

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE présentée par :
Jessica COULLERAY

soutenue le : **14 novembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Chimie Biologique et Thérapeutique

**Synthèse de sondes moléculaires rétinoïdes en vue de
déterminer la forme active de la vitamine A *in vivo***

THÈSE dirigée par :
M WAGNER Alain

Directeur de recherche, UMR7199, Université de Strasbourg

THÈSE encadrée par :
M CHAUBET Guilhem

Chargé de recherche, UMR 7199, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M PAPOT Sébastien
M BIOT Christophe

Professeur, UMR 7285, Université de Poitiers
Professeur, UMR 8576, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M DEVEL Laurent

Directeur de recherche, CEA, Université de Paris Saclay

Mme SEEMANN Myriam

Directeur de recherche, UMR7177, Université de Strasbourg

Sans ambition, on ne commence rien. Sans travail, on ne termine rien. Le prix ne vous sera pas envoyé. Il faut le gagner - Ralph Waldo Emerson

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, au sein de l'équipe de Chimie BioFonctionnelle de l'Université de Strasbourg sous la direction du Dr. Alain Wagner et la supervision du Dr. Guilhem Chaubet.

Je tiens tout d'abord à remercier Alain de m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir permis de faire ma thèse sur un sujet passionnant. Merci d'avoir su m'aider à garder le cap et de de m'avoir tant appris, même si nous n'étions pas toujours sur les mêmes longueurs d'onde.

Merci également à Guilhem d'avoir suivi ce projet et d'avoir su réorienter mes travaux quand ils s'égarraient.

Je voudrais ensuite remercier les Pr Sébastien Papot, Pr Christophe Biot, Dr Laurent Devel et Dr Myriam Seemann d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Également, merci aux Dr Jean-Yves Winum et Dr Alexandre Specht d'avoir participé au suivi de mes travaux.

Merci au Dr Wojciech Kretzel, à la tête de ce projet et collaborateur sur les aspects biologiques, de m'avoir fait confiance sur le design de toutes les molécules.

Merci également à nos collaborateurs de l'équipe de Dr François Fenaille du CEA de Paris Saclay pour avoir réalisé l'ensemble des analyses par masse de ce projet.

Merci à Jean-Serge d'avoir été d'un si grand soutien durant les conseils de laboratoire et auprès de l'Université pour faire entendre la voix des doctorants.

Un grand merci à notre gestionnaire Françoise sans qui rien ne serait possible dans le laboratoire. Merci pour votre gentillesse et votre écoute.

Merci à Delphine et Cheng du PACSI pour votre travail et votre réactivité. Un remerciement particulier à Delphine pour avoir passé des heures avec moi sur mes premiers spectres isomérisés qui étaient, on ne va pas se mentir, un sacré pêle-mêle.

Merci à Cyril Antheaume de m'avoir accueillie à l'ISIS et d'avoir pris de son temps pour réaliser les expériences qui ont conduit à comprendre le mécanisme clé de ma thèse.

Merci à Michel d'être notre magicien de la chimie sans qui beaucoup de nos problèmes seraient restés non résolus.

Merci à Ilias, Lorenzo et Valentine d'avoir été mes partenaires d'aventure. Tous arrivés en même temps, il a fallu se serrer les coudes et nous y sommes arrivés.

Merci à Fanny, même si on ne s'est pas côtoyées longtemps, ton humour et ta bonne humeur ont été des plus agréables.

Je voudrais remercier Charlotte de m'avoir si bien accueillie dans l'équipe et de m'avoir épaulée dans mes premiers mois de thèse. Également, merci à Tony qui, dès le départ a été très présent et avec qui nous avons eu de longues discussions passionnantes, scientifiques ou non.

Merci à Enes pour ta gentillesse, ton écoute et toutes ces discussions partagées. Si tu pouvais arrêter de vouloir laisser les femmes à la cuisine, ça serait parfait ! Merci à Julien d'avoir partagé, au-delà de tes conseils qui m'ont beaucoup aidée, ton amour pour la moto.

Merci à Safae, Indréalie et Louis pour l'énergie et la bonne humeur que vous avez apporté à notre équipe. Merci d'avoir partagé avec moi vos histoires rocambolesques qui ont égayés mes journées.

Merci à Ketty pour ta présence et pour avoir toujours eu les mots justes pendant ces trois années. Merci d'avoir partagé avec moi tes pérégrinations, que ce soit dans la pâtisserie ou avec ton fils.

Un remerciement particulier à ma binôme de thèse, Alexia, avec qui j'ai partagé ce projet, avec qui j'ai traversé les joies et les déceptions de notre thèse. Mais on y est arrivées et on peut être fières de nous. Warrior girls !

Un autre remerciement particulier à mon Robinou, pour avoir été un pilier tout au long de ces trois années. Nous avons vécu intensément cette thèse, en nous soutenant toujours. Merci pour ça. La thèse n'aurait pas été la même sans toi, c'est une évidence.

J'aimerais également adresser un remerciement particulier à Héloïse, ma petite loutre. Au-delà de ton aide précieuse sur le point de vue scientifique et tes nombreux conseils, j'ai trouvé une amie qui m'a soutenue et guidée dans tous les moments que j'ai pu

traverser dans cette thèse, même les plus compliqués. Merci pour ton soutien sans failles qui m'a permis de toujours avancer.

Je tiens aussi à remercier mes Teuteus qui, même éparpillées aux quatre coins de la France, ont toujours été moralement présentes.

J'aimerais remercier Jérôme pour m'avoir si gentiment accueillie dans ses bureaux pendant près de deux ans lors de mes venues dans le Nord. J'en profite également pour remercier l'ensemble de ton équipe qui a toujours eu un petit mot de soutien, même si vous ne compreniez rien à ma thèse.

Merci également à Jean-Pierre d'être mon mentor depuis maintenant plus de trois ans, de m'avoir guidée dans mes choix et mes décisions professionnels. Merci d'être cette personne qui a su m'amener à la fin de cette thèse en faisant les bons choix. Je sais que cela ne s'arrête pas là.

Merci à Alexandre, mon conjoint, pour son amour et son soutien sans failles pendant ces deux années qui n'ont pas été faciles. Pour le reste, tu sais déjà tout.

J'aimerais finalement remercier mes parents et mon frère qui ont toujours été là, à me soutenir dans tous mes projets, quelle que soit leur difficulté. Merci de ne jamais m'avoir laissée tomber, même quand je suis partie à 800 km. Merci d'avoir cru en moi, en particulier ces trois dernières années quand moi-même je n'y croyais plus. J'y suis arrivée, avec vous.

Je termine avec mon partenaire sans qui cette thèse n'aurait jamais été possible, sans qui je n'aurais jamais pu y voir clair : ma lampe frontale rouge. Merci pour tes bons et loyaux services.

Merci aussi à l'ensemble des personnes non mentionnées mais que j'ai été amenée à côtoyer de près ou de loin pendant mes trois années de thèse.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADH : alcool déshydrogénase	oxoethyl) tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium
ADN : acide désoxyribonucléique	
AKR : aldo-céto réductase	BCO1 : bêta-carotène oxygénase 1
Ala : alanine	BF₃.OEt₂ : diéthyléthérate de trifluorure de bore
APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique	Boc : tert-butoxycarbonyle
APTS : acide paratoluènesulfonique	Boc₂O : dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
AR : acide rétinoïque	BODIPY : 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène
ARN : acide ribonucléique	BRET : transfert d'énergie par résonance de bioluminescence
atAR : acide rétinoïque all- <i>trans</i>	CaCO₃ : carbonate de calcium
atRAL : rétinal all- <i>trans</i>	CCl₄ : tetrachlorométhane
atRoateBu : rétinoate de <i>tert</i> -butyle all- <i>trans</i>	CCM : chromatographie sur couche mince
atRoateEt : rétinoate d'éthyle all- <i>trans</i>	CHCl₃ : trichlorométhane
atRoateMe : rétinoate de méthyle all- <i>trans</i>	CH₂Cl₂ / DCM : dichlorométhane
atROL : rétinol all- <i>trans</i>	CRABP : protéine cellulaire de liaison à l'acide rétinoïque
atROLAc : acétate de rétinyle all- <i>trans</i>	CRBP : protéine cellulaire de liaison au rétinol
BARAC : biarylazacyclooctynone	CuAAC : cycloaddition azide- alcyne catalysée au cuivre
βC : β,β-bétacarotène all- <i>trans</i>	CyH : cyclohexane
BCN : bicyclo[6.1.0]nonyne	
BCN TMPP : (2-((2-((((1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>s</i>)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl) methoxy carbonyl)amino)ethyl)amino)-2-	

CYP26 : cytochrome P450 de la sous famille p26	Et₂O : diéthyl éther
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	EtOAc : acétate d'éthyle
DBCO : dibenzocyclooctyne	FABP : protéine de liaison des acides gras
DBD : domaine de liaison à l'ADN	FDA : Food and Drug Administration
DBDMH : 1,3-dibromo-5,5-diméthylhydantoïne	FI-DIBO : dibenzocyclooctyne fluorescente
DBU : 1,8-diazabicycloundéc-7-ène	Fmoc : fluorénylméthoxycarbonyle
DMAP : diméthylaminopyridine	FRET : transfert d'énergie par résonance de fluorescence
DMF : diméthylformamide	GABA : acide gamma-aminobutyrique
DMSO : diméthylsulfoxyde	GAD67 : glutamate decarboxylase, 67 kDa
DIBAC : dibenzoazacyclooctyne	GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
DIBO : dibenzocyclooctyne	GFP : Green Fluorescent Protein
DIFO : difluorooctyne	HATU : hexafluorophosphate de N,N-diméthylméthaniminium
di-N₃ βC : β-carotène azidé en C4 et C4'	HCl : acide chlorhydrique
DIPA : N,N-diisopropylamine	HDAC : histone déacétylase
DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine	HEK 293T : cellules rénales embryonnaires humaines 293T
DMAP : diméthylaminopyridine	HPLC : chromatographie liquide à haute pression
DNMT : ADN méthyle transférase	HOBr : hydroxybenzotriazole
EDC : éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide	
EPR : épithélium pigmentaire rétinien	
Equiv. : équivalent(s)	
ER : esters de rétinyle	
ESI : ionisation par électrospray	

HRMS : spectrométrie de masse haute résolution	MeOH : méthanol
Hz : Hertz	MgSO₄ : sulfate de magnésium
IEDDA : Diels Alder à demande électronique inverse	MOFO : monofluoroctyne
IR : infrarouge	MOM : méthoxy méthyle
IRBP : protéine de liaison interphotorécepteur	MS : spectrométrie de masse
KOH : hydroxyde de potassium	MS² : spectrométrie de masse en tandem
LBD : domaine de liaison du ligand	MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
LC : chromatographie liquide	MW : micro-ondes
LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléoside sous forme oxydée
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	NADH : nicotinamide adénine dinucléoside sous forme réduite
LiOH : hydroxyde de lithium	NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
LiOTf : triflate de lithium	NaH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de sodium
LOD : limite inférieure de détection	NaN₃ : azoture de sodium
LOQ : limite inférieure de quantification	NaOH : hydroxyde de sodium
LpL : lipase des lipoprotéines	Na₂S₂O₃ : thiosulfate de sodium
LRAT : lécithine rétinol acyltransférase	N₃ AR : acide rétinoïque azidé en C4
LRMS : Spectrométrie de Masse Basse Résolution	N₃ RAL : rétinal azidé en C4
MAPK : protéines kinases activées par les mitogènes	N₃ RoateMe : rétinoate de méthyle azidé en C4
MeCN : acétonitrile	N₃ ROLAc : acétate de rétinyle azidé en C4

NBS : N-bromosuccinimide	RAE : équivalent activité rétinol
n-BuLi : n-Butyllithium	RAL : rétinal
NCoR : corépresseur des récepteurs nucléaires	RALDH : acide rétinoïque déshydrogénase
NCS : N-chlorosuccinimide	RAR : récepteur de l'acide rétinoïque
NH₄Cl : chlorure d'ammonium	RARE : élément de réponse de l'acide rétinoïque
NH₄OH : hydroxyde d'ammonium	RBP : protéine de liaison du rétinol
NHS : N-hydroxysuccinimide	RBPR : récepteur des protéines de liaison du rétinol
NIS : N-iodosuccinimide	RCPG : récepteur couplé aux protéines G
nm : nanomètre	RDH : rétinol déshydrogénase
OCT : cyclooctyne	RMN : résonance magnétique nucléaire
PBS : tampon phosphate salin	ROL : rétinol
Pd/C : palladium supporté sur charbon	ROR : récepteur orphelin lié aux RARs
PEG : polyéthylène glycol	ROS : espèces réactives de l'oxygène
PET : éther de pétrole	RT : température ambiante
PFA : para formaldéhyde	RXR : récepteur X des rétinoïdes
PIDA : diacétate d'iodobenzène	SMRT : médiateur de silençage du RAR et de l'hormone thyroïdienne
POCl₃ : trichlorure de phosphoryle	SNO-OCT : cyclooctynes hétérocycliques contenant du soufre, de l'azote et de l'oxygène
POM : pivaloyloxyméthyle	SPAAC : cycloaddition azoture alcyne favorisée par la contrainte
PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes	
ppm : partie par million	
Q-TOF : quadripôle couplé à un temps de vol	
PR : palmitate de rétinyle	

SRC : coactivateur des récepteurs stéroïdiens	TMTHSI : imino-3,3,6,6-tetramethyl-4,5-didehydro-2,3,6,7-tetrahydro-1H-1,6-thiepine oxide
SSEA3 : stage specific embryonic antigen 3	TsCl : chlorure de tosyle
STRA : signaling receptor and transporter of retinol	TTR : transthyrétine
TA : température ambiante	UA : unité arbitraire
TBACN : cyanure de tétrabutylammonium	UHPLC : chromatographie liquide ultra haute performance
TBANCS : thiocyanate de tétrabutylammonium	VAD : carence en vitamine A
TBATB : tribromure de tétrabutylammonium	4-oxo AR : acide 4-oxo rétinoïque
TBAN₃ : azoture de tétrabutylammonium	5-AmdU : 5-Azidométhyl-2'-désoxyuridine
TCEP : tris(2-carboxyéthyle)phosphine	9-cis AR : acide rétinoïque 9-cis
TFA : acide trifluoroacétique	9,13-di-cis AR : acide rétinoïque 9,13-di-cis
THF : tétrahydrofurane	13-cis AR : acide rétinoïque 13-cis
TMPP : tris(2,4,6-triméthoxyphényle)phosphane	13-cis- 4-oxo AR : acide 4-oxo rétinoïque 13-cis
TMSN₃ : azoture de triméthylsilyle	
TMTH : 3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne	
TMTI : 1-[4-(methoxycarbonyl)benzyl]-3,3,6,6-tetramethyl-4,5-didehydro-2,3,6,7-tetrahydrothiepinium trifluoromethane-sulfonate	

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
TABLE DES MATIÈRES.....	9
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	13
1.1. Vitamines A, structure, sources et formes.....	13
1.1.1. Différentes Vitamines A.....	13
1.1.2. Structure et définitions	14
1.1.3. Sources de vitamine A	15
1.1.4. Vitamine A – Différentes générations	16
1.2. Métabolisme de la Vitamine A.....	17
1.2.1. Métabolisme à partir d'esters de rétinyle ²³	18
1.2.2. Métabolisme à partir de caroténoïdes ²³	20
1.2.3. Des esters de rétinyle à l'acide rétinoïque actif	22
1.2.3.1. <i>Des esters de rétinyle au rétinol – et inversement</i>	22
1.2.3.2. <i>Du rétinol au rétinal – et inversement</i>	23
1.2.3.3. <i>Du rétinal à l'acide rétinoïque</i>	23
1.2.3.4. <i>Elimination des rétinoïdes</i>	24
1.2.3.5. <i>Stockage des rétinoïdes</i>	24
1.3. Récepteurs de la Vitamine A.....	25
1.3.1. Structure générale d'un récepteur nucléaire	25
1.3.2. Récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs)	26
1.3.3. Récepteurs X des rétinoïdes (RXRs)	27
1.3.4. Hétérodimères RAR/RXR	28
1.3.5. Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs).....	31
1.3.6. Récepteurs orphelins liés aux RARs (RORs).....	32
1.4. Rôles de la vitamine A dans l'organisme	33
1.4.1. Au cours de l'embryogénèse	33
1.4.2. Après la naissance	34
1.4.2.1. <i>Spermatogénèse</i>	35
1.4.2.2. <i>Système immunitaire</i>	35
1.4.2.3. <i>Système nerveux central</i>	35
1.4.2.4. <i>Renouvellement osseux</i> ¹²³	36
1.4.2.5. <i>Régénération des tissus</i>	36
1.4.2.6. <i>Métabolisme général</i> ¹²⁵	36

1.4.2.7. <i>Homéostasie énergétique</i>	37
1.4.3. Fonctions non-génomiques.....	37
1.5. Vitamine A et vision	38
1.6. Vitamine A et pathologies	40
1.6.1. Hypervitaminose	41
1.6.2. Carence en Vitamine A	42
1.7. Vitamine A à visée thérapeutique	45
1.7.1. Rétinoïdes de première génération	46
1.7.2. Rétinoïdes de deuxième génération.....	47
1.7.3. Rétinoïdes de troisième génération	48
1.7.4. Rétinoïdes de quatrième génération	48
1.8. Problématique et solutions proposées par cette thèse	49
1.8.1. Des chainons manquants	49
1.8.2. Solutions apportées par cette thèse.....	50
CHAPITRE 2– SONDES RÉTINOÏDES	52
2.1. Introduction.....	52
2.1.1. Etat de l'art des sondes rétinoïdes existantes	52
2.1.2. Etat de l'art des stratégies bioorthogonales	54
2.1.3. Insertion de l'azoture sur les rétinoïdes	57
2.2. Azidation de la position C4 du rétinal all-trans.....	62
2.2.1. Optimisation de la réaction	62
2.2.2. Proposition de mécanisme pour l'insertion de l'azoture	65
2.3. Validation biologique de la fonctionnalité du N₃ RAL	69
2.4. Application aux autres entrées de la cascade métabolique de la vitamine A.....	73
2.5. Vers la synthèse de nouveaux dérivés de l'acide rétinoïque en vue d'améliorer sa délivrance cytosolique	77
2.5.1. Modification de l'ester d'acide rétinoïque	77
2.5.2. Synthèse de l'acide rétinoïque azidé en C4	81
2.6. Evaluation de la toxicité des esters d'acide rétinoïque	84
2.7. Extension de la réaction de fonctionnalisation tardive à l'introduction d'autres nucléophiles en C4 des rétinoïdes.....	86
2.7.1. Dérivés du rétinal présentant un nitrile sur la position carbonylée	86
2.7.2. Introduction de nucléophiles aminés, oxygénés et carbonés en position C4 d'esters de l'acide rétinoïque	88
2.7.3. Dérivés de l'acide rétinoïque présentant en C4 des fonctions d'intérêt à distance du squelette rétinoïde	92
2.7.4. Réduction de l'azoture en amine dans le but d'obtenir des dérivés aminés facilement fonctionnalisables	93

2.8. Conclusion	95
CHAPITRE 3 – SONDES POUR L’ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES RÉTINOÏDES DANS LES CELLULES	96
3.1. Contexte et objectif	96
3.2. Technique pour les études de biodistribution	98
3.2.1. Choix de la méthode pour l’étude de la biodistribution des rétinoïdes	98
3.2.2. Outils pour le marquage en microscopie par fluorescence	99
3.2.2.1 <i>Fluorophore et sonde fluorescente</i>	99
3.2.2.2. <i>Propriétés clés d’une sonde fluorescente</i>	100
3.3. Protocole pour les travaux d’imagerie	105
3.4. Sonde commerciale – BCN- CF®650	106
3.5. Sondes conçues, synthétisées et imagées	110
3.5.1. Sonde fluorogène	110
3.5.2. Sonde BODIPY	114
3.5.3. Sonde TMTHSI-PEG ₃ -SulfoCy5	117
3.5.3.1. <i>Synthèse</i>	119
3.5.3.2. <i>Imagerie sur cellules vivantes</i>	121
3.5.3.3. <i>Imagerie sur cellules fixées</i>	123
3.5.3.4. <i>Imagerie sur cellules fixées – Marquages spécifiques</i>	124
3.6. Conclusion	132
CHAPITRE 4 – SONDES POUR LA DÉTECTION ET LA QUANTIFICATION DE NOUVEAUX MÉTABOLITES DE LA VITAMINE A	134
4.1. Introduction	134
4.1.1. Choix de la méthode d’analyse	134
4.1.2. Etat de l’art des études analytiques des rétinoïdes	135
4.1.3. Amélioration de la détection – « Marqueurs de masse »	139
4.2. Synthèse des sondes de masse	141
4.2.1. BCN-TMPP	141
4.2.2. TMTI	145
4.3. Mise au point des méthodes d’analyse de LC-MS/MS	145
4.3.1. Système d’extraction	146
4.3.1.1. <i>Technique d’extraction</i>	146
4.3.1.2. <i>Choix du solvant pour la précipitation des protéines de la matrice</i>	148
4.3.2. Effet de matrice	152
4.3.3. Mise en place d’une méthode de séparation par chromatographie en phase liquide	154
4.4. Détection et analyse des rétinoïdes naturels	157

4.5. Détection et analyse du N₃ RAL et des adduits du N₃ RAL avec les sondes de masse.....	162
4.5.1. Analyse de l'azido rétinal	162
4.5.2. Détection et analyses par MS et MS ² des adduits.....	163
4.5.2.1. <i>Adduit BCN-TMPP-N₃ RAL</i>	164
4.5.2.2. <i>Adduit TMTI-N₃ RAL</i>	166
4.5.3. Courbes de calibration.....	169
4.5.4. Détermination des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) du N ₃ RAL et des adduits.....	172
4.6. Etude de la cinétique de cycloaddition entre le N₃ RAL et les sondes de masse	174
4.6.1. Cinétique de formation de l'adduit BCN-TMPP-N ₃ RAL dans l'éthanol.....	175
4.6.2. Cinétique de formation de l'adduit TMTI-N ₃ RAL dans l'éthanol	178
4.6.3. Cinétique de formation de l'adduit TMTI-N ₃ RAL dans le plasma	181
4.7. Conclusion.....	185
CHAPITRE 5 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	188
5.1. Conclusions	187
5.2. Perspectives	188
5.2.1. Axes 1 et 2.....	188
5.2.2. Troisième axe	189
CHAPITRE 6 - PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	192
6.1. Chemistry	191
6.2. Biology	250
6.3. Mass analyses.....	257

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Vitamines A, structure, sources et formes

1.1.1. Différentes Vitamines A

Tout d'abord, la vitamine A1, ou rétinol *all-trans*, a été pour la première fois identifiée chez les vertébrés en 1920 par Drummond et Coward.¹ Elle est la plus abondante des vitamines A et est responsable d'un grand nombre de phénomènes biologiques qui seront détaillés au cours de cette introduction. Vingt ans plus tard, la Vitamine A2, ou 3-déhydrorétinol, a été découverte par Edisbury *et al.*² Il semblerait que cette forme de vitamine A soit produite de façon locale, en particulier, le rétinol serait converti en vitamine A2 au sein de l'épiderme.³ La vitamine A3, mise à jour en 1984 par Vogt, est quant à elle obtenue par clivage oxydatif de divers caroténoïdes. Sous sa forme aldéhyde, elle est indispensable à la vision chez les arthropodes.⁴ Pour ce qui est du 11-*cis*-4-hydroxyrétinol, aussi appelé vitamine A4, il a été découvert en 1988 et permet la formation de complexes rhodopsines pour la vision de certains vertébrés.⁵ Le dernier type de vitamine A, dont la découverte a été rapportée en 2021 par l'équipe de W. Kretzel, porte le nom de vitamine A5/X et correspond au 9-*cis*-13,14-dihydrorétinol.⁶ Cette molécule semble être un agoniste des récepteurs X aux rétinoïdes (RXRs).

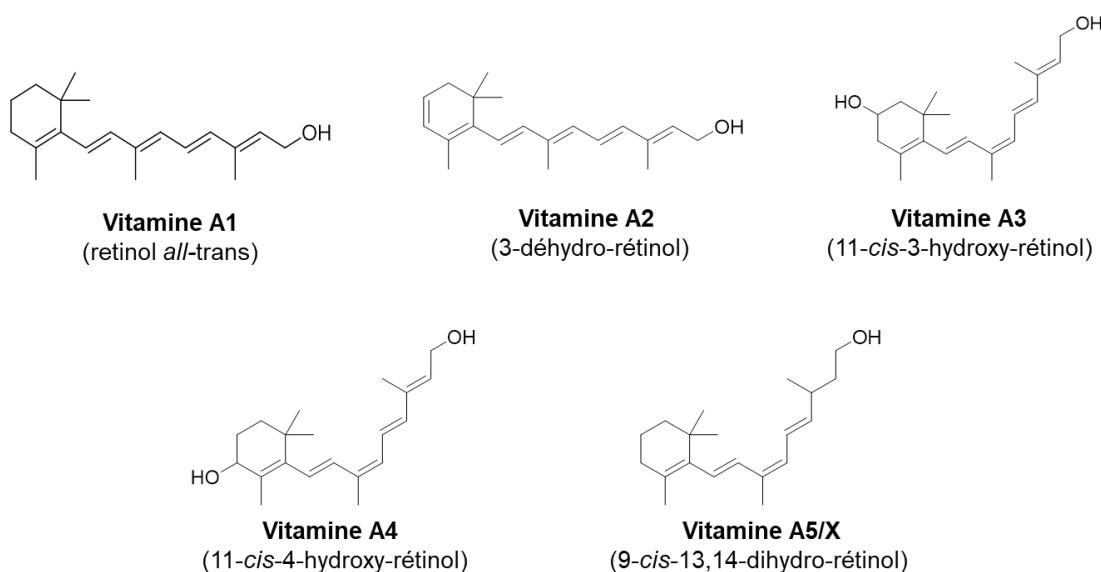


Figure 1. Structures et nomenclature des différentes vitamines A découvertes.

Les travaux de cette thèse se sont concentrés sur la vitamine A1, les autres formes étant des dérivés de celle-ci et présentant un panel d'action biologique plus restreint. Dans la suite de cette introduction, le terme de vitamine A sera ainsi utilisé pour désigner la vitamine A1.

1.1.2. Structure et définitions

La structure du rétinol a été établie en 1931 par Karrer *et al.*⁷ confirmée l'année suivante par Heilbron *et al.*⁸ puis cristallographiée en 1937 par Holmes et Corbet.⁹ Pour ce qui est du rétinal, il a été isolé pour la première fois par Wald en 1933 à partir de grenouilles et d'yeux de mammifères.¹⁰ C'est Morton qui, dix ans plus tard, est parvenu à mettre en évidence qu'il s'agissait de la forme aldéhyde de la vitamine A.¹¹

Pour être qualifiée de vitamine A, une molécule doit posséder un cycle type β -ionone (en bleu sur la **Figure 2**), une chaîne polyinsaturée (en vert) et un groupement polaire (en orange). Ce terme de vitamine A, qui référait initialement le rétinol, a aujourd'hui été étendu à l'ensemble des formes naturelles de cette vitamine, à savoir le rétinol, le rétinal, l'acide rétinoïque et les esters de rétinyle. Le terme de rétinoïde à quant à lui été défini au milieu des années 1970 par Sporn et désigne l'ensemble des molécules naturelles ou synthétiques ayant une ressemblance structurelle avec le rétinol, sans que ces molécules ne présentent forcément une activité type vitamine A.¹²

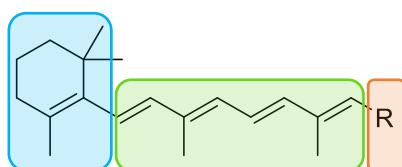


Figure 2. Structure générale d'une vitamine A. R est une fonction polaire telle que CHO , OH , CO_2H .

Plusieurs isomères de la vitamine A existent mais ce sont les formes *all-trans* qui sont majoritaires au sein de l'organisme, à l'exception des yeux où c'est le rétinal 11-*cis* qui domine.^{13,14}

Par la suite, l'acide rétinoïque sera noté AR, le rétinal RAL, le rétinol ROL et les esters de rétinyle ER. Lorsque la forme *all-trans* sera mentionnée, le préfixe *at* sera utilisé.

1.1.3. Sources de vitamine A

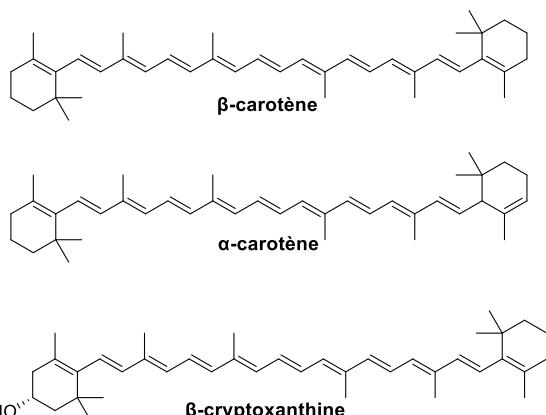
La vitamine A est une petite molécule lipophile ne pouvant être synthétisée *de novo* par les vertébrés. Il est donc nécessaire de l'obtenir par l'alimentation, la faisant entrer dans la classe des micronutriments. Elle est disponible sous deux formes principales dans l'alimentation : les caroténoïdes provitamine A, présents dans les végétaux, et les esters de rétinyle, contenus dans les produits animaux.¹⁵ Pour ce qui est des caroténoïdes provitamine A, il s'agit exclusivement de caroténoïdes possédant un cycle type β -ionone ainsi que la disposition et le nombre adéquats de méthyles sur la chaîne polyinsaturée. Bien que plus de cinquante caroténoïdes répondent à ces critères, seuls le β -carotène, l' α -carotène et le β -cryptoxanthine sont présents en quantités significatives dans l'alimentation humaine (Figure 3). Siani *et al.* ont rapporté les quantités de caroténoïdes provitamine A contenus dans une sélection de végétaux.¹⁶ Un extrait des données obtenues est illustré dans le Tableau 1.

Fruit/Légume	Quantité totale de caroténoïdes ($\mu\text{g/g}$ de végétal)
Abricot	173
Banane jaune	1.24
Banane rouge	20.0
Chou-fleur	0.75
Feuille de coriandre	1691
Pastèque	185

Figure 3. Caroténoïdes provitamine A les plus abondants dans l'alimentation humaine.

Pour ce qui est des produits animaux, ils apportent du ROL et des ER dont les principaux sont visibles dans la Figure 4. On les trouve essentiellement dans le lait, la viande, en particulier les abats, les œufs, le poisson et les fruits de mer, ainsi que tous les produits qui en dérivent (crème, beurre...).

Tableau 1. Exemples des quantités totales de caroténoïdes (β -carotène, α -carotène et β -cryptoxanthine) obtenues dans certains végétaux.



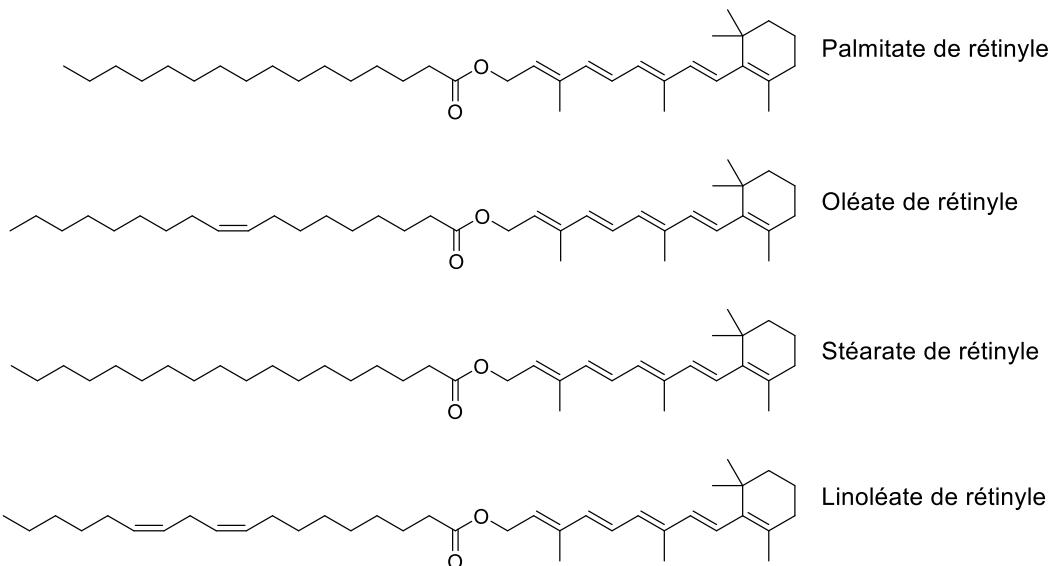


Figure 4. Principaux esters de rétinyle fournis par l'alimentation.

1.1.4. Vitamine A – Différentes générations

Après la découverte des différents rétinoïdes naturels, leur potentiel dans le traitement de diverses pathologies a été étudié (détailé dans le paragraphe 1.8). Du fait des résultats positifs qui ont été obtenus, des rétinoïdes synthétiques ont été créés afin d'élargir le panel thérapeutique de la vitamine A. L'ensemble des rétinoïdes existants a été classé en quatre générations, tel qu'illustré dans la Figure 5.

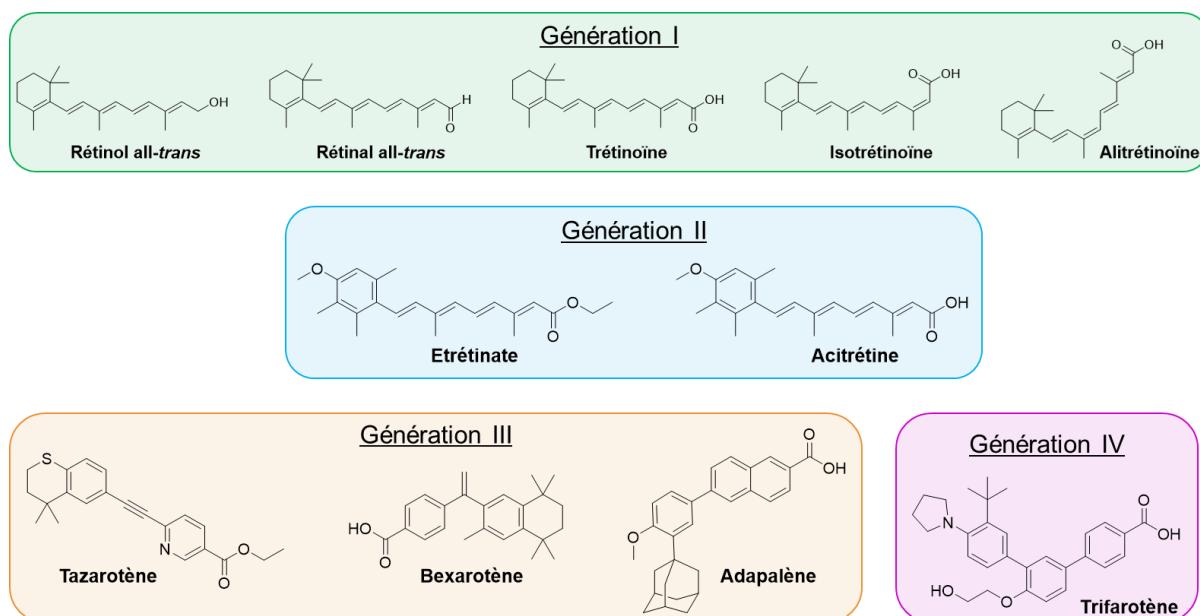


Figure 5. Présentation des quatre générations de rétinoïdes existantes.

La première génération se compose des rétinoïdes naturels à savoir l'acide rétinoïque *all-trans* ou trétinoïne, l'acide rétinoïque 9-*cis* ou alitrétinoïne, l'acide rétinoïque 13-*cis* ou isotrétinoïne, le rétinol et le rétinal. La seconde génération dénombre deux membres à savoir l'étrétinate et l'acitrétine, tous deux développés par Hoffmann-La Roche dans les années 1980.^{18,19} La troisième génération compte l'adapalène, synthétisé par Galderma au début des années 1980,²⁰ le tazarotène développé par Allergan dans les années 1990,²¹ et le bexarotène, commercialisé par Zeneus Pharma depuis le début des années 2000.²² Enfin, seul le trifarotène, mis sur le marché en 2019 par Galderma, compose la quatrième génération de rétinoïdes.

On remarque qu'au fil des générations, la structure polyénique de la vitamine A a été perdue, au profit de structures aux multiples cycles. Il faut aussi noter que l'ensemble de ces composés, à l'exception du ROL et du RAL, ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour des usages thérapeutiques. Ces derniers seront détaillés dans la partie **1.8**.

1.2. Métabolisme de la Vitamine A

L'absorption des rétinoïdes par l'organisme se fait de façon différente selon que l'alimentation apporte des esters de rétinyle ou des caroténoïdes. Chacun des processus sera détaillé dans cette partie de façon schématique. Également, sauf mention du contraire, la distinction entre les différents isomères de la vitamine A ne sera pas faite.

1.2.1. Métabolisme à partir d'esters de rétinyle²³

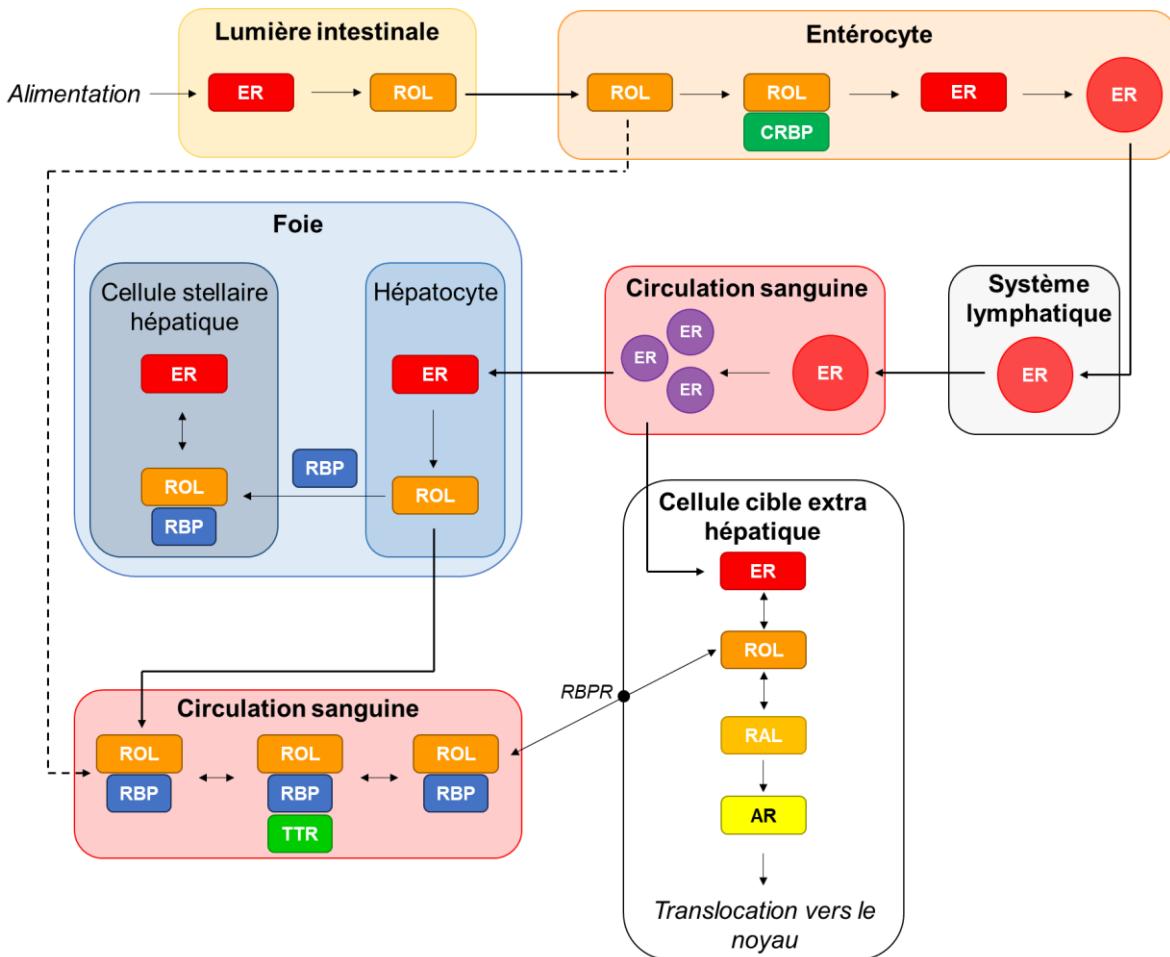


Schéma 1. Représentation schématique du métabolisme de la vitamine A dans le cas où l'alimentation apporte des esters de rétinyle. AR : acide rétinoïque ; CRBP : protéine cellulaire de liaison du rétinol ; ER : esters de rétinyle ; RAL : rétinal ; RBP : protéine de liaison du rétinol ; RBPR : récepteur des protéines de liaison du rétinol ; ROL : rétinol ; TTR : transthyrétine. Les cercles rouges représentent les chylomicrons et le cercle violet réfère aux chylomicrons résiduels. La ligne en pointillés illustre le rétinol non métabolisé dans les entérocytes rejoignant directement la circulation sanguine. Figure basée sur la littérature.

Pour ce qui est des esters de rétinyle, leur métabolisme est représenté sur le **Schéma 1**. Lorsqu'ils atteignent la lumière intestinale, les esters sont clivés en rétinol par des enzymes non spécifiques telles que les lipases des triglycérides ou les hydrolases des esters de cholestérol.²⁴ Le rétinol formé entre alors dans les entérocytes, un des types cellulaires majeurs de l'intestin, par voie active ou passive puis se lie à une de ses protéines cellulaires de liaison (CRPB) qui permet son transport intracellulaire.²⁵ À ce

jour, trois isoformes de cette protéine ont été caractérisés avec, pour seule différence, leur distribution dans l'organisme (**Tableau 2**).

Une fois dans les entérocytes, le rétinol peut être soit directement sécrété vers la circulation sanguine soit estérifié afin d'assurer sa métabolisation complète. Dans ce cas, les esters de rétinyle formés s'associent aux chylomicrons, des lipoprotéines en charge du transport des lipides.²⁶ Après avoir traversé le système lymphatique et pénétré dans la circulation sanguine, les chylomicrons subissent un processus de remodelage impliquant l'hydrolyse des triglycérides qui les composent par la lipase des lipoprotéines (LpL).²⁷ Il en résulte la formation de chylomicrons résiduels, beaucoup plus petits, qui peuvent alors soit accéder aux cellules cibles extra hépatiques soit entrer dans les hépatocytes. Dans ce second cas, le rétinol est reformé et transporté vers les cellules stellaires hépatiques en vue de son stockage sous forme d'esters. Il peut aussi se lier à sa protéine de liaison (RPB4, **Tableau 2**) pour rejoindre la circulation sanguine. Le complexe formé se lie alors à la transthyrétine (TTR), une autre protéine produite par le foie qui stabilise le complexe et évite son excrétion par les reins. De ce fait, elle permet la bonne délivrance du rétinol aux cellules cibles.²⁸ Au niveau des cellules cibles extra hépatiques, le complexe RBP-ROL est reconnu par un récepteur des RBPs noté RBPR. Dans le cas du complexe RBP4-ROL, c'est la STRA6 qui a ce rôle.²⁹ Une fois dans les cellules cibles, le rétinoïde subit des transformations successives qui seront explicitées dans la partie **1.2.3.**

Il faut noter qu'au cours du remodelage des chylomicrons, une partie de l'ester de rétinyle contenu à l'intérieur est hydrolysée, produisant du rétinol. Celui-ci est ensuite absorbé par les tissus extra hépatiques, en particulier les tissus adipeux. Également, l'ensemble des transformations décrites dans les cellules cibles peuvent avoir lieu dans les hépatocytes et ce sont alors des protéines différentes qui prennent en charge le transport du rétinoïde au niveau intracellulaire ou dans la circulation sanguine (**Tableau 2**).

Transporteur	Ligand	Localisation
RBP4	ROL	Sérum/plasma
CRBPI	ROL/RAL	Majorité des tissus
CRBPII	ROL/RAL	Intestin grêle
CRPBIII	ROL/RAL	Tissu adipeux, muscle
IRBP	ROL/RAL	Œil, rétine, EPR
CRAPBI	AR/métabolites AR	Majorité des tissus
CRAPBII	AR	Peau, tissu adipeux
FABP5	AR	Foie, tissu adipeux

Tableau 2. Principaux transporteurs des rétinoïdes avec leur ligand et distribution respectifs. Tableau repris de la littérature.³⁰ RBP = protéine de liaison du rétinol ; CRBP = protéine cellulaire de liaison du rétinol ; IRBP = protéine de liaison interphotorécepteur ; CRAPB = protéine cellulaire de liaison de l'acide rétinoïque ; FABP = Protéine de liaison des acides gras ; EPR = épithélium pigmentaire rétinien.

1.2.2. Métabolisme à partir de caroténoïdes²³

Concernant les caroténoïdes, il est important de noter que l'intégralité des quantités ingérées n'est pas métabolisée. De fait, en fonction des volumes consommés ainsi que des taux de rétinol présents dans l'ensemble de l'organisme, en moyenne seul un tiers des caroténoïdes est réellement métabolisé, le reste étant directement excrété.³⁰ De plus, il semblerait que la moitié des caroténoïdes non excrétée soit métabolisée en rétinol tandis que l'autre moitié est utilisée telle qu'elle par le corps.

Pour ce qui est de leur métabolisme, il est décrit dans le **Schéma 2**. Celui-ci se concentre sur le β -carotène, caroténoïde le plus abondant dans l'alimentation.

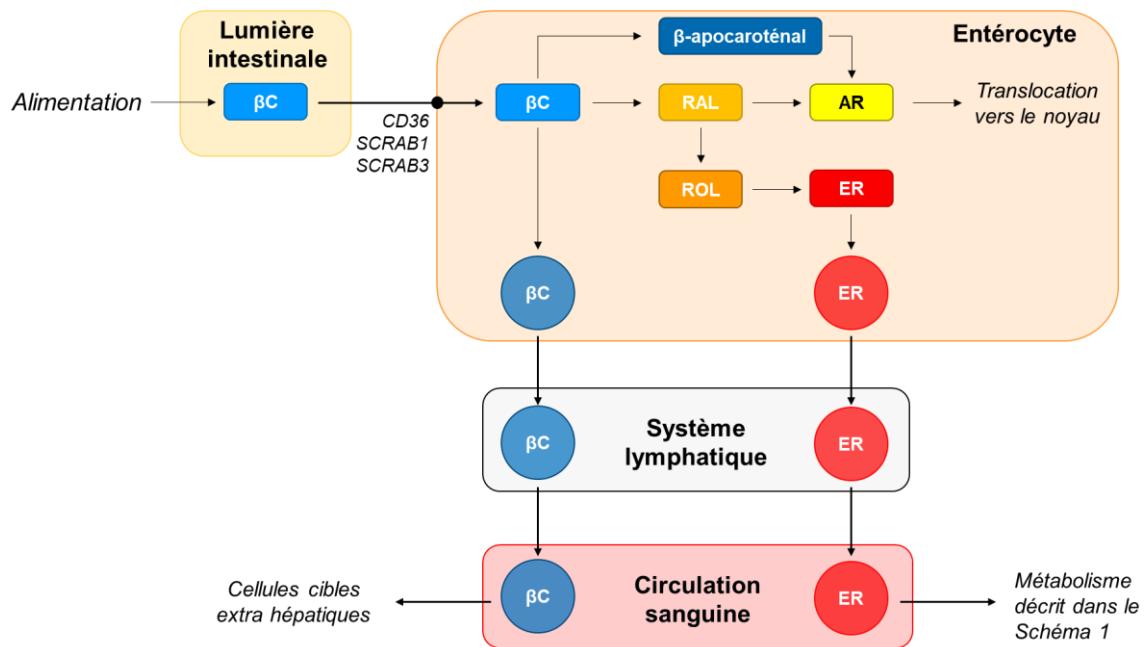


Schéma 2. Représentation schématique du métabolisme de la vitamine A dans le cas où l'alimentation apporte des caroténoïdes, en particulier du β -carotène. AR : acide rétinoïque ; β C = b β ta carotène ; ER : esters de rétinyle ; RAL : rétinal ; ROL : rétinol. Les cercles rouges et bleus représentent les chylomicrons de chaque espèce mentionnée à l'intérieur. Figure basée sur la littérature.

Le β -carotène a la possibilité d'entrer dans les entérocytes de façon passive ou active. Dans le cas du transport actif, il est assuré par différents transporteurs à savoir SCARB1, CD36 ou encore SCARB3.³¹ Une fois dans les entérocytes, le β -carotène peut suivre plusieurs voies. Premièrement, il peut être clivé en deux molécules de rétinal, qui sont ensuite oxydées en acide rétinoïque, activant ses récepteurs nucléaires au sein même des entérocytes. Deuxièmement, il peut être transformé en β -apocaroténal qui mène, lui aussi, à l'acide rétinoïque. Ces processus sont toutefois fortement régulés par l'organisme afin de limiter les actions de la vitamine A.³² Troisièmement, le rétinal précédemment formé peut être réduit en rétinol, qui suit alors les différentes étapes du métabolisme explicitées dans le **Schéma 1**. Enfin, le β -carotène peut se lier aux chylomicrons avant d'être sécrété dans le système lymphatique puis la circulation générale et d'être pris en charge dans les cellules cibles extra hépatiques.

1.2.3. Des esters de rétinyle à l'acide rétinoïque actif

Comme présenté dans les deux paragraphes précédents, les rétinoïdes ou pro-rétinoïdes apportés par l'alimentation subissent un métabolisme qui les amènent, en partie, à être transformés en forme active de la vitamine A, à savoir l'acide rétinoïque. Les différentes transformations intracellulaires qui y mènent sont illustrées dans le **Schéma 3**. Bien qu'il ne soit pas identique pour tous les types cellulaires de l'organisme, ce schéma est applicable à la majorité d'entre eux.

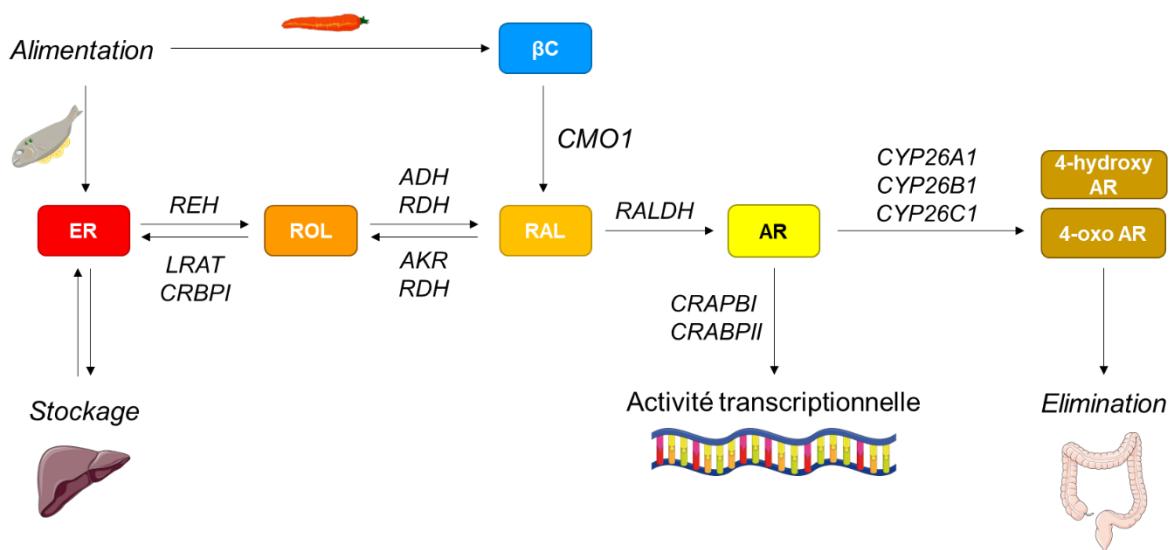


Schéma 3. Représentation schématique du métabolisme de la vitamine A au sein des cellules hépatiques ou extra hépatiques. AR : acide rétinoïque ; 4-oxo AR = acide 4-oxorétinoïque ; 4-hydroxy AR = acide 4-hydroxyrétinoïque ; ADH = alcool déshydrogénase ; AKR = aldo-céto réductase ; β C = béta carotène ; CRPBI = protéine de liaison cellulaire du rétinol de type I ; CYP26A1 = cytochrome p450 de la sous famille p26 de type A1 ; CYP26B1 = cytochrome p450 de la sous famille p26 de type B1 ; CYP26C1 = cytochrome p450 de la sous famille p26 de type C1 ; ER : esters de rétinyle ; RAL : rétinol ; REH = hydrogénase des esters de rétinyle ; LRAT = lécithine rétinol acyltransférase ; RDH = rétinol déshydrogénase ; RALDH = rétinol déshydrogénase ; ROL : rétinol.

1.2.3.1. Des esters de rétinyle au rétinol – et inversement

Les esters de rétinyle extraits de l'alimentation suivent deux voies. Ils peuvent d'une part être stockés dans le foie ou autres organes de stockage (explicite dans le **1.2.3.5**) soit être transformés en rétinol. Cela se fait avec des hydrolases, variables selon les organes de stockage.³³ Cette transformation est réversible puisque le rétinol peut être retransformé en esters de rétinyle grâce à la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT), supportée par l'enzyme de transport intracellulaire du rétinol (CRBP).³⁴

1.2.3.2. Du rétinol au rétinal – et inversement

Le rétinol formé peut alors être oxydé en rétinal par deux types d'enzymes : les alcools déshydrogénases (ADHs) et les rétinols déshydrogénases (RDHs) de la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte. Pour ce qui est des ADHs, trois principales sont à noter. Premièrement, ADH1 qui est majoritairement exprimée chez l'adulte dans les tissus épithéliaux, en particulier au niveau du foie.³⁵ Deuxièmement, ADH4 dont l'expression se concentre sur les tissus épithéliaux à l'exception du foie.³⁶ Enfin, ADH3, répartie dans l'ensemble de l'organisme, que ce soit pendant embryogénèse ou à l'âge adulte.³⁷ Concernant les RDHs, bien que plus d'une douzaine aient été identifiées,³⁸ ce sont RDH1 et RDH10 qui sont essentiellement impliquées dans le métabolisme de la vitamine A. RDH1 a été la première enzyme de la famille des déshydrogénases/réductases à chaînes courtes à montrer une capacité à oxyder le rétinol en rétinal, en particulier durant le début de l'embryogénèse.³⁹ RDH10, de son côté, est hautement exprimée dans les yeux et affiche différents niveaux d'expression dans les tissus de l'embryon en développement.^{40,41}

Cette étape est réversible, le rétinol pouvant être reformé à partir du rétinal à l'aide d'enzymes de la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte (RDH12) ou par des aldo-céto réductases telles que AKR1B10.⁴²

Il faut noter que le rétinal peut aussi être obtenu par clivage symétrique du β -carotène par l'oxygénase 15,15' des caroténoïdes (CMO1).⁴³

1.2.3.3. Du rétinal à l'acide rétinoïque

Pour ce qui est de l'oxydation du rétinal en acide rétinoïque, ce sont les rétinal déshydrogénases qui sont exploitées par les cellules. Trois isoformes ont été identifiées jusqu'à présent. Tout d'abord, RALDH1, qui est exprimée dans les tissus épithéliaux, en particulier dans le foie, de façon similaire à ADH1. Ensuite, RALDH2, enzyme clé de la formation de l'acide rétinoïque durant le développement embryonnaire. Pour finir, RALDH3 principalement attribuée au développement oculaire et des voies nasales au cours de l'embryogénèse.⁴⁴ Il est important de noter que ces enzymes présentent une distribution précise dans l'organisme afin de réguler les activités de la vitamine A.⁴⁵

Une fois l'acide rétinoïque formé, il peut être pris en charge par l'un des deux isoformes des protéines cellulaires de liaisons de l'acide rétinoïque (CRABPs, **Tableau 2**). Il s'agit de protéines cytosoliques liant l'acide rétinoïque et assurant son transport vers le noyau, en particulier jusqu'aux sites de liaison à ses récepteurs. En plus d'assurer le transport de l'acide rétinoïque vers le noyau, les CRABPs facilitent la formation de l'interaction ligand-récepteur, renforçant l'activité transcriptionnelle de la vitamine A.⁴⁶

1.2.3.4. *Elimination des rétinoïdes*

L'acide rétinoïque est capable de réguler les concentrations en vitamine A dans les organes cibles en modulant son propre catabolisme. En effet, il peut activer la transcription du gène *cyp26*, responsable de l'expression de la sous-famille p26 des cytochromes P450.⁴⁷ En particulier, les cytochromes CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1 qui métabolisent l'acide rétinoïque en deux formes inactives : l'acide 4-oxorétinoïque et l'acide 4-hydroxyrétinoïque (**Figure 6**).^{47,48}

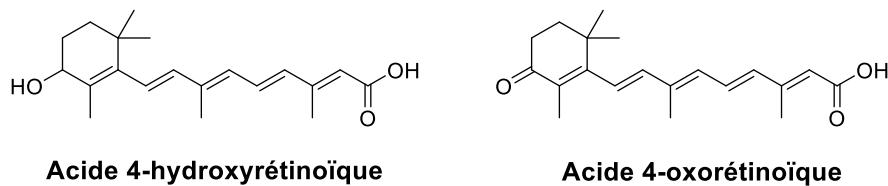


Figure 6. Formes oxydées de l'acide rétinoïque par la sous famille p26 des cytochromes P450.

Une fois obtenues, ces formes sont métabolisées de sorte à augmenter leur hydrosolubilité, conduisant à leur excrétion dans les urines et les selles.⁴⁹

1.2.3.5. *Stockage des rétinoïdes*

La capacité de stockage d'un organe dépend de ses besoins propres en vitamine A. Ainsi, c'est dans le foie que sont stockés 90% des rétinoïdes de l'organisme, sous forme d'esters de rétinyle.⁵⁰ Comme illustré en **1.2.1.**, le foie se compose de deux types cellulaires majoritaires : les hépatocytes et les cellules stellaires hépatiques. Les hépatocytes représentent deux tiers des cellules hépatiques, sont responsables de l'absorption de la vitamine A alimentaire mais ne comptent que 10 à 20% de son stockage. Les 80 à 90% restants sont en fait conservés dans les cellules stellaires

hépatiques sous forme de gouttelettes lipidiques.⁵¹ Il est important de souligner qu'aujourd'hui le mécanisme visant au transfert de la vitamine A des hépatocytes vers les cellules stellaires hépatiques n'a pas été élucidé.

En plus du foie, d'autres organes permettent la conservation des rétinoïdes, à savoir les tissus adipeux blanc et brun, les poumons, les yeux, les testicules, la peau et la rate.^{24,52} L'ensemble de ces organes présente la capacité de libérer la vitamine qu'ils stockent afin de répondre aux besoins d'autres organes. C'est pour cela qu'ils possèdent tous la capacité de produire la RBP4, protéine permettant le transport du rétinol dans la circulation générale. Néanmoins, la façon dont le manque de vitamine A est communiqué entre l'organe de stockage est l'organe cible n'est pas connue.

1.3. Récepteurs de la Vitamine A

1.3.1. Structure générale d'un récepteur nucléaire

A ce jour, quarante-huit familles de récepteurs nucléaires ont été découvertes chez l'Homme et toutes possèdent le même type de structure.⁵³ Celle-ci compte six domaines distincts, notés de A à F (Figure 7) dont quatre assurent les fonctions principales. Le domaine A/B est souvent spécifique de la sous-famille du récepteur et peut contenir une fonction d'activation indépendante des ligands (AF-1). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), noté C, est hautement conservé entre les récepteurs. Le domaine D sert de charnière entre les domaines C et E. De fait, il présente une séquence courte et peu conservée. Les domaines E/F sont le lieu de liaison du ligand (LBD) et contiennent le domaine d'activation dépendant du ligand noté AF-2. Ce dernier permet la localisation nucléaire du récepteur ainsi que la fixation des corégulateurs. Le ligand peut être une molécule endogène ou exogène.

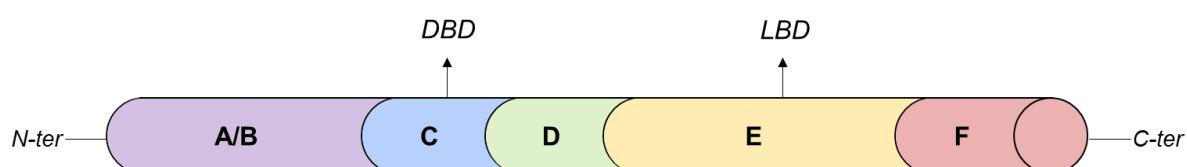


Figure 7. Structure générale d'un récepteur nucléaire.

De façon générale, les récepteurs nucléaires se trouvent dans le noyau. Toutefois, sous certaines conditions ou dans certaines cellules, ils peuvent migrer vers le cytoplasme où ils auront des fonctions non-génomiques, de façon dépendante ou non d'un ligand et avec ou sans complexation de différents facteurs.^{54,55}

1.3.2. Récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs)

Les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs) constituent la première famille de récepteurs nucléaires avec une haute affinité pour les rétinoïdes ayant été identifiée. Chez les mammifères, ils existent en trois sous types, notés α , β et γ , obtenus par des gènes situés sur trois chromosomes distincts.⁵⁶ C'est en 1987 que RAR α a été découvert,^{57,58} suivi l'année suivante par RAR β ⁵⁹ et RAR γ .⁶⁰ Ces trois sous familles se distinguent au niveau de leur LBDs, par un résidu de différence entre RAR α et RAR β et par deux résidus discordants entre RAR α et RAR γ . Cela impacte la taille de poche de liaison du ligand, différence majeure entre les trois RARs.⁶¹

Chacun de ces sous-types possède plusieurs isoformes. Les isoformes d'une protéine sont les diverses formes que peut prendre celle-ci à la suite de l'expression d'un seul et unique gène. Dans le cas des RARs, ces isoformes varient au niveau de leurs extrémités N-terminales (N-ter). Pour RAR α et RAR γ , deux isoformes principaux ont été identifiés notés RAR α 1, RAR α 2 et RAR γ 1, RAR γ 2 respectivement.^{62,63} Concernant RAR β , les isoformes sont au nombre de quatre, numérotés de RAR β 1 à RAR β 4.⁶⁴

Chacune des sous-familles mais également des isoformes n'est pas exprimé de façon identique au sein de l'organisme. Par exemple, RAR β se concentre dans le foie, le cerveau et les reins tandis que RAR γ est hautement exprimé dans l'épiderme. Seul RAR α est présent dans l'intégralité de l'organisme. Également, chacune des sous-familles de récepteur possède des variations structurales (**Figure 8**).⁶⁵

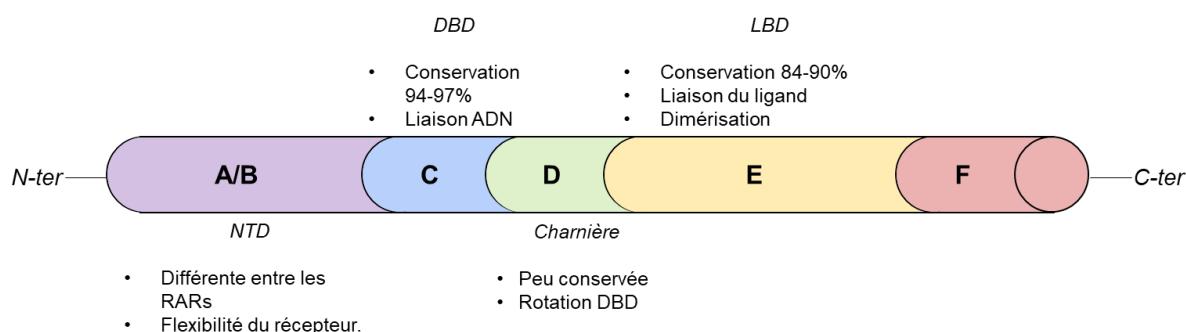


Figure 8. Structure générale, conservation et rôles des différents domaines d'un RAR.

Le domaine A/B, aussi appelé domaine N-terminal (NTD), est nécessaire à la flexibilité du récepteur et varie entre les RARs. Le domaine A a une longueur et une séquence variables selon la sous famille et l'isoforme de RAR tandis que le domaine B est une région hautement conservée, contenant plusieurs sites de phosphorylations. Il s'agit d'un domaine dont la structure en trois dimensions n'a pas encore été obtenue.

Le domaine C est la région de liaison à l'ADN. C'est la plus conservée entre les différents récepteurs avec 94 à 97% d'identité. C'est ce domaine qui confère la reconnaissance d'une séquence spécifique de l'ADN. Elle comporte les boîtes P, D, T et A responsables de la dimérisation du récepteur et du lien à l'ADN.

Le domaine D est un domaine charnière dont le but est de lier le DBD et le LBD, en permettant la rotation du DBD. De fait, il est peu conservé.

Le domaine E, ou LBD, est le second domaine le plus conservé avec 84 à 90% d'identité entre les différents RARs. En plus d'être le domaine de liaison du ligand, il est aussi impliqué dans la dimérisation des récepteurs et dans la fixation des corégulateurs. Selon la sous-famille de récepteurs, l'hélice C-terminale peut adopter plusieurs conformations, amenant la possibilité de liaison du ligand ou non. Les ligands connus des RARs sont les isomères *all-trans* et *9-cis* de l'acide rétinoïque.

Enfin, le domaine F est très variable, que ce soit en termes de longueur ou de séquence. C'est un domaine possédant plusieurs sites de phosphorylations.

Cependant, les RARs ne sont pas fonctionnels s'ils ne sont pas liés aux récepteurs X des rétinoïdes (RXRs). En effet, ils requièrent de former un hétérodimère RAR/RXR pour pouvoir se fixer à l'ADN, recruter les corégulateurs ainsi que la machinerie transcriptionnelle, dans le but d'activer la transcription des gènes cibles.

1.3.3. Récepteurs X des rétinoïdes (RXRs)

Le RXR α a été mis en évidence en 1990, soit trois ans après le RAR α .⁶⁶ Les deux autres sous familles, à savoir RXR β et RXR γ ont rapidement suivi.⁶⁷ Comme pour les RARs, la distribution de ces protéines au sein de l'organisme n'est pas homogène. De fait, RXR α est essentiellement localisé dans le foie, les poumons, les reins, le cœur et les muscles tandis que RXR γ est principalement présent dans le cerveau et les

muscles squelettiques. C'est RXR β qui est cette fois exprimé dans l'ensemble de l'organisme.⁶⁸ De plus, différents isoformes existent, au nombre de deux pour chaque sous type de RXR.

Bien que ces récepteurs puissent être activés par l'*atAR*, l'activation est cinquante fois inférieure à celle induite sur les RARs. Le ligand ayant le plus d'affinité pour ces récepteurs est l'acide rétinoïque 9-cis.⁶⁹ Cependant, celui-ci n'étant détecté qu'en faibles quantités dans les tissus, cela amène à se questionner quant à l'existence d'autres ligands des RXRs. C'est ainsi qu'ont été découverts ou synthétisés les réxinoïdes, molécules ayant la capacité de lier efficacement et sélectivement les RXRs (**Figure 9**).⁷⁰

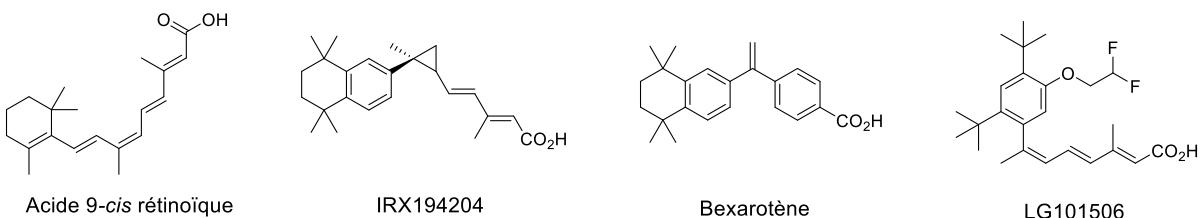


Figure 9. Exemples de réxinoïdes.

La principale différence entre les RARs et les RXRs se situe dans les DBD et LBD. Pour ce qui est du DBD, le taux de conservation moyen entre les RARs et les RXRs est de 60% tandis celui du LBD est inférieur à 30%. Également, le domaine F n'existe pas.

1.3.4. Hétérodimères RAR/RXR

Du fait de l'existence de plusieurs isoformes pour chacun des récepteurs, une grande diversité de dimères peut se former, compliquant ainsi la signalisation des rétinoïdes. Également, la régulation de la transcription par les hétérodimères RAR/RXR est un processus complexe composé de plusieurs étapes dynamiques, séquentielles et coordonnées.

Les hétérodimères RAR/RXR sont les entités fonctionnelles capables de lier des éléments de réponses de l'ADN (RAREs) spécifiques. Ces derniers se situent majoritairement dans la région promotrice des gènes cibles mais de nouveau *loci* ont aussi été identifiés.⁷¹ Une fois liés aux RAREs, les dimères peuvent activer ou réprimer la transcription des gènes en recrutant des corégulateurs dédiés. Ceux-ci interagissent

avec la surface hydrophobe des LBDs des deux récepteurs du dimère et peuvent interagir avec la machinerie transcriptionnelle mais également impacter la structure de la chromatine.^{72,73,74}

Pour ce qui est des corépresseurs, ils possèdent tous une organisation structurelle très similaire et sont recrutés par les dimères en cas d'absence de liaison d'un agoniste de RAR ou de liaison d'un antagoniste de RAR (**Schéma 4**). Le récepteur se trouve alors dans un état dit inactif. Une fois en place sur le dimère, les corépresseurs font appel à des facteurs de silençage tels que les histones déacétylases (HDACs)⁷⁵ ou les ADN méthyle transférases (DNMTs).⁷⁶ Ces derniers conduisent au maintien de la chromatine sous forme condensée, empêchant la transcription de se mettre en place.⁷⁷ Les corépresseurs se lient particulièrement au niveau du RAR et il a été montré que RAR β et RAR γ n'interagissent que très peu avec eux.^{78,79} RAR α , au contraire, peut lier deux grandes familles de corépresseurs : les corépresseurs des récepteurs nucléaires de type 1 (NCoR1) et les médiateurs de silençage du récepteur de l'acide rétinoïque et de l'hormone thyroïdienne (SMRT ou NCoR2).^{80,81} Il faut noter qu'en l'absence de ligand, la répression de la transcription requiert un nombre important de protéines dédiées.⁸²

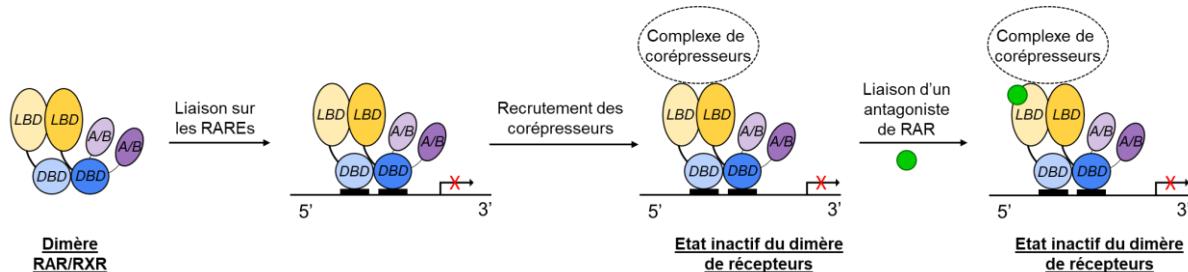


Schéma 4. Processus conduisant à la répression de la transcription en absence d'agoniste de RAR ou en présence d'un antagoniste de RAR.

Au contraire, lorsqu'un agoniste de RAR se lie à celui-ci, les LBDs des deux récepteurs subissent un changement conformationnel dont l'ampleur varie selon les récepteurs.⁸³ Cela modifie la surface d'interaction avec les corégulateurs, stabilise certaines parties des LBDs, permettant de relarguer les corépresseurs et de recruter les coactivateurs (**Schéma 5**).⁸⁴ Ces derniers entraînent la modification, le remodelage et la décompaction de la chromatine ainsi que le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.⁸⁵ Pour ce qui est des coactivateurs, cette fois encore, c'est majoritairement RAR α qui les nécessite. De façon générale, ce sont des coactivateurs

classiques qui sont recrutés, à savoir la famille des coactivateurs des récepteurs stéroïdiens (SRC). Les trois principaux sont SRC-1, SRC-2 et SRC-3, qui sont capables d'interagir avec les LBDs des deux récepteurs du dimère *via* une séquence dédiée.⁸⁶ D'autres activateurs moins conventionnels peuvent également être employés.

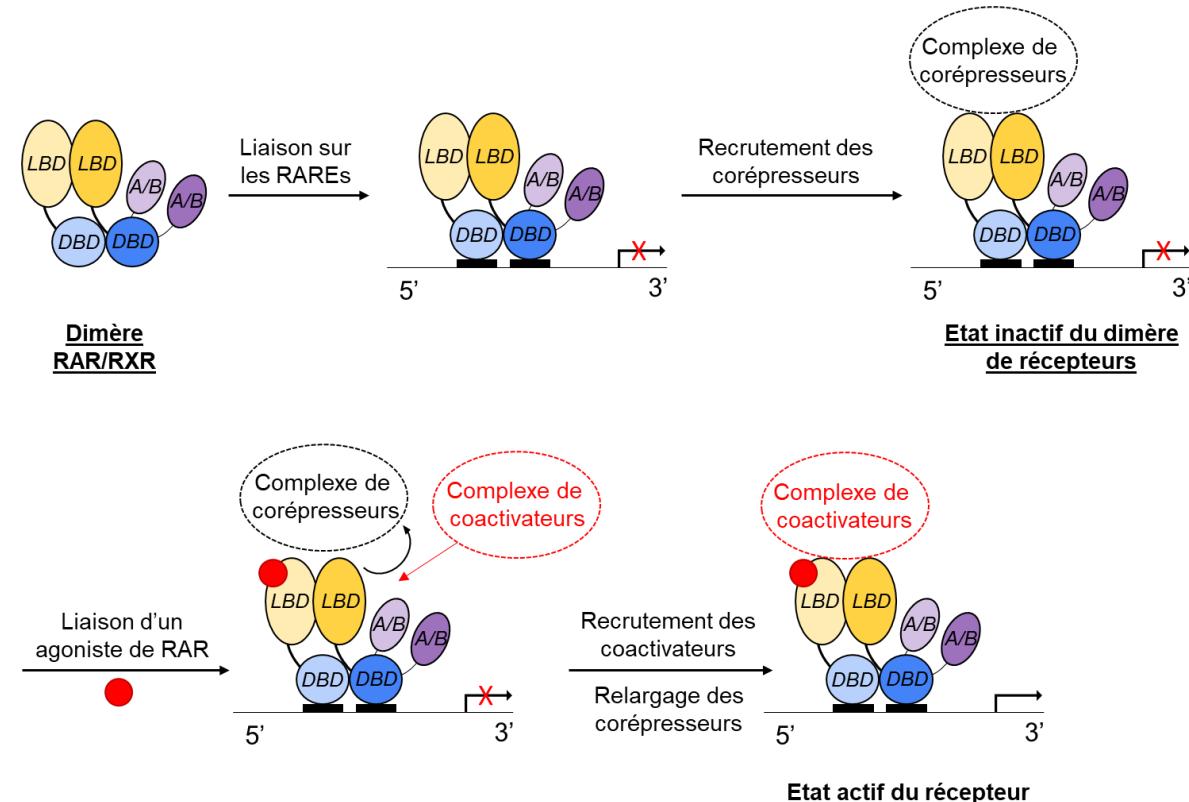


Schéma 5. Étapes conduisant à l'activation de la transcription par liaison d'un ligand agoniste de RAR.

Il faut noter que divers corégulateurs ont été découverts, montrant parfois des interactions avec des surfaces du LBD différentes de celle usuellement décrite à cet effet.⁸⁷ Il existe aussi des corégulateurs qui interagissent avec les NTDs tels que A cinus-S' ou HACE1.^{88,89}

Un autre point important à noter est qu'au sein du dimère, RXR ne peut répondre à ses ligands que si le RAR est lui-même lié à un agoniste. Ainsi, les réxinoïdes ne peuvent pas induire de réponse transcriptionnelle à eux seuls. C'est ce qu'on appelle la subordination des RXRs.⁹⁰ Cela s'explique par le fait que la liaison d'un agoniste de RAR sur celui-ci est nécessaire et suffisante au relargage des corépresseurs. De cette façon, c'est le RAR qui contrôle l'activité du dimère en silenciant celle de RXR et en induisant à lui seul la transcription en réponse à ses ligands, agonistes ou antagonistes. Il est important de prendre en compte que certaines molécules peuvent

être des agonistes de certaines sous-familles de récepteurs tandis qu'elles seront des antagonistes pour d'autres.⁹¹

A la fin de la transcription, le complexe ligand/RAR/RXR recrute des corégulateurs non conventionnels tels que RIP140 et PRAME qui inhibent la transcription *via* l'intervention de protéines spécifiques.⁹² Également, les RARs peuvent être dégradés pour limiter les effets de l'acide rétinoïque sur l'organisme.⁹³

Les RARs ne sont pas les seuls à pouvoir dimériser avec les RXRs. En effet, de nombreux autres récepteurs nucléaires tels que les récepteurs X aux farnesoïdes, les récepteurs de la vitamine D ou encore les récepteurs aux hormones thyroïdiennes peuvent former des dimères avec les RXRs.⁹⁴ On note aussi les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) pour lesquels le fonctionnement est très similaire à celui de RAR/RXR.⁹⁵

1.3.5. Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs)

Une nouvelle fois, cette famille de récepteurs nucléaires compte trois sous-familles notées PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ dont la répartition au sein de l'organisme diffère.⁹⁶ Pour ce qui est de PPAR α , on le trouve dans les tissus avec un important catabolisme des acides gras, à savoir le foie, les intestins, les tissus adipeux bruns ou le cœur. PPAR β/δ est, quant à lui, majoritairement exprimé dans la peau, les muscles squelettiques, les tissus adipeux et le cerveau.⁹⁷ Enfin, PPAR γ est présent dans les tissus adipeux blancs et bruns, le gros intestin et la rate.⁹⁸

De façon identique aux RARs, les PPARs nécessitent une dimérisation avec les RXRs pour pouvoir se lier à leur élément de réponse noté PPRE. Bien que ces récepteurs aient des structures proches de celles des RARs, l'affinité de l'atAR est bien moindre,⁹⁹ pouvant s'expliquer par une poche de liaison plus grande. En effet, les principaux ligands naturels des PPARs se trouvent être les acides gras insaturés (**Figure 10**).¹⁰⁰

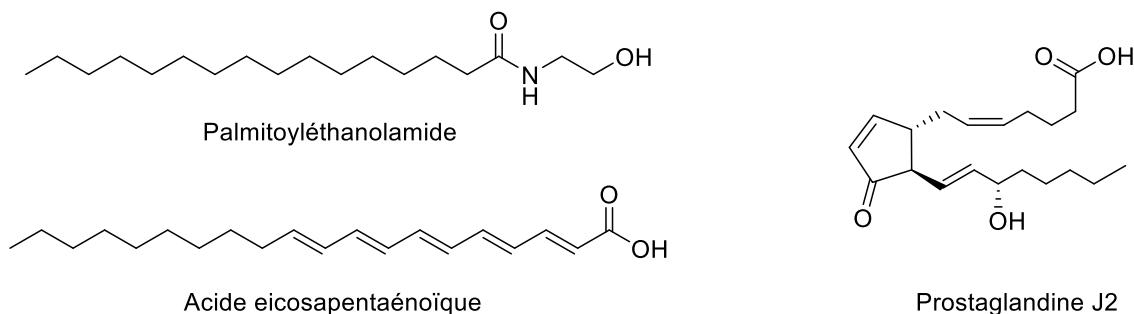


Figure 10. Exemples de ligands naturels des PPARs.

Il a été montré que l'*atAR* présente la capacité d'activer ces récepteurs dans les cellules présentant des taux de FABP5 (**Tableau 2**) supérieurs à ceux de CRABPII. En particulier, cela concerne deux types de cellules de la peau : les kératinocytes et les adipocytes. Cela pourrait expliquer que dans ce type de cellules, l'acide rétinoïque entraîne la prolifération cellulaire au lieu de l'inhiber.¹⁰¹ Néanmoins, les investigations se poursuivent pour en apprendre plus sur l'activation des PPARs par la vitamine A.

1.3.6. Récepteurs orphelins liés aux RARs (RORs)

Ces récepteurs, comme les précédents, comptent trois sous-familles : ROR α , ROR β et ROR γ dont l'expression dépend des tissus. ROR α est largement exprimé dans le foie, les muscles squelettiques, la peau, les poumons, les tissus adipeux, les reins, le cerveau tandis que ROR β est restreint à la rétine, au cerveau et à la glande pinéale. Pour ce qui est de ROR γ , il est hautement présent dans le thymus, les muscles, les testicules, le pancréas, la prostate, le cœur et le foie.¹⁰² Au contraire de la majorité des récepteurs nucléaires, ceux-ci peuvent se lier à l'ADN sous forme monomérique.¹⁰³ Différents ligands naturels ont été identifiés (**Figure 11**),¹⁰⁴ parmi lesquels l'*atAR* qui peut se lier exclusivement à ROR β .¹⁰⁵

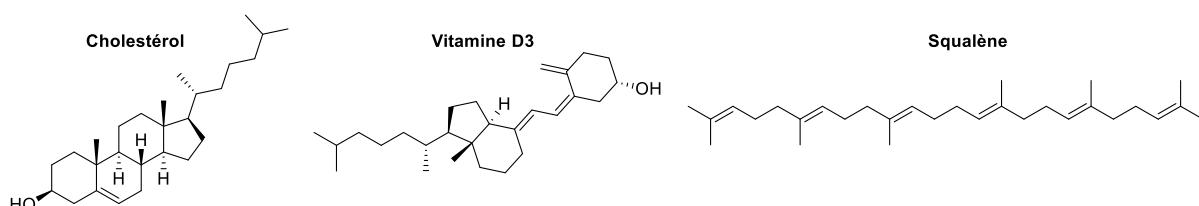


Figure 11. Exemples de ligands des RORs.

1.4. Rôles de la vitamine A dans l'organisme

La vitamine A est un facteur de régulation de plus de 530 gènes.¹⁰⁶ De ce fait, elle possède un nombre très important de fonctions au sein des organismes vivants, que ce soient des vertébrés ou non, pendant l'embryogénèse ou après la naissance. C'est l'acide rétinoïque qui est responsable de la quasi-totalité de ces actions. Le rétinal n'intervient que dans le cycle de la vision, qui sera détaillé en **1.5.**, tandis que le rétinol sert de précurseur à ces deux formes actives. Dans cette partie seront présentés les rôles principaux de la vitamine A, cette liste ne pouvant être exhaustive du fait du nombre très important de rôles de cette molécule. Également, il est possible que certains rôles ne soient pas encore connus.

1.4.1. Au cours de l'embryogénèse

Au sein de l'embryon, ce sont les gradients spatio-temporels de vitamine A qui régule ses différentes fonctions (**Figure 12**).

Rôles majeurs de la vitamine A durant l'embryogénèse

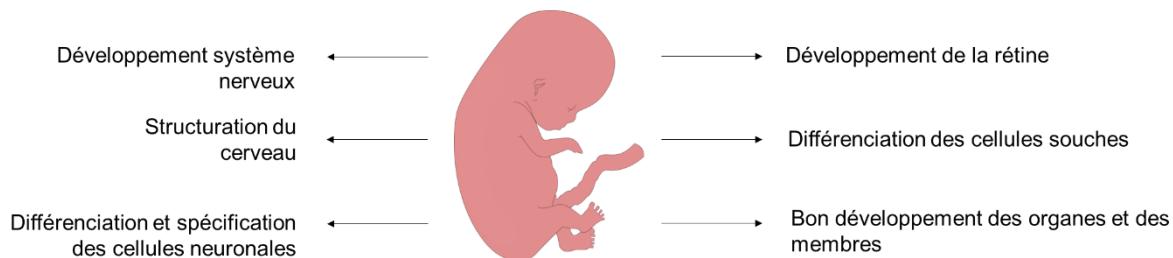


Figure 12. Rôles majeurs de la vitamine A durant l'embryogénèse.

Chez les vertébrés, la vitamine A intervient dans la structuration du système nerveux lors de son développement. En particulier, elle permet l'organisation précoce du cerveau antérieur, lequel contient le cortex cérébral, responsable des fonctions cognitives supérieures, de la perception et des émotions.¹⁰⁷ Également, le plateau neural, structure de base de développement du système nerveux, requiert un apport important de vitamine A afin de pouvoir spécifier les domaines supérieurs du cerveau ainsi que celui de la moelle épinière.¹⁰⁸ De plus, ce micronutriments est crucial dans la différenciation et la spécification des progéniteurs neuronaux.¹⁰⁹

Durant le croissance embryonnaire, on note aussi la participation de la vitamine A au développement des yeux et en particulier de la rétine.¹¹⁰ De fait, elle régule la différenciation des cellules progénitrices de la rétine de façon temporelle, en promouvant leur sortie du cycle cellulaire. A ce moment, elles sont alors transformées en l'ensemble de cellules de la rétine : photorécepteurs, cônes, bâtonnets, cellules de Müller...¹¹¹

De façon plus générale, la vitamine A gère avec précision la différenciation des cellules souches en cellules sanguines, musculaires, squelettiques ou encore immunitaires par différents biais tels que les modifications épigénétiques.¹¹² Par conséquent, l'acide rétinoïque intervient aussi dans le bon développement des poumons, du pancréas, des reins, du cœur ainsi que des membres.¹¹³

1.4.2. Après la naissance

Dans la vie post-natale, que ce soit lors de l'enfance ou de l'âge adulte, la vitamine A conserve un vaste panel d'actions (**Figure 13**).

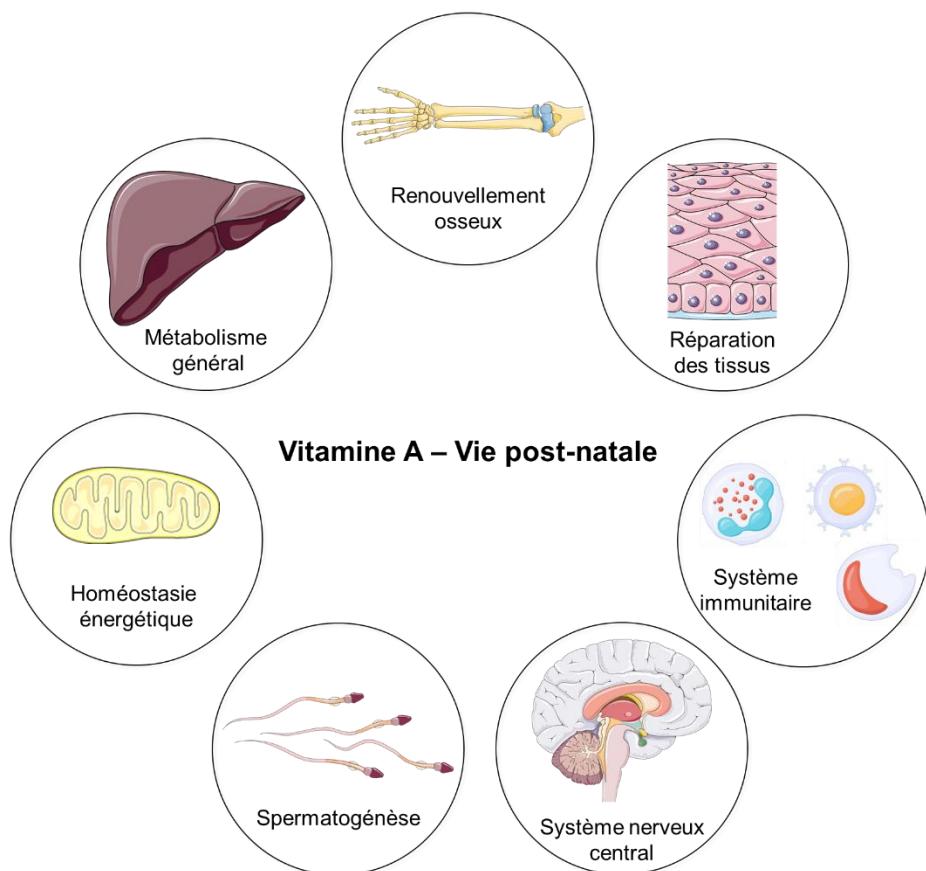


Figure 13. Rôles majeurs de la vitamine A dans la vie post-natale.

1.4.2.1. Spermatogénèse

La vitamine A est responsable de la régulation de *Stra8*, facteur indispensable à l'entrée en méiose des cellules précurseurs des spermatozoïdes.¹¹⁴ De cette façon, elle régule la spermatogénèse. Par la suite, cette molécule a également un rôle dans la différenciation spermatogoniale.¹¹⁵ Il est important de noter qu'au sein même des vertébrés, la modulation de la spermatogénèse par la vitamine A se fait *via* des processus variés.¹¹⁶

1.4.2.2. Système immunitaire

La vitamine A est essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire, à la fois inné et adaptatif. Premièrement, c'est elle qui module la formation des épithéliums – tissus recouvrant la surface du corps mais aussi l'intérieur des organes creux – de l'ensemble de l'organisme. S'ajoute à cela le contrôle de leur kératinisation, stratification ainsi que de la maturation fonctionnelle des cellules épithéliales. Les épithéliums ont un rôle immunitaire important puisqu'ils sont une première ligne de défense contre les pathogènes. Deuxièmement, l'AR est responsable de la différenciation, de la maturation et de la fonctionnalité des cellules du système immunitaire inné, à savoir les macrophages¹¹⁷ et les neutrophiles.¹¹⁸

Enfin, la migration des cellules T vers le thymus, où elles deviennent des cellules T matures, est gérée par la vitamine A. De plus, c'est elle qui régule l'homéostasie et l'activation de ces cellules.¹¹⁹ Cela s'explique par son rôle de cofacteur dans la prolifération et la différenciation de certains sous-types de cellules T.¹²⁰

1.4.2.3. Système nerveux central

Après avoir eu des rôles fondamentaux dans la formation et la structuration du système nerveux central au cours de l'embryogénèse, la vitamine A continue d'être indispensable au cerveau après la naissance. En effet, elle intervient dans la différenciation des phénotypes de certains neurotransmetteurs mais aussi dans la transmission synaptique. En particulier, elle veille au maintien de la plasticité de cette transmission.¹²¹ On note aussi que l'hippocampe, zone pivot dans l'apprentissage

relationnel et la mémoire, est une région du cerveau très sensible à la vitamine A. La mémoire gérée par l'hippocampe fait appel à la plasticité du réseau neuronal, lui-même guidé par l'efficacité synaptique, la neurogénèse et la morphologie neuronale.¹²² Néanmoins, l'intégralité de ces processus ne sont aujourd'hui pas compris.

1.4.2.4. Renouvellement osseux¹²³

Il s'agit d'une des activités de la vitamine A pour laquelle son homéostasie est particulièrement importante. De fait, cette molécule inhibe l'activité des ostéoblastes et favorise la formation des ostéoclastes. Les premiers synthétisent la matrice osseuse et aide à sa minéralisation tandis que les seconds sont responsables de sa destruction. Dans des concentrations adéquates, cela permet le renouvellement osseux. Cependant, dans à concentrations trop élevées, cela conduit à une fragilisation osseuse.

1.4.2.5. Régénération des tissus

L'acide rétinoïque possède un important pouvoir de régénération des tissus lésés puisqu'il stimule le renouvellement de l'épiderme, augmente son taux de ré-épithérialisation et restaure la structure épithéliale.¹²⁴ L'ensemble de ces processus est permis par le fait la vitamine A stimule la synthèse du collagène et la prolifération des kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme.

1.4.2.6. Métabolisme général¹²⁵

Tout d'abord, la vitamine A impacte la sensibilité à l'insuline – capacité de l'organisme à réguler, utiliser et disposer du glucose dans le sang – affectant directement le métabolisme du glucose, des lipides et des protéines. Ce phénomène n'a toutefois pas encore trouvé d'explication. Ensuite, l'AR régule différentes enzymes glycolytiques hépatiques, lui conférant un rôle supplémentaire dans le métabolisme hépatique des lipides. Également, *via* la régulation du cycle de l'urée dans le foie et les reins, elle influe sur le catabolisme des protéines. De plus, l'AR impacte le métabolisme énergétique basal du foie, c'est-à-dire les besoins énergétiques incompressibles de ce

dernier. Cela est dû à l'activité de la vitamine au sein des hépatocytes. Enfin, le métabolisme des lipides est étroitement lié à celui de la vitamine A, sans toutefois savoir comment. Il en résulte que l'AR régule la production de lipides dans le foie, phénomène majeur sans lequel les lipides s'accumuleraient, causant un dysfonctionnement du métabolisme du glucose et pouvant mener à des maladies du foie.¹²⁶

1.4.2.7. Homéostasie énergétique

Il a été découvert récemment que le rétinol n'est pas seulement un précurseur des formes actives de la vitamine A mais qu'il présente aussi sa propre activité. En effet, il sert de transporteur d'électrons au sein des mitochondries, jouant ainsi un rôle dans l'activation rédox des protéines kinases Cδ.¹²⁷ Ces kinases ont un rôle essentiel dans l'homéostasie énergétique, c'est-à-dire que leur régulation varie selon les besoins énergétiques des cellules.¹²⁸

1.4.3. Fonctions non-génomiques

Au départ, seules des fonctions génomiques étaient envisagées pour la vitamine A. Cependant, au cours de la dernière décennie, il a été découvert que l'AR et les RARs ont des effets extranucléaires non-transcriptionnels.

Un des effets qui a été le plus étudié jusqu'à présent est l'activation de la voie signalétique des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). Selon le type cellulaire, ce ne sont pas les mêmes MAPKs qui sont activées. Dans les fibroblastes, les cellules de cancers du sein ou encore les cellules de carcinomes embryonnaires murines, c'est MAPK p38 qui est concernée. En revanche, ce sont les MAPKs p42 et p44 qui sont stimulées dans les cellules de Sertoli, les neurones ou encore les cellules souches embryonnaires.⁸³ Une fois que leur voie signalétique est activée, les MAPKs intègrent le noyau et y phosphorylent diverses protéines, parmi lesquelles les RARs. Cela induit alors une variété de processus, dépendant de leur sous-famille et/ou de leur isoforme.¹²⁹

L'atAR extranucléaire peut également activer les kinases régulées par un signal extracellulaires, les ERK 1/2.¹³⁰ Celles-ci ont un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire de cellules souches embryonnaires et neuronales.¹³¹

On trouve aussi une portion des RAR α dans les radeaux lipidiques membranaires de certaines cellules. Il s'agit de microdomaines membranaires enrichis en différentes molécules telles que les flotillines, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), les protéines G... qui induisent une variété de signaux intra ou extracellulaires.¹³²

Néanmoins, cette découverte étant récente, de nombreuses autres fonctions résultant de la présence extranucléaire de l'AR et des RARs restent probablement à découvrir.

1.5. Vitamine A et vision

L'un des rôles majeurs de la vitamine A au sein de l'organisme est la vision. Elle est permise par deux types de photorécepteurs composant la rétine : les cônes et les bâtonnets. Tandis que les bâtonnets amènent la détection des faibles intensités lumineuses, les cônes servent pour une vision à hautes intensités de lumière. Leur fonctionnement étant très similaire, nous nous concentrerons dans cette partie sur le cycle visuel le mieux décrit, à savoir celui des bâtonnets.

Au contraire des différentes fonctions présentées précédemment pour la vitamine A, c'est ici le rétinal qui est la forme active. Chez les vertébrés, c'est l'isomère 11-*cis* ou certains de ses dérivés hydroxylés qui sont fonctionnels (**Figure 14**).

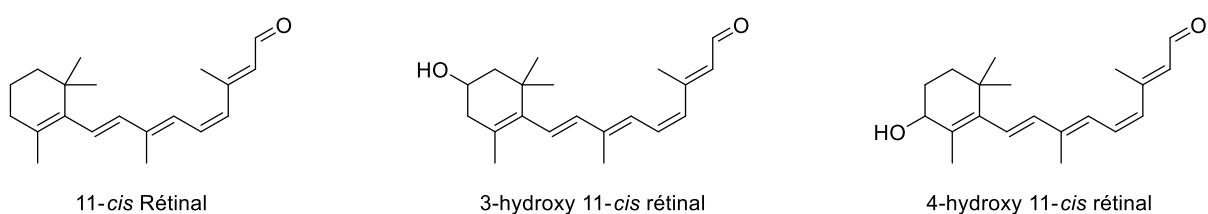


Figure 14. Formes actives de la vitamine A pour la vision chez les vertébrés.

Chez l'homme, seul le rétinal 11-*cis* est efficient. Ce dernier se lie à une opsine, qui est un RCPG, amenant la formation du chromophore indispensable à la vision : la rhodopsine (**Figure 15**).¹³³

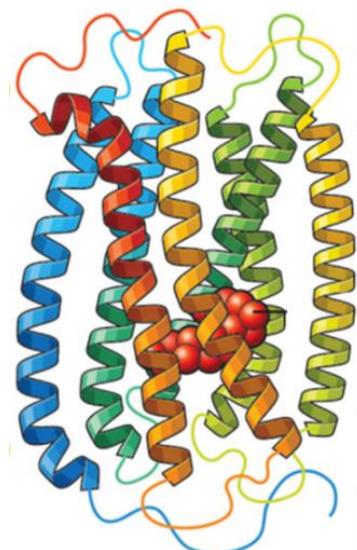


Figure 15. Illustration du rétinal 11-cis au sein de l'opsine, formant la rhodopsine. Le rétinal est représenté par les boules rouges. Figure extraite des travaux de Salesse publiés en 2017.

Le cycle de la vision se compose de deux parties : la phototransduction et le cycle de régénération (**Figure 16**).

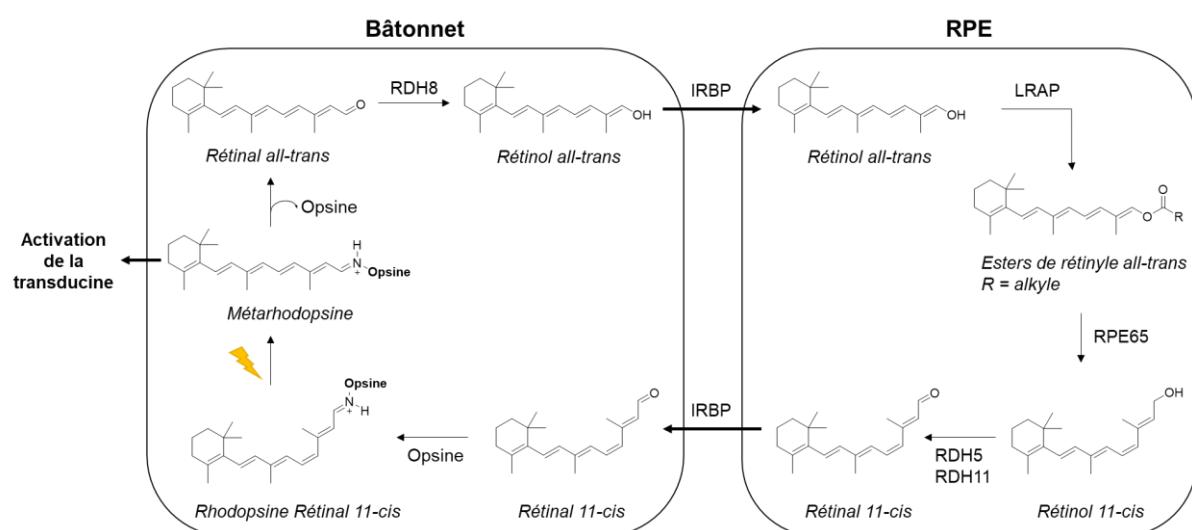


Figure 16. Cycle de la vision au sein des bâtonnets. IRBP = protéine de liaison interphotorécepteur ; LRAT = léchithine rétinol acyltransférase; RDH= rétinol déshydrogénase ; RPE65 = isomérohydrolase.

La phototransduction débute avec l'absorption d'un photon par la rhodopsine, conduisant à l'isomérisation du rétinal 11-cis en rétinal all-trans.¹³⁴ Ce processus amène des changements conformationnels de l'opsine, permettant l'accès à la forme activée de la rhodopsine : la métarhodopsine. Celle-ci est alors capable de reconnaître, lier et activer la protéine G qui lui est associée, à savoir la transducine. Une cascade signalétique spécifique se met alors en place dans laquelle les protéines employées devront être inactivées pour mettre fin à la transduction et retourner à l'état de noirceur du photorécepteur.¹³³

Lors de l'isomérisation du rétinal au sein de la rhodopsine, les deux partenaires se dissocient. C'est alors que débute le cycle de régénération du chromophore qui prend place entre le bâtonnet et l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE), ensemble de cellules adjacentes des bâtonnets.

Premièrement, le rétinal *all-trans* est réduit en rétinol *all-trans* (**Figure 16**) car l'aldéhyde est une fonction réactive pouvant lier différents phospholipides et pouvant ainsi conduire à une toxicité suivie de diverses pathologies ophthalmologiques.¹³⁵ Le rétinol *all-trans* formé est alors transporté du bâtonnet vers le RPE par une protéine de liaison interphotorécepteur (IRBP) puis au sein du RPE par une protéine cellulaire de liaison du rétinol (CRPB-1). A son arrivée dans le RPE, le rétinol *all-trans* est estérifié par la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT). L'ester formé est ensuite déprotégé et isomérisé par une isomérohydrolase, la RPE65. Le rétinol *11-cis* produit est oxydé en rétinal *11-cis* par RDH5 et RDH11 avant que ce dernier ne soit transporté vers le bâtonnet où la rhodopsine peut être régénérée. Un nouveau cycle visuel peut alors débuter.

Concernant le cycle de la vision des cônes, il est assez similaire à celui des bâtonnets puisque de nombreuses biomolécules sont communes. Toutefois, il est plus complexe car le cycle de régénération fait également appel aux cellules de Müller, en plus du RPE.¹³⁶ Également, les vitesses de transduction et de régénération sont très différentes. De fait, il ne sera pas détaillé ici.

1.6. Vitamine A et pathologies

Comme expliqué dans la partie **1.4.**, la vitamine A intervient, de façon directe ou non, dans un nombre très important de fonctions biologiques. De ce fait, beaucoup de pathologies peuvent mettre en cause ce micronutriments telles que les maladies cardiovasculaires,¹³⁷ les diabètes,¹³⁸ ou certains cancers.¹³⁹ Toutefois, du fait d'un manque de connaissances, il est aujourd'hui complexe d'expliquer le lien entre ces pathologies et la vitamine A. Il existe cependant de nombreux autres troubles qui ont été expliqués soit par une hypervitaminose soit par une carence en vitamine A. C'est sur une partie non-exhaustive de ces maladies que va se concentrer ce paragraphe.

Il est important de noter que les apports journaliers recommandés en vitamine A dépendent de l'âge, du sexe mais aussi de la condition de chaque individu. En effet, une femme enceinte aura des besoins supérieurs à ceux d'une femme qui ne porte pas d'enfant (**Tableau 3**). Les indications des apports journaliers recommandés en vitamine A sont exprimées en Équivalent Activité Rétinol (RAE). Un RAE équivaut à 1 µg de rétinol ou 12 µg de β-carotène.¹⁴⁰ Ces apports sont déterminés de sorte à maintenir une concentration en rétinol dans le plasma de 1 µM.

Quantité journalière recommandée (en RAE)	
Enfant et adolescent	400 à 600
Homme adulte	900
Femme adulte	700
Femme enceinte	750 à 770
Femme allaitante	1200 à 1300

Tableau 3. Apports journaliers recommandés en vitamine A selon l'âge, le sexe et la condition de l'individu.

1.6.1. Hypervitaminose

L'hypervitaminose, ou intoxication à la vitamine A, est un trouble rare du fait de la régulation très précise des concentrations en vitamine A au sein de l'organisme.¹⁴¹ On considère une hypervitaminose quand le taux de rétinol dans le sang dépasse les 2.09 µM, soit 600 µg/L de plasma. Elle est causée par une prise de vitamine A préformée (rétinol ou esters de rétinyle) trop élevée. Cela peut survenir lors d'une thérapie employant la vitamine A ou d'une supplémentation en cette vitamine, au cours de la grossesse par exemple.

L'hypervitaminose peut être passagère à faible dose, passagère à haute dose ou chronique. Pour ce qui est d'une intoxication passagère à faible dose (200 mg d'apports en une seule prise), des symptômes transitoires peuvent apparaître tels que des maux de tête, des douleurs musculaires, des nausées, des vomissements ou encore une vision floutée. En cas d'une hypervitaminose passagère à haute dose (500 mg d'apports en une seule prise), d'autres symptômes s'ajoutent à savoir de la

somnolence ainsi que des démangeaisons, sécheresses, ulcérations et importantes desquamations cutanées.¹⁴² Dans ces deux cas, le traitement consiste à revenir à un apport normal de vitamine A. Enfin, une hypervitaminose chronique peut mener à une diminution de la densité minérale osseuse résultant en des troubles tels que l'ostéoporose ou l'ostéopénie. Le foie est également affecté pouvant conduire à une cirrhose. Dans les cas les plus graves, cela peut même amener à la mort.

Il faut toutefois noter que les cas les plus importants d'hypervitaminose concerne la femme enceinte. En effet, l'intoxication à la vitamine A engendre d'importants effets tératogènes sur le fœtus: malformations du crâne, de la face, du système cardiaque mais aussi du système nerveux central.¹⁴³

1.6.2. Carence en Vitamine A

La carence en vitamine A (VAD) est la deuxième maladie nutritionnelle la plus répandue au monde.¹⁴⁴ Elle est particulièrement présente dans les régions en voie de développement telles que l'Asie du Sud-Ouest, l'Afrique centrale ou subsaharienne. On considère qu'un individu présente une VAD lorsque son taux de rétinol dans le plasma est inférieur à 0.7 µM soit 200 µg/L de plasma. Cette carence est considérée sévère lorsque cette concentration passe en dessous de 0.35 µM soit 100 µg/L de plasma.¹⁴⁵

Les carences peuvent être primaire ou secondaire. Une carence est dite primaire lorsqu'elle provient d'apports alimentaires trop pauvres en vitamine A. On parle de carence secondaire lorsqu'elle est causée par une mauvaise absorption, un déficit de transport ou de stockage de ce micronutriments. Ces troubles peuvent être la conséquence de certaines pathologies chroniques telles que la maladie de Crohn.¹⁴⁶

Comme pour l'hypervitaminose, la VAD est particulièrement problématique lors de la grossesse et de l'allaitement (**Figure 17**). En effet, cela peut causer plusieurs malformations ou anomalies congénitales de la vision, du système reproductif, du cœur, du diaphragme ou encore des reins du fœtus.¹⁴⁷ Après la naissance, d'importants retards de croissance peuvent aussi apparaître, la vitamine A étant étroitement liée à l'hormone de croissance.¹⁴⁸ Également, les réponses immunitaires à certains vaccins peuvent être altérées.^{149,150}

Impacts d'une carence en Vitamine A maternelle durant la grossesse et/ou l'allaitement

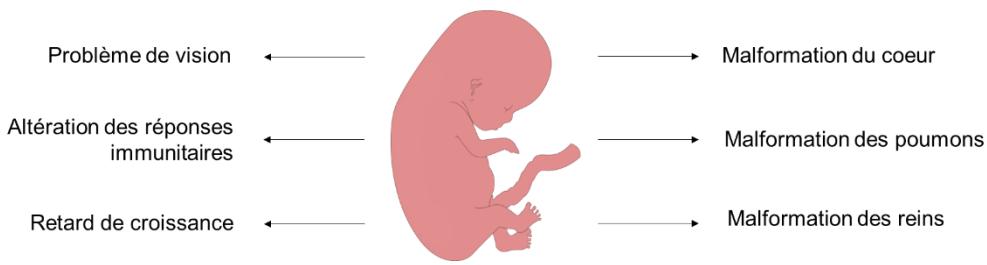


Figure 17. Liste non-exhaustive des troubles causés par une carence en vitamine A maternelle lors de la grossesse et/ou de l'allaitement.

Chez l'enfant et l'adulte, la carence en vitamine A peut se manifester de nombreuses façons (**Figure 18**). En premier lieu, le manque de vitamine A conduit à une diminution progressive de la concentration en rétinol dans le plasma et dans l'ensemble des tissus de l'organisme. En conséquence, le foie produit moins de transporteurs (RBP et TTR),¹⁵¹ rendant l'absorption des faibles quantités de vitamine A ingérée plus difficile.¹⁵² De plus, la vitamine A étant nécessaire à la synthèse des mucopolysaccharides présents au sein des papilles gustatives,¹⁵³ une altération voire une perte de goût peuvent survenir, menant à une diminution de la prise alimentaire. Toutes ensembles, ces conséquences primaires mènent à une aggravation de la carence.

Par la suite, si la carence se maintient, plusieurs processus biologiques se trouvent impactés, entraînant alors diverses pathologies (**Figure 18**). Tout d'abord, le système immunitaire présente des défaillances de plus en plus importantes, qui conduisent à des infections plus nombreuses et plus sévères.¹⁵⁴ Cela peut même aller jusqu'au développement de la malaria ou de la tuberculose.^{155,156} Ensuite, la vitamine A étant directement impliquée dans le métabolisme du fer *via* la régulation de la transcription de gènes codant pour des biomolécules de ce métabolisme, une carence de celle-ci mène à des risques élevés d'anémie.^{157,158} Par ailleurs, la vitamine A est étroitement liée aux bactéries du microbiote. En effet, celles-ci ont un rôle clé dans la biosynthèse et le métabolisme de la vitamine A induisant, par exemple, l'activité de RALDH2.¹⁵⁹ Ainsi, en cas de carence en vitamine A, la flore intestinale est touchée, causant l'inhibition de nombreuses cascades biologiques, dont celle visant à l'activation de RALDH2.

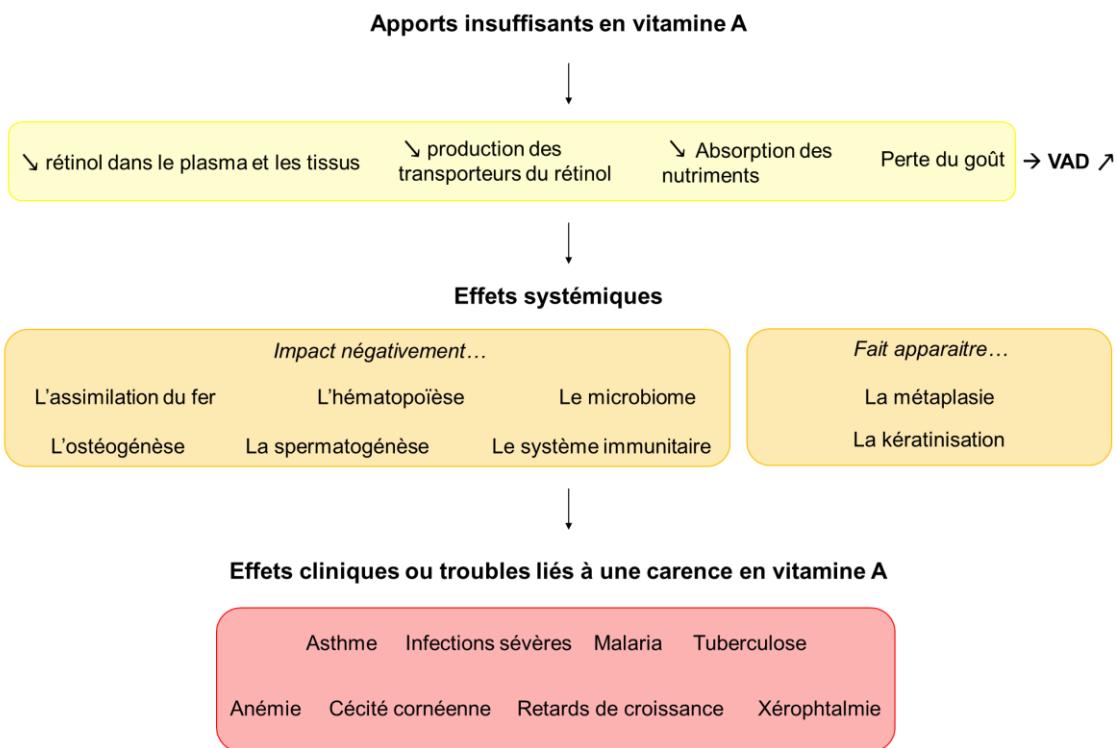


Figure 18. Conséquences d'apports insuffisants en vitamine A de façon chronique. En jaune sont représentés les effets directs. En orange sont indiqués les effets systémiques, conséquences des premiers. En rouge sont représentés les conséquences cliniques.

On peut ajouter que la vitamine A possède un rôle « anti-kéatinisation » dans les cellules épithéliales, quelle que soit la localisation de celles-ci dans l'organisme.¹⁶⁰ La kéatinisation est un processus par lequel les cellules s'enrichissent de façon anormale en kératine, bloquant leur desquamation et donc le renouvellement cellulaire.¹⁶¹ Dans le cas d'une VAD, la vitamine A ne pouvant plus remplir ce rôle, le renouvellement cellulaire est affecté. Un autre phénomène régulé par la vitamine A à l'échelle cellulaire est la métaplasie. Il s'agit d'un changement de type cellulaire de cellules matures au sein d'un tissu. C'est un phénomène normal et réversible intervenant lors d'une agression extérieure à l'organisme. Toutefois, en cas de VAD, il est amené à perdurer, pouvant conduire au cancer.¹⁶²

La vitamine A agit également à différents niveaux de l'hématopoïèse, c'est-à-dire de la fabrication des cellules sanguines. Une carence en cette molécule mène donc à une perturbation de ce processus.¹⁶³ Il en va de même pour l'ostéogénèse.¹⁶⁴ Il est aussi important de noter que la vitamine A intervient dans la spermatogénèse et que celle-ci peut aller jusqu'à totalement s'arrêter en cas de taux insuffisants de vitamine A.¹⁶⁵

Enfin, une des conséquences les plus graves de la VAD concerne la vision.¹⁶⁶ En effet, la carence en vitamine A peut causer une interruption de la cascade biologique indispensable à la vision (expliquée dans la partie **1.6**), endommageant ainsi la rétine, la qualité de la vision en couleurs et l'adaptation à l'obscurité.¹⁶⁷ Lorsque la carence perdure, cela peut aller jusqu'à la xérophthalmie, pathologie pouvant mener à la cécité visuelle.¹⁶⁸

Il faut souligner que, selon l'importante et la durée de la carence, certains de ces troubles peuvent être réversibles grâce à une supplémentation en vitamine A. Dans le cas contraire, la VAD peut mener à la mort. Également, les cascades biologiques liant le manque de vitamine A et les différents effets observés ne sont pas toujours connues.

1.7. Vitamine A à visée thérapeutique

Comme annoncé précédemment (paragraphe **1.1.4.**), les rétinoïdes ont été approuvés par la FDA pour divers usages thérapeutiques. Ils peuvent être administrés selon deux voies principales, correspondant aux deux grandes familles de maladies traitées. Premièrement, la voie topique, requise pour le traitement d'un large panel de maladies cutanées. Deuxièmement, la voie orale employée notamment dans le traitement préventif ou curatif de cancers (**Figure 19**). Le fait que les rétinoïdes permettent de soigner plusieurs pathologies cutanées réside dans leur rôle au sein la différenciation et la division des cellules de l'épiderme. De plus, ils modulent la kératinisation de celles-ci, souvent en cause dans les troubles cutanés. Pour ce qui est du potentiel anti-cancéreux, il est amené par l'inhibition de certains signaux de stimulation de la croissance cellulaire en parallèle de l'induction de voies signalétiques régulant l'apoptose ainsi que l'arrêt de la croissance et de la différenciation cellulaire dans les lésions cancéreuses et pré-cancéreuses.¹⁶⁹

Pathologies cutanées		Autres pathologies/ effets thérapeutiques
<i>Acne vulgaris</i>	Mélasma	Accidents vasculaires cérébraux
Cosmétiques anti-âge	<i>pityriasis rubra pilaris</i>	Effet anti-microbien
Eczéma sévère	Psoriasis	Large variété de cancers
Hyperpigmentation	Pustulose palmoplantaire	Lymphomes cutanés à cellules T
Ichtyose lamellaire	Rosacées	Maladie d'Alzheimer
Maladie de Darier	Verrues plantaires	Maladie de Parkinson
Maladie de Dowling-Degos		Effet neuroprotecteur

Figure 19. Liste non-exhaustive des pathologies traitées par les rétinoïdes.

Il est important de noter que les traitements aux rétinoïdes impliquent une modification de l'homéostasie de ces derniers au sein de l'organisme, causant divers effets secondaires. D'une part, lors d'une administration par voie topique, cela peut conduire à une forte sécheresse cutanée (xérose), d'intenses démangeaisons, des rougeurs, la sécheresse de nombreuses muqueuses, une inflammation des lèvres (chélite), une perte de cheveux, des saignements de nez... D'autre part, par prise orale, les effets indésirables observés sont essentiellement des myalgies, des douleurs osseuses, une calcification des tendons et ligaments et divers problèmes ophtalmologiques.^{170,171}

1.7.1. Rétinoïdes de première génération

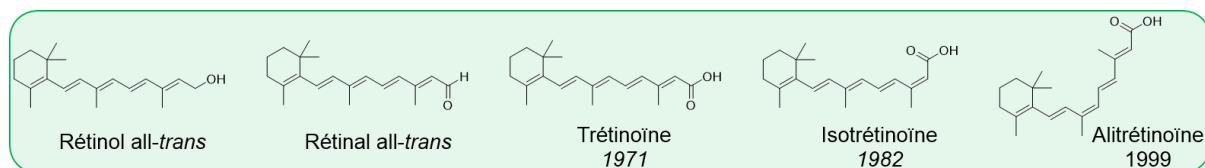


Figure 20. Structures des rétinoïdes de première génération avec leur date d'approbation par la FDA quand elle existe.

La trétinoïne, ou acide rétinoïque *all-trans*, est la forme de la vitamine A la plus utilisée en thérapie, toutes générations confondues. D'une part, on la retrouve dans le traitement de plusieurs pathologies cutanées : *acne vulgaris*,¹⁷² anomalies pigmentaires cutanées telles que l'hyperpigmentation et le mélasma,¹⁷³ rosacée, psoriasis, dermatoses kératinisantes...¹⁷² D'autre part, il s'agit d'un agent antitumoral exploité dans divers types de cancers : foie, poumon,¹⁷⁴ sein, ovaires,¹⁷⁵ prostate,¹⁷⁶

mélanomes, leucémies, lymphomes...^{177,178,179} Toutefois, il est assez commun que les cancers soient résistants à la trétinoïne, nécessitant l'emploi d'autres formes de la vitamine A.¹⁸⁰ Plus récemment, un potentiel dans le traitement de la maladie d'Alzheimer a été découvert pour cette molécule.¹⁸¹

Concernant les deux autres isomères de l'acide rétinoïque, leur usage est exclusivement réservé au traitement de maladies de peau. L'alitrétinoïne est utilisée pour lutter contre le *pityriasis rubra pilaris*,¹⁸² la maladie de Darier,¹⁸³ la pustulose palmoplantaire¹⁸⁴ ou encore l'eczéma sévère des mains.¹⁸⁵ L'isotrétinoïne, quant à elle, est efficace dans le traitement de l'acné sévère¹⁸⁶ et de diverses formes de rosacées.^{187,188}

Pour ce qui est du rétinol, son usage est plus esthétique que thérapeutique. En effet, il est l'un des rétinoïdes les plus utilisé en cosmétique avec les esters de rétinyle et le β -carotène. Il est largement employé dans la cosmétique « anti-âge » du fait de sa capacité à stimuler le renouvellement cellulaire et la production de collagène, tout en limitant la dégradation de ce dernier.¹⁸⁹

Enfin, concernant le rétinal, il est très peu utilisé du fait de l'importante réactivité de l'aldéhyde pouvant amener de la toxicité. Néanmoins, il est présent à de faibles concentrations dans des mélanges pour le traitement de l'*acne vulgaris*.¹⁹⁰

1.7.2. Rétinoïdes de deuxième génération

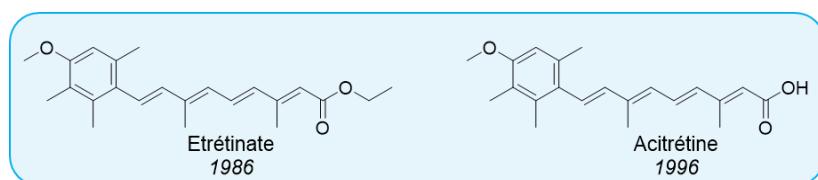


Figure 21. Structures des rétinoïdes de deuxième génération avec leur date d'approbation par la FDA.

L'étrétinate et l'acitretine ayant des structures très proches, leurs usages thérapeutiques le sont également. Concernant l'étrétinate, il a un effet curatif sur les psoriasis érythrodermique et pustuleux. Il est aussi employé en tant qu'adjvant dans le traitement du *psoriasis vulgaris*.¹⁹¹ Pour ce qui est de l'acitretine, il permet de soigner les psoriasis en plaques sévère, pustuleux généralisé et pustuleux localisé, en combinaison d'une autre thérapie ou non.¹⁹² Il faut noter que, du fait de sa très grande

efficacité en monothérapie, il est plus souvent utilisé seul qu'en tandem avec une autre molécule thérapeutique.¹⁹³

1.7.3. Rétinoïdes de troisième génération

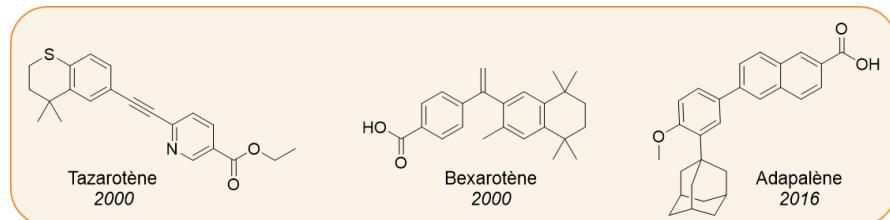


Figure 22. Structures des rétinoïdes de troisième génération avec leur date d'approbation par la FDA.

Concernant le tazarotène, il est utilisé dans le traitement du psoriasis mais aussi de l'onychomycose.¹⁹⁴ Ensuite, comme pour la majorité des rétinoïdes, l'adapalène permet de traiter une variété de pathologies cutanées telles que la rosacée, les verrues plantaires, le vieillissement cutané ou encore la maladie de Dowling-Degos, une hyperpigmentation cutanée d'origine génétique. Plus récemment, l'adapalène ainsi que ses dérivés ont montré des potentiels anti-microbien et anti-cancéreux mais aussi des effets neuroprotecteurs.^{195,196} Enfin, le bexarotène a quant à lui été approuvé par la FDA pour un usage en monothérapie ou thérapie complémentaire dans le traitement de lymphomes cutanés à cellules T, un type de cancer pouvant prendre plusieurs formes.¹⁹⁷ Plus récemment, il a montré des effets prometteurs pour le traitement de maladies cérébrales telles que les accidents vasculaires cérébraux, les lésions cérébrales traumatiques, la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer.¹⁹⁸ Également, il peut être employé en remplacement dans la trétinoïne dans les chimiothérapies.^{199,200}

1.7.4. Rétinoïdes de quatrième génération

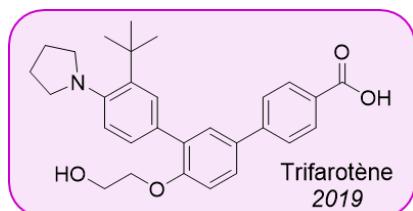


Figure 23. Structure du trifarotène, seul rétinoïde de quatrième génération, avec sa date d'approbation par la FDA.

Le trifarotène est employé, comme tous les rétinoïdes, pour traiter l'*acne vulgaris* mais aussi l'ichtyose lamellaire, une maladie résultant d'un dérèglement de la kératinisation des cellules épithéliales cutanées. Également, il a révélé un potentiel intéressant dans le traitement du lymphome cutané précoce à cellules T.²⁰¹ Toutefois, cette molécule n'ayant été synthétisée et approuvée que très récemment, d'autres rôles thérapeutiques sont envisagés tels que la réparation des dommages causés à la peau par le soleil, le traitement des infections fongiques ou encore le soin des cancers de la peau n'appartenant pas à la famille des mélanomes.²⁰²

1.8. Problématique et solutions proposées par cette thèse

1.8.1. Des chainons manquants

Comme expliqué tout au long de cette introduction, la variété de fonctions de la vitamine A nécessite une importante régulation de sa biodisponibilité, de son métabolisme et de sa signalisation. Bien que cela ait été largement étudié, les connaissances actuelles ne permettent pas une appréciation complète de l'ensemble de ces processus. Également, certaines activités des rétinoïdes ne sont aujourd'hui pas ou peu comprises à l'échelle moléculaire. Cela indique que les voies métaboliques et signalétiques découvertes jusqu'à présent sont incomplètes. Par exemple, on peut noter que les fonctions non-génomiques de la vitamine A n'ont été découvertes que récemment, amenant à penser qu'un pan complet du fonctionnement de la vitamine A reste à découvrir. Également, cela conduit à penser que certaines de ses fonctions ne sont aujourd'hui pas connues. On peut par exemple citer des connaissances incomplètes concernant le transfert des rétinoïdes entre les hépatocytes et les cellules hépatiques stellaires en vue du stockage des esters de rétinyle. Également, la communication inter-organes visant à signaler un déficit en vitamine A n'est aujourd'hui pas élucidée. Si on se place du point de vue des récepteurs des rétinoïdes, là encore la connaissance est partielle. En effet, l'acide 9-*cis* rétinoïque est considéré comme permettant l'activation des RXRs la plus efficace. Toutefois, il est présent en quantités infimes dans les tissus, amenant à se demander si d'autres molécules ne pourraient pas activer les RXRs ou si le 9-*cis* AR ne présenterait pas un mécanisme de régulation spatio-temporelle particulier. Il en va de même pour l'activation des PPARs et des

RORs par la vitamine A, pour laquelle les connaissances sont limitées. Pour finir, jusque récemment, on pensait avoir dévoilé l'ensemble des métabolites et formes de la vitamine A. Néanmoins, un rapport de Krezel *et al.* datant de 2021 a fait état d'une nouvelle forme de la vitamine A nommée vitamine A5/X,^{6,203} relançant l'idée que de nouveaux métabolites restent à découvrir.

Pour pallier ce manque de connaissances sur le métabolisme, la signalisation et le stockage des rétinoïdes, il est ainsi nécessaire de développer des outils qui permettront leur étude à l'échelle moléculaire, que ce soit en conditions physiologiques ou pathologiques.

L'objectif de cette thèse était donc de mettre au point des outils pour le décodage des voies métaboliques et signalétiques de la vitamine A aux échelles cellulaire et subcellulaire. Cela inclut l'identification de nouveaux métabolites et protéines nécessaires à ces voies métaboliques.

1.8.2. Solutions apportées par cette thèse

Afin de répondre au mieux à la problématique posée, le projet a été découpé en trois axes principaux (**Figure 24**).

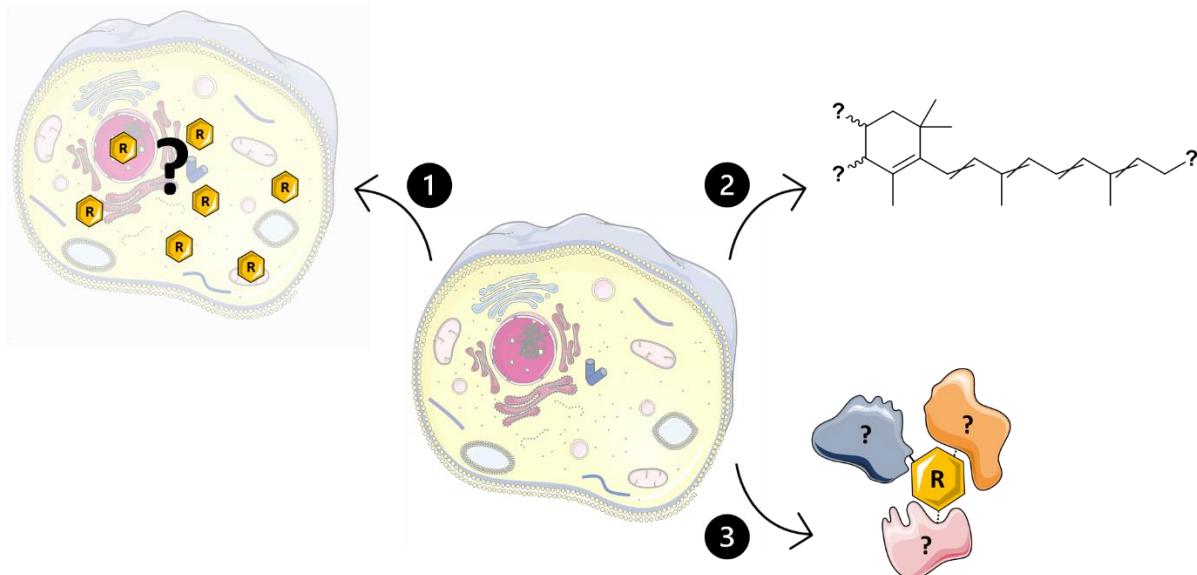


Figure 24. Illustration des trois axes de la thèse. Les hexagones jaunes représentent la vitamine A, quelle que soit sa forme. Les formes bleue, orange et rose désignent les partenaires d'interaction endogènes de la vitamine A.

Le premier axe porte sur l'étude de la distribution et du stockage des rétinoïdes au sein des cellules et des compartiments subcellulaires. Les outils ont été développés dans le but de travailler avec les techniques d'imagerie cellulaire. Cela a été réalisé par Alexia Kindler de l'équipe de Wojciech Krezel de l'IGBMC de Strasbourg et sera présenté dans le chapitre 3.

Concernant le deuxième axe, il est dédié à la capture, l'identification et la quantification de nouveaux métabolites de la vitamine A. Il a été choisi de travailler avec des techniques de spectrométrie de masse de grande précision. Les analyses qui seront présentées dans le chapitre 4 ont été effectuées par l'équipe de François Fenaille et Benoit Colsch du CEA de Paris Saclay.

Pour ce qui est du troisième axe, il s'oriente sur la capture et l'identification des partenaires d'interaction endogènes de la vitamine A et de ses récepteurs. Pour ce faire, ce sont des études de protéomiques qui ont été envisagées. Toutefois, par manque de temps, cet axe n'a pas pu être exploré. Les travaux préliminaires qui ont été conduits seront présentés dans les perspectives.

CHAPITRE 2 – SONDES RÉTINOÏDES

2.1. Introduction

2.1.1. Etat de l'art des sondes rétinoïdes existantes

Afin d'étendre les connaissances actuelles sur le métabolisme de la vitamine A, diverses méthodes ont déjà été utilisées. De notre côté, nous avons choisi une approche de chimie bioorthogonale, avec modification chimique des rétinoïdes afin d'en faire des sondes moléculaires fonctionnelles. Les travaux de la littérature rapportent plusieurs sondes rétinoïdes au cours des quinze dernières années, principalement développées par l'équipe d'Andrew Withing. On peut notamment citer le composé diphenylacétène EC23 (**Figure 25, A**) développé en 2008,²⁰⁴ présentant la capacité d'activer RAR β de la même façon que l'acide rétinoïque. De plus, sa capacité à induire la différenciation de cellules souches a été testée. Pour cela, les taux de différents marqueurs de différenciation des cellules pluripotentes (SSEA3, TRA-1-60 et A2B5) ont été suivis,²⁰⁵ montrant un comportement très proche de celui de l'acide rétinoïque. Néanmoins, EC23 n'a pas démontré la capacité à induire la transcription du gène codant pour CYP26A1. Cette enzyme, clé dans le métabolisme de la vitamine A, permet la formation des premiers métabolites de l'acide rétinoïque mais également l'élimination des rétinoïdes actifs.²⁰⁶ Cela a ainsi remis en question l'usage d'EC23 pour des études de métabolomique.

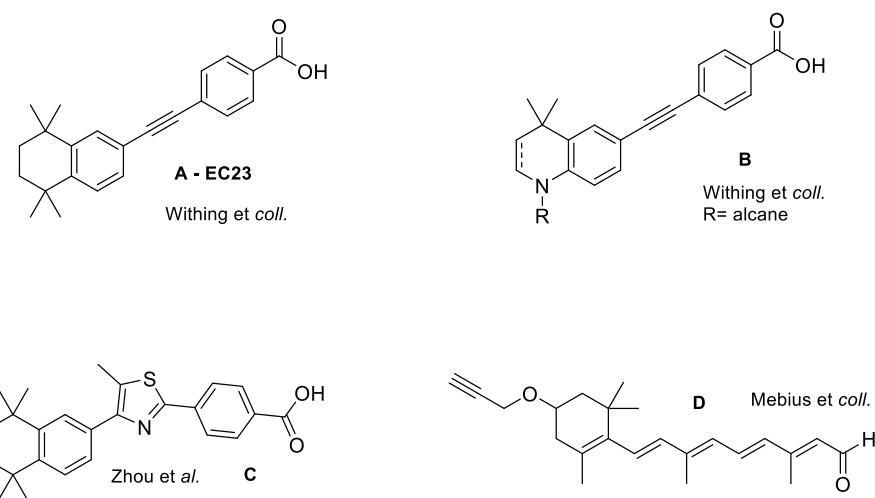


Figure 25. Structures des principales sondes rétinoïdes décrites dans la littérature.

Le même groupe a repris cette structure en 2019 et a remplacé le motif tétrahydronaphtalène par une dihydroquinoléine (**Figure 25, B**).²⁰⁷ Cela a conduit à des rétinoïdes synthétiques avec une importante fluorescence intrinsèque permettant des travaux d'imagerie cellulaire ne faisant appel à aucune autre molécule fluorochrome. La capacité de cette nouvelle catégorie de rétinoïdes à lier la protéine cellulaire de liaison aux rétinoïdes (CRABPII) a été évaluée. En effet, cette protéine joue un rôle majeur dans la prise en charge des rétinoïdes au niveau cellulaire puisqu'elle permet leur translocation du cytoplasme vers le noyau, jusqu'aux RARs.²⁰⁸ La liaison avec CRAPBII a pu être suivie par fluorescence et s'est révélée efficiente pour l'ensemble des dérivés, permettant même la détermination de constantes de dissociation (K_d) et une meilleure compréhension des sites d'interactions clés entre les deux molécules.²⁰⁷ Cependant, aucun autre test concernant la fonctionnalité de ces sondes n'est décrit, présentant un frein à son usage pour nos travaux.

Par la suite, Zhou *et al.* ont rapportés des structures directement dérivées d'EC23 dont l'alcyne central a été remplacé par un thiazole (**Figure 25, C**).²⁰⁹ Le potentiel de différenciation des cellules souches a été étudié grâce à différents marqueurs (SSEA3, TRA-1-60 et A2B5) et seul un composé a montré une activité quasi identique à celle de l'acide rétinoïque. Toutefois, dans des travaux ultérieurs,²¹⁰ cette molécule a montré une faible capacité à se lier aux RAR α et RAR β (deux fois moindre que pour l'acide rétinoïque), réduisant significativement le champ de ses activités biologiques. Aussi, bien qu'une dizaine de composés de ce type soient décrits dans la littérature, un seul présente la capacité de différenciation des cellules pluripotentes, montrant des limitations structurales fortes.

De façon plus prometteuse pour des études de métabolomique, on trouve les travaux de Mebius *et coll.*, qui décrivent des rétinoïdes structurellement et fonctionnellement non-distinguables des rétinoïdes naturels (**Figure 25, D**). En effet, ils possèdent le même squelette isoprénoïde, ainsi que le cyclohexène triplement méthylé et ne se différencient des rétinoïdes naturels que par la modification de la position C3. Leurs travaux de 2019 visaient à approfondir les connaissances sur la famille des RALDHs²¹¹ en développant une sonde basée sur le substrat naturel de cette famille, à savoir le rétinal. L'objectif était de parvenir à suivre l'activité de ces enzymes au sein de diverses lignées cancéreuses afin d'expliquer la capacité de certaines lignées à produire l'acide rétinoïque, ce qui a été réalisé avec succès. Ils ont à nouveau employé ce type de

dérivés en 2021 dans le but, cette fois, de suivre la vitamine A dans des cellules immunitaires humaines.²¹² Le potentiel des sondes à être internalisées dans différents types de cellules immunitaires a été suivie grâce à une sonde fluorescente azidée commerciale. Il en est ressorti que l'internalisation se fait de façon plus ou moins importante selon le type cellulaire, rendant possible l'étude du métabolisme de la vitamine A dans ces cellules. En revanche, bien que les molécules décrites soient très proches des rétinoïdes naturels, elles requièrent un important travail de synthèse. En effet, la modification de la position C3 des rétinoïdes nécessite une synthèse totale en onze étapes, conduisant à un rendement inférieur à 10% et à la manipulation de nombreux intermédiaires sensibles, en particulier à la photoisomérisation.

De cette façon, les travaux de la littérature ne présentent aucune solution satisfaisante pour les besoins de nos travaux. Nous avons donc choisi de nous orienter sur une autre stratégie en réalisant la modification chimique tardive de rétinoïdes naturels commerciaux.

2.1.2. Etat de l'art des stratégies bioorthogonales

Afin que les rétinoïdes modifiés prennent place dans une stratégie applicable à l'ensemble des axes du projet, nous nous sommes orientés vers la chimie bioorthogonale. Ce terme, défini par Carolyn R. Bertozzi à la fin des années 1990, désigne un ensemble de réactions présentant des caractéristiques communes. Celles-ci doivent avoir lieu à température et pH physiologiques, être rapides, former des adduits stables, être hautement sélectives et surtout, ne pas interférer avec les processus biologiques. Également, les rapporteurs doivent être faciles à insérer sur les biomolécules d'intérêt, et ni les réactifs ni les produits ne doivent induire de toxicité pour les cellules et l'organisme. Au sein de cette boîte à outils développée au cours des dernières décennies, nous avions le choix entre plusieurs approches.^{213,214}

Premièrement, la ligation de Staudinger, dont l'inconvénient majeur est le recours à une phosphine, espèce rapidement oxydée en milieu biologique.²¹⁵ Cela engendrerait une diminution de la vitesse de réaction, déjà moindre en comparaison des autres méthodes, et qui se répercuterait sur la sensibilité de la détection. Pour ce qui est de la Diels Alder à Demande Électronique Inverse (IEDDA), elle présente une vitesse de réaction élevée, ce qui est particulièrement intéressant pour une application sur

cellules vivantes.²¹⁶ Elle requiert d'une part un diène, plus précisément une tétrazine, dont les propriétés peuvent être modulées grâce à un ou plusieurs groupements électroattracteurs. D'autre part, elle fait appel à un diénophile, à savoir un cycloalcène à 3, 6 ou 8 chainons et portant un ou plusieurs groupements électrodonneurs. Ainsi, il s'agit de deux fonctions stériquement encombrantes qui, si elles étaient introduites sur le rétinoïde, impacteraient fortement son activité biologique. Dans le cas de la Cycloaddition de Huisgen (CuAAC), les sels de cuivre (I) amènent une réaction très rapide, idéale pour l'étude de phénomènes biologiques en temps réel.²¹⁷ Cependant, ce métal, de par sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), est toxique pour les cellules vivantes, ce qui a longtemps limité l'usage de cette réaction aux cellules fixées.²¹⁸ Pour pallier ce problème, une librairie de ligands du cuivre a été développée.²¹⁹ Ceux-ci permettent la formation d'un nouveau système catalytique, à savoir une espèce possédant deux atomes de cuivre liés à un seul ligand polydentate. En plus de réduire la toxicité du cuivre, cela va également mener à une augmentation significative de la vitesse de réaction. Ces ligands, principalement basés sur un motif *tris(triazolylméthyle)amine*, présentent cependant des problèmes de solubilité en milieu aqueux. Afin de les pallier, de nouveaux ligands, inspirés des ligands naturels du cuivre, à savoir la glycine et l'histidine, ont été rapportés.²²⁰ Bien que ces systèmes aient été utilisés pour réaliser des réactions de marquage extracellulaire *in vivo*,²²¹ il reste difficile de les employer pour des marquages intracellulaires du fait de leur faible perméabilité aux membranes et de la désactivation plus ou moins importante du complexe catalytique en milieu intracellulaire.²²² Finalement, c'est la Cycloaddition Azoture-Alcyne favorisée par la Contrainte (SPAAC) qui remplit l'ensemble des critères requis pour nos travaux.²²³ En effet, elle requiert un azoture d'un côté et un alcyne contraint de l'autre. Le premier, grâce à sa petite taille et à sa stabilité, peut être inséré sur les rétinoïdes, avec un risque minimal d'impact sur leurs activités biologiques.²²⁴ Pour ce qui est de l'alcyne tendu, il est possible de le choisir dans une vaste librairie de composés mono ou polycycliques, présentant un ou plusieurs hétéroatomes.^{225,226} De fait, afin de moduler leur cinétique de réaction mais aussi leur stabilité, il a été nécessaire de modifier les structures des alcynes contraints. Une partie de ces alcynes est présentée dans la **Figure 26**.

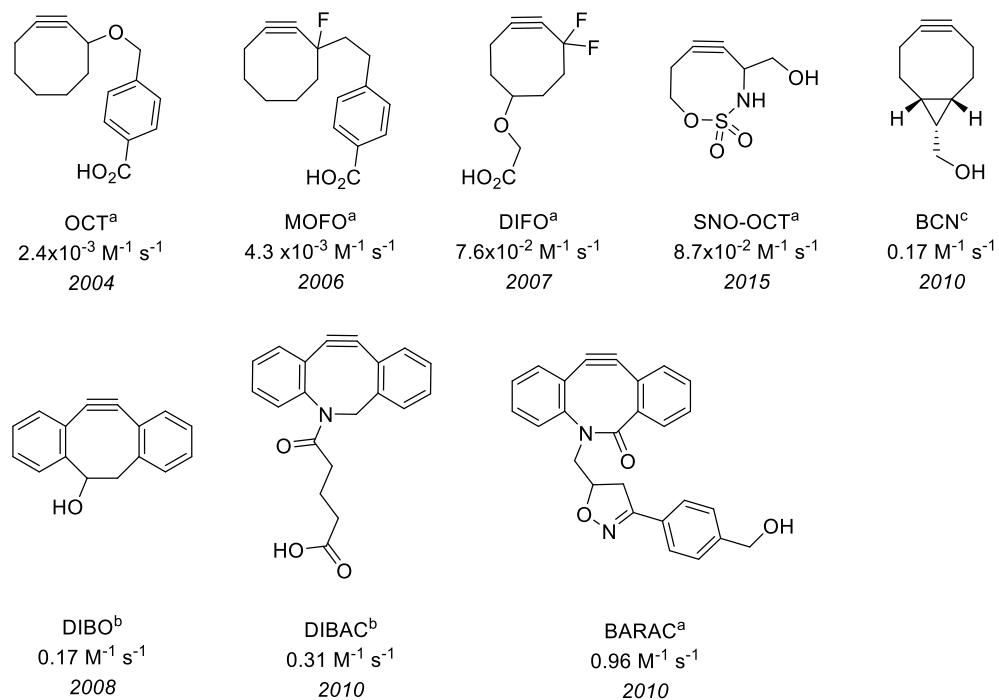


Figure 26. Liste non exhaustive d'alcynes contraints développés depuis le début des années 2000. Toutes les cinétiques ont été réalisées avec l'azoture de benzyle, à température ambiante, dans les solvants suivants : a CD_3CN ; b $MeOD$; c 3/1 CD_3CN/D_2O .

La cyclooctyne (OCT) est le premier alcyne tendu à avoir été synthétisé par l'équipe de Carolyn R. Bertozzi en 2004.²²⁷ Afin d'augmenter sa réactivité, un atome de fluor a été introduit en position propargylique (MOFO), suivi d'un second (DIFO), permettant une cycloaddition trente fois plus rapide.²²⁸ Par la suite, toujours dans un soucis de cinétique, les cyclooctynes (di)benzoannulées, à savoir la dibenzocyclooctyne (DIBO), la dibenzoazacyclooctyne (DIBAC) et la biarylazacyclooctynone (BARAC) ainsi que leurs formes dérivées, ont été synthétisées.²²⁹ Il a été admis que leur réactivité accrue est due à une forte augmentation de la contrainte, résultant du nombre important de carbones hybridés sp^2 sur l'ensemble de la structure. Cependant, bien que hautement réactives, ces molécules sont également très instables, encourageant la recherche parallèle d'autres structures. C'est ainsi que l'*endo*-9-hydroxyméthylbicyclo[6.1.0]nonyne (*endo* BCN) a été préparé. Malgré une réactivité moindre en comparaison des cyclooctynes (di)benzoannulées, le BCN possède une meilleure stabilité et une synthèse plus courte et plus simple.²³⁰ Néanmoins, les travaux se poursuivent, à la recherche de l'équilibre idéal entre réactivité et stabilité,^{231,232} avec notamment la classe des cyclooctynes hétérocycliques contenant du soufre, de l'azote et de l'oxygène, notée SNO-OCTs, dont les structures sont modulable.^{233,234}

Concernant les applications de la SPAAC, elles sont très variées. On peut tout d'abord noter un usage pour le marquage ou la modification de biomolécules. En effet, elle est employée pour le marquage de diverses protéines²³⁵ mais aussi comme méthode de bio-conjugaison sur le site N-glycane des anticorps.²³⁶ Elle permet également de mettre en place divers outils thérapeutiques visant au ciblage actif de tumeurs solides,²³⁷ à la réduction de la croissance tumorale,²³⁸ à l'internalisation facilitée de nanoparticules portant une drogue,²³⁹ ou encore à la délivrance ciblée de molécules médicamenteuses afin de minimiser les effets secondaires de la thérapie utilisée.²⁴⁰ Cette méthode de chimie bioorthogonale est aussi employée en imagerie *in vivo* avec, par exemple, l'étude du devenir de différentes cellules, après leur transplantation : cellules chondrocytes,²⁴¹ souches²⁴² ou encore de type T.²⁴³ Enfin, la SPAAC présente un fort intérêt pour le milieu biomédical. De fait, en 2013 a été réalisée la première synthèse d'un hydrogel réticulé biocompatible pour un usage *in vivo* à l'aide de cette réaction.²⁴⁴ Cette technologie a ensuite pu être appliquée à la fabrication d'organes sur puce²⁴⁵ et à l'étude des polymères biocompatibles.²⁴⁶

Nous avons donc retenu la SPAAC pour nos travaux. Il nous a ainsi fallu travailler d'une part sur l'insertion d'un azoture sur les rétinoïdes et d'autre part sur la synthèse de sondes portant un alcyne constraint. Le travail sur les sondes sera décrit dans les chapitres 3 et 4.

2.1.3. Insertion de l'azoture sur les rétinoïdes

Le premier azoture organique a été synthétisé en 1860 par Peter Griess mais l'essor de ces nouveaux composés organiques a débuté au milieu du 20^{ème} siècle, avec l'apparition de nombreuses réactions: réarrangement de Curtius,²⁴⁷ transfert de diazo de Regitz,²⁴⁸ réduction et ligation de Staudinger,^{249,250} réaction d'aza-Wittig,²⁵¹ réarrangement sigmatropiques [3,3],²⁵² réaction de Mitsunobu,²⁵³ réarrangement de Hemetsberger²⁵⁴... Cependant, sa structure a été débattue pendant plusieurs années (**Figure 27**). En effet, Huisgen proposait en 1894 une forme cyclique de type triazirine. Néanmoins, cette forme n'expliquant pas la réactivité de l'azoture, Thiele a avancé en 1911, une structure linéaire impliquant un azote pentavalent, peu probable. C'est ce dernier qui a poussé les investigations à se poursuivre et c'est finalement Pauling, en

1917, qui a proposé des formes de résonance, expliquant les propriétés réactionnelles de l'azoture.



Figure 27. Structures de la fonction azoture proposées successivement par Huisgen, Thiele et Pauling. R est quelconque.

L'azoture présente l'avantage de pouvoir être introduit pour lui-même ou en tant que précurseur de divers autres groupements fonctionnels tels que les amides,²⁵⁵ les amines²⁵⁶ ou encore la plupart des hétérocycles azotés.²⁵⁷ Ainsi, les azotures sont des synthons clés pour de nombreuses applications, que ce soit dans le domaine médicale, de la biologie ou des matériaux. On peut par exemple citer la modification de nucléosides dans le but d'en faire des traitements antiviraux^{258,259,260} mais aussi l'insertion d'azoture sur anticorps afin d'obtenir des bio-conjugaisons site-spécifiques.²⁶¹ De plus, la synthèse de nombreux polymères peut être effectuée par cycloaddition.²⁶² C'est pour permettre l'ensemble de ces applications que la synthèse des molécules azidées a été largement rapportée. En particulier, les stratégies développées permettent une insertion tardive de l'azoture, sur des molécules souvent complexes, évitant ainsi les risques de réactions secondaires au cours de la synthèse. Avant d'investiguer la littérature, il a fallu déterminer la position idéale pour l'insertion de l'azoture sur le squelette rétinoïde (**Figure 28**).

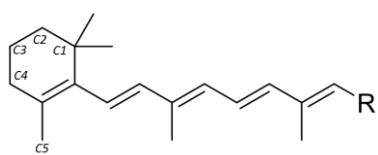


Figure 28. Structure générale d'un rétinoïde dont les carbones discutés ici ont été numérotés. R=CHO, CH₂OH ou CO₂H.

Pour cela, l'acide rétinoïque a été modélisé au sein du RAR α (**Figure 29, A**), révélant l'interaction de la partie carbonyle avec plusieurs résidus du récepteur (**Figure 29, B**). Cette position ne peut donc pas porter l'azoture sous peine de modifier l'interaction ligand-récepteur et donc les effets biologiques des rétinoïdes. Également, la chaîne isoprénoïde, avec ses substituants, se trouve dans la poche catalytique (**Figure 29, C et D**). Bien qu'aucune interaction avec les résidus de celle-ci ne soit notée, l'azoture présente la capacité de former des liaisons hydrogènes, ce qui pourrait, à nouveau,

modifier l'interaction ligand-récepteur. Ainsi, seule la partie cyclohexène triplement méthylée semble être suffisamment extérieure à la poche catalytique pour être modifiée (**Figure 29, C et D**).

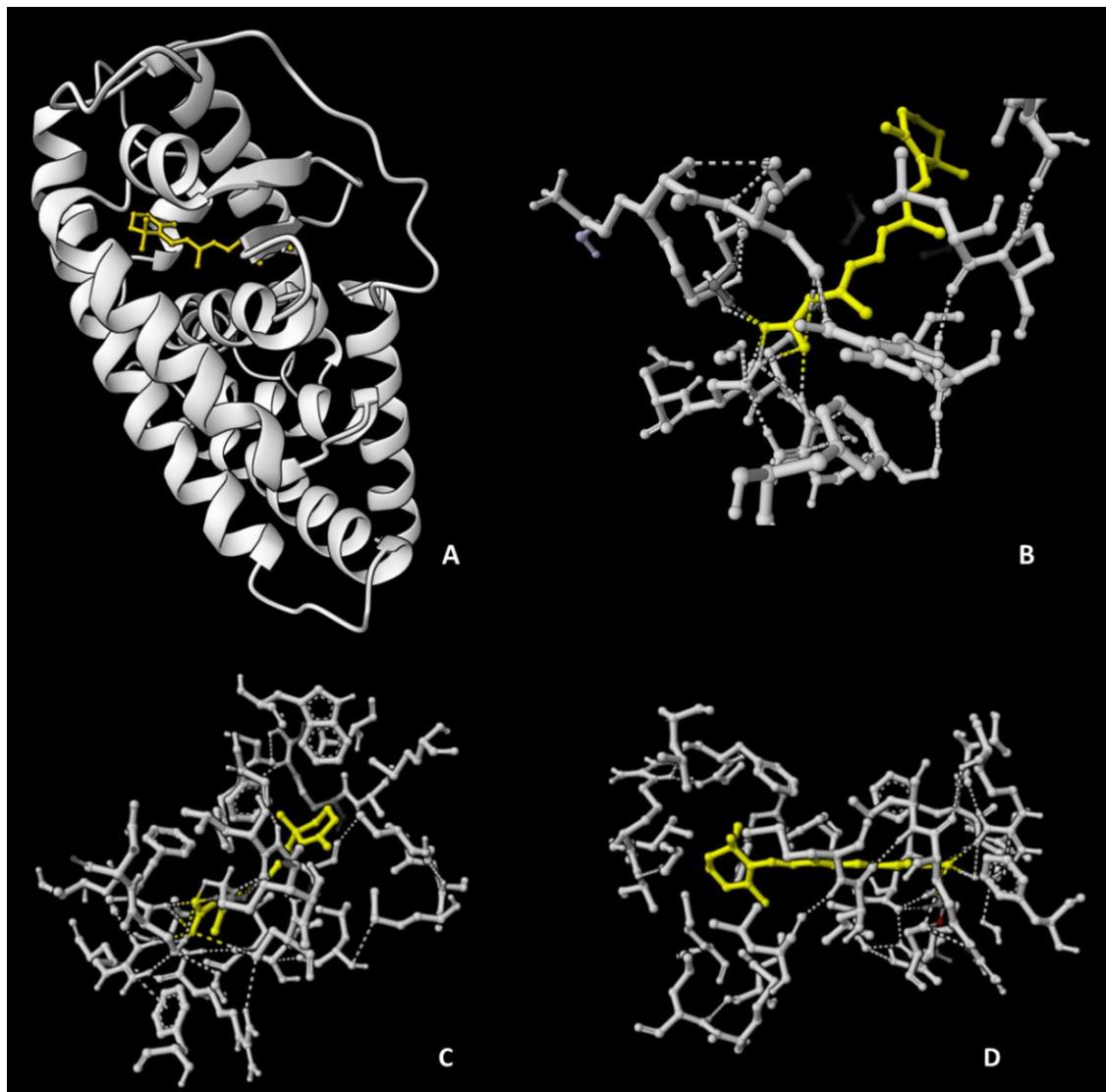


Figure 29. Modélisation de l'acide rétinoïque dans le récepteur RAR α . Modélisation moléculaire réalisée avec Mol*. En jaune, l'acide rétinoïque all-trans. En blanc, le RAR α . Les interactions non-covalentes apparaissent en pointillé. A : vue intégrale de l'acide rétinoïque all-trans dans son récepteur ; B, C, D : vues rapprochées, ne modélisant que l'acide rétinoïque, les résidus d'intérêt du récepteur et les interactions non-covalentes entre les deux molécules.

Six positions sont accessibles. Tout d'abord, les méthyles en position géminale sur le carbone C1 mais qui ne possèdent pas la réactivité nécessaire pour être modifiés de façon tardive. Il en va de même pour les positions C2 et C3. Ainsi, seules les positions allyliques C4 et C5 présentent une possibilité de modification en « late-stage ». Néanmoins, la position C4 est endocyclique secondaire tandis que la position C5 est

exocyclique primaire. De cette façon, quel que soit le mécanisme de la réaction d'insertion d'azoture, la position la plus favorable sera l'endocyclique secondaire. En effet, si un radical est formé, il sera plus stable s'il est secondaire et, si un cation se forme et doit être stabilisé par délocalisation de la double liaison, la nouvelle double liaison sera plus favorable en endocyclique qu'en exocyclique, du fait du cycle à six chainons. Nous avons donc retenu la position allylique C4 pour l'introduction de l'azoture sur les rétinoïdes.

Nos recherches se sont alors orientées vers les stratégies d'insertion d'azoture en position allylique. La méthode la plus utilisée consiste à substituer un groupement partant par un azoture. Cela peut se faire en une seule étape si le groupement est déjà présent ou en deux dans le cas où le groupement partant doit être introduit.²⁶³ Néanmoins, les travaux présentés font appel à un catalyseur métallique couplé à un acide de Lewis.²⁶⁴ Dans le cas des rétinoïdes, l'acide de Lewis risquerait d'activer le carbonyle, rendant cette position préférentielle pour l'addition de l'azoture. De plus, aucun essai n'a été rapporté sur des structures polyéniques, en particulier conjuguées. Parmi les autres méthodologies, on peut citer la conversion d'allènes en azoture allyliques. Elle peut être réalisée tardivement ou au cours de la synthèse.²⁶⁵ Cependant, la formation d'un allène sur la position C4 d'un rétinoïde n'est pas possible. Enfin, on trouve les activations de liaisons C-H, pour lesquelles la formation *in situ* d'un iodure hypervalent est requise.²⁶⁶ Toutefois, ce dernier pourrait entraîner la formation d'un iodonium au sein du système isoprénioïde du rétinoïde, résultant en un mélange complexe de produits et/ou en l'insertion aléatoire de la fonction azoture. Ainsi, on peut noter qu'il existe peu de stratégies visant à la formation d'azotures allyliques, que ce soit en « late-stage » ou non. Ceci peut s'expliquer par la capacité de la plupart de ces molécules à se remanier spontanément selon le réarrangement de Winstein (**Schéma 6**). Cela conduit à des mélanges d'isomères non-désirés, difficiles à séparer et amenant des rendements très faibles, diminuant l'intérêt pour ce type d'azotures. Il est possible d'éviter ce réarrangement mais le cas de chacun des azotures allyliques doit être préalablement étudié afin de choisir les conditions adéquates d'insertion (température, durée de réaction et choix précis des réactifs).²⁶⁷

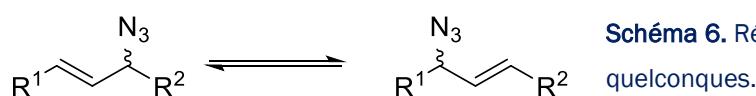


Schéma 6. Réarrangement de Winstein avec R¹ et R² quelconques.

Les méthodes d'insertion en position allylique étant peu nombreuses, nous avons investigué la littérature à la recherche d'autres stratégies d'azidation pouvant être adaptées à ces molécules à la fois très apolaires, photosensibles et sensibles à l'oxygène. Parmi l'ensemble des méthodologies décrites, la majorité va à la synthèse d'azotures aliphatiques ou benzyliques et est basée sur l'activation de la liaison C-H visée. Cette dernière peut se faire de nombreuses façons (métaux, iodé hypervalent...), qui ont évolué au fil des travaux dans le domaine.²⁶⁸ On peut tout d'abord citer une approche développée par Huang *et al.* qui s'applique aux azidations aliphatiques (primaires, secondaires, tertiaires) et benzyliques.²⁶⁹ Celle-ci requiert une catalyse au manganèse complexé par des ligands spécifiques et l'usage d'un oxydant iodé. Également, Rabet *et al.* rapportent une azidation en position benzylique en utilisant à la fois un iodé hypervalent, un catalyseur métallique (cuivre ou ruthénium) et la lumière visible.²⁷⁰ Ces rapports montrent que ce type de réaction, même sur des positions plus activées comme les positions benzyliques, nécessite une importante activation multi factorielle. De plus, ils présentent des paramètres incompatibles avec les rétinoïdes, en particulier la lumière et l'usage de catalyseurs avec une structure type catalyseur de Jacobsen, décrit pour réaliser efficacement des époxydations.²⁷¹ Dans les méthodes plus douces, on peut nommer l'abstraction radicalaire d'un proton, à l'aide d'un agent radicalaire dédié. Cette réaction, bien qu'ayant une sélectivité modulable, fait généralement appel à une catalyse avec des complexes du fer. Elle est suivie d'un transfert d'azoture vers le carbone portant le radical préalablement formé grâce à un agent de transfert, le plus souvent iodé.²⁷² Cette méthode ne peut pas être appliquée aux rétinoïdes sans un risque important de réactions secondaires, dues à la capacité des complexes de fer à former des radicaux sur les doubles liaisons.²⁷³ En parallèle de ces travaux, des études de mono ou di-azidation sur les oléfines ont été menées. Une fois encore, les stratégies mises en œuvre font appel à un métal couplé à une seconde source d'activation telle qu'un iodé hypervalent²⁷⁴ ou la lumière visible.²⁷⁵ De fait de la structure polyénique des rétinoïdes, cette méthode ne peut pas leur être appliquée. Ainsi, aucune des méthodologies présentes dans la littérature n'est utilisable pour l'azidation allylique des rétinoïdes.

Il a donc été nécessaire de nous orienter vers le développement d'une nouvelle stratégie d'insertion tardive d'azoture en position allylique de polyènes tels que les rétinoïdes. Pour la mise au point de cette méthode, et comme première sonde

rétnoïde, nous avons choisi le rétinal *all-trans* (*at*RAL). Cette forme de la vitamine A a été sélectionnée car elle permet d'accéder à l'acide rétnoïque *all-trans* (*at*AR), mais aussi au rétinol *all-trans* (*at*ROL), en une seule étape enzymatique (**Chapitre 1, Schéma 3**).

2.2. Azidation de la position C4 du rétinal *all-trans*

2.2.1. Optimisation de la réaction

Comme point de départ de nos travaux, nous avons noté ceux d'Anil Kumar Singh, publiés en 1983²⁷⁶ et repris en 2007 par Hashimoto,²⁷⁷ décrivant la préparation de dérivés oxygénés du rétinal sur la position C4 via une activation du rétinal au N-bromosuccinimide (NBS). Bien que le mécanisme reste difficile à déterminer et les dérivés du rétinal peu caractérisés, il nous a semblé que l'optimisation des conditions de réaction avec des méthodes modernes pourrait conduire à un processus d'activation propre menant à l'introduction nucléophile de l'azoture en position C4. Cette hypothèse a également été étayée par le rapport de Sheves *et al.* en 1984,²⁷⁸ suggérant la formation d'un intermédiaire photoréactif azidé lors de l'ajout d'un excès d'azoture de sodium après une activation au NBS.

À partir de ces conditions d'activation originales, l'*at*RAL a été soumis à des conditions extrapolées à partir du rapport de Sheves (**Schéma 7**) : l'*at*RAL a d'abord été mis en réaction avec du NBS dans du CCl₄ pendant 10 minutes à -20 °C avant d'ajouter de l'azoture de sodium et d'agiter la réaction pendant 2 heures (**Tableau 4, entrée 1**). Cependant, aucune conversion de l'*at*RAL n'a été observée et les variations du temps de réaction ou de la température n'ont entraîné aucun changement notable.

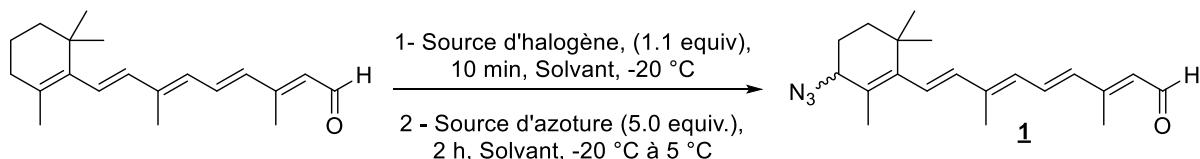


Schéma 7. Conditions réactionnelles pour l'insertion d'un azoture sur la position C4 de l'*at*RAL. La source d'halogène, le solvant ainsi que la source d'azoture ont été modifiés successivement.

La première étape de la réaction étant limitante, un manque de solubilité de la source de brome a été suspectée. Afin de pallier ce problème, et compte tenu de la toxicité du CCl_4 , il a été remplacé par le dichlorométhane (**Tableau 4, entrée 2**). Cela a conduit à une conversion totale de l'*atRAL*, confirmant notre hypothèse. Cependant, un mélange de **1** et d'un sous-produit non identifié a été obtenu dans les proportions 60/40. Les investigations ont été poursuivies en changeant la source d'azoture (**Tableau 4, entrée 3**), amenant à une conversion totale en azido rétinal **1** attendu. Les conditions de l'entrée 3 ont ainsi été considérées comme optimales. Les effets de l'agent électrophile ont ensuite été examinés (**Tableau 4, entrées 4 à 7**). Que ce soit avec l'iode ou le chlore, aucune conversion n'a eu lieu, ce qui peut s'expliquer d'une part par la taille de l'iode (rayon 20% supérieur à celui du brome) et d'autre part par une réactivité du chlore inférieure à celle du brome. En changeant le type d'agent bromant, deux résultats distincts ont été obtenus. Avec le 1,3-dibromo-5,5-diméthylhydantoïne (DBDMH), une forte dégradation du rétinal a été observée tandis que le tribromure de tétrabutylammonium (TBATB) a mené au même résultat que l'entrée 3. Du fait du coût bien plus important de TBATB par rapport au NBS, nous avons choisi de conserver les conditions de l'entrée 3 pour notre nouvelle méthode d'insertion d'azoture en position allylique.

Entrée	Source d'halogène	Source d'azoture	Solvant	Conversion (%)
1	NBS	NaN_3	CCl_4	0
2	NBS	NaN_3	CH_2Cl_2	100
3	NBS	TBAN_3	CH_2Cl_2	100
4	NIS	TBAN_3	CH_2Cl_2	0
5	NCS	TBAN_3	CH_2Cl_2	0
6	TBATB	TBAN_3	CH_2Cl_2	100
7	DBDMH	TBAN_3	CH_2Cl_2	Dégradation

Tableau 4. Conditions testées pour l'optimisation de l'insertion d'azoture en position C4 de l'*atRAL* en passant par un intermédiaire halogéné. La conversion a été suivie par HPLC analytique à 370 nm.

Après avoir optimisé les conditions de réaction, il a également été nécessaire d'optimiser la purification de l'azido rétinal. En effet, lors de la synthèse, un phénomène d'isomérisation a été observé. Ce dernier ne correspond pas à l'insertion de l'azoture qui peut se faire de façon identique sur les deux faces de la molécule car un dédoublement marqué des signaux RMN est observé. Celui-ci est associé à un chromatogramme présentant un pic unique en HPLC. L'isomère majoritaire, 85% basé sur le proton géminal de l'azoture, est le *all-trans*. Le second (15%) n'a pas été identifié bien que la forme la plus probable soit l'isomère *11-cis*. Sur la **Figure 30** ont été attribués les déplacements chimiques de l'ensemble des protons des deux isomères d'après les travaux de Wang *et al.*²⁷⁹ On note que seuls les quatre signaux en rouge présentent un déplacement chimique différent.

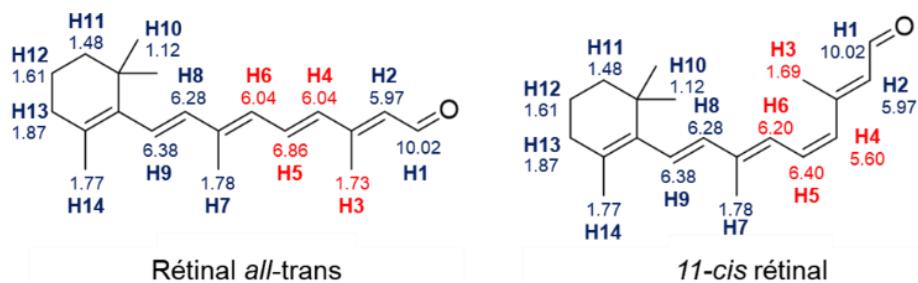


Figure 30. Déplacements chimiques des protons du rétinal *all-trans* et du rétinal *11-cis* selon les travaux de Wang *et al.* En rouge sont notés les déplacements chimiques qui varient entre les deux isomères de la molécule. Les protons ont été numérotés pour faciliter leur nomination.

Bien que les spectres ne soient pas décrits pour les composés azidés en position C4, il est tout de même possible de transposer les déplacements chimiques à ces derniers. Il est important de noter que les déplacements fournis en **Figure 30** sont ceux de la littérature et sont donc légèrement différents des nôtres, qui plus est avec l'azoture en C4. Parmi les quatre signaux présentant une différence de déplacement chimique, seul le proton H4 a pu être intégré de façon claire pour illustrer l'isomérisation (**Figure 31, A**). En effet, les signaux des protons H5 et H6 se superposent avec les signaux de H8 et H9, résultant en un massif complexe entre 6.5 et 7.1 ppm. Pour ce qui est de H3, il se trouve inclus dans les signaux de H11 et H12 du mélange. Un second proton a pu être intégré de sorte à montrer cette isomérisation : le proton géminal de l'azoture noté H13 (**Figure 31, A**). On peut voir que le ratio est identique et les deux triplets distincts. Après de nombreux essais, nous sommes parvenus à isoler l'isomère *all-trans* de l'azido rétinal à 97% de pureté, selon la RMN du proton (**Figure 31, B**) avec un

rendement isolé de 22%. Par la suite, les structures seront présentées sous leur forme majoritaire, à savoir la forme *all-trans*.

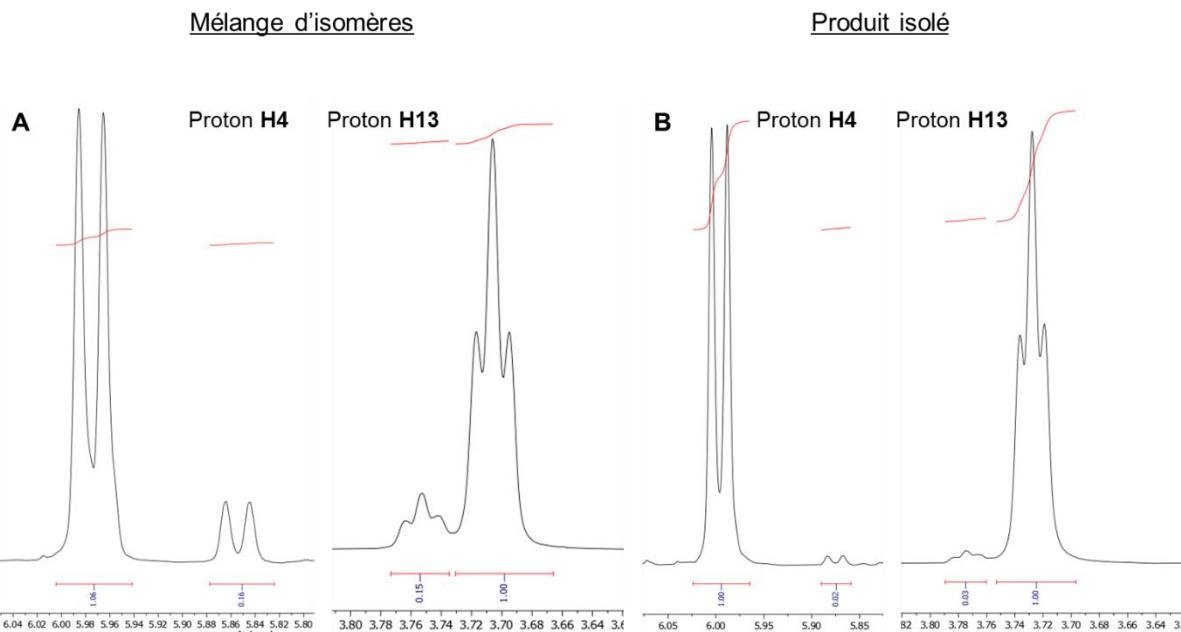


Figure 31. A: Extraits du spectre RMN proton du mélange obtenu lors de l'insertion de l'azoture sur le rétinal *all-trans* avant purification. Le signal intégrant pour 1.00 est celui de l'isomère *all-trans*. Celui intégrant pour 0.15 est celui du second isomère. B : Extraits du spectre RMN proton du mélange obtenu lors de l'insertion de l'azoture sur le rétinal *all-trans* après purification. Le signal intégrant pour 1.00 est celui de l'isomère *all-trans*. Celui intégrant pour 0.02 est celui du second isomère.

2.2.2. Proposition de mécanisme pour l'insertion de l'azoture

Le NBS est un réactif principalement utilisé pour l'insertion d'un ou plusieurs atomes de brome sur des liaisons carbone-carbone insaturées,²⁸⁰ des composés aromatiques²⁸¹ ou encore des positions allyliques.²⁸² Son mécanisme d'action à longue échéance a été discuté, entre l'approche radicalaire proposée par Bloomfield en 1944²⁸³ et l'approche ionique de Goldfinger, décrite en 1953,²⁸⁴ avant d'admettre que les deux mécanismes co-existent. Dans le cas de la bromation allylique utilisant le NBS, appelée réaction de Wohl Ziegler, un activateur est toujours requis : lumière, chaleur, microondes ou encore initiateur radicalaire chimique.^{285,286} Afin d'élucider le type de mécanisme ayant lieu dans notre cas, la réaction a été conduite en l'absence stricte de promoteur radicalaire chimique, d'oxygène ou encore de lumière. Dans ce contexte, il s'est avéré que la formation du produit n'a pas été affectée, ce qui exclut

la possibilité d'un processus radicalaire et tend vers une activation du rétinal *via* un intermédiaire bromonium.

Pour étayer cette hypothèse, différentes sources d'ion bromonium décrites dans la littérature ont été testées lors de l'optimisation des conditions de réaction (**Tableau 4, entrées 6 et 7**).²⁸⁷ Si le DBDMH a conduit à la dégradation de l'*at*RAL, le TBATB a lui bien permis l'obtention du N₃ RAL attendu. La dégradation induite par le DBDMH peut s'expliquer par le fait qu'il est couramment utilisé pour l'insertion, simple ou double, d'atomes de brome sur les oléfines et donc susceptible de conduire à de nombreuses réactions parasites.²⁸⁸ Le TBATB présentant un mécanisme de bromation ionique,²⁸⁹ l'hypothèse que l'activation de la position C4 procéderait par l'intermédiaire d'un ion bromonium s'en trouve renforcée.

Cette espèce très sensible n'a pas pu être isolée mais des études RMN et MS ont validé la formation d'un intermédiaire bromonium ponté. Dans un premier temps, une analyse de masse a permis la détection d'un ion avec un *m/z* = 363.1316 (**Figure 32**).

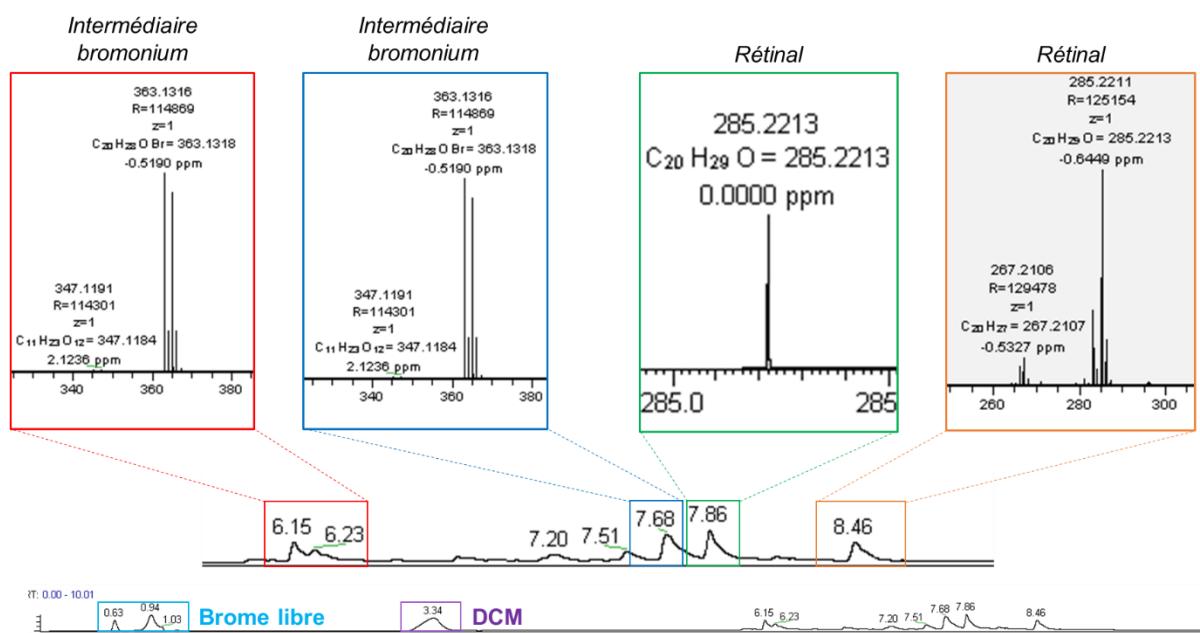


Figure 32. Analyse par LC-MS de la réaction 3 min après l'ajout du NBS dans le milieu. Les signaux dans l'encadré bleu clair (centré sur 0.94 min) ne sont pas des rétinoïdes selon la trace PDA. Selon la masse, il s'agit de brome libre. Les signaux à 7.20 min et 7.51 min n'ont pas donné de masse associée. Les encadrés rouge (centré sur 6.20 min) et bleu foncé (7.68 min) correspondent à un *m/z* = 363.1316 et présentent la signature associée à un atome de brome. Il s'agit de l'intermédiaire bromé recherché. Les encadrés vert (7.86 min) et orange (8.46 min) correspondant à un *m/z* = 285.2213, sans signature bromée. Il s'agit du rétinal n'ayant pas encore réagit.

Cette masse peut correspondre à trois espèces distinctes (**Figure 33**), avec un écart de 0.52 ppm : un bromonium ponté **A** ou ouvert **B** ou une espèce portant un brome allylique **C**.

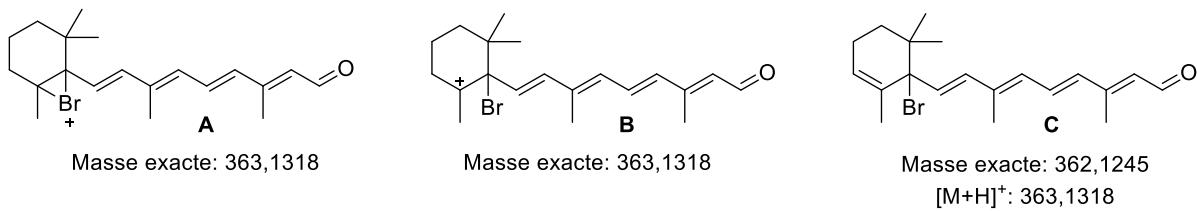


Figure 33. Formes possibles de l'intermédiaire bromé détecté par l'analyse LC-MS.

Ce sont ensuite les études RMN, en particulier du carbone par analyse DEPT135, qui ont permis de conclure sur une forme bromonium pontée. Tout d'abord, le spectre présente trois signaux CH_2 (**Figure 35**) correspondant aux trois méthylènes du cycle à six chainons de l'intermédiaire chargé, tandis que seuls deux signaux sont attendus dans le cas de l'intermédiaire non-chargé (**Figure 34**). Également, un signal à 59.8 ppm est détecté, concordant avec la forme bromonium pontée. Dans le cas de la forme allylique neutre, un signal aux alentours de 70 ppm pour la liaison C-Br est attendu tandis que pour la forme chargée ouverte, ce sont des signaux à 80 et 224 ppm qui sont escomptés (**Figure 34**). Or, aucun de ces trois signaux n'est présent sur le spectre.

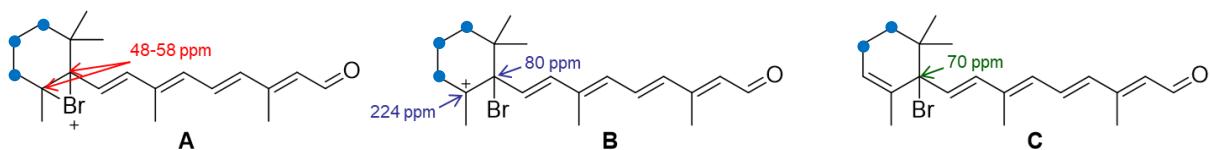


Figure 34. Déplacements chimiques attendus pour les carbones signatures de chacune des espèces possibles. En bleu foncé sont indiqués les CH_2 .

Ainsi, la forme intermédiaire détectée est le bromonium ponté **A**. Ce résultat est étayé par les travaux de la littérature. En effet, l'observation directe d'ions bromoniums pontés stables a pu être réalisée en phase gazeuse.²⁹⁰ Ces études ont été accompagnées de calculs *ab initio* de façon à déterminer les formes les plus stables de nombreux ions halogénés, pontés ou non.²⁹¹ Il s'est avéré que le bromonium tend systématiquement à se ponter de façon à stabiliser son énergie. De plus, sa durée de vie est bien supérieure à celle des formes ouvertes, rendant sa détection possible.^{292,293}

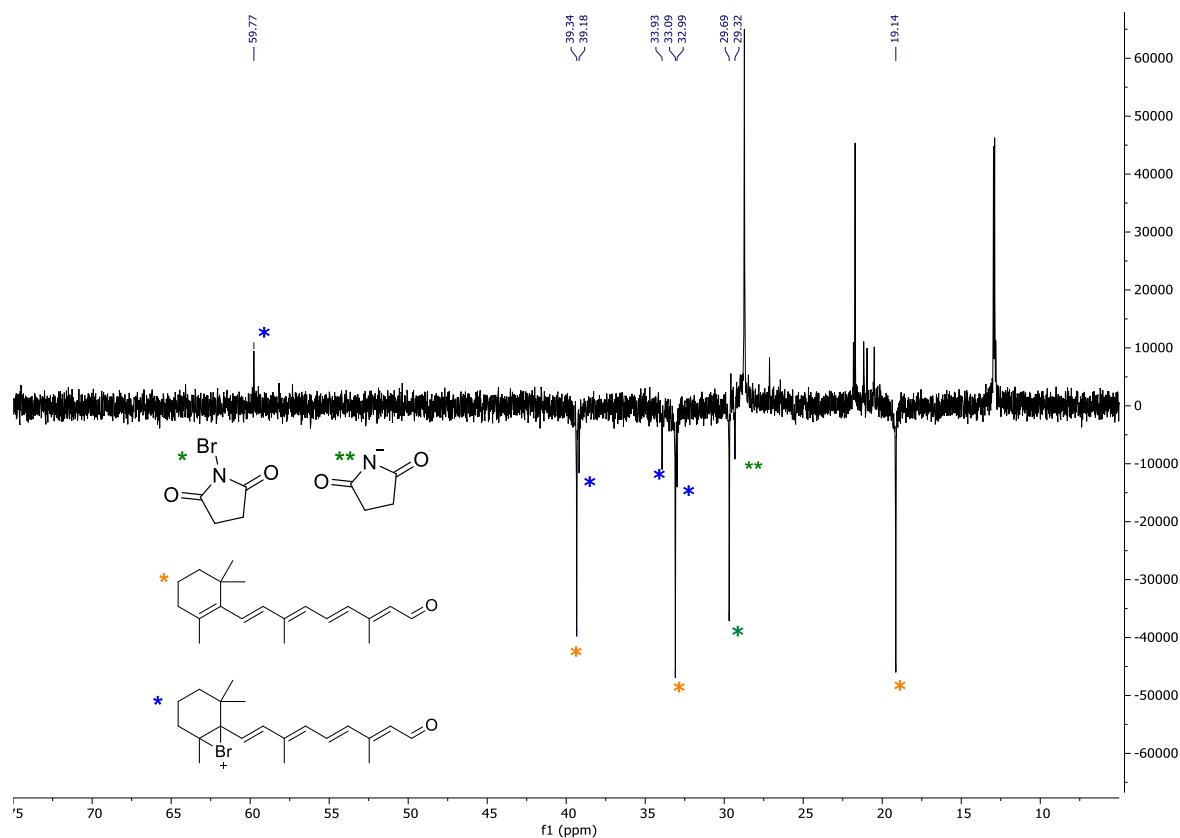


Figure 35. Zoom du spectre RMN ^{13}C DEPT135 du mélange réactionnel 10 min après l'ajout du NBS. La mesure a été faite dans un tube 3 mm dans le CD_2Cl_2 à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ et dans le noir. L'analyse se concentre sur les signaux d'intérêt, à savoir ceux du cycle à six chainons. Les signaux caractéristiques de chacune des espèces en présence ont été annotées et reliées à leurs structures respectives avec des étoiles de coloris différents afin de les distinguer clairement.

Par la suite, par perte d'un proton et ouverture du bromonium ponté, l'espèce bromée allylique tertiaire **C** est formée puis subit une addition nucléophile 1,3 de l'azoture, conduisant à l'azido rétinal attendu (**Schéma 8**). Il est important de noter qu'aucun réarrangement de Winstein n'a été observé, ce qui peut s'expliquer par la présence de la chaîne isoprénoïde hautement conjuguée. De fait, plus la conjugaison est importante, plus l'azoture allylique formé est stable, réduisant fortement la probabilité d'un réarrangement.²⁹⁴ De plus, aucune réaction sur la chaîne polyénique n'a été notée, malgré la capacité du NBS et du TBATB à insérer le brome sur les liaisons insaturées.²⁹⁵

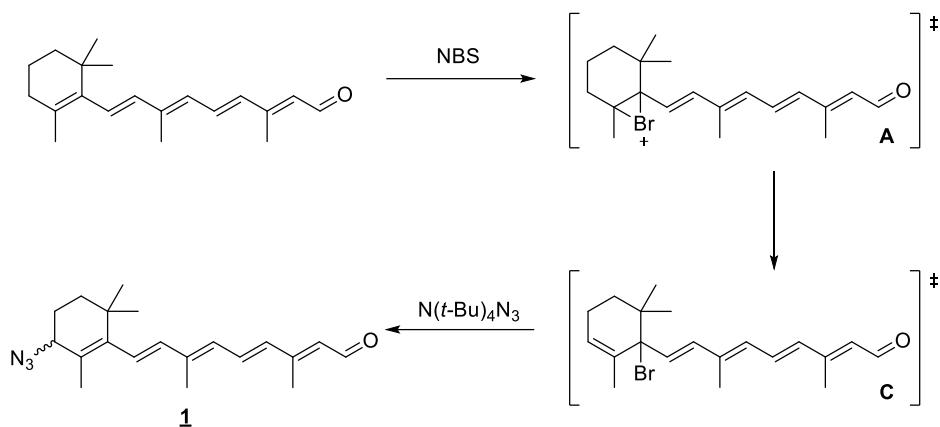


Schéma 8. Mécanisme proposé pour la formation du rétinal azidé **1** en passant par un premier intermédiaire bromonium ponté puis un intermédiaire portant un brome allylique.

2.3. Validation biologique de la fonctionnalité du N₃ RAL

Afin de vérifier la fonctionnalité de ce dérivé synthétique de la vitamine A, plusieurs tests biologiques ont été réalisés par Alexia Kindler, doctorante de l'équipe de Wojciech Krezel (IGBMC, Strasbourg). L'ensemble de ces expériences visaient à étudier la capacité du rétinal azidé à entraîner différentes activités biologiques en comparaison avec le rétinal naturel.

Pour le premier test, c'est l'activité de Raldh3 qui a été mesurée. Il est en effet essentiel que le rétinoïde modifié soit pris en charge de façon normale par cette enzyme car elle est responsable de la conversion du RAL en AR, forme active de la vitamine A, comme décrit dans l'introduction. Ce test consiste à mesurer le taux de NADH produit lorsque l'enzyme est en action. De fait, quand Raldh3 prend en charge le rétinoïde, elle recrute le NAD⁺ comme coenzyme, qui se trouve alors réduit en NADH. Les deux états de cette coenzyme ayant des maximums d'absorbance différents, à savoir 340 nm pour le NADH contre 259 nm pour le NAD⁺, il est possible de suivre la production de NADH dans le milieu par fluorescence. Les mesures ont été effectuées à 10 et 100 µM de rétinoïde et montrent que la quantité de NADH produite est sensiblement la même (**Figure 36**) illustrant que la prise en charge du rétinoïde par Raldh3 est identique, qu'il soit azidé ou non.

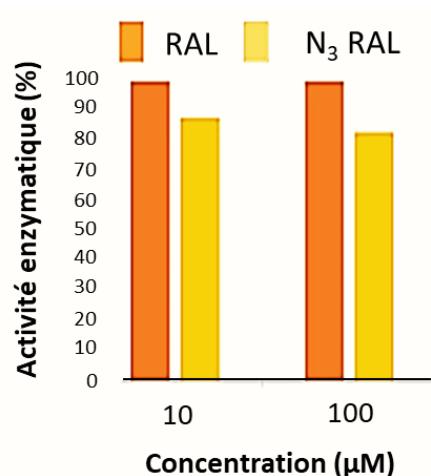


Figure 36. Test de l'activité enzymatique de Raldh3 envers le rétinal naturel et son homologue azidé synthétique. L'activité a été suivie par fluorescence via la production de NADH.

Le N₃ RAL étant correctement pris en charge par Raldh3, nous avons voulu vérifier que sa transformation en AR était effective. Pour cela, un test d'activation de la transcription a été fait. Comme décrit dans l'introduction générale, l'acide rétinoïque est responsable de la transcription de nombreux gènes essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Ainsi, il est important que le rétinal azidé soit transformé en acide rétinoïque azidé afin de conserver son activité biologique pour une utilisation en tant que sonde moléculaire. Cette expérience a été effectuée avec la luciférase Firefly en tant que rapporteur, dans des cellules HEK 293T préalablement transfectées avec le plasmide de RAR α . La transfection permet de faire exprimer aux cellules utilisées un gène d'intérêt. Elle est ici réalisée avec un plasmide, c'est-à-dire une molécule d'ADN circulaire, naturelle ou modifiée. Dans notre cas, le plasmide codant pour RAR α , récepteur principal de l'acide rétinoïque, a été sélectionné et modifié afin qu'il porte le gène de la luciférase. Les résultats ont été obtenus par mesure de fluorescence et normalisés par rapport au contrôle négatif, à savoir le DMSO (**Figure 37**). L'acide rétinoïque *all-trans* a servi de contrôle positif. Comme attendu, ce dernier active la transcription de RAR α , même à la concentration la plus faible testée, de l'ordre du nanomolaire. Cette activité augmente jusqu'à 10⁻⁷ M avant de diminuer à partir de 10⁻⁶ M, de fait de la cytotoxicité de l'acide rétinoïque à compter de cette concentration.²³ Le profil d'activation de l'*at*RAL est différent puisque l'activité transcriptionnelle n'apparaît qu'à partir de 10⁻⁷ M, ce qui peut s'expliquer par la nécessité d'une conversion enzymatique de l'*at*RAL en forme bioactive *at*AR. De façon surprenante, il semblerait que l'insertion de l'azoture sur le rétinal renforce l'activation de la transcription puisqu'à 10⁻⁷ M celle-ci est significativement plus importante pour N₃ RAL que pour *at*RAL. On note également qu'à 10⁻⁶ M, le N₃ RAL permet une

activation de la transcription très proche de celle de l'atAR. Ces résultats montrent que l'azido rétinal est converti efficacement en acide rétinoïque azidé mais aussi que ce dernier permet une activation de la transcription supérieure à celle observée avec le rétinal. On peut ainsi penser que l'azoture joue un rôle dans l'interaction, d'une part avec Raldh3, d'autre part avec le domaine de liaison du ligand de RAR α .

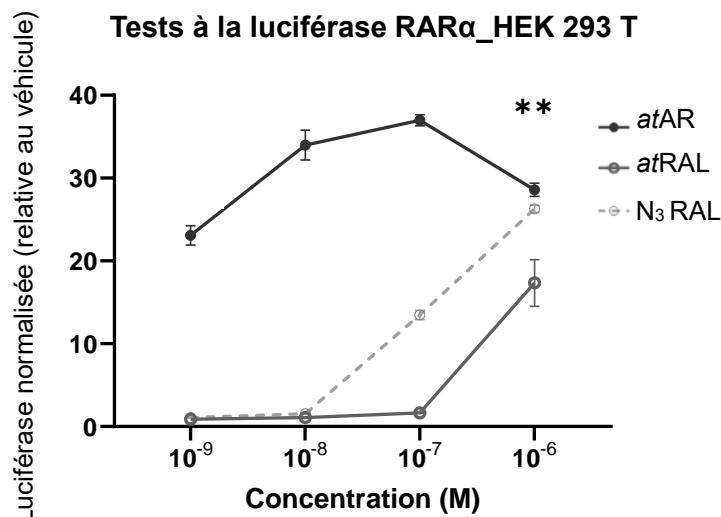


Figure 37. Tests à la luciférase Firefly de l'activation de la transcription de RAR α dans les cellules HEK 293 T en fonction de concentrations croissantes en atAR, atRAL et N₃ RAL. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Selon l'analyse ANOVA à deux mesures répétées, la variable dépendante (temps) était significative ($P<0,0001$) et la variable indépendante (composé) l'était également ($P<0,05$). La signification statistique des facteurs combinés est indiquée sur le graphique (** $P<0,01$).

Un autre rôle clé de la vitamine A est la différenciation cellulaire qui intervient lors de l'embryogénèse. Un test d'induction de la différenciation de cellules souches par le rétinal azidé a donc été réalisé. Pour cela, des cellules de carcinome embryonnaire P19 ont été employées et leur différenciation en neurones GABAergiques a été suivie par immunomarquage. Ce type de neurones produit de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), lui-même obtenu par transformation du glutamate grâce à l'enzyme GAD67. C'est cette enzyme qu'il a été possible de marquer grâce à un anticorps anti-GAD67. Afin de révéler ce premier marquage, un second anticorps, anti-anti-GAD67, portant un fluorophore a été utilisé. De cette façon, seules les cellules produisant la GAD67, et donc différenciées en neurones GABAergiques, ont pu être visualisées en imagerie. À la suite de l'immunomarquage, les cellules ont été imageres puis les cellules positives comptées manuellement (**Figure 38**). On note qu'avec l'acide rétinoïque, près de 90% des cellules se trouvent différenciées. Pour ce qui est de l'atRAL, ce taux se situe aux

alentours de 65%, pouvant une nouvelle fois s'expliquer par la nécessité de transformation de l'*at*RAL en *at*AR actif. Quant au rétinal azidé, il permet un peu plus de 60% de différenciation, montrant que l'azoture n'interfère pas lors de l'induction de la différenciation des cellules.

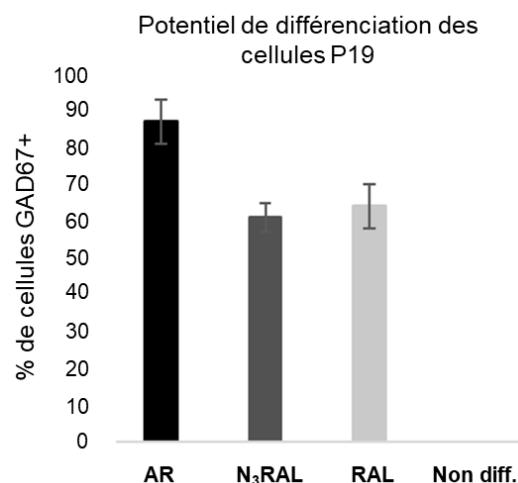


Figure 38. Quantification de la différenciation des cellules de carcinome embryonnaire P19 en neurones GABAergiques via le marquage de GAD67 en fonction du rétinoïde utilisé. Les noyaux des cellules ont été marquées par le DAPI afin de distinguer les cellules positives et négatives.

Enfin, d'autres travaux, réalisés au sein de l'IGBMC avant le début de cette thèse et non publiés par le Dr Mohamad Rima, visaient à comparer l'effet tératogène du N₃ RAL avec celui de l'*at*RAL. Ces tests ont été conduits sur des embryons de poisson zébré et ont montré que les deux molécules avaient des effets identiques, à temps et concentrations équivalents.

Ainsi, l'ensemble des tests a permis de montrer que l'azoture inséré en position C4 du rétinal n'impacte ni sa prise en charge enzymatique, ni son activité biologique. Nous sommes donc parvenus à mettre au point une sonde rétinoïde efficiente en une seule étape de synthèse. Cela ouvre la voie à la modification d'autres rétinoïdes dans le but de proposer un plus large panel de sondes pour l'étude du métabolisme de la vitamine A.

2.4. Application aux autres entrées de la cascade métabolique de la vitamine A

Les différents tests biologiques ayant montré que l'insertion de l'azoture en position C4 ne modifie ni la prise en charge ni l'activité biologique du rétinal, nous avons voulu élargir la boîte à outils pour l'exploration de la cascade métabolique de la vitamine A. Outre le rétinal, les trois principales entrées dans cette cascade sont le β C, le ROL et l'AR, comme expliqué dans le Chapitre 1. Pour ce qui est du β -carotène, il s'agit de l'apport principal de vitamine A par l'alimentation végétale qui permet d'accéder à deux molécules de rétinal mais également à de nombreux autres métabolites.²⁹⁶ Sa modification en sonde moléculaire permettrait ainsi une exploration, non seulement de la cascade métabolique principale de la vitamine A mais aussi de voies secondaires. Concernant le rétinol, du fait de sa grande instabilité à la manipulation, il n'a pas pu être utilisé directement. Il a donc été choisi de travailler avec l'acétate de rétinyle (noté *at*ROLAc), ester le plus documenté et le plus utilisé en tant que précurseur stable du rétinol. Au sujet de l'acide rétinoïque, celui-ci étant cytotoxique à des concentrations supérieures à 10^{-6} M, nous avons décidé d'utiliser le rétinoate de méthyle (noté *at*RoateMe) qui devrait conduire à l'AR azidé en une seule étape, avec un risque limité de toxicité.

Pour la modification du β C, le défi supplémentaire était d'obtenir une double insertion sur les positions C4 et C4'. Pour cela, les conditions de réaction optimisées ont été utilisées en doublant les équivalents de tous les réactifs. Le diazido β -carotène (noté di- $N_3\beta$ C) a ainsi été synthétisé avec un rendement isolé de 94% (**Figure 39, 2**). Il faut noter que divers essais ont été réalisés sur 100 mg de β C mais ils n'ont jamais permis d'isoler le produit propre. Seule la synthèse effectuée sur 250 mg a abouti, montrant que ce composé nécessite une modification sur une échelle conséquente pour pouvoir être isolé. Cela peut s'expliquer, en partie, par l'importante hydrophobie de cette molécule. Ensuite, c'est l'*at*ROLAc qui a été azidé, menant au N_3 ROLAc (**Figure 39, 3**) avec un rendement de 57%. Enfin, après avoir été synthétisé, l'*at*RoateMe a été soumis aux conditions d'azidation, conduisant à la formation de sa forme azidée N_3 RoateMe (**Figure 39, 5**) avec un rendement de 57%.

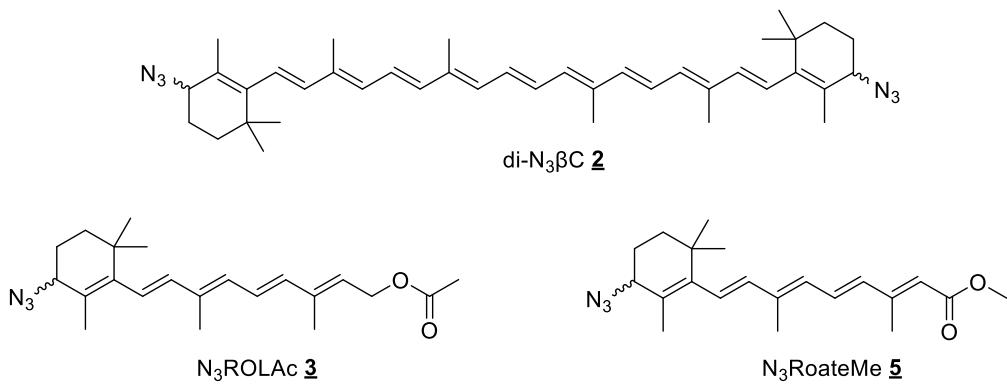


Figure 39. Formes mono ou di-azidées du β -carotène, de l’acétate de rétinyle et du rétinoate de méthyle.

A nouveau, pour ces trois dérivés azidés, on constate le phénomène d’isomérisation, qui conserve un ratio de 85/15 entre l’isomère *all-trans* et le second isomère. Il n’a pas été possible, malgré plusieurs essais, de séparer les isomères, ceux-ci présentant des rétentions identiques, que ce soit sur silice ou sur colonne greffée et ce malgré des systèmes d’élution variés. Ainsi, lors des tests biologiques, les molécules non azidées ont été utilisées en configuration exclusivement *all-trans* tandis que les azidées se trouvaient sous la forme d’un mélange d’isomères.

Après avoir été synthétisées, les molécules **2**, **3** et **5** ont été soumises au test d’activation de la transcription à la luciférase, comme le N_3 RAL précédemment. C’est ce test qui a été choisi pour quantifier l’activité de l’ensemble des rétinoïdes synthétiques. De fait, il permet de mesurer l’activation de la transcription de RAR α , qui n’est possible que si la molécule incubée est transformée en acide rétinoïque actif. Cette fois, seule la concentration de 10^{-6} M a été utilisée puisque les différents composés synthétisés nécessitent une ou plusieurs étapes enzymatiques afin d’accéder à l’acide rétinoïque actif. Il était donc nécessaire que la quantité initiale de composé soit suffisamment élevée. Également, il n’était pas possible d’aller au-delà, du fait de la cytotoxicité de l’acide rétinoïque utilisé comme contrôle positif.

Tout d’abord, c’est l’activation de la transcription par le di- $N_3\beta C$ qui a été étudiée. Dans un premier temps, ce sont les cellules Hepa 1-6 qui ont été utilisées puisqu’elles expriment BCO1, enzyme responsable du clivage symétrique du β -carotène en deux molécules d’*at*RAL. Néanmoins, ces cellules sont difficiles à transfecter, ne rendant pas les tests d’activation de la transcription exploitables, même au niveau du contrôle positif. Dans un second temps, nous nous sommes tournés vers les cellules HEK 293T mais, comme rapporté en 2014,²⁹⁷ le β C *all-trans* ne montra aucune activation de la

transcription (**Figure 40**). L'idéal aurait été de travailler avec le 9-cis β -carotène mais les quantités commercialement disponibles sont beaucoup trop faibles et coûteuses par rapport à la quantité nécessaire pour réaliser la double insertion d'azotures puis la purification. Nous avons donc tenté une dernière approche en utilisant les cellules 3T3-L1. Malgré des essais avec différents temps d'incubation du β C, allant de 5 heures à 24 heures, et des réplicats supplémentaires, la transfection s'est chaque fois révélée fortement hétérogène et non reproductible. Il serait donc nécessaire de poursuivre les essais afin de parvenir à des transfections satisfaisantes.

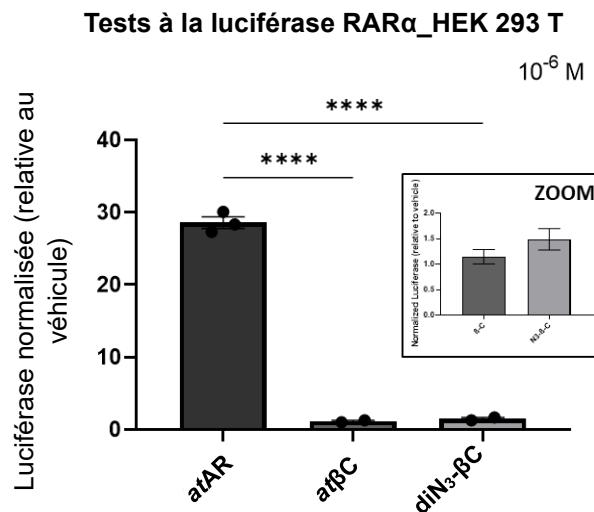


Figure 40. Test à la luciférase Firefly de l'activation de la transcription du récepteur RAR α dans les cellules HEK 293T à 10^{-6} M en atAR, at β C et diN₃ β C. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM. **** P<0.0001 selon l'analyse ANOVA.

Pour ce qui est de l'atROLAc, il a montré une activité trois fois moins importante que l'atAR contrôle pour l'activation transcriptionnelle de RAR α (**Figure 41**). Ce résultat n'est pas aberrant puisqu'il faut une hydrolyse de l'ester puis deux oxydations successives, soit trois étapes enzymatiques, pour que cette provitamine A soit convertie en atAR. Concernant la forme azidée, N₃ROLAc, elle a permis d'activer la transcription de RAR α de façon deux fois plus efficace que l'atROLAc. Cela nous apprend que l'azoture en position C4 est compatible avec les trois étapes de transformation de l'atROLAc en AR. Une nouvelle fois, le fait que l'activité soit supérieure à celle du rétinoïde non modifié suggère une interaction favorable de l'azoture avec les sites catalytiques des différentes enzymes. Une modélisation précise au sein de celles-ci serait nécessaire afin de valider cette hypothèse.

Tests à la luciférase RAR α _HEK 293 T

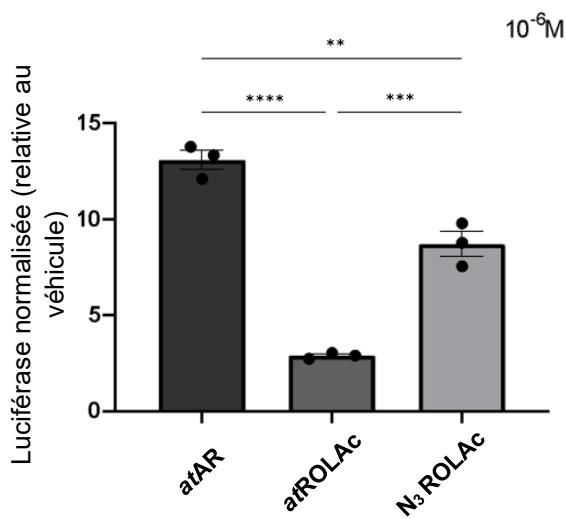


Figure 41. Test à la luciférase Firefly de l'activation de la transcription du récepteur RAR α dans les cellules HEK 293T à 10^{-6} M en atAR, atROLAc et N₃ ROLAc. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM. **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 selon l'analyse ANOVA.

Enfin, nous avons testé l'atRoateMe ainsi que sa version azidée. On peut voir sur la **Figure 42** que l'activation induite par ce dérivé est très faible en comparaison de celle de l'atAR. Également, bien que cet ester devrait conduire à l'atAR en une seule étape enzymatique, son activité est significativement inférieure à celle de l'atROLAc qui requiert, lui, trois transformations. Cela pourrait s'expliquer par une non-reconnaissance de ce rétinoïde non naturel par les hydrolases ou bien par un problème de biodistribution due à l'hydrophobie supérieure de l'atRoateMe par rapport à l'atAR. Cependant, comme précédemment, on note une activité significativement supérieure quand la fonction azoture est présente. Dans le cas du N₃RoateMe, on peut faire l'hypothèse que la polarité de l'azoture permettrait de réduire l'hydrophobie de l'atRoateMe, la rendant plus proche de celle de l'atAR.

Tests à la luciférase RAR α _HEK 293 T

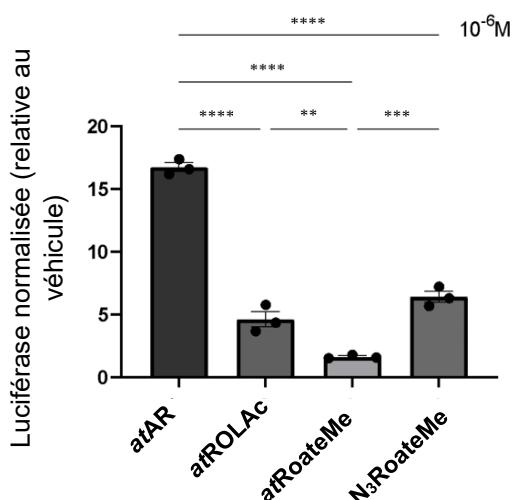


Figure 42. Test à la luciférase Firefly de l'activation de la transcription du récepteur RAR α dans les cellules HEK 293T à 10^{-6} M en atAR, atROLAc, atRoateMe et N₃ RoateMe. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM ; **P< 0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 selon l'analyse ANOVA

Nous sommes ainsi parvenus à synthétiser les formes azidées des trois autres molécules d'entrée dans la cascade métabolique de la vitamine A. Ces sondes sont fonctionnelles, à l'exception de l'ester d'acide rétinoïque *at*ROateMe. De même, les travaux sur le β C sont à poursuivre afin de pouvoir en tirer des conclusions. Encouragés par ces résultats positifs, nos travaux se sont poursuivis avec la synthèse d'autres esters d'acide rétinoïque afin de trouver une forme permettant la bonne délivrance de l'AR.

2.5. Vers la synthèse de nouveaux dérivés de l'acide rétinoïque en vue d'améliorer sa délivrance cytosolique

2.5.1. Modification de l'ester d'acide rétinoïque

L'*at*RoateMe ayant mené à une activation de la transcription négligeable, nous avons voulu varier le type d'ester afin de trouver une forme permettant l'accès à l'AR actif. Pour cela, le méthyle a été remplacé par une variété d'autres groupements et l'activation de la transcription de RAR α par ces esters ainsi que celle de leurs homologues azidés a été testée. L'activité de ces nouvelles molécules a été comparée à celle de l'*at*ROLAc puisqu'il s'agit d'une forme naturelle de la vitamine A et c'est elle qui requiert le plus grand nombre d'étapes pour accéder à l'AR. L'*at*AR a été conservé en tant que contrôle positif.

Il est essentiel de revenir sur l'isomérisation mentionnée préalablement. Il se trouve en effet que celle-ci n'a pas lieu lors de l'estérification mais intervient de façon systématique lors de l'insertion de l'azoture sur les esters, avec toujours un ratio 85/15 entre l'isomère *all-trans* et le second isomère. Il n'a cependant pas été possible, malgré plusieurs essais, de séparer ces isomères, ceux-ci présentant des rétentions identiques, que ce soit sur silice ou sur colonne greffée et malgré des systèmes d'élution variés. Ainsi, lors des tests biologiques, les esters non azidés sont en configuration exclusivement *all-trans* tandis que les esters azidés sont utilisés sous la forme d'un mélange d'isomères.

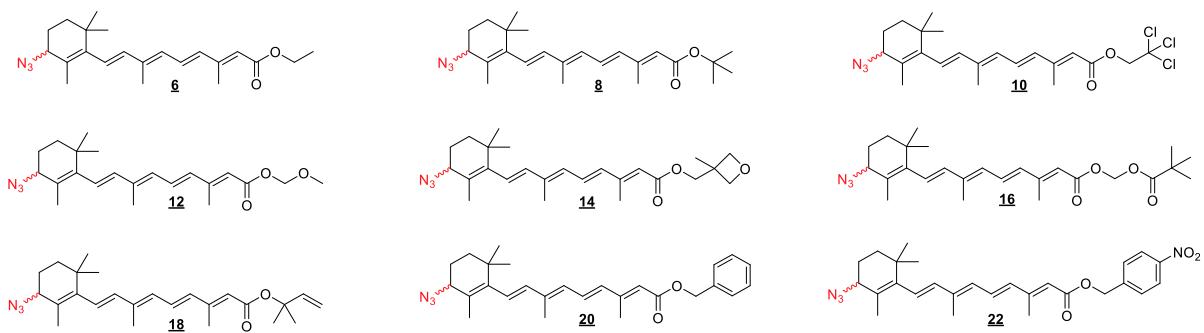


Figure 43. Librairie d'esters d'acide rétinoïque synthétisés et testés, ainsi que leurs formes azidées (en rouge).

Pour commencer, un éthyle (*atRoateEt*) et un *tert*-butyle (*atRoateBu*), deux groupements augmentant l'hydrophobie de la molécule, ont été introduits (**Figure 43**, composés **6** et **8**). Ces esters, qu'ils soient azidés ou non, ont montré une activation de la transcription très faible (**Figure 44**), confortant l'hypothèse d'une faible entrée dans les cellules due à une hydrophobie trop importante. Nous avons alors poursuivi avec l'ester trichloroéthyle **10**, noté CCl_3 , dont les trois atomes de chlore visaient à augmenter la polarité, et donc à réduire l'hydrophobie du rétinoïde. Ce dernier ayant montré une activation deux fois plus importante que l'*atROLAc* (**Figure 45**), la nécessité d'introduire un groupement polaire permettant l'entrée du rétinoïde dans la cellule pour y être transformé a été confirmée. Dans un but similaire, l'ester méthoxyméthyle **12**, noté *MOM*, qui, quant à lui, porte un atome d'oxygène supplémentaire capable de faire des liaisons hydrogènes, a été préparé. Il a conduit à une activation bien supérieure à celle de l'*atROLAc* et quasiment identique à celle de l'*atAR* (**Figure 45**). Cela nous a amené à penser que la présence d'un troisième hétéroatome au sein de l'ester est favorable pour sa prise en charge en vue d'une hydrolyse en AR. Par la suite, nous avons souhaité synthétiser le dérivé orthoester de l'AR car il s'agit d'une espèce acido-labile, dont le comportement aurait pu nous aiguiller quant à la prise en charge des rétinoïdes synthétiques. Pour ce faire, l'ester oxétane **14** a été synthétisé et plusieurs essais ont été conduits dans le but d'accéder à l'orthoester. Malheureusement, ces tentatives n'ont pas été fructueuses. Toutefois, l'activité de l'oxétane a été mesurée, ce dérivé possédant un troisième atome d'oxygène, comme le *MOM*, mais également un cycle contraint à 4 chainons, apportant un nouveau paramètre à notre étude. On peut voir sur la **Figure 45** que cet ester présente une activité bien supérieure à celle d'*atROLAc* et très similaire à celle de

l'ester MOM, appuyant la nécessité de l'oxygène supplémentaire au sein de l'ester, sans toutefois donner d'indications quant à la contrainte du cycle. Dans le but d'augmenter encore le nombre d'hétéroatomes, nous avons choisi le pivaloyloxyméthyle **16**, noté POM, un type d'ester régulièrement utilisé pour des prodrogues dans divers traitements.^{298,299,300} Dans notre cas, une activation de la transcription très importante a pu être observée, du même ordre que celle de l'atAR (**Figure 45**), suggérant que cette fonction est idéale pour la pénétration dans les cellules et la prise en charge enzymatique. Enfin, l'ester diméthylbutène **18**, noté di-Me, qui, bien qu'apolaire, possède une structure et une répartition électronique distinctes des esters hydrophobes précédents, a été synthétisé. De façon surprenante, l'activation est sensiblement identique à celle de l'atROLAc, montrant que la structure de l'ester et sa répartition électronique sont, de la même manière, déterminantes pour son activité (**Figure 45**). Encouragés par ce résultat, nous avons synthétisés les esters benzylque **20** et 4-nitrobenzylque **22**. L'objectif était d'étudier l'impact d'un cycle benzénique, plan et stériquement encombrant, substitué ou non, sur l'activité des rétinoïdes. Bien que ces esters n'aient pas encore été testés, ils ont été rapportés en 1975 et ont montré une efficacité sept fois supérieure à celle de l'atAR dans le traitement de l'acné, démontrant une prise en charge effective par l'organisme.³⁰¹

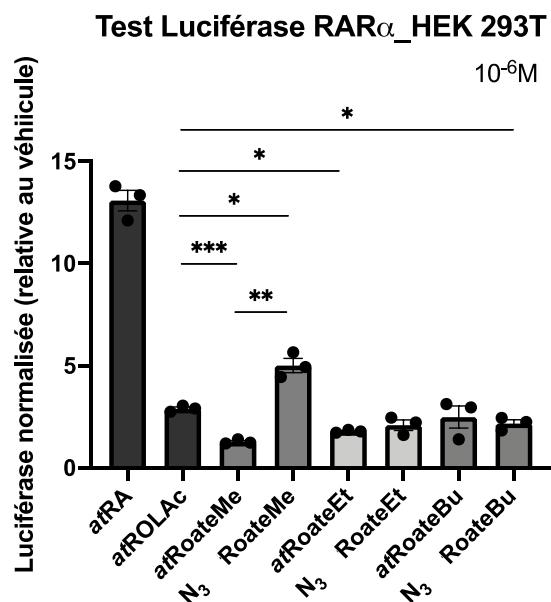


Figure 44. Test à la luciférase de l'activation de la transcription du récepteur RAR α dans les cellules HEK 293T à 10^{-6} M en atRoateMe, atRoateEt, atRoateBu et leurs formes azidées. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM ; **P< 0.01; ***P<0.0001 selon l'analyse ANOVA.

Test Luciférase RAR α _HEK 293T

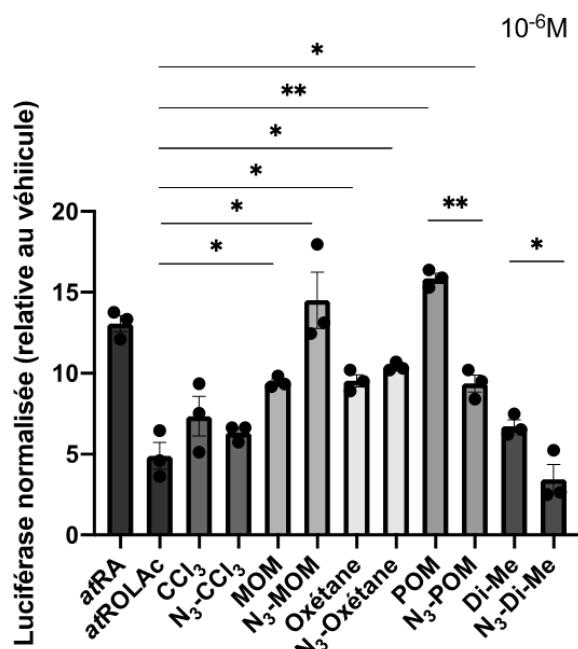


Figure 45. Test à la luciférase de l'activation de la transcription du récepteur RAR α dans les cellules HEK 293T à 10⁻⁶ M en esters CCl₃, MOM, oxétane, POM et di-Me et leurs formes azidées. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM ; *P< 0.1; ***P<0.0001 selon l'analyse ANOVA.

Pour ce qui est des formes azidées, trois comportements différents se sont détachés. Tout d'abord, les esters CCl₃ et oxétane, pour lesquels l'activation de la transcription se fait de façon quasi identique, que le composé soit azidé ou non. Ensuite, l'activité induite par le MOM augmente significativement lorsque l'azoture est introduit. En opposition, les ester di-Me et POM ont vu leur activité diminuer de façon non négligeable une fois l'azoture ajouté en C4. Au vue de ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que, selon l'ester, la structure générale du rétinoïde se trouve modifiée de façon plus ou moins importante suite à l'insertion de l'azoture, impactant l'interaction du rétinoïde avec l'enzyme qui le prend en charge. Également, il est possible que, selon les esters, l'enzyme qui vise à la transformation en AR soit différente, présentant donc un autre site catalytique, ce qui pourrait expliquer la divergence d'impact de l'azoture. Pour étayer ces hypothèses, il serait nécessaire de réaliser des modélisations précises, avec un large panel d'enzymes ayant la capacité de prendre en charge les rétinoïdes.

En conclusion, parmi l'ensemble des esters testés, l'ester MOM est celui que nous avons retenu comme étant le plus adapté. En effet, il a montré une activité quasiment identique à celle de l'atAR lorsqu'il est azidé, en faisant un précurseur idéal pour ce dernier.

2.5.2. Synthèse de l'acide rétinoïque azidé en C4

Afin de pouvoir étudier indépendamment les effets de l'acide rétinoïque portant l'azoture en C4, l'hydrolyse de différents esters azidés a été tenté afin d'obtenir le N₃ AR (**Tableau 5**). Il est important de noter que l'objectif n'était pas de l'utiliser comme sonde fonctionnelle par la suite mais simplement de faire une comparaison avec ses formes protégées.

La majorité des conditions présentées dans le **Tableau 5** ont été préalablement testées sur les esters non azidés et ont mené à des déprotections efficientes et propres. Cependant, les mêmes conditions réactionnelles se sont révélées inefficaces en présence de l'azoture. La conversion de l'ester azidé de départ a été suivie par HPLC analytique à 370 nm. Lorsque les bruts ou les produits isolés se sont avérés dégradés, des analyses RMN et LC-MS ont été réalisées.

Rétinoïde	Conditions de déprotection	Observation ^a
N₃ RoateMe	NaOH (aq., 5M), 25 °C, MeOH, 48 h	Pas de conversion
	KOH (aq., 10%), 25 °C, MeOH, 16 h	Pas de conversion
	LiOH (10 equiv.), 25 °C, MeOH, 16 h	Pas de conversion
	LiOH (20 equiv.), 25 °C, MeOH, 16 h	Pas de conversion
	LiOH (64 equiv.), 25 °C, MeOH/THF, 16 h	Brut dégradé
	BBr ₃ (1.5 equiv.), 25 °C, DCM, 16 h	Brut dégradé
	TMSOK (4.0 equiv.), 25 °C, THF, 16 h ³⁰²	Pas de conversion
N₃ RoateEt	KOH (aq., 1 M), 70 °C, EtOH, 3 h	Brut dégradé
	KOH (aq., 1 M), 25 °C, EtOH, <i>sonication</i> , 2 h	Pas de conversion
N₃ RoateBu	LiOH (10 equiv.), 25 °C, MeOH, 16 h	Pas de conversion
	LiOH (10 equiv.), 25 °C, THF, 16 h	Pas de conversion
	LiOH (10 equiv.), 35 °C, THF, 16 h	Pas de conversion
	TFA (4 equiv.), 25 °C, DCM, 24 h	Pas de conversion
	HCl (4 M dioxane), 25°C, DCM, 16 h	Brut dégradé
	HCl (aq., 37%), 25 °C, THF, 2 h	Pas de conversion
	HCl (aq., 37%), 25 °C, THF, 24 h	Brut dégradé
	Trifluoroéthanol, 25 °C, 16 h ³⁰³	Pas de conversion
	Trifluoroéthanol, 45 °C, <i>micro-ondes</i> , 3 h	Pas de conversion
	Trifluoroéthanol, 60 °C, <i>micro-ondes</i> , 3 h	Pas de conversion
	Trifluoroéthanol, 100 °C, <i>micro-ondes</i> , 1 h	Pas de conversion
	Pig Liver Esterases, 37 °C, tampon borate/ EtOH, 48 h	Pas de conversion ^c
N₃ MOM ³⁰⁴	BiCl ₃ (1 equiv.), 50 °C, MeCN/H ₂ O (5/0.1 v/v), 16 h	Dégradation ^b
	BiCl ₃ (1 equiv.), 40 °C, MeCN/H ₂ O (5/0.1 v/v), 16 h	Dégradation ^b
N₃ di-Me	LiOH (10 equiv.), 25 °C, THF/H ₂ O (95/5), 16 h	Pas de conversion
	TFA (aq., 20%), 25 °C, DCM, 16 h	Dégradation ^b
	HCl (aq., 1 M), 25 °C, MeOH, 16 h	Dégradation ^b
N₃ CCl₃ ³⁰⁵	Zn (38 equiv.), AcOH (aq., 90%), 25 °C, MeOH, 16 h	Dégradation ^b
	Zn (10 equiv.), 25 °C, NH ₄ OAc (aq., 1M), THF, 4 h	Pas de conversion

Tableau 5. Ensemble des conditions de déprotection testées sur différents esters azidés. ^a : conversion suivie par HPLC analytique à 370 nm; ^b : Dégradation observée après traitement et/ou purification ; ^c : Absence de conversion qui peut s'expliquer par le manque de solubilité du rétinoïde dans la solution, majoritairement aqueuse (4% EtOH, 2% DMSO).

Pour N₃ RoateMe, N₃ RoateEt et N₃ RoateBu, on remarque que la majorité des conditions testées n'ont permis aucune conversion de l'ester. Les conditions ayant conduit à une conversion ont mené à une dégradation du brut réactionnel, traduite par une multiplication importante du nombre de signaux en HPLC analytique, ayant des temps de rétention et des longueurs d'ondes maximales d'absorbance non cohérentes avec les molécules attendues. Les analyses LC-MS de ces bruts réactionnels ont indiqué une disparition totale de la masse du réactif et l'apparition d'un nombre important d'autres masses, ne correspondant ni à la masse attendue ni à celles de structures identifiables. Il en va de même pour les analyses RMN du proton, dont les signaux caractéristiques des rétinoïdes n'ont pu être discernés, tant le nombre et la répartition des signaux sur l'ensemble du spectre sont importants, en particulier dans la région inférieure à 3 ppm (**Figure 46**).

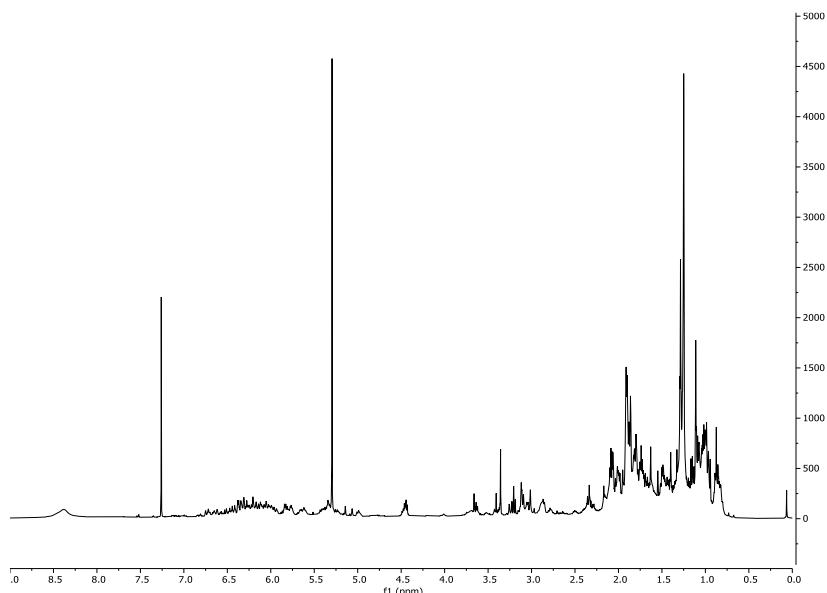


Figure 46. Exemple de RMN proton obtenue lors des tentatives de déprotection des esters azidés pour accéder à l'AR azidé.

Pour ce qui est de N₃ MOM, N₃ di-Me et N₃ CCl₃, le comportement observé est différent. En effet, dans la majorité des cas, les analyses des bruts réactionnels ont montré une conversion, totale ou partielle, du rétinoïde de départ. Les analyses par HPLC analytique ont révélé des pics cohérents en termes de rétention et de longueur d'onde maximale d'absorbance par rapport aux molécules attendues. Cependant, après traitement et/ou purification, ces analyses se sont avérées non reproductibles et les mêmes résultats que décrits précédemment ont été retrouvés. Cela nous a amené à penser que l'acide rétinoïque azidé a la capacité de se former dans le milieu mais qu'il

n'est pas stable à la manipulation. Une des solutions pour parvenir à isoler ce composé serait une transformation enzymatique dans des conditions physiologiques. En effet, en travaillant avec Raldh3, il est possible d'envisager l'oxydation du N₃ RAL en N₃ AR.

2.6. Evaluation de la toxicité des esters d'acide rétinoïque

Les différents esters d'acide rétinoïque synthétisés et testés visaient à éviter une incubation directe de l'AR étant donné sa cytotoxicité à partir de 10⁻⁶ M. Il a donc été nécessaire de réaliser des tests afin de vérifier que ces esters ainsi que leurs formes azidées ne présentaient pas de toxicité, qui empêcherait de les utiliser comme sondes moléculaires par la suite.

La toxicité a été évaluée au sein des cellules HEK 293T, à une concentration de 10⁻⁶ M puisqu'il s'agit de la concentration à laquelle nous avons travaillé pour les tests d'activation de la transcription. Le test de viabilité cellulaire qui a été employé consiste en un dosage colorimétrique au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Le MTT est un sel jaune qui, par réduction au sein du système rédox des cellules vivantes, se transforme en Formazan, un sel de couleur bleue/violette (**Schéma 9**).³⁰⁶ Ainsi, après avoir incubé successivement les rétinoïdes puis le MTT, l'absorbance de chaque solution a été mesurée à 370 nm, permettant de déterminer le taux de cellules vivantes dans chacun des puits. En effet, l'absorbance étant immédiatement liée à la quantité de Formazan produite par les cellules vivantes, elle nous informe directement de la quantité de cellules vivantes au sein de chaque solution analysée.

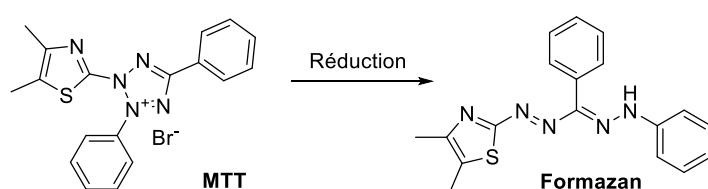


Schéma 9. Réduction du MTT en Formazan.

Tous les esters préparés n'ont pas été testés. Seule la toxicité des esters présentant une activité suffisante a été étudiée, à l'exception de l'atRoateMe, pour lequel nous voulions vérifier que son manque d'activité ne provenait pas d'une éventuelle cytotoxicité. On peut voir sur la **Figure 47** que seul l'oxétane azidé présente une

toxicité non négligeable puisque l'on observe 30% de mort cellulaire. Ce résultat est surprenant puisque la forme non azidée ne montre aucune toxicité et que les activités biologiques des deux molécules sont identiques (Figure 45). Toutefois, la géométrie des oxétanes est un facteur clé pour leurs propriétés physicochimiques et donc pour leur activité et leur toxicité.³⁰⁷ Ainsi, on pourrait expliquer la toxicité de l'ester azidé par un changement de géométrie de la molécule, en particulier de l'oxétane, induit par l'ajout de l'azoture en position C4.

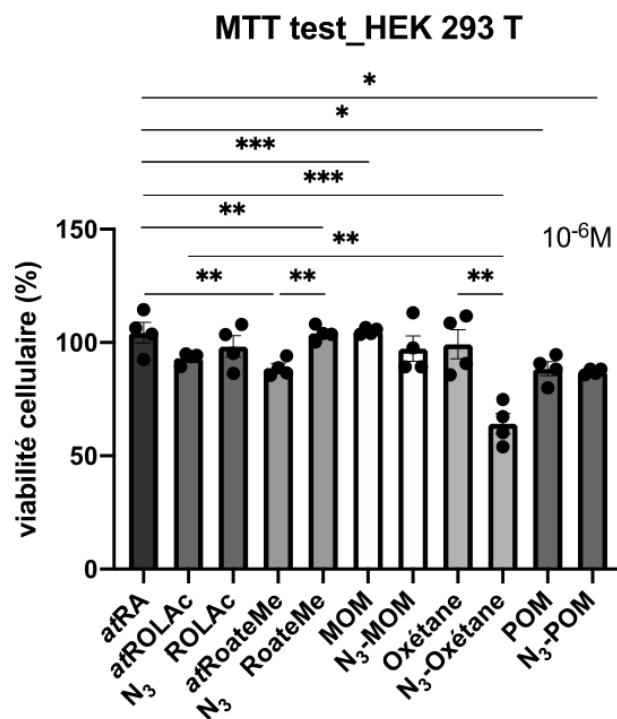


Figure 47. Mesures de viabilité cellulaire réalisées sur les cellules HEK 293T. La concentration en chacun des rétinoïdes est de 10^{-6} M. Les valeurs ont été normalisées par rapport au véhicule, à savoir le DMSO. Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM ; * $P<0.1$; ** $P< 0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ selon l'analyse ANOVA.

En conclusion, la synthèse de différents esters d'acide rétinoïque, ainsi que leurs homologues azidés a été effectuée avec succès. Ceux-ci se sont révélés efficaces pour la délivrance de l'AR au sein des cellules et n'ont montré aucune cytotoxicité, à l'exception de l'un d'entre eux. Cela en fait donc des outils fonctionnels utilisables pour l'étude du métabolisme de la vitamine A.

2.7. Extension de la réaction de fonctionnalisation tardive à l'introduction d'autres nucléophiles en C4 des rétinoïdes

Afin de compléter la gamme de sondes présentée dans les paragraphes précédents mais également d'étoffer la librairie de dérivés de la vitamine A existante, nous avons poursuivi nos travaux avec d'autres approches présentées en **Figure 48**. L'ensemble des composés décrits dans cette partie ont été synthétisés mais n'ont pas encore pu être soumis aux tests biologiques.

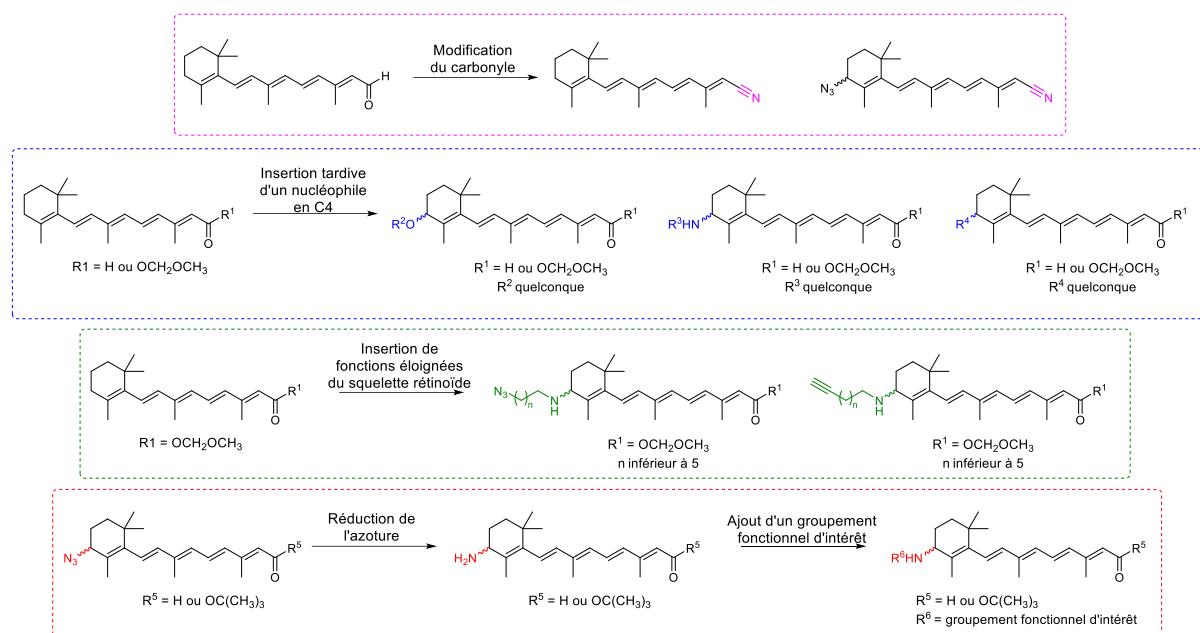


Figure 48. Ensemble des approches expérimentées pour la synthèse de nouveaux dérivés de la vitamine A.

2.7.1. Dérivés du rétinal présentant un nitrile sur la position carbonylée

La première approche visant à modifier le carbonyle en une autre fonction est apparue de façon fortuite. En effet, lors de l'optimisation des conditions décrites plus tôt dans ce chapitre, le TMN_3 a été utilisé comme source d'azoture et il a été noté que l'insertion de l'azoture en position C4 s'accompagnait d'une transformation de l'aldéhyde en nitrile (**Schéma 10**). Cette expérience a été répétée plusieurs fois, conduisant toujours à ce même résultat. De plus, il a été constaté que la conversion de l'aldéhyde en nitrile pouvait avoir lieu sur l'azido rétinal préalablement isolé.

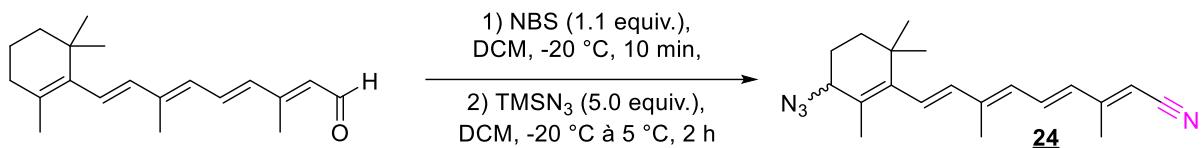


Schéma 10. Conditions réactionnelles pour l'obtention du composé **24**.

Cette modification a été validée par les analyses RMN, de masse et d'infrarouge. Pour ce qui est de l'analyse RMN du proton, la présence du signal à 3.7 ppm attendu pour le proton géminal de l'azoture a été notée, en parallèle d'une disparition du proton de l'aldéhyde. Également, un signal intégrant pour un proton à 5.20 ppm est apparu, n'étant pas en adéquation avec le proton en α de l'aldéhyde dont le déplacement chimique se situe à 5.97 ppm. Sur le spectre RMN du carbone, le signal caractéristique de nitrile a été identifié à 118.2 ppm. Concernant l'analyse par HRMS, elle a révélé une masse de 345.2053, correspondant à l'ion $[M+Na]^+$ de **24**. Enfin, le spectre IR a montré les bandes signatures des liaisons C-N₃ et C≡N, respectivement à 2094 cm⁻¹ et 2206 cm⁻¹.

Nous avons par la suite questionné la possibilité de ne modifier que l'aldéhyde en nitrile, sans insertion d'azoture. Lors de l'optimisation des conditions d'insertion de l'azoture, il avait été constaté qu'en utilisant le NIS et le TBAN₃, aucune réaction n'avait lieu. Nous avons donc choisi d'essayer de remplacer le NBS par le NIS, de sorte à éviter l'insertion de l'azoture, tout en permettant la transformation de l'aldéhyde en nitrile (**Schéma 11**). Cela a été un succès puisque ces conditions ont permis d'isoler le composé **25** souhaité. Les spectres RMN obtenus sont similaires à ceux rapportés très récemment dans la littérature.³⁰⁸

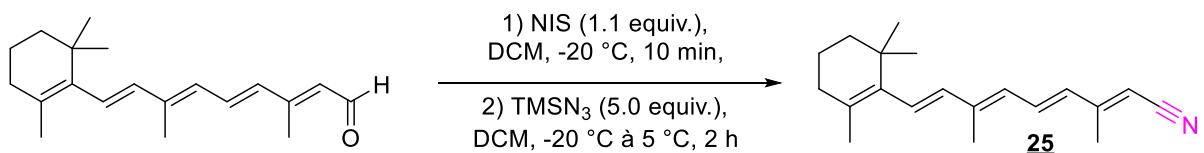


Schéma 11. Conditions réactionnelles pour l'obtention de **25**.

Nous avons alors voulu voir s'il était possible d'appliquer ces conditions réactionnelles pour la substitution d'un aldéhyde par un nitrile sur d'autres molécules. Elles ont donc été appliquées au (*Z*)-hexen-2-al et au *trans*-cinnalmaldéhyde (**Figure 49**) mais, dans les deux cas, aucune réaction n'a eu lieu.

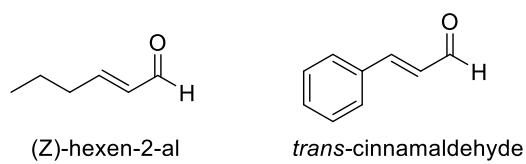


Figure 49. Aldéhydes testés pour l'extension des conditions réactionnelles de transformation de l'aldéhyde en nitrile. Les molécules ont été soumises aux conditions présentées dans les **Schémas 10 et 11**.

Ainsi, en modifiant la source d'azoture dans les conditions optimisées, nous avons montré qu'il était possible de substituer un aldéhyde par un nitrile, permettant l'accès à deux dérivés supplémentaires de la vitamine A. Néanmoins, ces conditions n'ont pas pu être appliquées à d'autres molécules, laissant à penser que la chaîne polyénique est indispensable pour que la réaction ait lieu.

2.7.2. Introduction de nucléophiles aminés, oxygénés et carbonés en position C4 d'esters de l'acide rétinoïque

Pour cette seconde approche, l'objectif était de parvenir à insérer des nucléophiles de différentes natures sur la position C4 en conservant la méthodologie développée précédemment. De fait, en insérant de nouvelles fonctionnalités, il serait possible d'accéder à une plus grande variété de sondes moléculaires utilisables pour l'étude du métabolisme de la vitamine A. Également, dans un intérêt de synthèse chimique, cela apporterait une plus-value à notre méthode.

Ces travaux ont été débutés avec le rétinal *all-trans*, en utilisant le NBS comme agent d'activation et en faisant varier le nucléophile (**Schéma 12**). Bien que le rétinal ait été totalement consommé avec le cyanure de tétrabutylammonium **A**, le spectre IR n'a présenté aucune bande caractéristique de la C≡N, attendue vers 2200 cm^{-1} . Aussi, aucune masse cohérente n'a été détectée et le spectre RMN n'a pas pu être attribué du fait de signaux sous forme de massifs. Pour ce qui est des deux autres nucléophiles utilisés, la conversion du rétinal n'a été que très partielle. Concernant la fonction isocyanate **B**, l'analyse HRMS a révélé de nombreuses masses soit bien supérieures soit bien inférieures à celle attendue. Pour ce qui est du spectre RMN, il n'a pas pu être attribué. Enfin, pour la tentative d'insertion du carbamate **C**, bien que le spectre RMN soit propre et identifiable, aucune des fractions collectées n'a montré de signal correspondant au groupement Boc. Une de nos hypothèses a été qu'au cours de la réaction l'amine avait pu être déprotégée, mais aucune analyse n'a pu le confirmer.

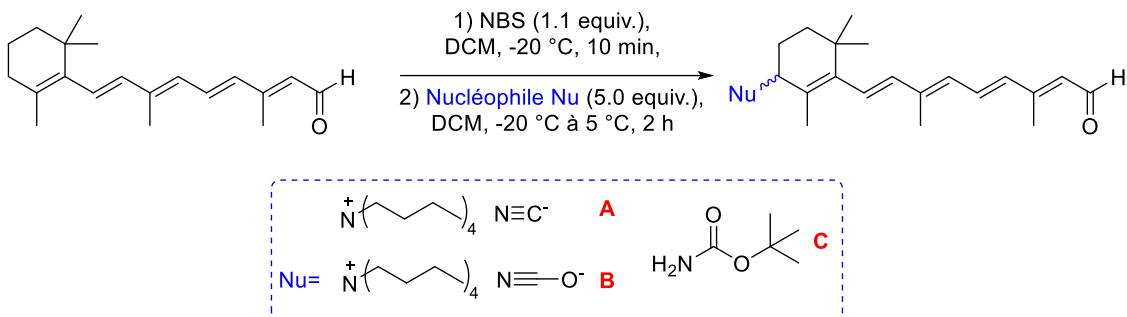


Schéma 12. Conditions testées pour l'insertion de différents nucléophiles sur le rétinal. Le NH_2 du carbamate C a été préalablement déprotoné avec 3.0 équivalents de DIPEA.

Au vu de ces résultats, l'aldéhyde a été soupçonné de provoquer des réactions secondaires du fait de son électrophilie. Après avoir tenté, sans succès, de le protéger sous forme d'acétal, nous avons orientés nos études vers une forme protégée de l'AR, à savoir l'ester MOM. En effet, il s'agit de l'ester ayant montré la meilleure activité biologique, en faisant donc un candidat idéal pour la synthèse d'autres sondes fonctionnelles. Les conditions décrites dans le **Schéma 13** ont ainsi été appliquées pour tenter d'obtenir de nouvelles fonctionnalités en position C4.

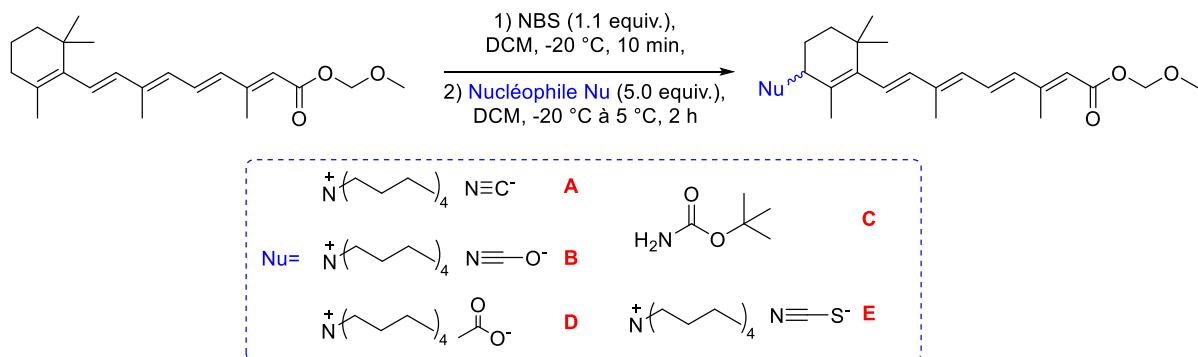


Schéma 13. Conditions testées pour l'insertion de différents nucléophiles sur l'ester MOM. Le NH_2 du carbamate C a été préalablement déprotoné avec 3.0 équivalents de DIPEA.

Le composé **26** (**Figure 50**), portant un nitrile en C4, a ainsi été préparé. L'insertion du nitrile a été confirmée par IR avec une bande caractéristique à 2195 cm^{-1} mais également par RMN du carbone avec le signal de la $\text{C}\equiv\text{N}$ à 120.6 ppm. Ensuite, grâce à l'acétate **D**, la molécule **28** a ensuite été obtenue. L'addition de l'acétate a été appuyée par la RMN du carbone avec l'apparition d'un second signal de carbonyle à 171 ppm et par la RMN du proton avec un nouveau signal intégrant pour trois protons à 2.1 ppm, correspondant au méthyle de l'acétate. Enfin, en utilisant le thiocyanate de tétrabutylammonium **E**, c'est le rétinoïde modifié **27** qui a été produit. Les analyses ont

cette fois permis, en plus d'affirmer la bonne insertion du groupement, de déterminer si le produit obtenu portait un thiocyanate ou un isothiocyanate.

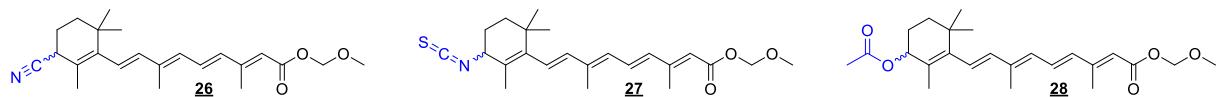


Figure 50. Nouveaux dérivés de la vitamine A obtenus par insertion de nucléophiles carboné, aminé et oxygéné en position C4. Ces insertions ont été réalisées dans les conditions optimisées préalablement mises au point.

De fait, en fonction de l'atome par lequel se fait la substitution nucléophile, la fonction obtenue est différente, entraînant des caractéristiques distinctes au niveau des analyses, en particulier en RMN du carbone et en IR (Figure 51). La RMN du carbone nous a permis d'affirmer que le composé formé est un isothiocyanate et non un thiocyanate. En effet, sur l'extrait du spectre fourni en Figure 52, on note l'absence des deux signaux caractéristiques de la fonction thiocyanate, à savoir un signal à 50 ppm pour le carbone C4 et un signal à 110 ppm pour le carbone du thiocyanate lui-même. En revanche, les signaux de l'isothiocyanate sont bien visibles à 59 ppm et 136 ppm, contre 58 et 135 attendus. Concernant les signaux escomptés en IR, celui du thiocyanate devrait se présenter sous la forme d'une très fine bande entre 2000 et 2200 cm^{-1} tandis que pour l'isothiocyanate, la bande devrait être très large. Dans notre cas, nous avons obtenu une bande très large à 2082 cm^{-1} .

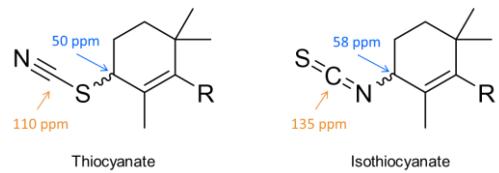


Figure 51. Déplacements chimiques caractéristiques attendus en RMN du carbone selon la fonction insérée. R représente le reste du squelette rétinoïde de l'ester MOM.

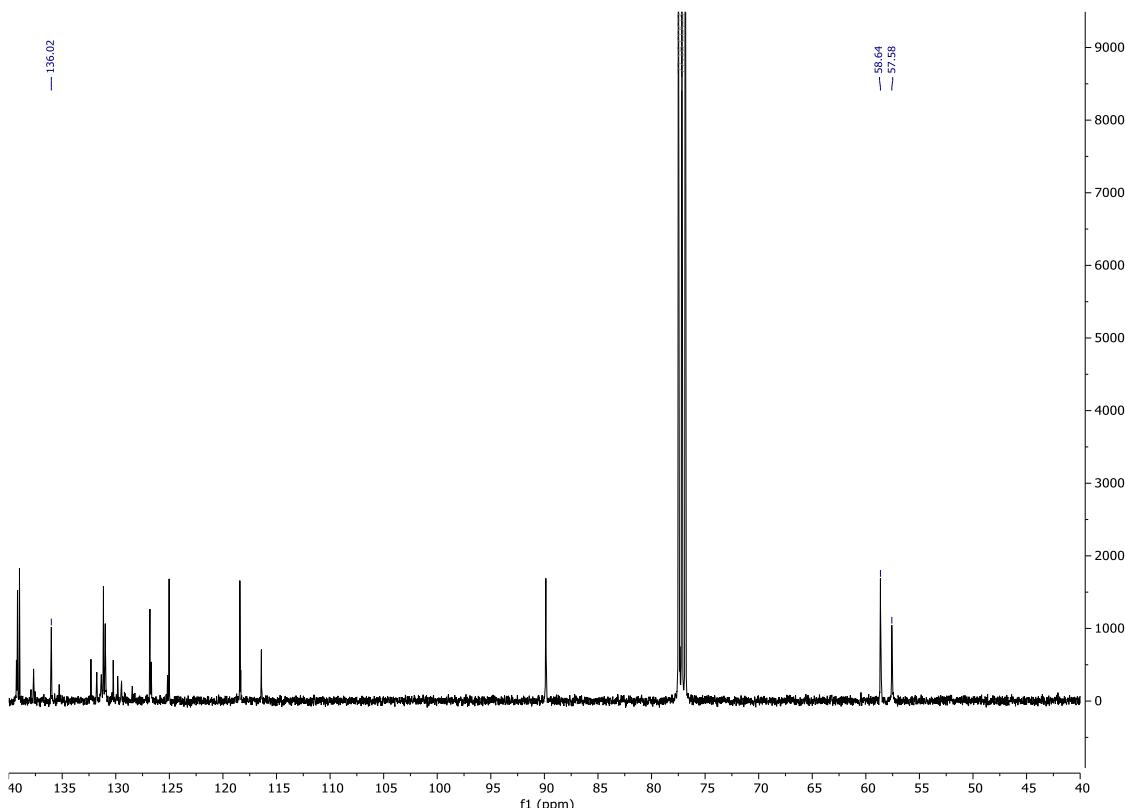


Figure 52. Extrait du spectre RMN du carbone du composé **27**, centré sur [40 ;140 ppm]. Seuls les signaux d'intérêt ont été mis en évidence.

Pour ce qui est de la tentative d'insertion du carbamate **C**, cela n'a pas été concluant. En effet, comme avec le rétinal, il n'a pas été possible de détecter, par RMN, la présence du groupement protecteur Boc. Également, aucune analyse n'a permis de mettre en lumière une éventuelle déprotection de l'amine. Concernant l'insertion de l'isocyanate **B**, elle a été tentée à plusieurs reprises. Bien que le composé ait pu être détecté en début de réaction au sein du brut, il n'a jamais pu être isolé. Cela peut s'expliquer par la forte réactivité de cette fonction. Afin de contourner ce problème, sa capture *in situ* avec la propargylamine a été tentée selon les conditions décrites dans le **Schéma 14**. Toutefois, bien que les analyses du brut réactionnel aient montré une conversion quasi-totale de l'ester de départ, seul ce dernier a été isolé après purification.

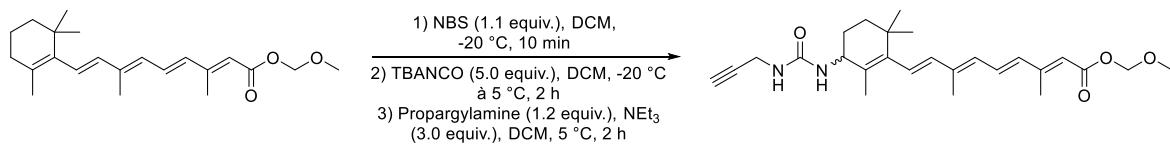


Schéma 14. Conditions testées pour la capture *in situ* de l'isocyanate sur l'ester MOM.

Ainsi, trois nouveaux dérivés de la vitamine A ont été synthétisés avec succès en utilisant la méthode initialement développée pour l'insertion de la fonction azoture. Cela montre que ces conditions peuvent être appliquées à l'insertion de divers nucléophiles sur la position C4 des rétinoïdes, ouvrant de nombreuses perspectives à cette méthodologie.

2.7.3. Dérivés de l'acide rétinoïque présentant en C4 des fonctions d'intérêt à distance du squelette rétinoïde

Pour ce qui est de la troisième approche, afin de lui donner une légère mobilité et de le rendre, potentiellement, plus accessible à la sonde alcyne tendu pour la cycloaddition, l'azoture a été mis à distance du squelette rétinoïde. Cette démarche a été motivée par les résultats obtenus lors des travaux d'imagerie. Nous avons en effet observé un important manque de spécificité du marquage par les sondes fluorescentes (voir Chapitre 3), pouvant être dû à de nombreux facteurs. En particulier la structure de la sonde rétinoïde : l'azoture étant directement attaché au squelette rétinoïde, il peut ne pas être accessible à l'alcyne tendu. C'est pour cela qu'un dérivé sur lequel l'azoture est mis à distance grâce à un petit bras espaceur a été préparé (**Schéma 15, 29**). C'est le motif diéthylène glycol qui a été choisi afin de ne pas augmenter l'hydrophobie de la molécule. La longueur de cet espaceur a été sélectionnée de sorte à créer une distance suffisante avec le rétinoïde sans pour autant apporter trop de flexibilité qui pourrait, par exemple, conduire à un repliement non désiré de ce bras. Le diéthylène glycol retenu a été modifié de sorte à obtenir une extrémité avec l'azoture et l'autre avec une amine libre, permettant son insertion sur le rétinoïde en C4, comme illustré dans le paragraphe **2.7.2**.

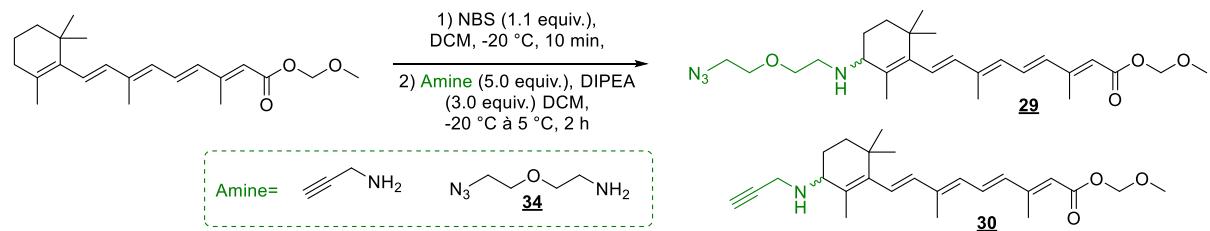


Schéma 15. Conditions réactionnelles pour l'obtention des composés **29** et **30**.

Dans un même temps, et toujours par suite des résultats d'imagerie, nous avons émis l'hypothèse que la SPAAC puisse ne pas convenir à nos études. En effet, la littérature la présente quasi exclusivement pour du marquage de biomolécules en surface des cellules et non pour du marquage intracellulaire,^{309,310,311} amenant à considérer la possibilité de travailler avec la CuAAC. De fait, comme expliqué en introduction de ce chapitre, il est possible d'utiliser cette réaction pour du marquage intracellulaire de cellules vivantes, à condition de se servir de ligands du cuivre adaptés. Ce procédé n'est pas idéal car il implique l'utilisation de molécules exogènes supplémentaires pouvant biaiser les études mais il reste intéressant pour parvenir à un premier niveau d'étude du métabolisme de la vitamine A. Le composé **30** a ainsi été obtenu en utilisant la propargylamine. Il pourra par la suite être testé en imagerie.

De cette façon, la synthèse de deux nouvelles sondes rétinoïdes a été réalisée en conservant la méthodologie développée initialement. Les tests biologiques, notamment d'imagerie, devraient permettre de déterminer si cette distance est utile ou non et si elle est insuffisante, satisfaisante ou trop importante.

2.7.4. Réduction de l'azoture en amine dans le but d'obtenir des dérivés aminés facilement fonctionnalisables

La dernière approche qui a été tentée est la réduction de l'azoture en amine. En effet, en obtenant une amine sur la position C4, il serait ensuite possible d'ajouter une multitude de fonctions d'intérêt, que ce soit par couplage ou par addition. Tout d'abord, diverses conditions de réduction ont été expérimentées sur le rétinal azidé comme décrit dans le **Tableau 6**. Les trois premières conditions testées, qui ont été reproduites à plusieurs reprises, ont montré une dégradation complète après traitement et/ou purification des bruts réactionnels. Cela se traduit par des analyses en HPLC analytique avec un grand nombre de pics, des signaux RMN non attribuables et des données de HRMS ne rapportant aucune masse attendue ou probable. Nous avons pensé que le problème pouvait venir de l'usage des phosphines, que l'on sait oxophiles et ayant donc le potentiel d'interagir avec l'aldéhyde. Une hydrogénéation a donc été tentée en utilisant un palladium empoisonné afin de ne pas impacter les doubles liaisons mais une importante dégradation du brut a été observée. Une hydrogénéation au palladium sur charbon a tout de même été essayée mais elle a

également conduit à la dégradation du rétinal. Le substrat de départ a alors été modifié et c'est l'ester *tert*-butylique de l'AR qui a été retenu, les autres esters n'ayant pas été synthétisés au moment de ces tests. L'utilisation de la triméthylphosphine a, une nouvelle fois, amené une dégradation après traitement. Une condition plus douce a été testée avec le TCEP, n'amenant aucune réaction. Enfin, des conditions faisant appel à une Amberlite hautement acide ont été appliquées, ne produisant aucune réaction.

Rétinoïde	Conditions de réduction	Observation ^a
N ₃ RAL	PPh ₃ (1.3 equiv.), 25 °C, THF/HCl 1M, 16 h	Dégradation ^b
	PPh ₃ supportée (10.0 equiv.), 25 °C, dioxane/HCl 1M, 16 h	Dégradation ^b
	PMe ₃ (1.1 equiv.), 25 °C, THF, H ₂ O, 16 h	Dégradation ^b
	H ₂ , Pd Lindlar (20% w/w), quinoline (2.2 equiv.), 25 °C, MeOH, 16 h	Brut dégradé
	H ₂ , Pd/C (20% w/w), 25 °C, MeOH, 16 h	Brut dégradé
N ₃ RoateBu	PMe ₃ (1.2 equiv.), 25 °C, THF, H ₂ O, 16 h	Dégradation ^b
	TCEP (1.5 equiv.), 25/50 °C, dioxane, H ₂ O, 16 h ³¹²	Pas de conversion
	Nal (4.0 equiv.), Amberlite (2.0 equiv.), 40 °C, 200 mbar, CHCl ₃ /MeOH, 10 min ³¹³	Pas de conversion

Tableau 6. Ensemble des conditions de réduction de l'azoture testées sur le rétinal et l'ester *tert*-butylique azidés ; a: conversion suivie par HPLC analytique à 370 nm ; b: dégradation ayant eu lieu après traitement et/ou purification.

En définitive, les conditions testées pour la réduction de l'azoture en C4 n'ont soit pas permis de réaction soit mené à une dégradation du rétinoïde de départ. Il est difficile d'envisager d'autres conditions étant donné que les rétinoïdes présentent deux facteurs limitants : le système polyénique et le carbonyle. En effet, la majorité des procédures pour la réduction des azotures en amines sont également valables pour la réduction de carbonyles tandis que les autres permettent généralement la réduction des liaisons insaturées. N'ayant pas obtenu de composé avec une amine libre permettant une fonctionnalisation facile, la solution qui semble la plus adaptée serait de se tourner vers l'ester de MOM portant l'isothiocyanate en C4. En effet, il s'agit

d'une fonction sur laquelle il est possible d'ajouter de nombreux nucléophiles, qui permettrait donc un accès aisément à un large panel de dérivés supplémentaires.^{314,315}

2.8. Conclusion

En conclusion, nous sommes parvenus à synthétiser vingt sondes moléculaires rétinoïdes pour l'étude du métabolisme de la vitamine A. Cela a été rendu possible par la mise au point d'une nouvelle méthode d'insertion tardive d'azoture en position allylique. Bien que cette stratégie ne semble applicable qu'aux rétinoïdes et aux caroténoïdes, elle a pu être utilisée sur l'ensemble des entrées de la cascade métabolique de la vitamine A puis extrapolée à l'insertion de divers autres groupements nucléophiles, qu'ils soient carbonés, aminés ou oxygénés en position C4. Onze de ces sondes ont vu leur activité biologique testée, *via* leur capacité à activer la transcription du récepteur RAR α . Même si certaines sondes n'ont pas présenté l'activité escomptée, d'autres se sont détachées, en particulier l'ester méthoxyméthyle d'acide rétinoïque (MOM), dont l'activité, en particulier de la forme azidée, est quasi identique à celle de l'acide rétinoïque naturel. Également, les sondes présentant une activité intéressante ont vu leur cytotoxicité contrôlée. De fait, ces dernières ayant été synthétisées dans le but d'éviter une utilisation directe de l'acide rétinoïque, cytotoxique dès la concentration du micromolaire, il était nécessaire d'étudier ce paramètre pour nos sondes. Il s'est avéré que seule une des molécules possède une toxicité significative, autorisant une utilisation des autres sondes pour nos diverses études.

Les neufs dernières sondes présentées n'ont pas encore pu être testées mais les résultats biologiques seront déterminants. En effet, selon l'impact de chacune des modifications effectuées, il sera possible d'orienter la suite des modifications sur ces composés, de sorte à enrichir la librairie de sondes avec des composés ayant une activité intéressante. Par exemple, la modification du carbonyle en nitrile pourrait amener à développer une classe de sondes antagonistes de RAR α .

CHAPITRE 3 – SONDES POUR L’ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES RÉTINOÏDES DANS LES CELLULES

3.1. Contexte et objectif

Le premier axe du projet consistait à développer une méthodologie permettant l’étude de la biodistribution des rétinoïdes à l’échelle cellulaire et subcellulaire. Le terme de biodistribution est majoritairement utilisé en pharmacologie pour désigner la répartition, localisation et concentration, d’une molécule médicamenteuse au sein d’un organisme.³¹⁶ Ici, la définition est identique, exception faite que les études portent sur des molécules endogènes et non exogènes à visée thérapeutique.

Suite à un manque d’outils adaptés, les connaissances sur les dynamiques cellulaires et intracellulaires des rétinoïdes restent limitées et spéculatives. En effet, on note dans la littérature que les rétinoïdes ont fait l’objet de nombreuses recherches depuis leur découverte mais qu’il n’existe aujourd’hui aucune technique adaptée à leur visualisation aux niveaux cellulaire et subcellulaire. De fait, les études qui ont été réalisées portaient sur la distribution des rétinoïdes au niveau d’un organe avec, le plus souvent, l’analyse parallèle de plusieurs organes conduisant à recontextualiser les résultats à l’échelle de l’organisme.

Parmi ces travaux, on peut citer ceux de Cifelli et Ross publiés en 2006 dans lesquels la biodistribution des rétinoïdes a été suivie par radio marquage dans le foie, les intestins et les poumons de rats chez lesquels une inflammation avait été induite.³¹⁷ Par la suite, Kane *et al.* ont travaillé au développement d’une méthode d’HPLC/UV avec une haute sensibilité pour la quantification du ROL, de l’atAR et des ER au sein de nombreux tissus.³¹⁸ Cette méthodologie ayant donné accès à des quantifications jusque-là non accessibles, elle a été largement employée dans les travaux ultérieurs. En 2017, Yokoto et Oshio l’ont appliquée pour la quantification du ROL et des ER dans le sérum, le foie et le cerveau de souris atteintes d’hypervitaminose.³¹⁹ Enfin, des travaux très récents ont également fait appel à l’HPLC/UV pour suivre l’évolution des concentrations de l’atAR et du ROL dans le plasma de femmes enceintes à différents

stades de la grossesse ou durant le post-partum.^{320,321} En parallèle, Wuertz *et al.* ont étudié l'accumulation des rétinoïdes dans certains tissus de sandres femelles lors de la maturation des ovocytes, montrant une migration du ROL contenu dans le foie vers les gonades.³²²

Bien que l'ensemble de ces recherches ait amené à une meilleure compréhension des dynamiques régissant l'homéostasie des rétinoïdes au sein des organismes vivants, ils n'ont pas permis de le faire à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Il faut en effet noter que l'utilisation de l'HPLC/UV sur ces échelles n'est pas adaptée car il ne serait pas possible d'isoler chacune des organelles pour les analyser individuellement et la quantité de cellules requises serait trop importante pour des quantités d'analytes récoltées très faibles.

Deux équipes ont toutefois publiés des travaux faisant appel à des outils avec un potentiel pour des études de biodistribution aux échelles cellulaire et subcellulaire. Tout d'abord, Chisholm *et al.* ont rapportés en 2019 des rétinoïdes synthétiques possédant une fluorescence intrinsèque.³²³ Bien que ces molécules aient permis d'étudier précisément la liaison des rétinoïdes aux CRABPs, leurs structures restent très éloignées de celles des rétinoïdes naturels. Ainsi, il est difficile d'envisager des expériences sur la biodistribution qui ne soient pas biaisées par ces différences. Deux ans plus tard, Bos *et al.* ont fait état de rétinoïdes modifiés en position C3 avec un alcyne terminal permettant une réaction click avec une sonde fluorescente azidée.³²⁴ Ces molécules ont donné lieu à la visualisation de l'internalisation des rétinoïdes au sein de différentes cellules immunitaires mais, comme mentionné en introduction du Chapitre 2, un important travail de synthèse est requis, expliquant qu'elles n'aient pas été retenues pour nos travaux.

Ainsi, notre objectif était de parvenir à mettre au point des outils permettant la localisation des rétinoïdes à l'échelle cellulaire et subcellulaire dans différents types de cellules, à diverses étapes du cycle cellulaire, à plusieurs niveaux de différenciation... de sorte à visualiser les modifications spatio-temporelles subies par les rétinoïdes et à apporter de nouvelles connaissances sur les dynamiques moléculaires de la vitamine A.

3.2. Technique pour les études de biodistribution

3.2.1. Choix de la méthode pour l'étude de la biodistribution des rétinoïdes

Les études de biodistribution peuvent être réalisées à l'aide du marquage radioactif,^{325,326} de la microscopie par fluorescence^{327,328} ou de l'imagerie par spectrométrie de masse (ISM).^{329,330} Concernant le marquage radioactif, il est nécessaire de posséder l'ensemble des équipements et installations permettant la manipulation de composés radioactifs mais également leur détection. Il en va de même pour l'imagerie par spectrométrie de masse qui fait appel à des appareillages spécifiques, dédiés à cet usage. Dans les deux cas, notre laboratoire ne possède pas les équipements requis, nous orientant ainsi vers la microscopie par fluorescence.

La microscopie par fluorescence est une technique d'imagerie moléculaire qui consiste à générer des images dans lesquelles l'intensité lumineuse en un point précis est proportionnelle à la quantité de l'espèce moléculaire étudiée. Les images sont générées par l'illumination de molécules portant un fluorophore (illustré par un rond bleu dans le **Schéma 16**) à une longueur d'onde définie, idéalement proche du pic d'excitation du fluorochrome. S'en suit la détection de la lumière émise par le fluorophore, permettant d'acquérir les images qui sont ensuite analysées.

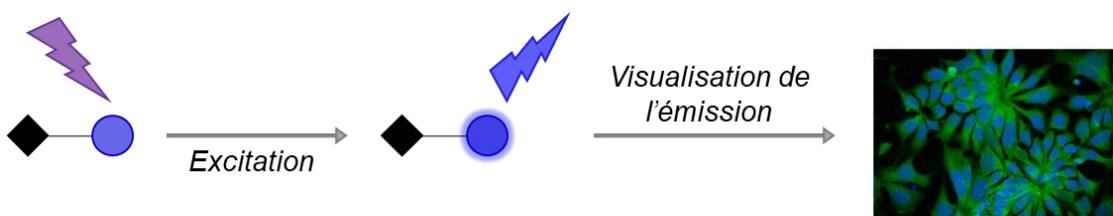


Schéma 16. Illustration du principe de la microscopie par fluorescence. Le carré noir correspond à la biomolécule à visualiser seule ou substituée. Le rond bleu représente le fluorophore.

La microscopie par fluorescence est une méthode peu invasive, permettant ainsi un usage *in vitro*,³³¹ *ex vivo*³³² et *in vivo*.³³³ Il s'agit d'un procédé à la fois spécifique et très sensible, conduisant à des marquages précis au sein des cellules et à la capacité de suivre des processus dynamiques.³³⁴ Avec cette technique, il est aussi possible d'utiliser plusieurs fluorophores ayant des couleurs distinctes. Cela donne la possibilité de traquer diverses molécules simultanément mais également de visualiser d'éventuelles interactions entre celles-ci ou avec les organelles.³³⁵ Toutefois, des

inconvénients sont à souligner. Tout d'abord, cette méthode ne permet pas la découverte de structures inattendues si celles-ci ne possèdent pas de fluorescence intrinsèque. Ensuite, lorsque l'on souhaite travailler conjointement avec plusieurs fluorochromes, ils doivent être choisis avec précision de sorte que les fluorescences émises ne se recouvrent pas. Cela conduirait à une extinction des fluorescences et donc à une diminution du ratio signal/bruit, réduisant grandement la résolution des images. De plus, le photoblanchiment – processus par lequel le fluorophore perd sa fluorescence à la suite d'une altération de sa structure causée par la lumière – peut se révéler plus ou moins important selon les fluorochromes utilisés.^{336,337} Enfin, on note l'endommagement des cellules pouvant survenir à la suite de leur interaction avec le fluorophore et/ou la lumière excitatrice.

Ainsi, il est indispensable de prendre en compte l'ensemble de ces paramètres afin d'obtenir des marquages les plus propres et précis possible.

3.2.2. Outils pour le marquage en microscopie par fluorescence

3.2.2.1 *Fluorophore et sonde fluorescente*

Comme évoqué précédemment, de façon générale, les biomolécules que l'on souhaite étudier ne présentent pas de fluorescence intrinsèque qui permettrait de réaliser directement l'imagerie. Il est donc nécessaire de leur ajouter un marqueur fluorescent de sorte à les rendre visibles dans les milieux biologiques. Ce marqueur peut être un fluorophore seul ou inclus dans une sonde fluorescente tel qu'illustre sur la **Figure 53**. Une sonde comporte généralement un groupement fonctionnel pour faire la liaison sur la biomolécule à étudier (noté R^1), un bras espaceur permettant la mise à distance des différentes fonctionnalités (représenté par le rectangle blanc) et un fluorophore (illustré par le rond bleu). Le groupement fonctionnel R^1 peut être soit directement amené par le bras espaceur soit ajouté à celui-ci lors de la synthèse de la sonde.

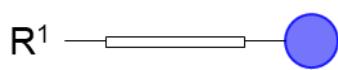


Figure 53. Structure générale d'une sonde fluorescente. R^1 est une fonction permettant la réaction sur la biomolécule à étudier. Le rond bleu représente le fluorophore. Le bras espaceur est illustré par un rectangle blanc.

De cette façon, il est possible de marquer la biomolécule d'intérêt selon deux approches illustrées dans le **Schéma 17**. La première, qui est la plus directe, consiste en l'addition du fluorophore choisi sur la biomolécule. La fonction R^2 peut être naturellement présente ou avoir été incorporée chimiquement sur la molécule. Toutefois, cette approche ne peut s'appliquer aux petites molécules sans un risque non négligeable d'impacter leur activité biologique du fait des structures souvent encombrantes des fluorochromes. La seconde stratégie repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente qui est ajoutée dans le milieu biologique. Cette approche permet de marquer la biomolécule de façon plus tardive et donc de réduire les risques de modifier son activité.

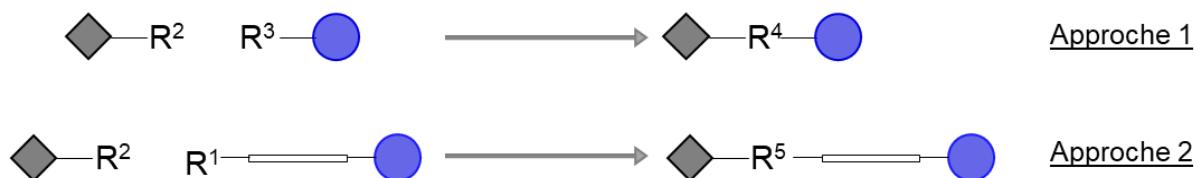


Schéma 17. Voies possibles pour le marquage fluorescent de biomolécules. R^2 peut réagir avec R^1 et R^3 . R^4 est la fonction résultante de la réaction entre R^2 et R^3 . R^5 est la fonction résultante de la réaction entre R^2 et R^1 . Le carré gris représente la biomolécule d'intérêt. Le rond bleu correspond au fluorophore.

Dans notre cas, les rétinoïdes étant des molécules dont les nombreuses activités dépendent fortement de leur structure, nous avons souhaité limiter au maximum les insertions directes sur leur squelette. C'est pour cela que l'approche 2 a été retenue. Il a ainsi été nécessaire d'étudier les paramètres requis pour la préparation d'une sonde fluorescente fonctionnelle.

3.2.2.2. Propriétés clés d'une sonde fluorescente

Pour être efficiente, une sonde fluorescente doit posséder différentes caractéristiques précises. En particulier, ces propriétés doivent être minutieusement respectées dans le cas des cellules vivantes, plus sensibles et donc plus délicates à imager.

Tout d'abord, dans le cadre de travaux d'imagerie intracellulaire, une bonne perméabilité aux membranes est requise afin de pouvoir pénétrer dans les cellules. Pour ce faire, il est possible de se baser sur la règle des 5 de Lipinski, déjà couramment utilisée pour la synthèse de potentiels médicaments et illustrée dans la **Figure 54**.³³⁸

Cette règle consiste à dire que pour avoir un bon équilibre entre hydrophilie et hydrophobie, une molécule ne doit pas comporter plus de cinq donneurs et dix accepteurs de liaisons hydrogène, sa masse molaire ne doit pas dépasser 500 g/mol et son coefficient de partage (logP) doit être inférieur à cinq. Néanmoins, il est difficile de respecter ces règles tout en répondant aux paramètres photophysiques requis pour la microscopie par fluorescence. C'est pour cela que le manque de perméabilité des molécules fluorescentes est aujourd'hui l'une des problématiques majeures dans ce type de travaux.³³⁹ Il est toutefois possible de l'outrepasser en perméabilisant les cellules,³⁴⁰ réalisant des micro injections³⁴¹ ou encore procédant par écrasement des cellules.³⁴² Cependant, ce sont des méthodes invasives, amenant un biais dans les études.

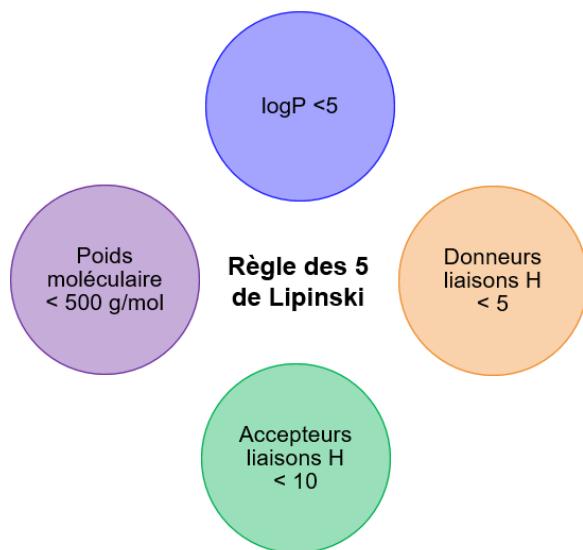


Figure 54. Règle des 5 de Lipinski.

Ensuite, le marquage de la biomolécule cible doit être spécifique de la molécule ciblée et rapide afin de conduire à une haute résolution des images. Ce paramètre est modulé par l'ensemble de la structure de la sonde, les différents éléments pouvant impacter les paramètres physicochimiques de celle-ci. Il s'agit d'un second point problématique, en particulier pour l'imagerie des cellules vivantes, ce qui a conduit à la création des sondes fluorogènes. La fluorogénécité définit la capacité d'une molécule à voir sa fluorescence apparaître ou augmenter significativement à la suite d'une activation. Diverses voies d'activation ont été rapportées dans la littérature et sont présentées sur la **Figure 55**.³⁴³ La fluorescence peut apparaître à la suite de l'action d'enzymes sur un groupement bloquant la fluorescence, représenté ici en gris (**Figure 55, A**). Il peut s'agir d'un clivage entre la molécule et le groupement ou d'une transformation de ce

dernier.³⁴⁴ Il est aussi possible de travailler avec des sondes de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) pour lesquelles c'est la coupure de la jonction entre les deux fluorophores qui conduit à l'apparition de la fluorescence (**Figure 55, B**).³⁴⁵ Il est également envisageable de former la molécule fluorescente par photoconversion *in situ* (**Figure 55, C**).^{346,347} Enfin, la liaison de la sonde fluorescente, en particulier d'une fonction précise, à une molécule d'intérêt peut conduire à une augmentation non négligeable de la fluorescence (**Figure 55, D**).³⁴⁸ Cette dernière technique a déjà été largement utilisée pour l'imagerie de protéines,³⁴⁹ du cytosquelette³⁵⁰ ou bien de l'ADN.³⁴⁸

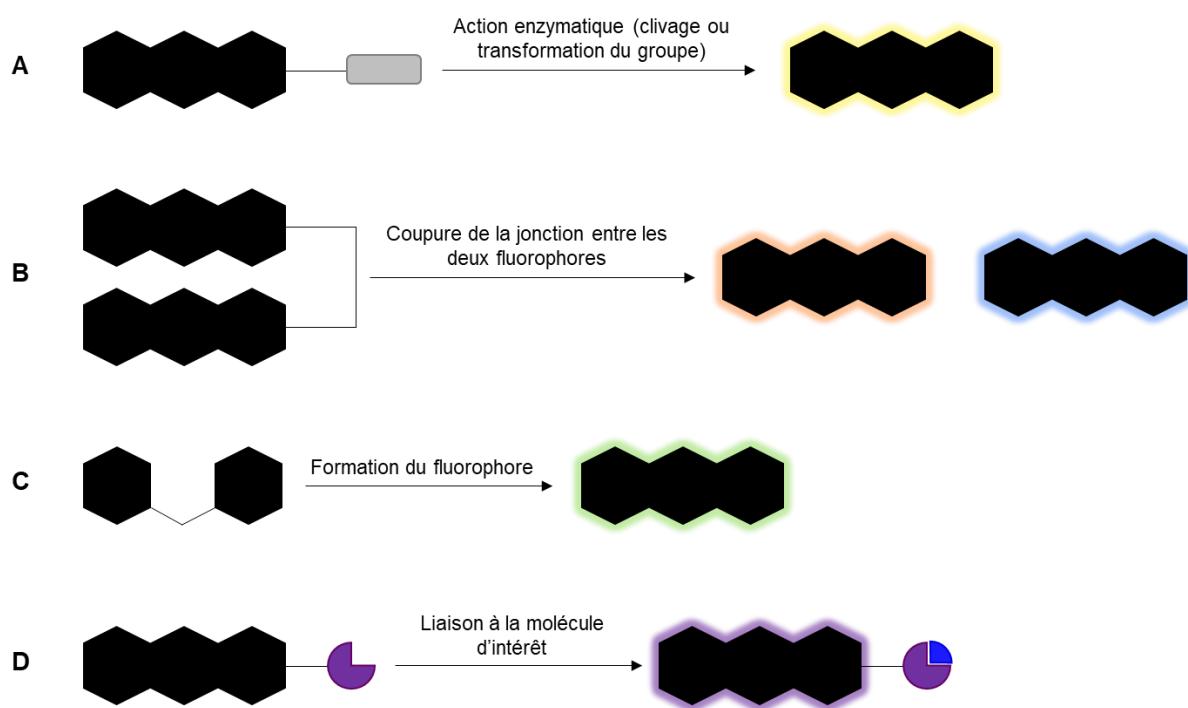


Figure 55. Différentes activations possibles des molécules fluorogènes. Figure reprise du rapport de Grimm et al. publié en 2013. En noir apparaissent les structures des sondes fluorogènes. Les couleurs illustrant la fluorescence ont été choisies de façon arbitraire.

Bien que ces sondes permettent de palier les problèmes de spécificité³⁵¹ et que de nombreuses stratégies de synthèses aient été rapportées,³⁵² elles représentent un défi supplémentaire. En effet, en plus de l'ensemble des caractéristiques requises pour des sondes fluorescentes, les sondes fluorogènes doivent être en mesure de commuter entre deux formes stables, à savoir la forme éteinte (non-fluorescente) et la forme allumée (fluorescente), cette dernière devant apporter une fluorescence suffisante pour être détectable.^{353, 354}

Un autre paramètre important pour les sondes fluorescentes est la solubilité au sein des milieux aqueux. De fait, une bonne solubilité permet notamment de minimiser voire d'éviter l'ajout de solvants organiques tels que le DMSO lors de la solubilisation des sondes.

Également, la sonde doit posséder une forte brillance. La brillance correspond au rendement de fluorescence par molécule et se calcule comme le produit du rendement quantique de fluorescence par le coefficient d'extinction molaire pris à la longueur d'onde d'excitation de travail (**Formule 1**). Elle est, le plus souvent, exclusivement apportée par le fluorophore. Une brillance importante permet de réduire l'intensité des lasers utilisés lors de l'imagerie et donc de diminuer les risques de phototoxicité. De ce fait, l'ensemble des processus peuvent se dérouler normalement au sein des cellules, évitant un biais dans les études. Ce paramètre amène aussi une meilleure résolution des images et peut être amélioré en supprimant les voies de désexcitation non-radiatives du fluorophore *via* des modifications structurelles de celui-ci.³⁵⁵

$$\text{Brillance} = \text{Coefficient d'extinction molaire}(\epsilon) \times \text{Rendement quantique de fluorescence}(\Phi_F)$$

Formule 1. Formule pour le calcul de la brillance d'une molécule. La brillance et le coefficient d'extinction molaire sont en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le rendement quantique de fluorescence est le ratio du nombre de photons émis par la molécule sur le nombre de photons absorbés par celle-ci. ϵ et Φ_F sont déterminés à la longueur d'onde d'excitation de travail.

D'autre part, pour que la sonde soit utilisable, elle doit posséder une certaine photostabilité. Ce paramètre est une nouvelle fois incombe au fluorophore et désigne la propriété de celui-ci à produire un signal fluorescent stable dans le temps et dont l'intensité reste constante lors de l'irradiation. Elle varie selon les familles de fluorochromes, comme illustré dans la **Figure 56** réalisée à partir de la revue de Demchenko.³³⁶ La photostabilité est déduite du rendement quantique de photoblanchiment, noté Φ_B , et calculé selon la formule suivante :

$$\Phi_B = \frac{\text{nombre de molécules photoblanchies}}{\text{nombre total de photons absorbés}}$$

Formule 2. Formule pour le calcul du rendement quantique de photoblanchiment.

On remarque que les bore-dipyrrrométhenes (BODIPYs) et les cyanines sont les familles de fluorophores qui subissent le moins le photoblanchiment. Elles sont donc plus stables et permettent une utilisation plus longue avant de se dégrader.

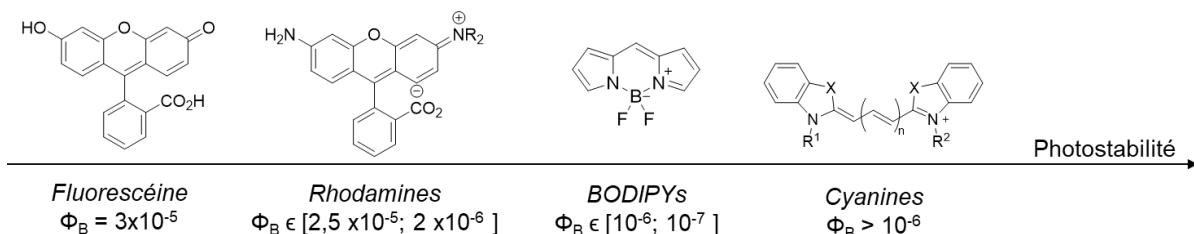


Figure 56. Echelle de photostabilité des grandes familles de fluorophores déterminée par les valeurs de rendement quantique de photoblanchiment. R, R¹ et R² sont des chaines alkyles quelconques. Les BODIPYs peuvent être substitués. Les cyanines sont de toutes classes.

Il est important de noter que la photostabilité recherchée peut varier selon les techniques d'imagerie utilisées et selon la durée des expériences. Ainsi, il peut être suffisant, dans certains cas, d'utiliser des fluorochromes moins stables. Il existe aussi diverses méthodes permettant de réduire la perte d'intensité du signal telles que la modulation de la structure^{356,357} ou l'ajout d'un triplet state quencher (TSQ).³⁵⁸

Pour finir, il est avantageux que la sonde, plus particulièrement le fluorophore, présente des longueurs d'onde d'émission et d'excitation situées du rouge lointain jusqu'au proche IR, soit entre 650 nm et 1350 nm. En effet, cela permet de se placer dans une gamme de longueurs d'onde où les cellules absorbent moins, entraînant une auto-fluorescence des cellules ou tissus plus faible. Par ailleurs, cela permet de réduire la phototoxicité. Cependant, il n'est pas possible de travailler exclusivement avec des fluorophores de cette gamme car un ensemble de couleurs est nécessaire pour réaliser des études complètes en imagerie multicanale.³⁵⁹

Il est important de noter que chacun des paramètres est lié aux autres. De ce fait, la modification de l'un peut entraîner des variations significatives ou non de l'ensemble des propriétés, faisant de la synthèse d'une sonde fluorescente un processus complexe et itératif. Toutefois, il existe aujourd'hui un large panel de sondes décrites dans la littérature ou commercialement disponibles, permettant d'éviter ce cheminement.

Dans notre cas, en plus de posséder l'ensemble des critères présentés, la sonde doit posséder un alcyne contraint de sorte à permettre une cycloaddition sur les rétinoïdes azidés. Également, ceux-ci pouvant se trouver dans le noyau, il serait idéal que la sonde puisse y pénétrer. Au cours de nos travaux, quatre sondes distinctes ont été testées, une commerciale et trois synthétiques. Les intérêts de chacune de ces sondes seront explicités dans les paragraphes dédiés.

3.3. Protocole pour les travaux d'imagerie

L'intégralité des études d'imagerie présentées dans ce chapitre ont été menées par Alexia Kindler, doctorante de l'équipe de Wojciech Krezel (IGBMC, Strasbourg).

Sauf mention du contraire, l'ensemble des expériences d'imagerie de cette thèse ont été conduites selon le protocole illustré dans le **Schéma 18**. Les cellules ont été incubées à 37 °C avec un taux de CO₂ de 5%. Le type de microscope utilisé sera précisé pour chacune des images fournies. Lors de la prolifération des cellules, des sphères de cellules non différenciées se forment : on parle de corps embryonnaires. Durant cette étape ont été incubées les molécules d'intérêt, à savoir le rétinal (contrôle négatif), le 5-AmdU (contrôle positif) et le rétinal azidé (molécule testée) pendant 16 h. Cette durée a été allongée à 24 h pour certaines conditions. La concentration de 5 µM pour les rétinoïdes correspond à la concentration maximale qu'il est possible d'incuber sur les corps embryonnaires sans causer de toxicité. La concentration de 10 µM de 5-AmdU a pour objectif de permettre un marquage non-discutable. Les sphères traitées et en cours de différenciation ont ensuite subi un traitement à la trypsine permettant de dissocier les cellules. Elles ont alors pu être plaquées sur lames et ensemencées pendant 3 h ou 24 h selon les conditions dans un milieu favorisant la différenciation. L'usage des rétinoïdes conduit à la différenciation exclusive des P19 en neurones. Une fois différencierées, les cellules ont été utilisées vivantes ou fixées.

Dans le cadre des travaux sur cellules vivantes, la sonde a été incubée pendant différentes durées et à différentes concentrations. Les marqueurs spécifiques (DAPI, LysoTracker,...) ont aussi incubés à cette étape, avec des durées et des concentrations précises qui seront mentionnées en légende des figures concernées. Pour finir, les cellules ont été lavées afin de retirer l'excès des différentes molécules puis imagées par microscopie par fluorescence. Pour les études sur cellules fixées, une étape de fixation au paraformaldéhyde (PFA) est préalable à l'incubation de la sonde. Elle peut également s'accompagner d'une étape de perméabilisation pour certaines expériences. La suite des étapes est identique.

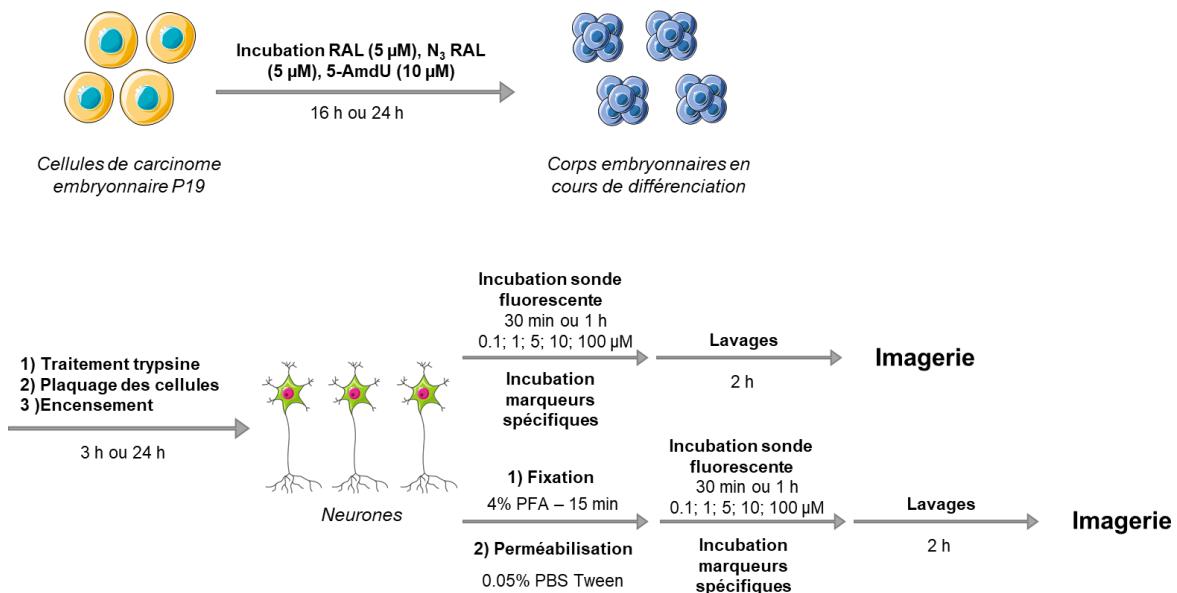


Schéma 18. Protocole mis en place pour l'étude de la biodistribution des rétinoïdes par imagerie confocale.

Il est important de noter qu'aucune mort cellulaire n'a été remarquée lors de l'ensemble des travaux réalisés, montrant que les quatre sondes étudiées ne présentent pas de phototoxicité sur l'échelle temporelle de nos expériences.

3.4. Sonde commerciale – BCN- CF®650

Nous avons débuté nos travaux en utilisant une sonde commerciale, à savoir le BCN-CF®650 de chez Biotum. Bien que sa structure exacte soit gardée secrète par le fournisseur, nous savons qu'elle se compose d'un BCN et d'une sulfocyanine doublement pégylée comme illustré sur la **Figure 57**.

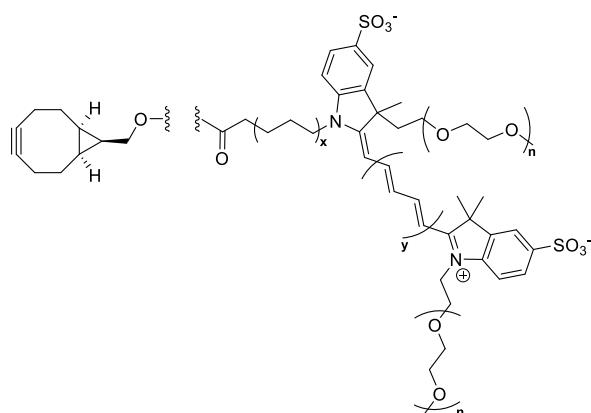


Figure 57. Portions connues de la structure de la sonde commerciale BCN- CF®650. n et $x \geq 1$; $y \geq 0$.

L'objectif était de tester sa spécificité de marquage sur cellules vivantes afin de nous aiguiller quant à la structure de la sonde fluorescente adaptée à nos travaux. Pour ce faire, trois molécules distinctes ont été incubées durant la phase de croissance des cellules P19 : l'*at*RAL, le N₃ RAL et le 5-AmdU. Le 5-AmdU est un nucléoside, plus particulièrement une uridine, possédant un azoture sur sa position C5. Il a ainsi la capacité naturelle à intégrer l'ADN et donc le noyau, comme illustré dans la **Figure 58**. Il a servi de contrôle positif puisqu'il doit permettre, si la sonde est efficace, un marquage sélectif du noyau.³⁶⁰ L'*at*RAL a, quant à lui, été utilisé en tant que contrôle négatif puisque l'absence d'azoture ne doit permettre aucun marquage par la sonde fluorescente. Un autre contrôle, noté « Sonde seule », sert de comparaison entre les images obtenues avec et sans une incubation des rétinoïdes. Cela correspond à une incubation du véhicule (DMSO) à la place des rétinoïdes, avant incubation de la sonde.

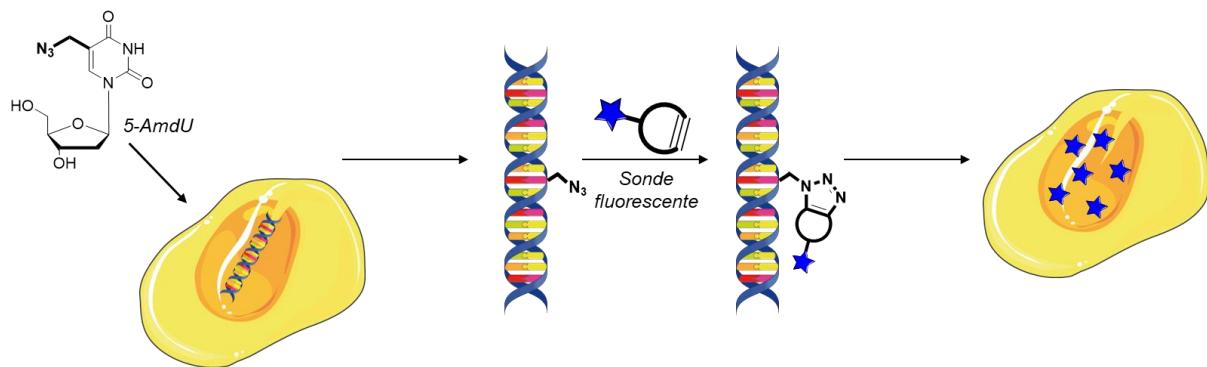


Figure 58. Illustration du marquage sélectif du noyau grâce au 5-AmdU et à une sonde fluorescente portant un alcyne tendu.

Les images obtenues avec le BCN-CF®650 sont présentées dans la **Figure 58**. En plus de la sonde, un marquage des noyaux au Hoechst ainsi qu'un marquage des lysosomes au LysoTracker ont été effectués. Il est important de labelliser les lysosomes car ils sont un lieu de dégradation des molécules, qu'elles soient endogènes ou non. Cela permet de voir si la sonde n'y est pas directement dirigée, ce qui empêcherait son action de marquage. Pour la sonde seule, à savoir les images 1 à 3, on peut voir qu'à part quelques punctas, rien n'est détecté. De façon surprenante, le contrôle positif au 5-AmdU montre un marquage exclusivement en dehors des noyaux avec une colocalisation très partielle avec les lysosomes, comme indiqué par les flèches. Concernant les images obtenues avec l'*at*RAL (7 à 9) et le N₃ RAL (10 à 12), elles sont très similaires et semblent montrer une colocalisation de la sonde avec les lysosomes.

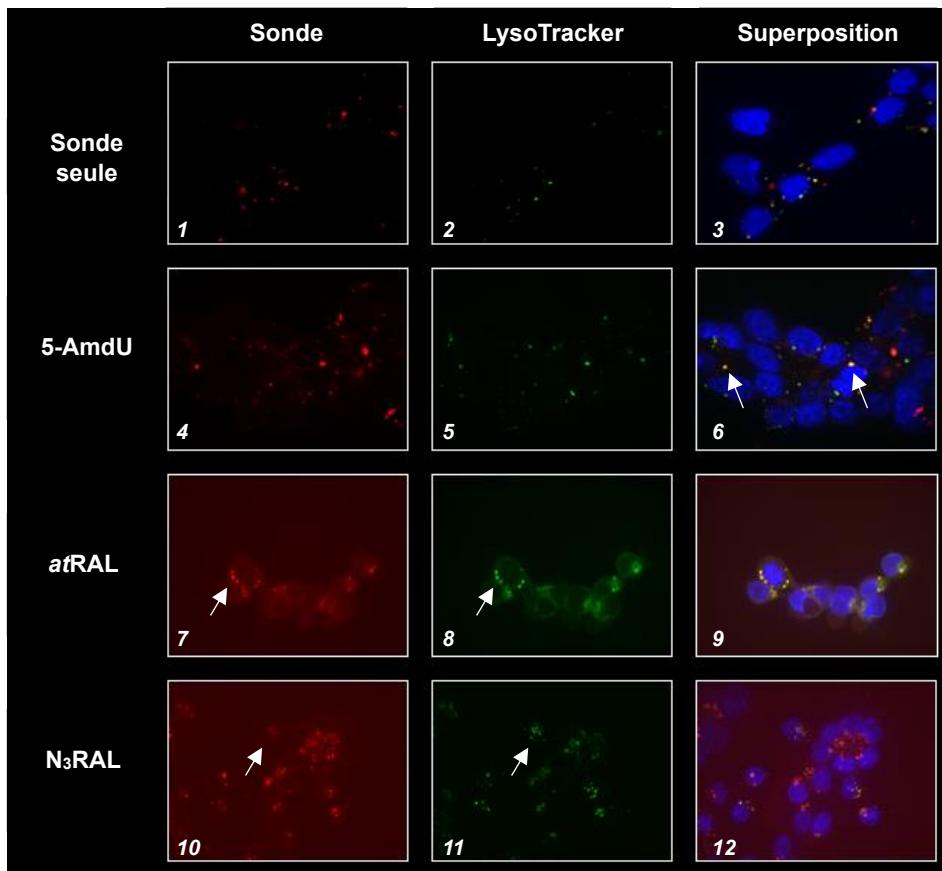


Figure 59. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules de carcinome embryonnaire P19 différenciées vivantes. Les noyaux ont été mis en évidence avec le Hoechst 33342 (en bleu). Les lysosomes ont été mis en évidence avec le LysoTracker green DND-26. Le Hoechst et le LysoTracker ont été incubés à 0.1 µg/mL, le 5-AmdU et la sonde à 10 µM. Le Hoechst a été imaginé à 361 nm, le LysoTracker à 488 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

Afin de confirmer ou non la colocalisation de la sonde avec les lysosomes, un traitement des images a été effectué par masques. La **Figure 60, A** présente la superposition des images obtenues grâce au marquage avec le LysoTracker (en vert) et grâce à la sonde, dont le marquage est visible par les tracés jaunes. Sur la **Figure 60, B**, c'est le contraire : les images en rouge sont celles acquises pour la sonde fluorescente et sont contournées en jaune les zones marquées par le LysoTracker. On peut ainsi observer que les deux marquages se superposent pour la quasi-totalité des punctas. Cela illustre la présence de la sonde BCN-CF®650 au sein des lysosomes.

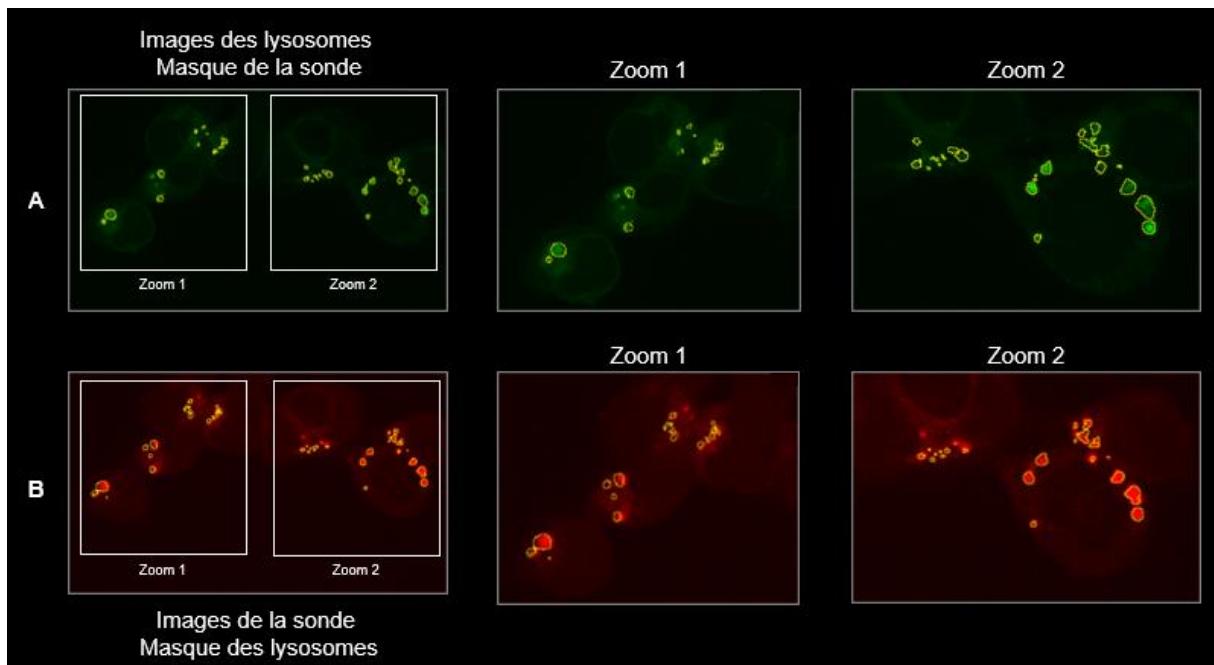


Figure 60. Images obtenues par microscopie confocale au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules de carcinome embryonnaire P19 différencierées vivantes. Les lysosomes ont été mis en évidence avec le LysoTracker green DND-26. Le LysoTracker a été incubé à 0.1 µg/mL et la sonde à 10 µM. Le LysoTracker a été imagé à 488 nm et la sonde à 647 nm. Le traitement des images a été réalisé avec ImageJ.

Ainsi, cette expérience nous montre un très faible marquage par le BCN-CF®650 situé exclusivement en dehors des noyaux et concentré en punctas. Cela pourrait s'expliquer par un temps de résidence court de la sonde dans les cellules, qui l'aurait amenée à sortir des cellules avant le lavage. Il se pourrait aussi que le lavage ait été effectué trop tôt, ne laissant pas le temps à la sonde de rentrer. Une autre hypothèse, au vue de la colocalisation avec les lysosomes, est que l'entrée de la sonde dans les cellules se fait par endocytose, l'amenant à être piégée dans les lysosomes sans avoir accès au reste de la cellule. Cette expérience ne permet donc pas de conclure quant à l'efficacité et la spécificité de marquage de la sonde BCN- CF®650.

L'expérience a été reproduite sur cellules fixées amenant cette fois à un marquage aspécifique de l'intégralité des cellules.

Pour conclure, il semblerait que le BCN ou la sulfocyanine pégylée ne soit pas adapté à l'imagerie souhaitée. D'après les expériences préalablement réalisées au laboratoire, des sondes fluorescentes portant un BCN avaient montré un important marquage aspécifique, laissant à penser que c'est ce dernier qui n'est pas adapté.

3.5. Sondes conçues, synthétisées et imagées

3.5.1. Sonde fluorogène

La sonde commerciale testée n'ayant pas abouti à une imagerie satisfaisante, nous avons décidé de nous orienter vers une approche différente en utilisant une sonde fluorogène. Ce type de sonde devrait permettre de pallier la problématique de marquage aspécifique, comme expliqué en introduction de ce chapitre. Dans la littérature, diverses sondes de ce type ont été rapportées, généralement dérivées de fluorophores connus et/ou commerciaux : rhodamines,^{359,361} cyanines,^{362,363} orange de thiazole,³⁶⁴ Hoechst³⁴⁸... Toutefois, notre choix a été restreint du fait de la nécessité de la sonde de posséder un alcyne contraint en son sein. Nous nous sommes donc tournés vers les travaux de Friscourt *et al.* publiés en 2012 et décrivant une dibenzocyclooctyne fluorogène (FI-DIBO).³⁶⁵ Les adduits préparés par SPAAC ont montré un rendement quantique de fluorescence jusqu'à 60 fois plus important que celui du FI-DIBO, prouvant son potentiel en tant que sonde fluorogène pour l'imagerie.

La synthèse a été effectuée en cinq étapes avec un rendement global de 12% (**Schéma 19**). Le couplage de Sonogashira entre le 3-éthynylanisole et le 3-iodoanisole a conduit au bis aryle **35** dont la triple liaison a ensuite été réduite en alcène par hydrogénéation catalysée au palladium. La configuration *cis* de l'alcène **36** a été permise par l'usage du catalyseur de Lindlar. Une réaction de Friedel-Craft avec le tétrachlorocyclopropène a ensuite amené au composé **37** avec un rendement de 50%. La double liaison formée lors de la seconde étape a alors été dibromée (**38**) pour permettre une double élimination, conduisant au FI-DIBO **39**.

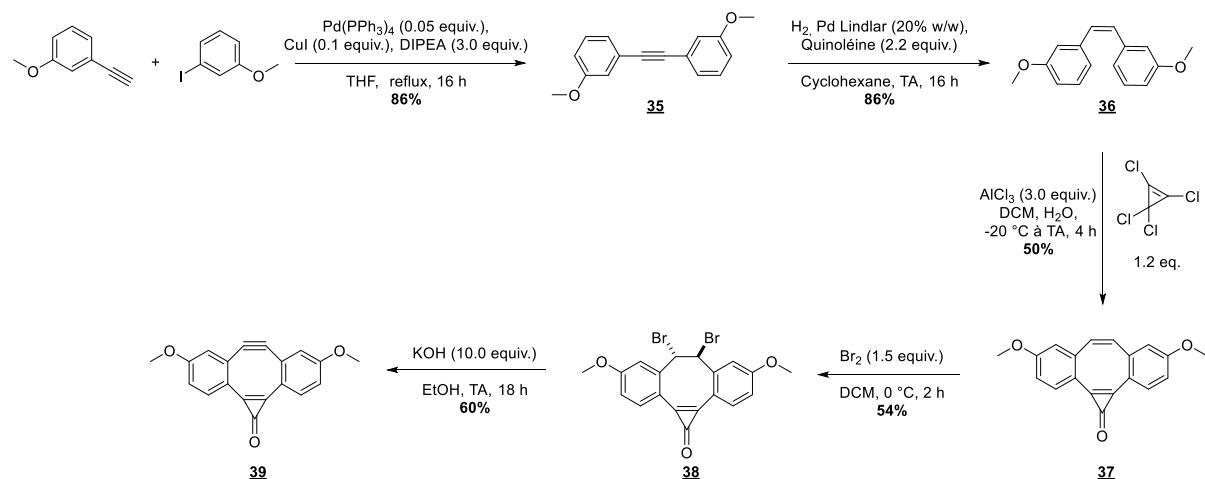


Schéma 19. Synthèse de la sonde fluorogène décrite par Friscourt *et al.*. Les deux dernières étapes ont été réalisées à l'abri de la lumière.

Par la suite, pour les expériences en microscopie, de nombreuses conditions ont été testées. La sonde devant être imagée dans l'UV, c'est un microscope confocal inversé SP8 UV qui a été utilisé ici.

Pour le premier test, la sonde a été incubée sur cellules différencierées vivantes pendant 30 minutes avant l'imagerie, amenant uniquement à la détection de l'auto-fluorescence des cellules, avec ou sans incubation du rétinal azidé. Une seconde approche consistant à ajouter la sonde juste avant l'imagerie a également été tentée afin d'éliminer un potentiel problème lié au lavage des cellules. Toutefois, aucune fluorescence n'a pu être détectée hormis celle des cellules elles-mêmes. La dernière expérience qui a été essayée sur cellules vivantes fût l'ajout de la sonde directement sous le microscope afin d'éliminer, en plus, une éventuelle dégradation très rapide de la sonde une fois au contact des cellules. Le même résultat que précédemment a été obtenu.

Les travaux ont alors été poursuivis sur cellules fixées avec incubation de la sonde en amont de l'imagerie. Les images obtenues sont présentées dans le **Figure 61**. Les noyaux ont été imagés au draq5 mais on peut voir sur les images 2, 5 et 8 que ce marquage n'a pas fonctionné puisque le signal est présent dans l'entièreté des cellules et non exclusivement dans les noyaux. Cela peut s'expliquer par la fixation au PFA qui entraîne une légère perméabilisation des cellules, bien que le draq5 soit usuellement utilisé sur cellules fixées.

Pour la sonde seule (images 1 à 3), le marquage est à peine détectable. Concernant le contrôle avec l'atRAL (images 4 à 6), on constate que le marquage est plus intense mais diffus. Pour ce qui est de l'expérience avec le N₃ RAL illustré par les images 7 à 9, certains noyaux sont légèrement plus brillants que les autres, laissant à penser que le marquage a été efficace dans les cellules concernées. Toutefois, ces résultats n'ont pas pu être reproduits.

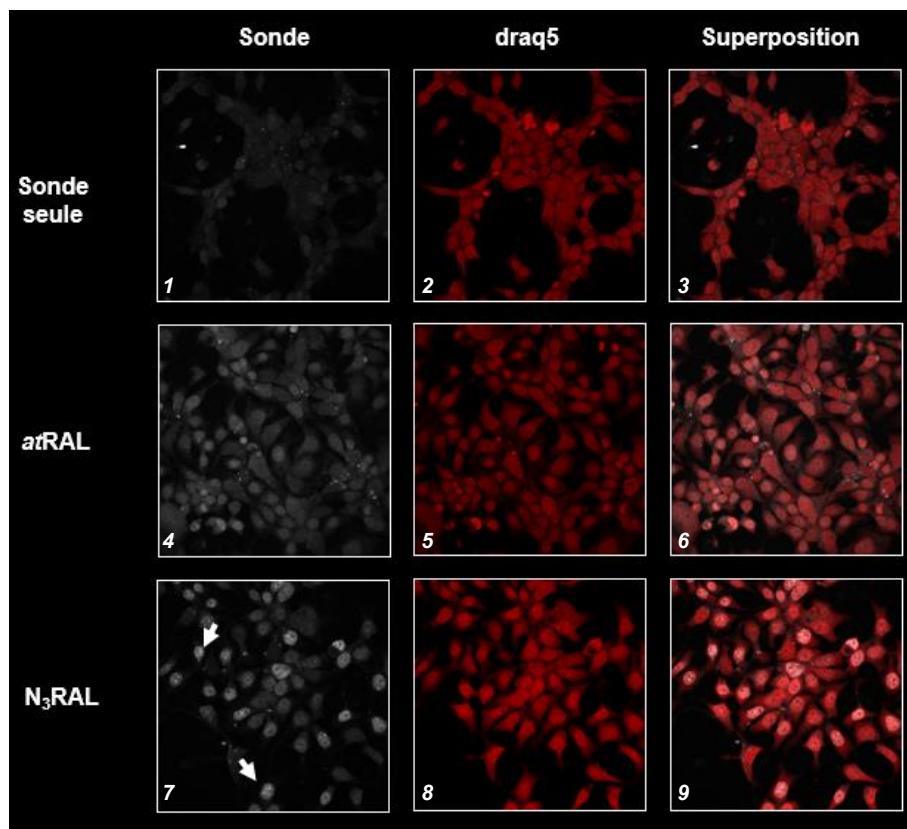


Figure 61. Images obtenues par microscopie confocale inversée sur SP8 UV x63 sur des cellules de carcinome embryonnaire P19 différenciées et fixées. Les cellules ont été fixées 15 min à 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le draq5 (en rouge). Le draq5 a été incubé à 5 μ M et la sonde à 10 μ M. Le draq5 a été imité à 647 nm et la sonde dans l'UV. L'atRAL sert de contrôle négatif.

La luminosité détectée lors de l'imagerie étant très faible, nous avons émis l'hypothèse que la réaction entre le FI-DIBO et le N₃ RAL n'avait pas ou peu lieu. L'adduit entre le FI-DIBO et le N₃ RAL **40** a donc été synthétisé (**Figure 62**). Pour ce faire, un mélange équimolaire des deux réactifs a été agité pendant 16 h à 25 °C dans du DCM avant d'être purifié par HPLC préparative. Il a ensuite pu être incubé à la place des rétinoïdes. L'objectif était de voir s'il était possible de détecter cet adduit grâce à sa luminosité plus importante.

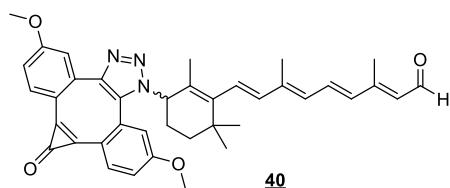


Figure 62. Adduit obtenu par réaction de SPAAC entre le FI-DIBO et le N₃RAL.

A plusieurs reprises, l'adduit a été incubé avant imagerie sur cellules vivantes. Quelle que soit la durée d'incubation (30 minutes ou 1 heure), seule l'auto-fluorescence des cellules a été détectée. Comme précédemment, nous avons alors tenté l'ajout juste

avant l'imagerie à deux concentrations distinctes (**Figure 63**). Le marquage des noyaux au draq5 a cette fois été efficace. Sur les images 3 et 4, correspondant à un ajout de 10 μM d'adduit, le marquage est extrêmement faible, à l'exception de rares punctas. En revanche, pour 100 μM d'adduit (images 5 et 6), un signal non négligeable est observé pour la sonde, presque exclusivement hors des cellules.

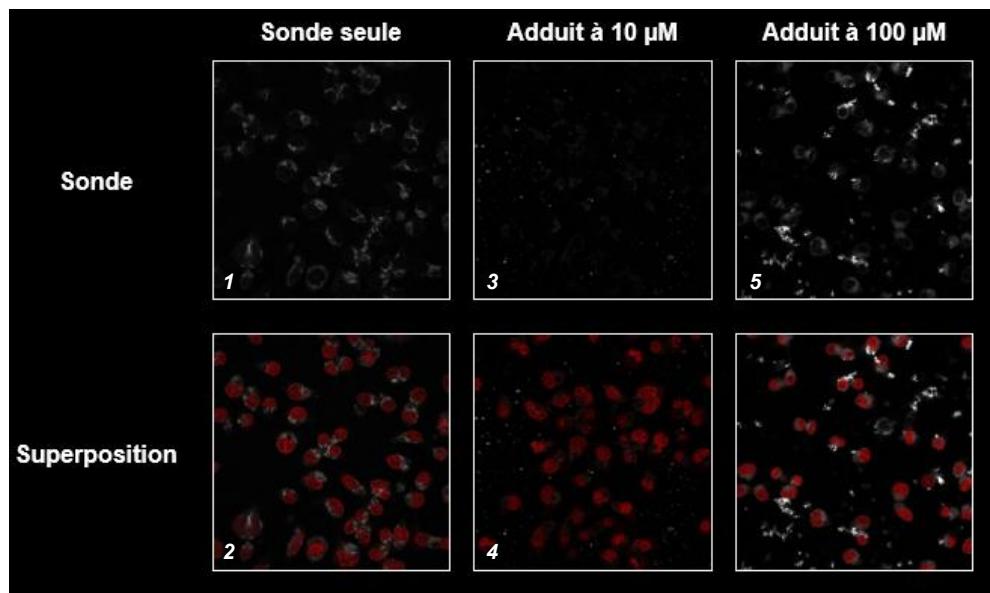


Figure 63. Images obtenues par microscopie confocale inversée sur SP8 UV x63 sur des cellules de carcinome embryonnaire P19 différenciées non-fixées. Les noyaux ont été mis en évidence avec le draq5 (en rouge). Le draq5 a été incubé à 5 μM et l'adduit à 10 ou 100 μM . Le draq5 a été imité à 647 nm et l'adduit dans l'UV.

Ces résultats nous ont amené à conclure que la fluorescence émise par l'adduit n'est pas suffisante pour réaliser de l'imagerie, que ce soit sur cellules vivantes ou fixées. De fait, il a été nécessaire d'utiliser 100 μM d'adduit préalablement synthétisé pour obtenir un signal détectable. Ainsi, une incubation du rétinoïde puis de la sonde n'est pas envisageable au vue des quantités très importantes qui seraient nécessaires puisqu'il n'est en effet pas possible de dépasser les 5 μM de rétinoïdes sous peine de cytotoxicité. Également, même à forte concentration, la sonde ne présente qu'une faible capacité à entrer dans les cellules, s'agrémentant, au mieux, dans le cytoplasme de celles-ci. Cela pourrait expliquer qu'à faibles concentrations la sonde ne parvienne pas à rencontrer les rétinoïdes pour réagir avec eux et former l'adduit fluorescent.

3.5.2. Sonde BODIPY

La sonde fluorogène n'ayant pas permis d'imager les rétinoïdes au sein des cellules, les investigations ont été poursuivies, à la recherche d'une sonde adaptée. Nous nous sommes tournés vers les travaux de Alamudi *et al.* qui font état d'une sonde ayant la capacité de marquer spécifiquement chaque organelle de la cellule, noyau inclus et ce sur cellules vivantes.³⁶⁶ Il s'agit d'une sonde BODIPY, dont l'un des pyrroles est méthylé en positions 2 et 4, et qui porte en position méso une chaîne aliphatique terminée par un BCN.

Les BODIPYs sont des fluorophores présentant une large gamme de coloris,^{367,368} permettant de très nombreuses applications : bio-imagerie,^{369,370} sondes pH,³⁷¹ agents chélateurs de métaux,³⁷² photosensibilisateurs pour les thérapies photodynamiques³⁶⁸ ou encore sondes de FRET ou de bioluminescence (BRET).³⁷³ L'ensemble de ces utilisations est permis par des propriétés particulièrement adaptées à la chemobiologie. Tout d'abord, ils ont une très faible sensibilité au pH et à la polarité du milieu. Également, ils sont particulièrement stables en conditions physiologiques malgré une faible solubilité en solution aqueuse. Pour ce qui est des caractéristiques photochimiques, on note un grand coefficient d'absorption molaire (40 000 à 110 000 M⁻¹ cm⁻¹), un rendement quantique de fluorescence élevée (60 à 90%), une durée de vie de l'état singulet excité suffisante (1 à 10 ns) ainsi qu'une bande d'absorption nette (25 à 35 nm de largeur).³⁷⁴ Cependant, ils présentent un inconvénient majeur, à savoir leur hydrophobie, qui peut toutefois être palliée en modulant la substitution des pyrroles et de la position méso (**Figure 64**).

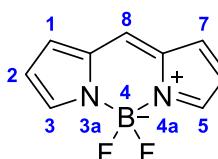


Figure 64. Structure de base d'un BODIPY. La position 8 est aussi appelée méso.

La sonde décrite par Alamudi *et al.* a été synthétisée en quatre étapes avec un rendement global de 11% (**Schéma 20**), qui peut s'expliquer par les difficultés rencontrées lors des purifications. L'acide N-Fmoc-N-méthoxy-3-aminopropionique a été activé au disulfure de 2,2'-dipyridyle afin de permettre l'insertion du pyrrole, préalablement activé en α de l'azote, menant à l'obtention de **41**. La seconde étape a consisté en l'insertion d'un pyrrole doublement méthylé puis en la formation du cœur BODIPY, conduisant à **42** avec un rendement de 68%. La chaîne aliphatique a alors

été déprotégée à l'aide du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) puis l'amine fonctionnalisée avec l'anhydride succinique pour former **43**. Enfin, une estérfication de Steglich avec le BCN-OH a mené à la sonde fluorescente **44**.

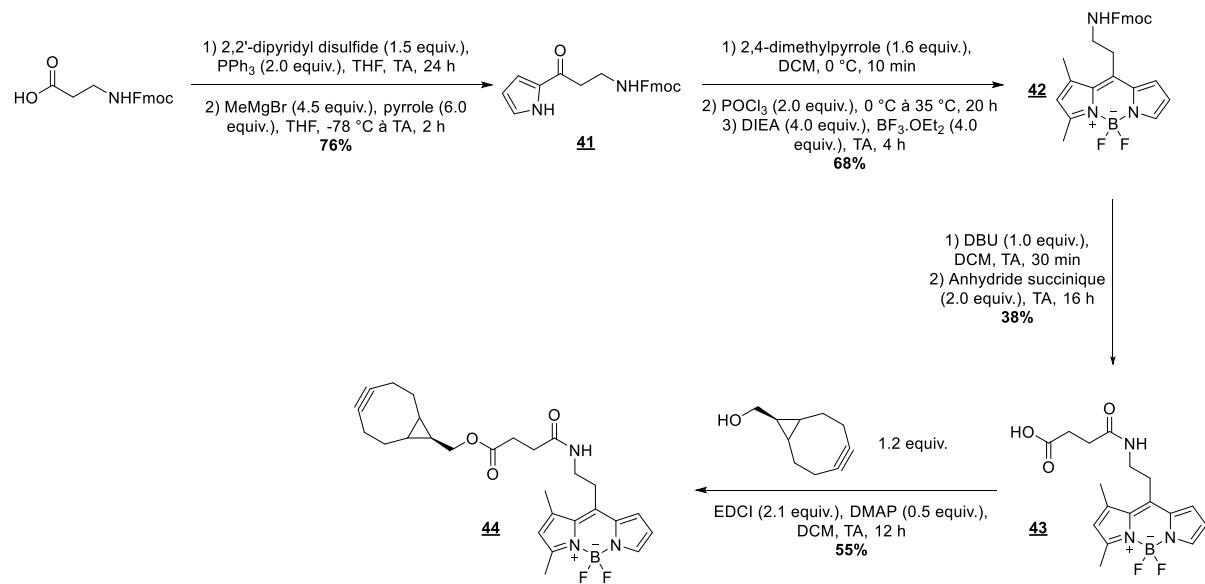


Schéma 20. Synthèse de la sonde BODIPY décrite par Alamudi *et al.*. L'ensemble des étapes, à l'exception de la première, a été réalisé à l'abri de la lumière.

Après synthèse, cette sonde a été testée pour l'imagerie cellulaire. La première expérience a été réalisée sur cellules vivantes et les résultats sont présentés dans la **Figure 65**. Le choix a été fait de marquer les mitochondries (images 2, 5, 8 et 11), la sonde étant rapportée comme ayant la capacité de labelliser celles-ci de façon spécifique. Pour la sonde seule (images 1 à 3), on note un marquage visible mais qui ne coïncide ni avec le noyau ni avec les mitochondries. Concernant les résultats obtenus pour le 5-AmdU (images 4 à 6), l'atRAL (images 7 à 9) et le N₃ RAL (images 10 à 12), ils sont très similaires, avec la sonde sous forme de punctas plus ou moins intenses ne colocalisant ni avec le noyau ni avec les mitochondries.

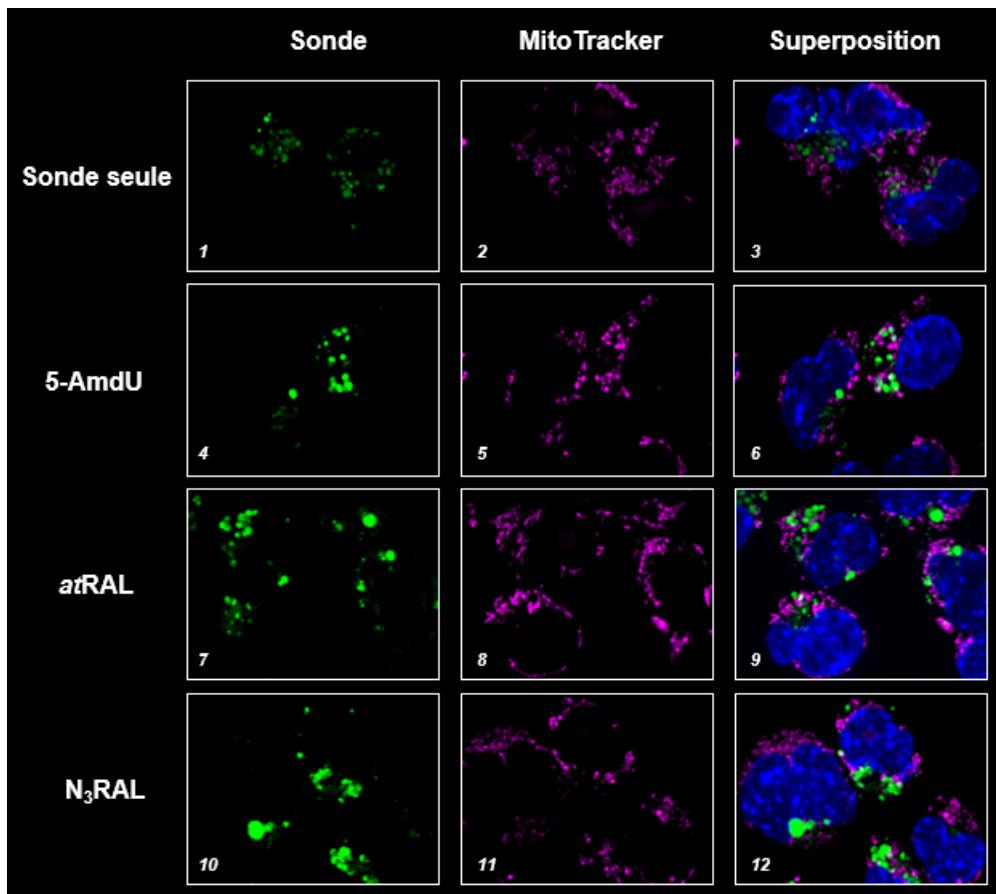


Figure 65. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées vivantes. Les noyaux ont été mis en évidence avec le Hoechst 33342 (en bleu). Les mitochondries ont été mises en évidence avec le MitoTracker orange CMTMRos (en violet). Le Hoechst et le MitoTracker ont été incubés à 0.1 µg/mL, le 5-AmdU et la sonde à 10 µM. Le Hoechst a été imaginé à 361 nm, le MitoTracker à 561 nm et la sonde à 491 nm. Le 5-AmdU sert de contrôle positif. La sonde seule sert de contrôle négatif.

Nous avons alors émis l'hypothèse que le type de cellules ne convenait pas. En effet, l'expérience a été réalisée avec des cellules P19 alors qu'Alamudi *et al.* rapportent leurs travaux sur les cellules U-2OS. En changeant de type cellulaire, les mêmes résultats ont été obtenus. Malgré plusieurs tentatives de contact avec les auteurs afin de comprendre nos difficultés à reproduire leurs résultats, nous n'avons reçu aucune réponse de leur part.

Les manipulations ont donc été poursuivies sur les P19 fixées. Les résultats sont visibles dans la **Figure 66**. On peut cette fois noter que, quelle que soit la condition, les cellules sont marquées en intégralité, à l'exception de leurs noyaux, révélant un marquage aspécifique par la sonde.

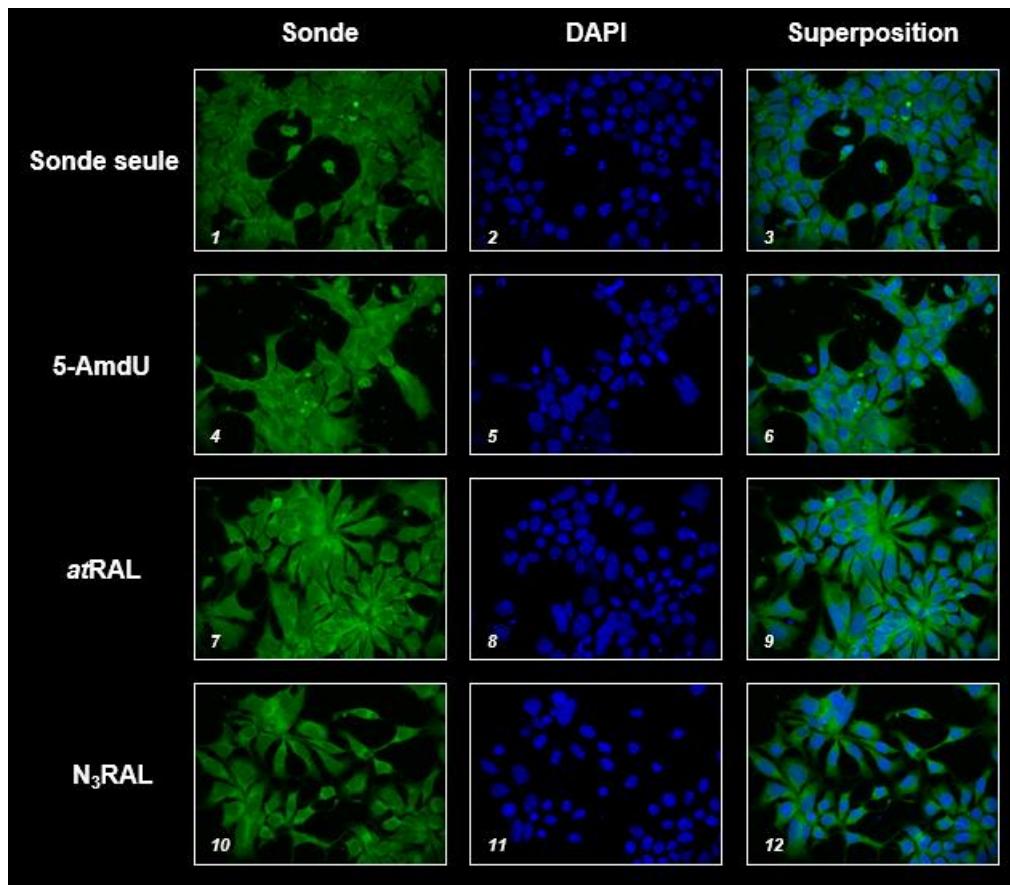


Figure 66. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées fixées avec 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL, le 5-AmdU et la sonde à 10 µM. Le DAPI a été imager à 405 nm et la sonde à 491 nm. Le 5-AmdU sert de contrôle positif.

En conclusion, nous ne sommes pas parvenus à reproduire les travaux de la littérature visant au marquage spécifique de certaines organelles dans les cellules vivantes. Également, sur cellules fixées, le marquage se trouve être totalement aspécifique, rendant la sonde non-utilisable pour notre projet.

3.5.3. Sonde TMHSI-PEG₃-SulfoCy5

Ne parvenant pas à trouver une sonde satisfaisante dans la littérature, nous avons décidé d'en concevoir une nous-même. Pour cela, un ensemble de trois synthons a été choisi en faisant l'hypothèse que les propriétés physico-chimiques de la sonde finale permettraient l'entrée de la sonde dans les cellules, ainsi qu'un risque minimum de marquage aspécifique. Les synthons ont donc été sélectionnés de sorte à optimiser les propriétés finales de la molécule.

Concernant le fluorophore, c'est une sulfocyanine qui a été retenue. Parmi les sulfocyanines possibles (**Figure 67**), nous avons choisi la SulfoCy5 car elle présente une absorbance maximale dans le rouge profond (650 nm), idéale pour limiter la phototoxicité sur les cellules. De plus, à cette longueur d'onde, l'auto-fluorescence des cellules ainsi que la diffusion de la lumière sont faibles, conduisant à une meilleure résolution des images. Pour ce qui est des caractéristiques photochimiques des cyanines, on note un coefficient d'absorption molaire élevé ($> 200\,000\,M^{-1}\,cm^{-1}$), une importante photostabilité et une grande sensibilité de détection.³⁷⁵ C'est pour cela que les cyanines, quelle que soit leur classe, sont utilisées dans de nombreuses applications: sondes FRET,³⁷⁶ marquage de biomolécules,³⁷⁷ bio-imagerie,³⁷⁸ détection d'acides nucléiques,³⁷⁹ visualisation des voies neuronales,³⁸⁰ étude de potentiels de membrane³⁸¹ ou encore diagnostic.³⁷⁵ Néanmoins, leur rendement quantique de fluorescence est assez faible (1 à 18%) et les deux motifs sulfoniums sont obligatoires pour palier la faible solubilité en milieux aqueux et réduire le marquage non spécifique.

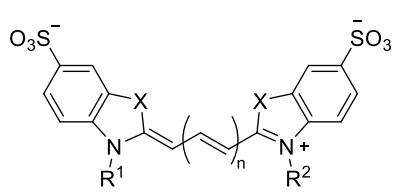


Figure 67. Structure générale d'une sulfocyanine. R^1 = chaîne alkyle ; R^2 = chaîne fonctionnalisée ; $X = CH_2, C(CH_3)_2$. n variable de 0 à 3. $n=0$: monométhine sulfocyanine, notée SulfoCy1 ; $n=1$: triméthine sulfocyanine, notée SulfoCy3 ; $n=2$: pentaméthine sulfocyanine, notée SulfoCy5 ; $n=3$: pentaméthine sulfocyanine, notée SulfoCy7.

Afin de mettre l'alcyne tendu à distance, l'ajout d'un bras espaceur a été nécessaire et c'est un PEG₃ qui a été retenu. En effet, il devrait permettre une distance suffisante pour que l'alcyne constraint soit accessible sans toutefois qu'il ne soit pas trop flexible permettant d'éviter une trop grande mobilité. Au cours de nos différents essais, la fonctionnalisation des extrémités de ce bras espaceur a été amenée à évoluer de sorte à s'adapter aux synthèses testées.

Pour ce qui est du choix de l'alcyne tendu, nous nous sommes orientés vers l'oxyde d'imino-3,3,6,6-tétraméthyle-4,5-didéhydro-2,3,6,7-tétrahydro-1H-1λ⁶-thiépine (TMTHSI), publié en 2020 par Weterings *et al.*³⁸² Cet alcyne contraint, décrit pour la première fois, présente une vitesse de réaction presque six fois supérieure à celle du BCN, tout en étant près de trois fois moins hydrophobe. Ainsi, nous pouvons espérer que la sonde ne soit pas séquestrée dans les membranes cellulaires et conduise à un marquage rapide et sélectif des rétinoïdes azidés.

3.5.3.1. Synthèse

Cette sonde a nécessité un travail d'optimisation important en termes de synthèse, l'iminosulfanone du TMTHSI ayant révélé une faible réactivité.

Afin de limiter la manipulation du fluorophore, nous avons tout d'abord essayé d'insérer le bras espaceur directement sur le TMTHSI (**Schéma 21**). Que ce soit par un couplage au HATU ou avec EDCI/HOBt, aucune réaction n'a été observée, les deux réactifs ayant été récupérés intacts. Nous avons aussi tenté d'activer l'amine du PEG mais cela a mené à une dégradation complète des réactifs.

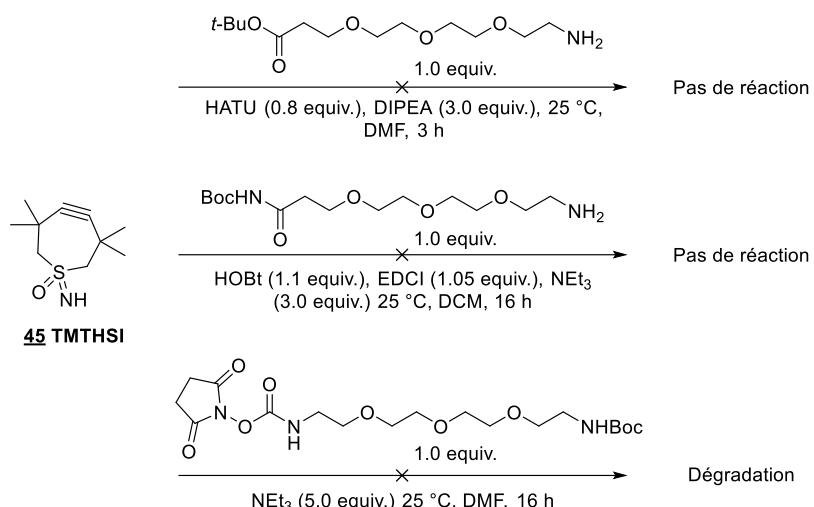


Schéma 21. Tentatives d'insertion du bras espaceur PEG directement sur le TMTHSI.

Notre hypothèse étant un manque de réactivité de l'azote de l'iminosulfanone, nous avons décidé de travailler avec des formes activées **A** et **B** du TMTHSI (**Schéma 22**) dont la synthèse a également été décrite par Weterings *et al.* Dans les deux cas, les mêmes conditions ont été appliquées mais aucune réaction ne s'est produite. Ces conditions ont été ultérieurement testées en ayant préalablement inséré le fluorophore sur le PEG, aboutissant au même résultat, voire à la dégradation du fluorochrome.

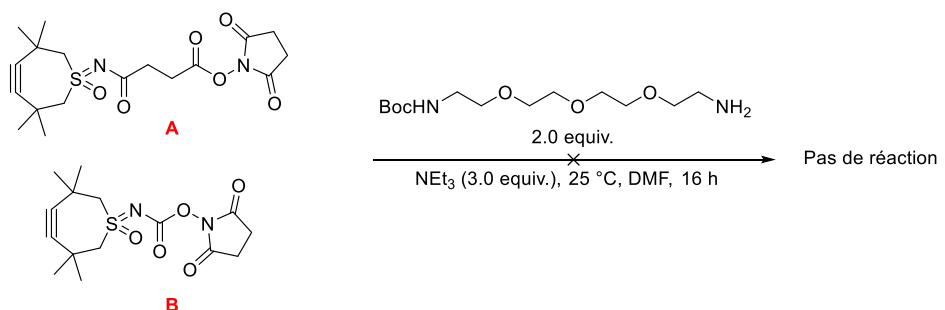


Schéma 22. Essais d'insertion du bras espaceur PEG sur des formes activées du TMTHSI synthétisées selon les travaux de Wetterings *et al.*

Les résultats obtenus lors de l'ensemble de ces tests sont surprenants. En effet, les auteurs rapportent diverses modifications du TMTHSI directement sur l'amine, avec des conditions variables et accèdent aux produits attendus. Bien que les conditions testées ici soient différentes, cela ne justifie ni la dégradation ni l'absence totale de réaction entre le TMTHSI et le PEG.

Par la suite, nous avons décidé de coupler la SulfoCy5 sur le bras PEG **51** dès la première étape (**Schéma 23**). Le PEG retenu pour cette expérience présente d'une part une amine libre pour réaliser le couplage avec l'acide carboxylique de la SulfoCy5 et d'autre part un acide carboxylique protégé de sorte à pouvoir réagir avec l'amine du TMTHSI.

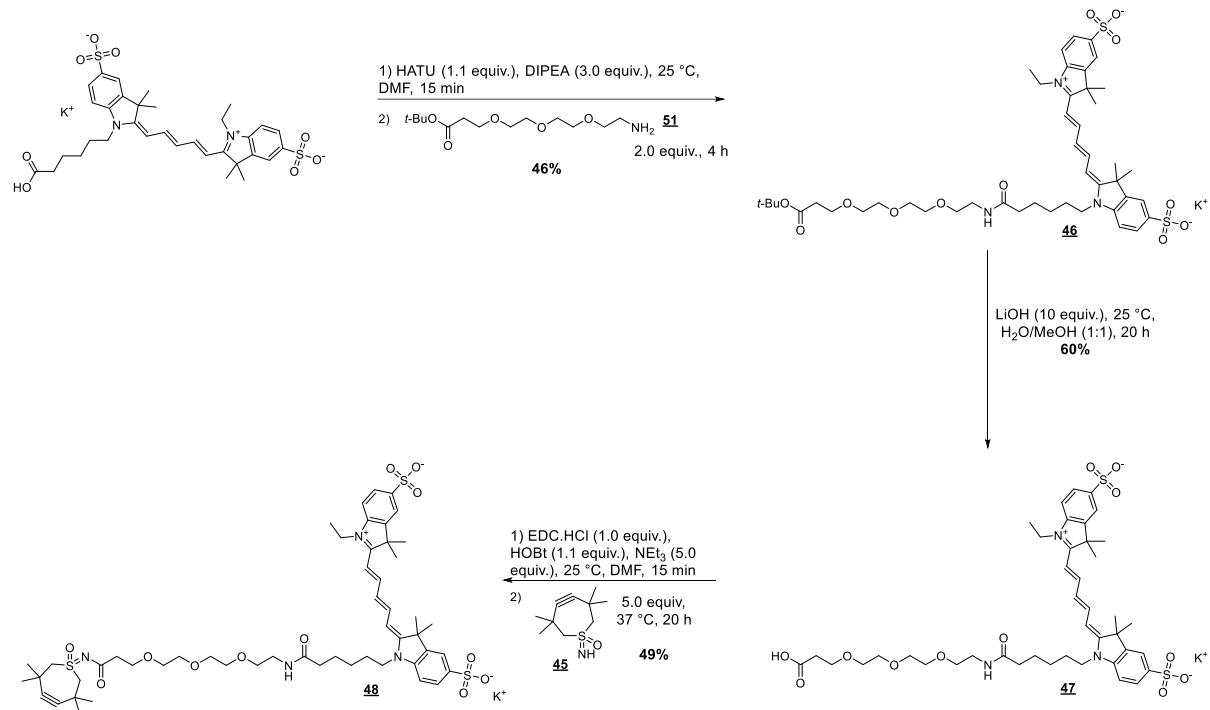


Schéma 23. Voie de synthèse de la sonde fluorescente **48**, nommée TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5

Pour la première étape, un couplage avec EDCI/HOBt a d'abord été testé, menant à la dégradation du fluorophore. Nous nous sommes alors tournés vers le HATU, conduisant cette fois au produit attendu **46** avec un rendement de 46%. L'étape de déprotection de **46** avec 10 équivalents d'hydroxyde de lithium a mené à l'acide carboxylique **47**. Enfin, une tentative de couplage du TMTHSI sur l'acide carboxylique du PEG en utilisant le HATU a été faite mais aucune réaction n'a été observée. Nous avons alors essayé avec le couple EDCI/HOBt, donnant cette fois accès à la sonde fluorescente **48**. Toutefois, il faut noter qu'un faible rendement de 19% a été observé,

dû à une conversion de l'intermédiaire **47** ne dépassant pas les 25%. Une augmentation de la température de la réaction, passant de 25 °C à 37 °C, a permis d'atteindre 29% de rendement. Pour améliorer encore ces conditions, le TMTHSI a été introduit à hauteur de cinq équivalents au lieu de deux, menant à une conversion de plus de 80% et un rendement isolé de 49%. Il faut noter que la concentration de cette étape a aussi été augmentée, passant de 0.06 M à 0.12 M, conduisant cette fois à une diminution du rendement (14%). Ainsi, après optimisation, nous sommes parvenus à synthétiser la sonde **48**, nommée TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 avec un rendement global de 14%.

3.5.3.2. Imagerie sur cellules vivantes

Une fois synthétisée, la sonde a pu être testée pour l'imagerie de cellules vivantes. Le protocole général donné en **3.3** a été appliqué en faisant varier différents paramètres : incubation des rétinoïdes pendant 16 ou 24h, ensemencement des cellules de 3 à 24 h, incubation de la sonde jusqu'à 1 h, concentration en sonde allant de 0.1 à 100 µM. Également, pour certaines expériences, la sonde fluorescente n'a pas été incubée en amont mais ajoutée sur les cellules au moment de l'imagerie.

Quelles que soient les conditions utilisées, le résultat est identique. A titre d'exemple, la **Figure 68** présente les résultats correspondant à une incubation des rétinoïdes pendant 16 h, un ensemencement de 3 h et une concentration de sonde fluorescente de 10 µM. A la différence des imageries effectuées sur la sonde précédente, ce sont ici les lysosomes qui ont été marqués. En effet, les lysosomes étant les organelles responsables de la dégradation des molécules, qu'elles soient endogènes ou non, il est important de savoir si la sonde n'y est pas directement dirigée, ce qui empêcherait son action de marquage. On peut voir que, que ce soit pour les contrôles ou avec le rétinal azidé, la sonde est visible sous forme de quelques punctas dispersés dans le cytosol des cellules. La faible quantité de marquage amène à penser que la sonde ne parvient pas à entrer dans les cellules.

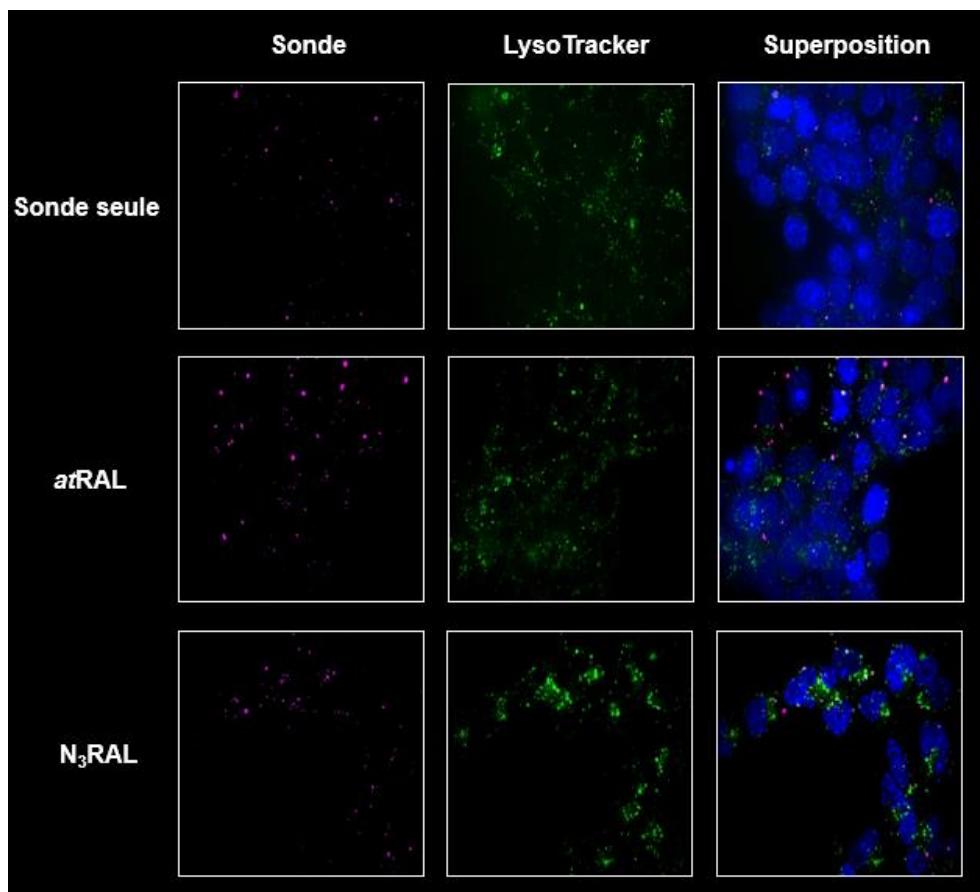


Figure 68. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées vivantes. Les noyaux ont été mis en évidence avec le Hoechst 33342 (en bleu). Les lysosomes ont été mis en évidence avec le LysoTracker green DND-26. Le Hoechst et le LysoTracker ont été incubés à 0.1 µg/mL, la sonde à 10 µM et l'adduit à 5 µM. Le Hoechst a été imagé à 361 nm, le LysoTracker à 488 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

Une entrée dirigée de la sonde dans les cellules a alors été tentée. Pour ce faire, le 5-AmdU et le TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 ont été mis en réaction dans du DCM en quantité équimolaire à 25 °C pendant 16 h. L'adduit **52** formé (**Figure 69**) a été purifié par HPLC préparative puis incubé sur les cellules pendant 16 h à la place des rétinoïdes.

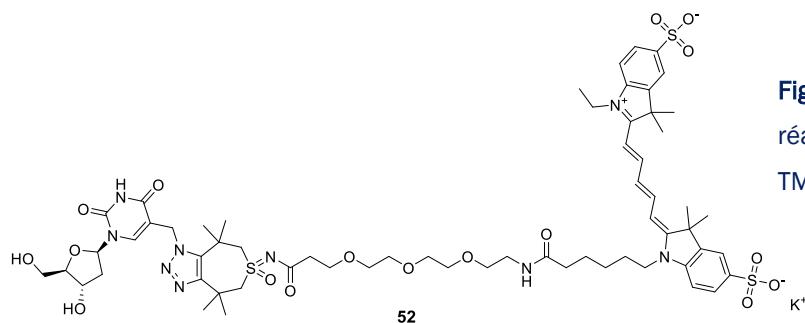


Figure 69. Adduit résultant d'une réaction de SPAAC entre la sonde TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 et le 5-AmdU.

Les résultats sont présentés dans la **Figure 70** et montrent une absence totale de l'adduit, à l'exception de deux punctas sur l'image 2. Cela amène à penser que la sonde, même liée au 5-AmdU, ne parvient pas à entrer dans les cellules vivantes.

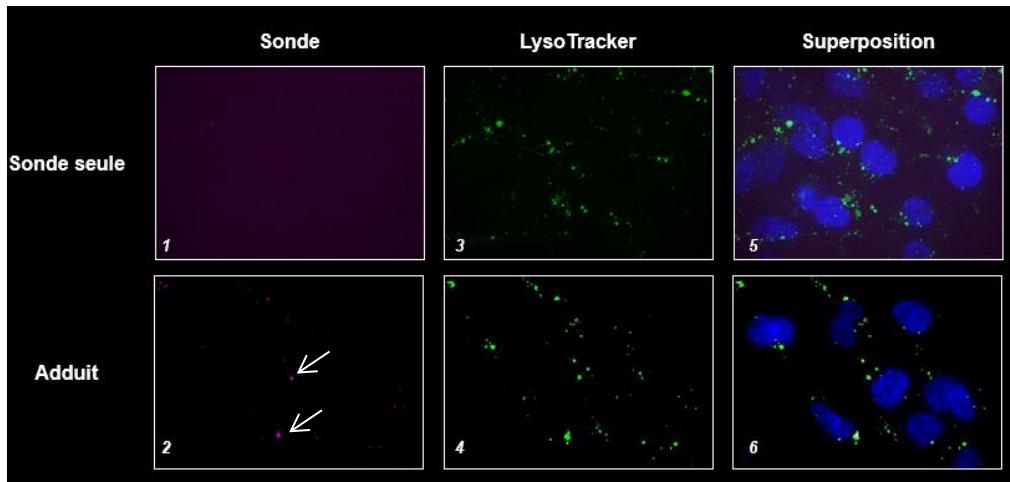


Figure 70. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées vivantes. Les noyaux ont été mis en évidence avec le Hoechst 33342 (en bleu). Les lysosomes ont été mis en évidence avec le LysoTracker green DND-26. Le Hoechst et le LysoTracker ont été incubés à 0.1 µg/mL, la sonde à 10 µM et l'adduit à 5 µM. Le Hoechst a été imité à 361 nm, le LysoTracker à 488 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

3.5.3.3. Imagerie sur cellules fixées

Au vue des résultats obtenus, les travaux ultérieurs ont été conduits sur cellules fixées. Sur la **Figure 71** sont présentés les résultats obtenus dans les mêmes conditions que pour la **Figure 70**. On peut noter que la sonde marque l'intérieur des cellules de façon non spécifique, quelle que soit la molécule initialement incubée. Toutefois, chaque cas montre un marquage différent. Sur les images 1 et 2, correspondant à la sonde sans incubation préalable d'un rétinoïde, les cellules sont intégralement marquées par la sonde. Quand on observe le contrôle négatif, à savoir avec l'atRAL (images 3 et 4), on peut voir que les noyaux ne sont pas marqués. Enfin, avec le N₃ RAL, on remarque, grâce au DAPI utilisé pour le marquage des noyaux, que certaines cellules n'ont pas été marquées par la sonde (images 5 et 6). Ces résultats étant reproductibles (n>3), des études complémentaires ont été menées de sorte à comprendre ces différences significatives de marquage.

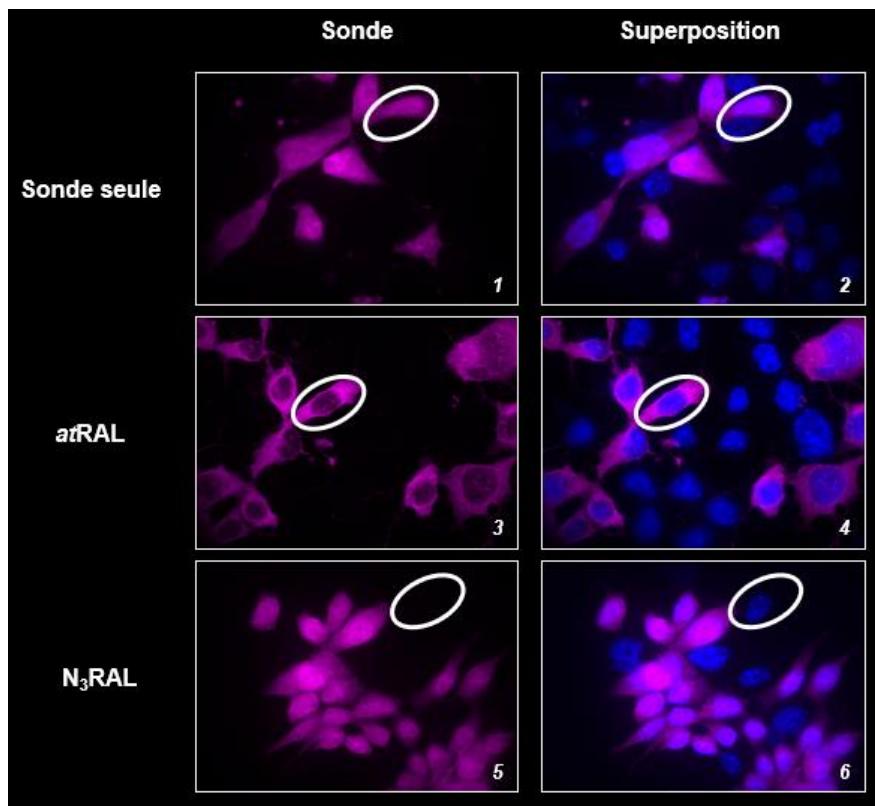


Figure 71. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées fixées avec 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL et la sonde à 10 µM. Le DAPI a été imaginé à 405 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

3.5.3.4. Imagerie sur cellules fixées – Marquages spécifiques

Afin de comprendre les différences de marquage observées, plusieurs expériences ont été conduites.

Tout d'abord, nous avons cherché à comprendre pourquoi le noyau n'était marqué que dans certains cas. Pour cela, une expérience de micro-radiation a été conduite. Il s'agit d'une technique couramment utilisée pour l'étude de la réparation des dommages causés à l'ADN.^{383,384,385} Dans notre cas, l'objectif était de voir si le DAPI, fluorophore se liant à l'ADN au niveau du petit sillon,³⁸⁶ interférait avec la visualisation de la sonde dans le noyau. Pour ce faire, le protocole présenté en **Figure 72** a été appliqué. Le laser utilisé émet à une longueur d'onde de 405 nm, correspondant à la longueur d'onde de travail pour le DAPI. Également, le microscope motorisé inversé est un Zeiss VideoMicroscope qui permet une acquisition très rapide des données, nécessaire ici. Les cellules ont été plaquées puis imagées une première fois. Elles ont ensuite subi

une irradiation de cinq secondes à la puissance maximale du laser de travail. Une seconde image a alors été prise puis les deux images ont été analysées et comparées. Cette expérience a été faite sur deux lots de cellules. Pour le premier, la sonde et le DAPI ont été incubés tandis que pour le second, seule la sonde a été utilisée. Les images du premier lot ont été prises avec la technique du Brightfield afin de visualiser la forme des cellules.

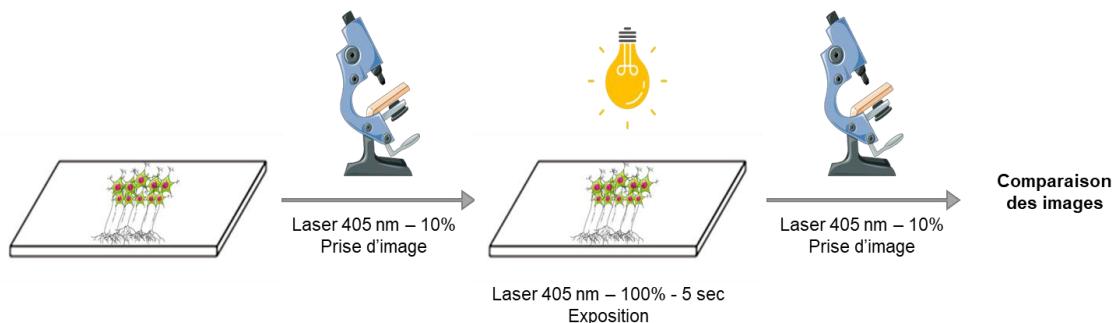


Figure 72. Protocole de micro-irradiation utilisé pour l'expérience menée.

Les résultats pour chacun des lots sont présentés dans la **Figure 73**.

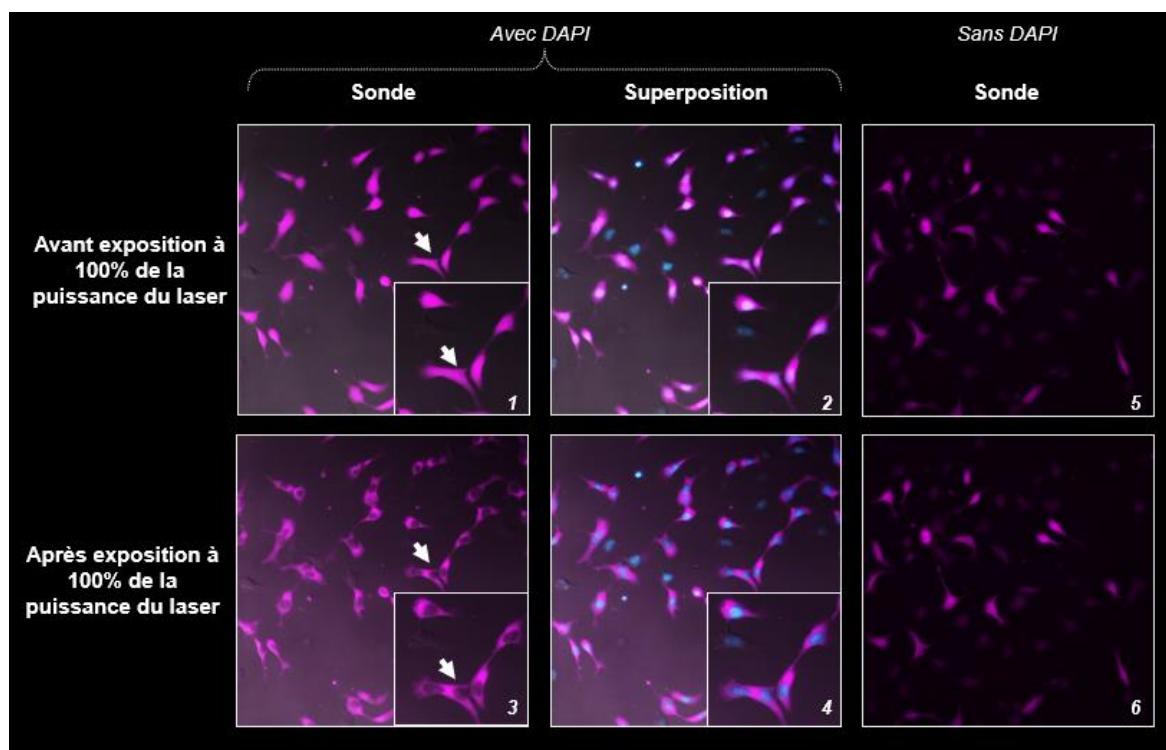


Figure 73. Images obtenues par microscopie Zeiss VideoMicroscope x40 sur des cellules P19 différenciées fixées avec 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL et la sonde à 0.1 µM. Le DAPI a été imité à 405 nm et la sonde à 647 nm. Les images réalisées avec la sonde et la DAPI ont fait appel à la technique du Brightfield.

On peut voir sur les images 5 et 6 que, en l'absence de DAPI, le marquage est identique avant et après irradiation, à savoir un marquage uniforme et non spécifique. En revanche, pour l'expérience avec la sonde et le DAPI (images 1 à 4), on note qu'après irradiation (images 3 et 4), les noyaux ne sont plus marqués par la sonde alors qu'ils l'étaient avant l'irradiation (images 1 et 2). Notre hypothèse est que, à la suite de l'irradiation, le DAPI interagit avec la sonde, entraînant une modification de sa structure et ainsi la perte de signal de celle-ci.

Le marquage sélectif des cellules a ensuite été étudié. La première hypothèse était que seul un type particulier de neurones pouvait être marqué par la sonde. Le Tuj1 a donc été employé comme marqueur spécifique. Il s'agit d'un anticorps interagissant avec la β -tubuline III, biomolécule principalement exprimée dans les neurones matures. Afin de pouvoir visualiser les résultats, il a fallu recourir à un anticorps secondaire, anti-Tuj1 et équipé d'un fluorophore, ici la GFP. Pour que l'immunomarquage puisse avoir lieu, il a été nécessaire, après fixation des cellules, de les perméabiliser. En effet, bien que la fixation apporte une certaine perméabilisation, celle-ci n'est pas suffisante pour la méthode d'immunomarquage.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 74**. Selon le marquage Tuj1 visible sur les images 2, 5, 8 et 11, la quasi-totalité des cellules se trouve être des neurones matures. Toutefois, en étudiant les images 3, 6, 9 et 12, résultats de la superposition des marquages obtenus pour la sonde et pour le Tuj1, on remarque que plusieurs cellules ne sont pas marquées par la sonde, bien qu'il s'agisse de neurones matures. Ainsi, cela nous éloigne de la piste d'un marquage exclusif des neurones matures par la sonde fluorescente.

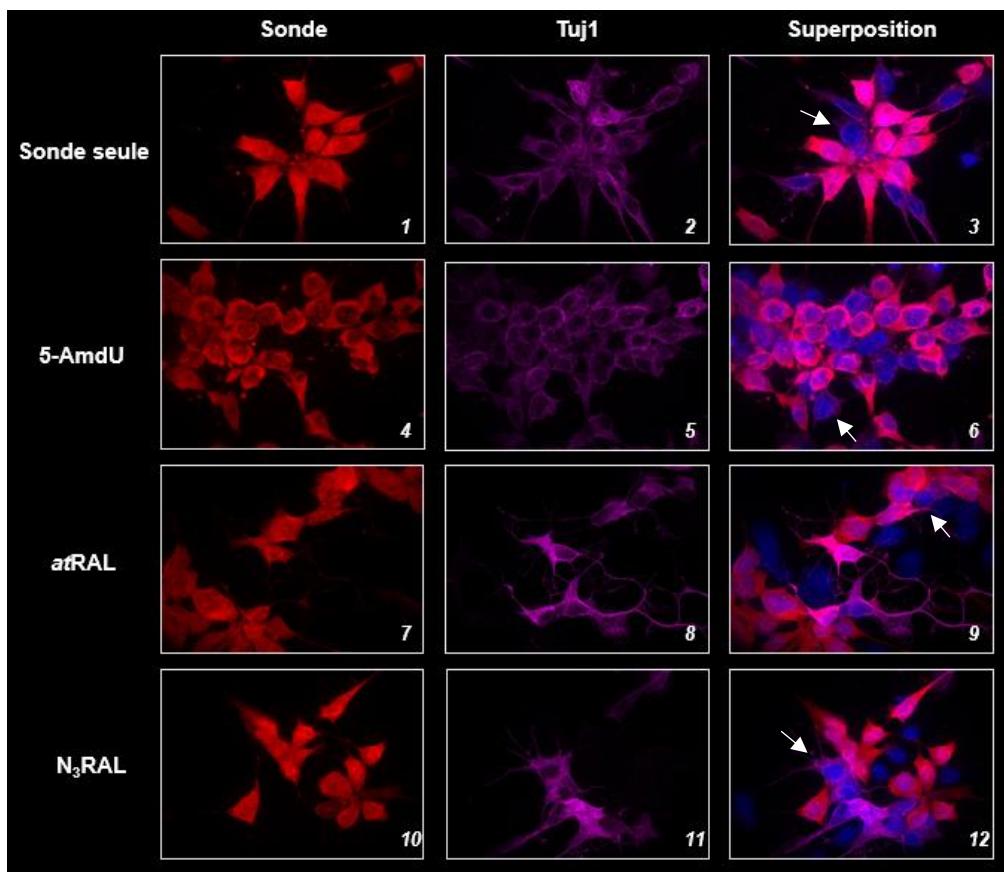


Figure 74. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées fixées avec 4% de PFA et perméabilisées avec 0.01% de Triton. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). L'anticorps marquant Tuj1 a été incubé à 2 µg/mL et l'anticorps secondaire marqué à la GFP a été incubé à 2 µg/mL. Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL, le 5-AmdU et la sonde à 10 µM. Le DAPI a été imager à 405 nm, l'anticorps secondaire à 488 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif. Le 5-AmdU sert de contrôle positif.

La seconde hypothèse qui a été faite était que le marquage dépend de la maturité des cellules. Un nouveau marquage spécifique a alors été effectué en utilisant cette fois le Mash1. Ce facteur de transcription, analogue chez l'humain de Ascl1, est exprimé dans les cellules progénitrices neuronales. Ces cellules descendent directement des cellules souches et sont ensuite différencierées en cellules spécialisées. Dans le cas du système nerveux central, l'expression de Mash1 est transitoire puisqu'elle diminue à mesure que les cellules progénitrices se différencient.^{387,388} Notre objectif ici était donc de parvenir à visualiser l'expression de Mash1 au sein des cellules, de sorte à évaluer leur maturité et ainsi valider ou non notre hypothèse. Pour cela, un premier anticorps a été utilisé pour se lier à Mash1 puis, afin de visionner ce marquage, un second anticorps portant la GFP a été nécessaire. De la même façon que précédemment, il a fallu perméabiliser les cellules pour effectuer l'immunomarquage.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 75**.

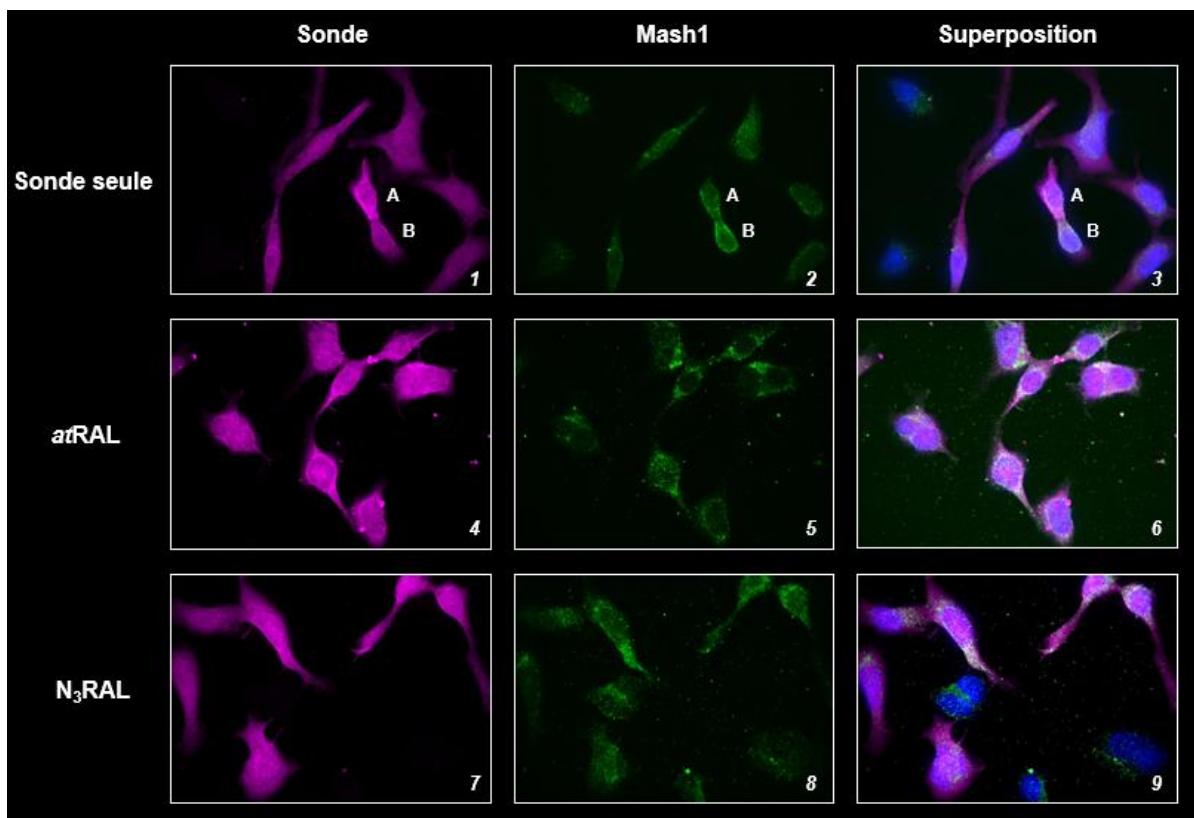


Figure 75. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées fixées avec 4% de PFA et perméabilisées avec 0.01% de Triton. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). L'anticorps marquant Mash1 a été incubé à 0.5 µg/mL et l'anticorps secondaire marqué à la GFP a été incubé à 2µg/mL. Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL et la sonde à 10 µM. Le DAPI a été imagé à 405 nm, l'anticorps secondaire à 488 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

Pour les cellules ayant été incubées avec les rétinoïdes (images 4 à 9), aucune différence significative n'est à noter dans le marquage des cellules. En revanche, dans le contrôle avec la sonde seule, à savoir les images 1 à 3, on remarque que l'intensité de marquage des cellules **A** et **B** est différente. En traitant les images, il a été possible de quantifier les marquages par Mash 1 et par la sonde de chacune des deux cellules. Les valeurs sont indiquées dans le **Tableau 7**. Bien que la différence dans le marquage par Mash1 soit faible (40 UA), nous avons fait l'hypothèse d'une division asymétrique de la cellule mère. La cellule **A**, du fait de son plus faible marquage, semble être une cellule souche tandis que la cellule **B**, avec son marquage légèrement plus important, pourrait être une cellule progénitrice. On note que pour la cellule **A** le marquage par la sonde est près de deux fois plus important que pour la cellule **B**. Cela nous a conduit à penser que le marquage par la sonde peut être plus ou moins

important selon la maturité de la cellule. Néanmoins, il faudrait répéter cette expérience pour pouvoir conclure.

Cellule	Marquage Mash 1 (UA)	Marquage sonde (UA)
A	134	14 456
B	175	8 071

Tableau 7. Intensité des marquages obtenus avec Mash1 et la sonde pour les cellules A et B. Les intensités de marquage sont données en unités arbitraires (UA) et ont été obtenues avec le logiciel ImageJ.

L'hypothèse de l'influence de la maturité des cellules n'ayant pas été proprement validée ou écartée avec le Mash1, nous avons décidé de travailler avec deux durées d'ensemencement différentes afin d'accéder à des cellules à plusieurs niveaux de maturité. Le protocole décrit en **3.3** a été suivi en appliquant un temps d'ensemencement de 3 heures. Les images obtenues sont présentées en **Figure 76**.

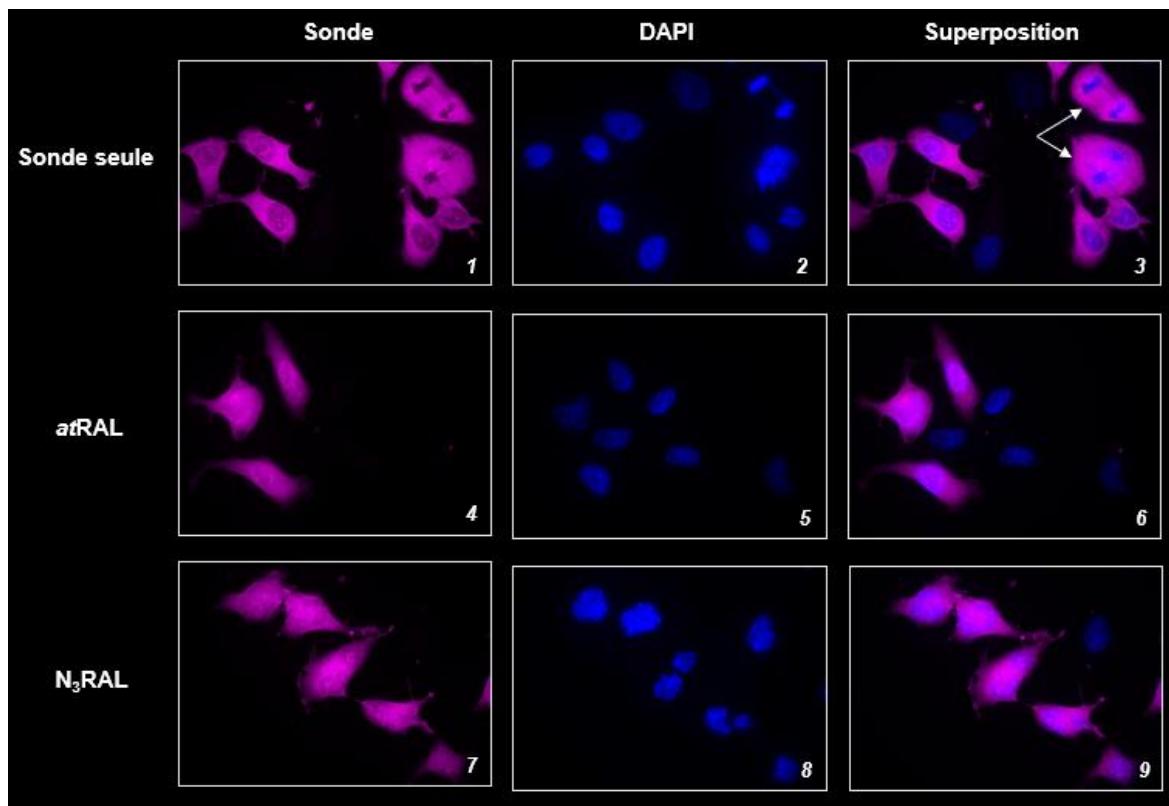


Figure 76. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées fixées avec 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL et la sonde à 10 µM. Le DAPI a été imaginé à 405 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

On note premièrement que, quelle que soit la condition, le marquage se fait de façon aspécifique dans l'intégralité de la cellule (images 1, 4 et 7). Deuxièmement, on peut voir sur les images 3, 6 et 9 que certaines cellules ne sont à nouveau pas marquées. Enfin, sur l'image 3, on remarque des cellules en division qui se trouvent être intégralement marquées, à l'exception de leurs noyaux.

Dans un but de comparaison, la durée d'ensemencement a été allongée à 24 heures. Cette fois, il est possible de voir sur l'ensemble des images de la **Figure 77** que le marquage est homogène et concerne toutes cellules.

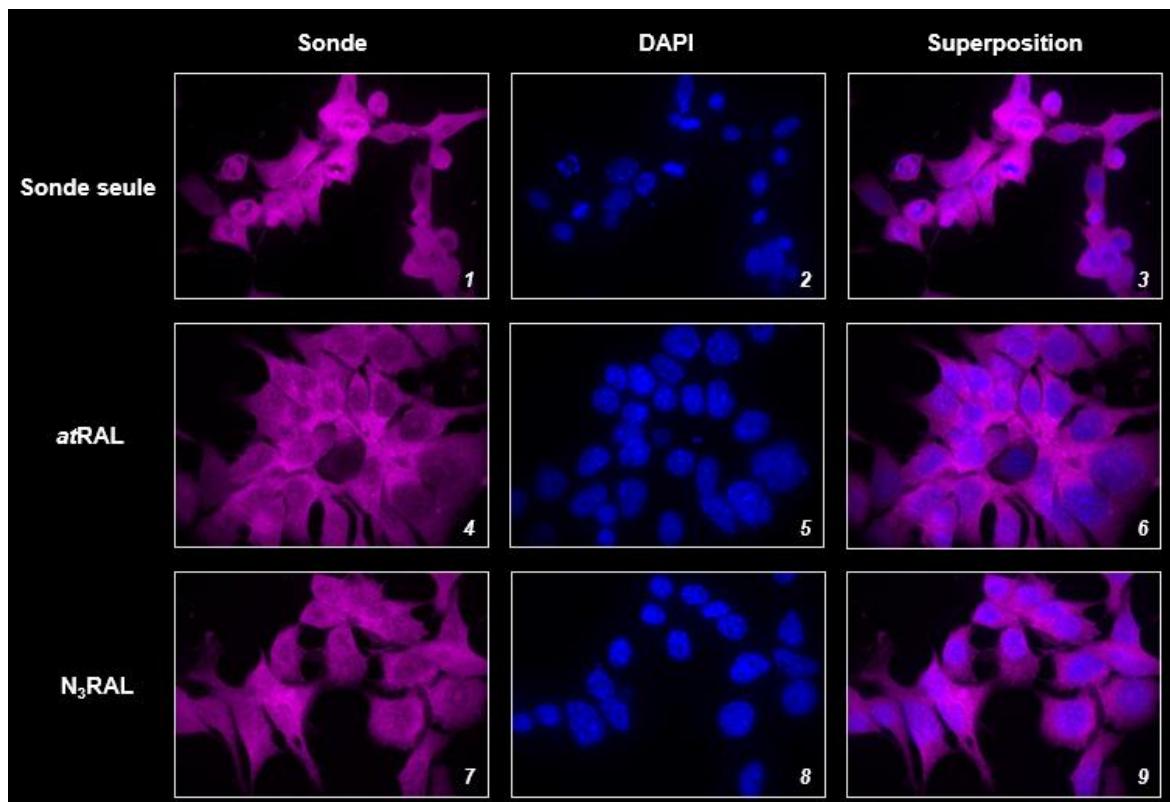


Figure 77. Images obtenues par microscopie confocale inversée au Spinning disk Nikon x100 sur des cellules P19 différencierées fixées avec 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). Le DAPI a été incubé à 0.1 µg/mL et la sonde à 10 µM. Le DAPI a été imagé à 405 nm et la sonde à 647 nm. La sonde seule sert de contrôle négatif.

Un test supplémentaire a été réalisé pour compléter ces résultats en synchronisant les cellules sur une même phase du cycle cellulaire. Pour ce faire, après avoir été ensemencées 24 heures, les cellules ont été traitées au Monastrol, pendant 16 heures avant d'être fixées. Le Monastrol est une petite molécule qui permet l'arrêt de la mitose via l'inhibition de la kinase Eg5, indispensable à la mise en place et au maintien du fuseau mitotique.^{389,390} La fixation des cellules a ensuite été réalisée à 30 minutes, 1

heure, 1 heure 30 minutes et 2 heures, permettant d'imager les cellules dans différentes phases du cycle cellulaire. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 78**. On peut voir que, quelle que soit la phase des cellules, la sonde a conduit à un marquage présentant une intensité et une homogénéité identiques, ne permettant pas de conclure quant à un marquage relatif à la maturité des cellules.

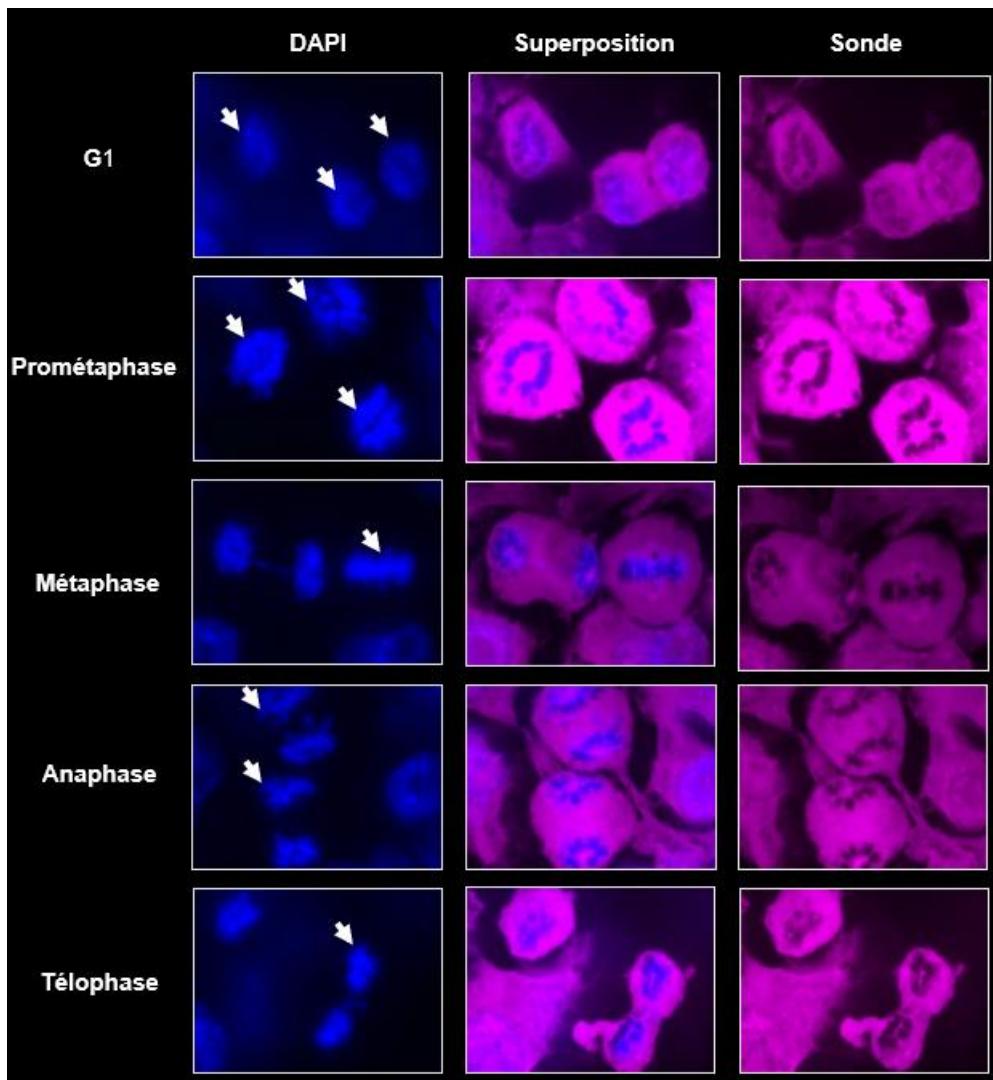


Figure 78. Images obtenues par microscopie Spinning disk x100 sur des cellules P19 différenciées fixées avec 4% de PFA. Les noyaux ont été mis en évidence avec le DAPI (en bleu). Le DAPI a été incubé à 0.1 μ g/mL et la sonde à 10 μ M. Le DAPI a été imité à 405 nm et la sonde à 647 nm.

On peut en conclure que la sélectivité de marquage de la sonde a lieu après la division cellulaire, la rendant ainsi liée à la maturation ou la différenciation des cellules. Toutefois, l'utilisation d'autres marqueurs neuronaux n'a pas permis de conclure quant à une influence de la différenciation cellulaire. De plus, plusieurs tests ont été conduits sur des corps embryonnaires obtenus à partie de cellules souches embryonnaires

murines, n'amenant à aucune nouvelle information. Ainsi, malgré les nombreuses expériences menées pour comprendre les différences de marquage observées pour la sonde TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5, aucune de nos hypothèses n'a pu être validée. Il serait donc nécessaire de poursuivre ces investigations. On pourrait par exemple envisager l'immunomarquage d'autres biomolécules d'intérêt telles que le GABA. Également, un changement de lignée cellulaire pourrait nous aiguiller : en comparant les caractéristiques des deux lignées ainsi que les résultats obtenus, il serait possible de mettre en lumière un facteur justifiant la différence de marquage.

En conclusion, la sonde TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 que nous avons conçue ne permet pas l'imagerie sur cellules vivantes car elle se trouve séquestrée dans les lysosomes. On retient aussi que l'imagerie sur cellules fixées n'est pas concluante puisqu'elle se révèle aspécifique. Néanmoins, le marquage semble présenter une sélectivité pour certaines cellules, qui reste à élucider.

3.6. Conclusion

Pour conclure, malgré un succès dans la synthèse des trois sondes présentées, leur utilisation en imagerie n'a pas conduit aux résultats espérés, que ce soit sur cellules vivantes ou fixées. En effet, la sonde profluorescente n'a pas révélée une intensité lumineuse suffisante tandis que la sonde BODIPY s'est montrée aspécifique. Concernant la sonde TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5, en dépit d'une large série d'expériences pour comprendre ses spécificités de marquage, nous ne sommes pas parvenus à élucider son comportement. Dans un premier temps, il serait donc nécessaire de procéder à d'autres études permettant la clarification de celui-ci. Dans un second temps, les résultats obtenus nous amènent à penser que les propriétés physico-chimiques du TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 ne sont pas adaptées. Cela nécessiterait donc un travail dédié et la synthèse d'une vaste librairie de sondes afin d'affiner progressivement les critères structuraux requis pour l'obtention d'une sonde fonctionnelle adaptée. Cette hypothèse est étayée par le fait que le contrôle positif au 5-AmdU n'a jamais montré le marquage spécifique du noyau attendu. Enfin, une autre solution serait, comme mentionné dans le chapitre précédent, de recourir à la CuAAC. De fait, cette stratégie a déjà été utilisée pour le marquage de biomolécules présentes

dans le noyau en ayant recourt à des sondes azidées et des ligands du cuivre adaptés.³⁹¹ Dans notre cas, cela pourrait être fait avec des rétinoïdes possédant un alcyne terminal en position C4, des sondes fluorescentes commerciales portant un azoture et des ligands du cuivre préalablement choisis selon les travaux de la littérature.

CHAPITRE 4 – SONDES POUR LA DÉTECTION ET LA QUANTIFICATION DE NOUVEAUX MÉTABOLITES DE LA VITAMINE A

4.1. Introduction

Le deuxième axe de ce projet consiste en la mise au point d'une méthode analytique permettant la détection, la quantification et la caractérisation de nouveaux métabolites de la vitamine A *in vivo*. Il est en effet essentiel d'en apprendre plus quant aux diverses formes que peut prendre la vitamine A ainsi que sur leur concentration spatio-temporelle, à la fois en circulation et dans les différents tissus. L'objectif est d'étendre les connaissances du métabolisme de la vitamine A ce qui conduirait, par la suite, à une meilleure compréhension de nombreuses pathologies comme expliqué en introduction générale. Pour y parvenir, l'étude des métabolites de la vitamine A par des approches de type métabolomique est requise. Une étude de type métabolomique consiste en l'analyse de l'ensemble des composés de petite taille (< 1500 Da) présents dans un échantillon biologique donné (cellules, tissus...).

4.1.1. Choix de la méthode d'analyse

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour les études métabolomiques. Les plus courantes sont la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS),³⁹² la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS),³⁹³ la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)³⁹⁴ et enfin la résonance magnétique nucléaire (RMN).³⁹⁵ Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients. Le choix de la méthode de travail se fait donc en fonction de la nature et de la quantité des analytes ainsi que du coût et de l'expertise requise pour la mise au point des analyses.

Dans notre cas, c'est la nature des analytes qui a dirigé notre choix. En effet, étant donné leur structure quasi exclusivement carbonée, les rétinoïdes sont faiblement ionisables, rendant leur détection complexe. Ce problème est intensifié par les très

faibles quantités endogènes de certains rétinoïdes (point détaillé en 4.1.2.), sachant que celles-ci varient selon l'espèce animale étudiée, le sexe et l'alimentation.³⁹⁶ C'est un paramètre essentiel à considérer pour des études *in vivo*. Enfin, il s'agit de molécules qui peuvent s'isomériser, en particulier l'acide rétinoïque, menant à des isomères de masses identiques qu'il est nécessaire de séparer pour réaliser une attribution et une quantification justes.³⁹⁷

L'ensemble de ces points amène à la nécessité d'une méthode sensible, avec des appareillages puissants et précis, que ce soit pour la séparation ou la détection des différents rétinoïdes. Cela nous a conduit à éliminer la RMN dont la sensibilité est limitée et qui requiert une quantité importante d'échantillon pour assurer une détection et une quantification précises. Concernant la GC-MS, la LC-MS et la LC-MS/MS, elles présentent toutes d'importantes sensibilité, résolution et reproductibilité. Kane et Napoli ont rapporté en 2010 une comparaison des limites de détection (LOD) de l'acide rétinoïque *all-trans* avec ces trois méthodes dans le plasma.³⁹⁸ Les valeurs sont indiquées dans le **Tableau 8**.

Méthode	LOD (fM)
GC-MS	120
LC-MS	210
LC-MS/MS	0.5 – 23.3

Tableau 8. Valeurs des LOD de l'acide rétinoïque *all-trans* dans le plasma selon différentes méthodes d'analyses rapportées par Kane et Napoli. Les LOD sont fournies en femtomolaire.

On peut voir que la LC-MS/MS permet la détection de quantités extrêmement faibles, ce qui en fait une méthode de choix pour l'étude des rétinoïdes. Il faut noter que, pour aboutir à une séparation efficace, en particulier des isomères de l'AR, il est important de réaliser une séparation par Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) en amont de la détection par spectrométrie de masse.^{399,400}

4.1.2. Etat de l'art des études analytiques des rétinoïdes

De nombreuses publications de la littérature rapportent l'analyse par spectrométrie de masse des rétinoïdes. Lors des premiers travaux sur ces molécules, aucune méthode analytique adaptée n'ayant été mise en place, des injections étaient effectuées *in vivo*

avec une grande quantité du rétinoïde d'intérêt, que ce soit le rétinol,⁴⁰¹ l'acétate de rétinyle⁴⁰² ou encore l'acide rétinoïque,⁴⁰³ afin d'assurer la détection des composés. Par la suite, De Leenheer *et al.* ont publié une première approche HPLC avec détection MS conduisant à une nette séparation de quatre formes différentes de l'acide rétinoïque au sein d'un échantillon de sérum.⁴⁰⁴ Toutefois, cette technique n'avait pas permis d'établir la quantification de ces composés. En 1990, Eckhoff et Nau ont proposé une méthode d'identification et de dosage de différentes formes de l'AR dans le plasma humain grâce à plusieurs analyses, à savoir la GC-MS et l'HPLC avec détection UV.⁴⁰⁵ Bien que cette stratégie ait mené à une quantification des rétinoïdes étudiés (**Tableau 9**), elle n'a pas permis la séparation des signaux, rendant cette quantification peu fiable.

Rétinoïde	Concentration (ng/mL)
atAR	1.32 ± 0.46
13-cis AR	1.63 ± 0.85
13-cis-4-oxo AR	3.68 ± 0.99

Tableau 9. Concentrations en trois formes de l'AR calculées au sein du plasma humain par Eckhoff et Nau. Le 4-oxo AR n'a pas été détecté. Les concentrations sont données en nanogramme/mL.

En parallèle, est apparue l'HPLC-UV, toujours utilisée aujourd'hui pour la séparation et la détection des rétinoïdes.^{406,407} En effet, ceux-ci présentent une longueur d'onde d'absorbance caractéristique située entre 325 et 380 nm, les rendant aisément détectables et attribuables par UV.

En 1996, Van Breemen et Huang ont mis au point la LC-MS à ionisation positive par électrospray (ESI+).⁴⁰⁸ La détection du rétinal, du rétinol et du palmitate de rétinyle, jusqu'à lors non détectés, a ainsi été rendue possible. Deux ans plus tard, Van Breemen *et al.* développaient la détection des rétinoïdes par LC-MS à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI LC-MS).⁴⁰⁹ Cette méthode d'ionisation a permis une réponse linéaire du spectromètre de masse sur une plus large gamme de concentration, affichant une nette amélioration de sensibilité par rapport à l'ESI+.

En 2005, Kane *et al.* ont rapporté une quantification de l'acide rétinoïque *all-trans* et de l'acide rétinoïque 13-*cis* dans plusieurs organes ainsi que dans diverses régions du cerveau par LC-MS/MS.⁴¹⁰ Ils ont ensuite amélioré cette technique afin qu'elle soit encore plus sensible et qu'elle permette la détection et la quantification d'autres

isomères de l'AR.⁴¹¹ Ainsi, les acides rétinoïques *all-trans*, 13-*cis* et 9,13-di-*cis* ont pu être quantifiés dans de nombreux organes (**Tableau 10**).

Tissu	atAR (pmol/g de tissu)	13- <i>cis</i> AR (pmol/g de tissu)	9,13-di- <i>cis</i> -AR (pmol/g de tissu)
Sérum	2.7 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.3
Foie	38.1 ± 3.4	6.2 ± 1.0	23.0 ± 1.3
Rein	15.2 ± 2.2	5.7 ± 2.2	12.1 ± 1.6
Epididyme	14.2 ± 2.4	1.1 ± 0.2	4.5 ± 0.6
Muscle	1.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1	/
Rate	7.3 ± 0.6	4.7 ± 0.2	3.3 ± 0.4
Testicule	8.9 ± 1.0	2.6 ± 0.6	4.3 ± 0.4
Cerveau	17.1 ± 3.7	3.0 ± 0.6	18.2 ± 3.0

Tableau 10. Concentrations obtenues par LC-MS/MS par Kane *et al.* pour un groupe de 5 à 30 souris mâles âgées de 2 à 4 mois de type sauvage. Le 9-*cis* AR n'a pas pu être détecté. Dans le muscle, il n'a pas été possible de détecter le 9,13-di-*cis* AR. Les concentrations sont données en picomole/gramme de tissu.

On note que les concentrations sont très variables d'un organe à l'autre. Par exemple, l'atAR montre une concentration de 38 pmol/g dans le foie contre seulement 1.5 pmol/g dans le muscle, soit un facteur 25 entre les deux concentrations tissulaires. Toutefois, quel que soit l'isomère, le foie reste l'organe avec la concentration la plus haute. Également, les trois isomères détectés ne sont pas présents à plus de 3 pmol/g dans le muscle et le sérum.

Les travaux de cette équipe ont aussi conduit à une quantification de ces trois mêmes molécules dans différentes régions du cerveau (**Tableau 11**). Il est nécessaire de souligner que les valeurs obtenues sur cerveau entier sont différentes de celles du **Tableau 10**, le groupe d'animaux étudié n'étant pas le même. On peut voir que le cerveau est un organe riche en vitamine A et que les disparités sont moins importantes qu'entre les différents organes. A titre d'exemple, l'atAR présente une concentration maximale de 81 pmol/g de thalamus contre 16 pmol/g de cortex, soit un facteur 5 entre ces deux régions.

Partie du cerveau	atAR (pmol/g de tissu)	13-cis AR (pmol/g de tissu)	9,13-di-cis-AR (pmol/g de tissu)
Entier	33.9 ± 3.9	22.2 ± 1.1	20.6 ± 2.6
Cervelet	54.8 ± 3.6	42.3 ± 4.8	17.6 ± 1.1
Cortex	16.0 ± 1.3	30.3 ± 2.5	17.2 ± 1.9
Hippocampe	45.3 ± 5.2	23.8 ± 3.1	21.1 ± 1.3
Striatum	78.0 ± 33.2	33.4 ± 11.2	25.2 ± 11.1
Bulbe olfactif	76.5 ± 21.3	38.1 ± 5.6	19.8 ± 2.4
Thalamus	80.9 ± 6.0	46.3 ± 1.9	22.4 ± 2.0

Tableau 11. Concentrations obtenues par LC-MS/MS par Kane *et al.* pour un groupe de 3 à 8 souris mâles âgées de 4 mois de type sauvage. Le 9-cis AR n'a pas pu être détecté. Les concentrations sont données en picomole/gramme de tissu.

Par la suite, la méthode a été reprise puis optimisée afin d'augmenter la sensibilité de détection, d'abaisser les limites de détection et de quantification mais également d'améliorer la séparation des différents isomères.⁴¹² Ainsi, en 2019, Zong *et al.* ont rapporté la quantification de cinq rétinoïdes différents dans le foie humain (**Tableau 12**).⁴¹³ La même année, Zelenková *et al.* ont publié une étude sur la quantification du rétinol et de l'acide rétinoïque *all-trans* dans le plasma humain (**Tableau 12**).⁴¹⁴

Rétinoïde	Concentration (foie)	Concentration (plasma)
PR	12.6 – 4282 nmol/g	/
ROL	1.2 – 161 nmol/g	2.41 – 3.04 nmol/mL
atAR	14.0 – 579.5 pmol/g	11.3 pmol/mL
13-cis AR	1.4 – 43.5 pmol/g	/
4-oxo-AR	1.8 – 376.3 pmol/g	/

Tableau 12. Les concentrations mesurées en différents rétinoïdes au sein du foie ont été réalisées par Zhong *et al.* sur des foies humains sains avec n=50. Les concentrations dans le plasma ont été mesurées par Zelenková *et al.* sur du plasma humain avec n=15. Les concentrations sont données en nanomole/gramme, en picomole/gramme, en nanomole/mL ou en picomole/mL.

On peut voir que, dans le foie, le rétinol se trouve à des concentrations allant de 1.2 à 161 nmol/g tandis que pour le palmitate de rétinyle cela monte jusqu'à 4.3 μ mol/g. En opposition, l'acide rétinoïque, quelle que soit sa forme, est présent au maximum à 580 pmol/g, soit un facteur de différence proche de 10^4 . Cette distinction se retrouve dans le plasma, avec un facteur 10^6 entre les concentrations des deux composés. Cette importante différence en circulation illustre que l'acide rétinoïque n'est pas une forme circulante de la vitamine A mais est obtenue par transformation de ses précurseurs au sein des tissus. On note que le rétinal est absent de ces données, ce qui s'explique par le fait que sa détection au sein des tissus biologiques est très récente.⁴¹⁵

Ainsi, les travaux présentés dans la littérature illustrent que les rétinoïdes sont des molécules détectables et quantifiables au sein d'une variété de tissus. Toutefois, on remarque que certaines formes ou isomères aux faibles concentrations endogènes sont encore difficilement détectables, nécessitant de continuer à investiguer les méthodes d'analyse. Nos recherches prennent donc place dans l'exploration de ces nouvelles méthodes pour la détection et la quantification de nouveaux métabolites de la vitamine A.

4.1.3. Amélioration de la détection – « Marqueurs de masse »

Certains rétinoïdes étant parfois difficiles à détecter, nous avons choisi d'optimiser ce paramètre en travaillant avec des « marqueurs de masse ». Un marqueur de masse est une molécule qui permet d'améliorer l'efficacité d'ionisation et donc la détection des analytes grâce à la charge permanente qu'elle porte. Dans notre cas, ce marqueur de masse doit pouvoir être équipé d'un alcyne tendu afin de réaliser la cycloaddition sur les rétinoïdes azidés. De fait, la stratégie de notre étude métabolomique consiste à injecter un rétinoïde azidé *in vivo* afin qu'il puisse être naturellement biotransformé en ses divers métabolites (**Figure 79**). L'animal est ensuite sacrifié à un temps donné, les tissus d'intérêt (plasma, foie, cerveau) sont récupérés et broyés. Le marqueur de masse est alors incubé avec les extraits tissulaires pour une durée impartie afin de réagir avec les métabolites azidés. Après élimination de la matrice biologique, le surnageant est récupéré et analysé par spectrométrie de masse haute résolution.

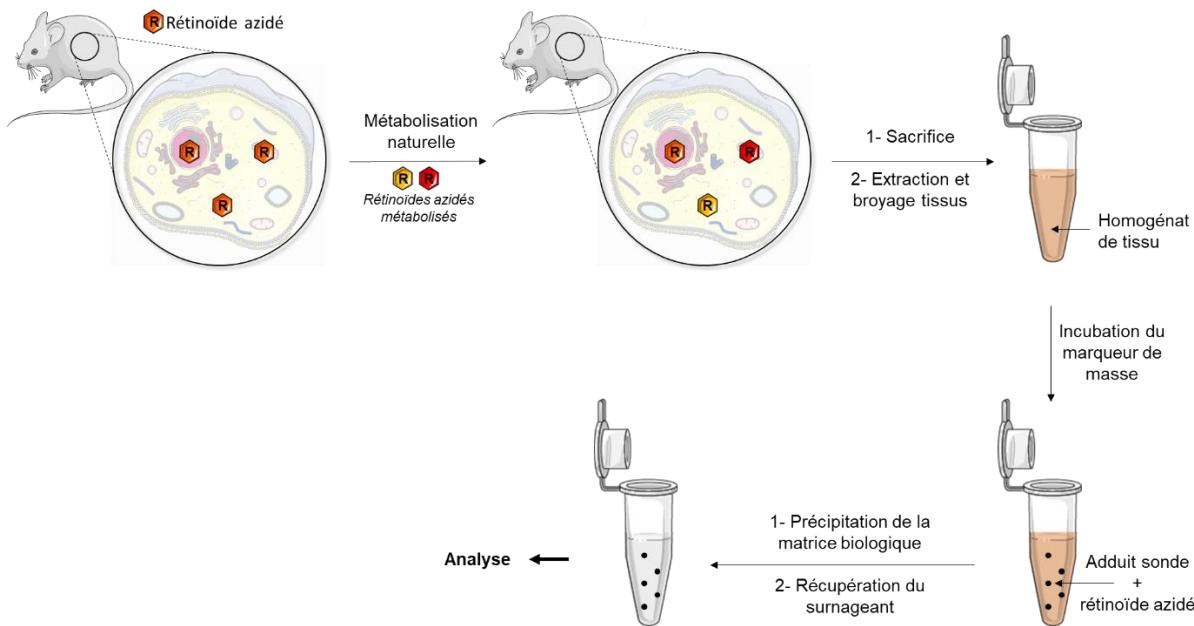


Figure 79. Différentes étapes illustrant l'usage des marqueurs de masse pour la détection et l'analyse de nouveaux métabolites de la vitamine A.

Nous avons fait le choix de débuter nos travaux avec la famille des tris(2,4,6-triméthoxyphényle)phosphanes (TMPP), couramment utilisée pour le marquage en N-terminus de nombreux peptides dans le but d'en faciliter le séquençage par spectrométrie de masse en tandem.^{416,417,418,419} En 2014, le TMPP a été rapporté par Koniev *et al.* pour le suivi de la fonctionnalisation sélective des cystéines par des motifs 3-Arylpropiononitriles (APN) sur différents peptides.⁴²⁰ L'utilisation du TMPP repose sur plusieurs propriétés d'intérêt. Tout d'abord, son hydrophobie permet de décaler l'élution des peptides vers des zones dégagées du chromatogramme, facilitant leur séparation et ainsi, leur identification. Ensuite, sa charge positive permanente conduit à l'augmentation de l'efficacité d'ionisation en mode ESI+ mais aussi à une meilleure détection des peptides peu abondants. On note que celle-ci est améliorée d'un facteur deux à huit selon les peptides. Les rétinoïdes étant peu abondants et difficilement ionisables, le choix du marqueur TMPP pour améliorer leur détection semblait donc judicieuse. De plus, il s'agit d'un motif sur lequel peuvent être insérées diverses fonctions au niveau de l'atome de phosphore, nous offrant la possibilité d'introduire un bras espaceur et un alcyne tendu pour accéder à la sonde de masse fonctionnelle souhaitée.

Toutefois, le TMPP est hydrophobe, propriété essentielle pour l'étude de peptides, molécules hydrophiles, mais contraignante pour l'analyse des rétinoïdes, déjà très

hydrophobes. C'est une des raisons qui nous a amené à développer une nouvelle famille de marqueurs de masse : des sulfoniums contraints, dérivés du TMTH.⁴²¹ L'objectif est d'obtenir des structures plus hydrophiles mais aussi plus compactes pour la détection des rétinoïdes.

4.2. Synthèse des sondes de masse

4.2.1. BCN-TMPP

Comme mentionné en introduction, le premier marqueur de masse que nous avons retenu est le TMPP. Également, nous avons fait le choix d'utiliser le BCN comme alcyne tendu afin de limiter la taille et l'hydrophobie de la sonde, qui aurait été beaucoup plus impactée avec un DBCO par exemple. Afin de mettre les deux motifs à distance, un bras espaceur de type éthylène diamine a été introduit. Il faut noter que cette sonde avait été préalablement synthétisée et utilisée au sein du laboratoire et avait montré des résultats satisfaisants (travaux non publiés).

Avant d'essayer une resynthèse, nous avons tenté la purification d'un lot de produit préparé par un ancien doctorant. Cette purification a été tentée par HPLC analytique et a mené à la dégradation du produit, montrant que cette méthodologie de purification n'était pas adéquate.

Pour ce qui est de la synthèse, nous nous sommes tournés vers la stratégie rapportée par Baatarkhuu *et al.* en 2018 et présentée dans le **Schéma 24**.⁴²² Celle-ci consiste en trois étapes successives, à savoir une activation de l'acide carboxylique suivie de deux substitutions nucléophiles, où seul le produit final a été purifié par colonne chromatographique et caractérisé. Nous ne sommes pas parvenus à reproduire ces travaux, la formation successive des différents produits n'ayant pas été observée.

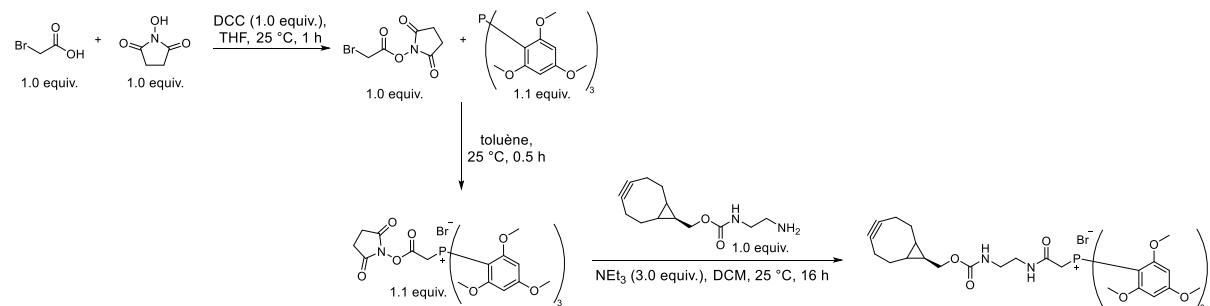


Schéma 24. Voie de synthèse rapportée dans la littérature pour le composé BCN TMPP.

Nous avons donc décidé de retravailler cette méthodologie afin d'accéder au produit attendu. Tout d'abord, le 2,5-dioxopyrrolidinyl 2-bromoacétate **53** a été synthétisé indépendamment selon les conditions décrites dans le **Schéma 25**. Il a pu être isolé, purifié et caractérisé.

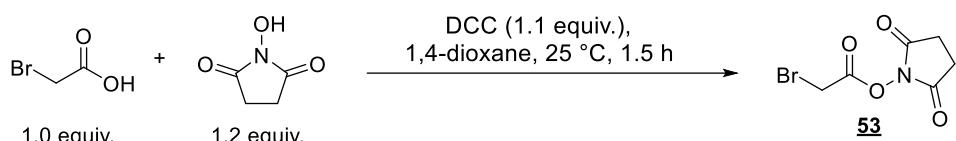


Schéma 25. Conditions réactionnelles pour la synthèse du composé **53**.

La synthèse de cet intermédiaire a été réalisée sur deux échelles différentes, à savoir 100 mg et 1 g amenant à des rendements respectifs de 30 et 94%. Ceci peut s'expliquer par la purification qui s'effectue par recristallisation, méthode pour laquelle une échelle trop faible conduit à d'importantes pertes de produit.

Concernant l'étape de substitution du brome par le motif TMPP sur **53**, nous avons également entrepris de la réaliser indépendamment afin d'isoler et de caractériser l'intermédiaire **54**. Pour cela, les conditions mentionnées dans le **Schéma 26** ont été suivies. Néanmoins, bien qu'une conversion totale des réactifs ait été observée, la purification par colonne chromatographique a mené à une dégradation du produit.

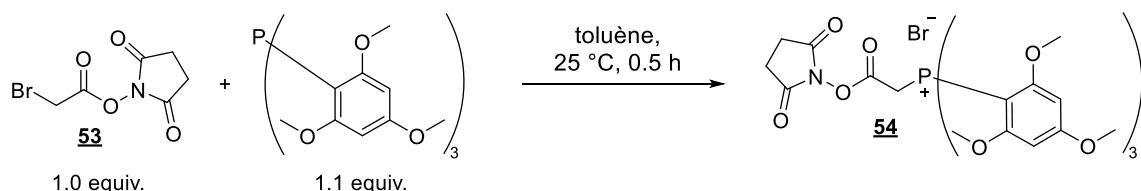


Schéma 26. Conditions réactionnelles pour la synthèse du composé **54**.

Cette expérience a été répétée plusieurs fois en effectuant une filtration et un rinçage du produit solide obtenu en guise de purification, amenant à des résultats hétérogènes. En effet, tandis que la formation du produit attendu a été chaque fois observée, les signaux du motif succinimide disparaissaient, de façon totale ou partielle et ce, aléatoirement. Nous avons donc choisi de poursuivre la synthèse en permettant, lors de l'étape suivante, une réinsertion du succinimide pour l'activation de l'acide carboxylique comme illustré dans le **Schéma 27**.

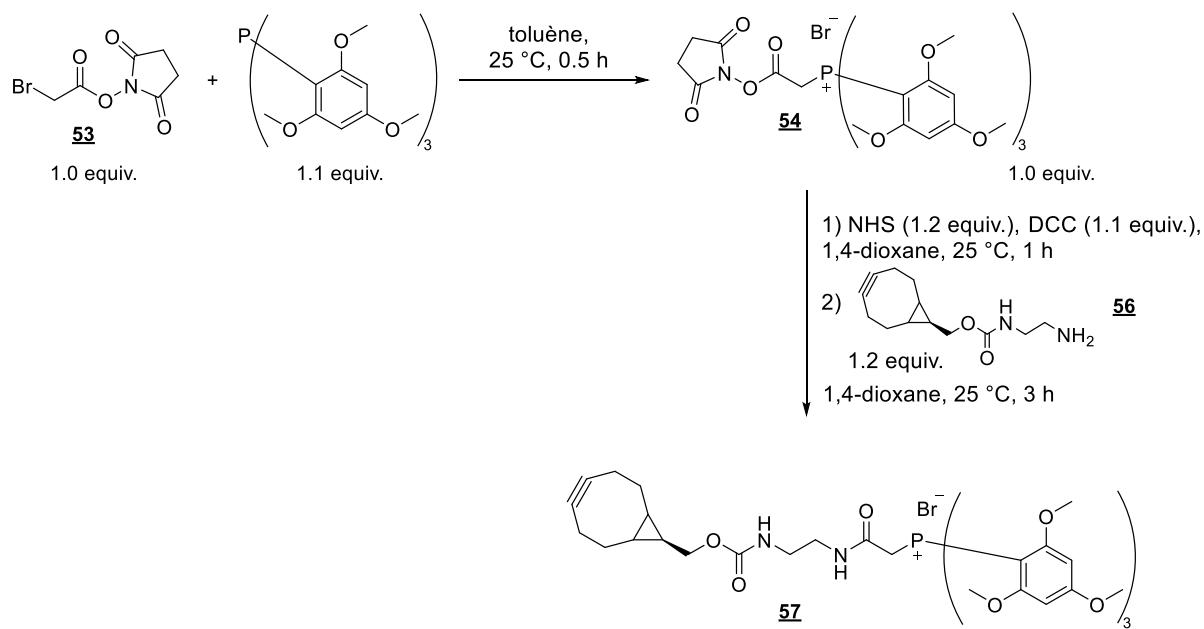


Schéma 27. Conditions réactionnelles testées pour l'obtention du BCN-TMPP **57**.

Le premier essai dans ses conditions n'a pas été concluant. De fait, en fin de réaction, le brut réactionnel a été soumis à une extraction liquide-liquide puis, après séchage, le solide blanc obtenu a été trituré dans l'éther froid. Cependant, cette trituration n'ayant pas amélioré la pureté du composé, une purification par colonne chromatographique avec un système dichlorométhane/méthanol a été effectuée, amenant à un produit dégradé. Une seconde tentative a été opérée avec cette fois une extraction liquide-liquide suivie d'une purification par colonne chromatographique avec un système cyclohexane/acétate d'éthyle. Le produit a été obtenu et isolé avec une pureté inférieure à 50% selon l'HPLC analytique. Finalement, faisant l'hypothèse que le problème majeur venait de l'extraction, nous avons directement purifié le brut de synthèse par colonne chromatographique avec un système cyclohexane/acétate d'éthyle, conduisant au produit attendu avec 86% de pureté et un rendement isolé de 9%.

Le spectre RMN du produit final contenant certains signaux cohérents avec ceux des réactifs, nous avons décidé de réaliser une dernière expérience dans laquelle toutes les espèces ont été introduites en quantités équimolaires (**Schéma 28**).

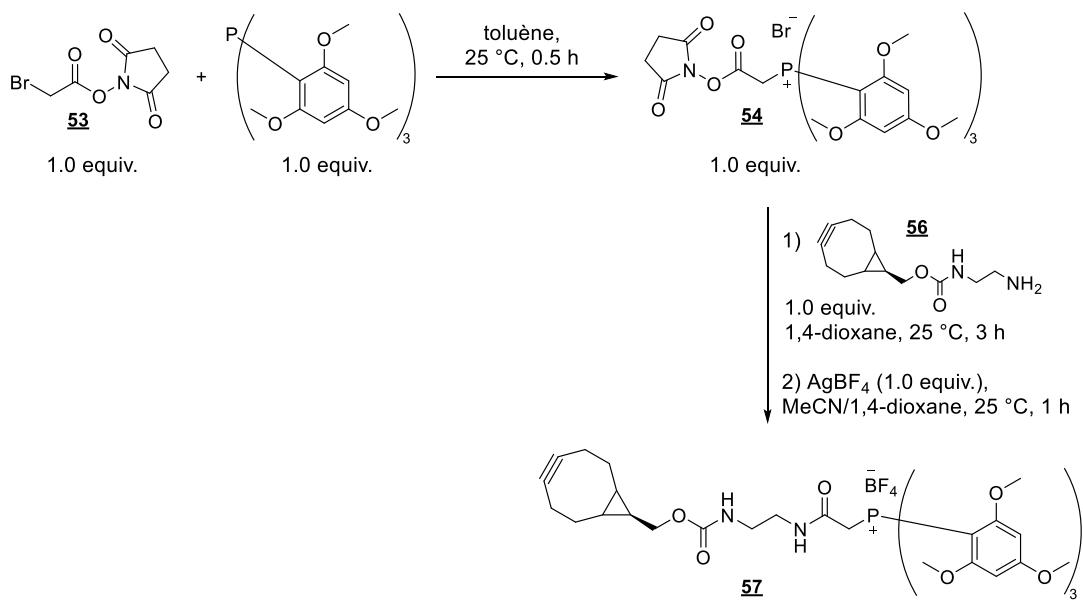


Schéma 28. Conditions réactionnelles pour l'obtention du BCN-TMPP **57**.

Nous avons analysé par RMN le produit **54** obtenu lors de la première étape afin de quantifier le N-hydroxysuccinimide (NHS) nécessaire pour la seconde étape. A notre grande surprise, les signaux du succinimide étaient encore intégralement présents. Ainsi, après avoir laissé réagir **54** et **56** pendant 3 heures à température ambiante, un échantillon de la réaction a été prélevé et analysé, révélant la formation du produit attendu. Afin de faciliter sa précipitation, nous avons alors ajouté dans le milieu du tétrafluoroborate d'argent (AgBF_4) et laissé 1 heure sous forte agitation à température ambiante avant de procéder à la filtration et au rinçage du solide obtenu. Nous sommes ainsi parvenus à isoler le BCN-TMPP **57** avec un rendement de 59% et une pureté de 86% selon l'HPLC analytique. Nous avons tenté d'augmenter la pureté en procédant à des précipitations dans le méthanol ou le toluène, sans succès. Bien que l'impureté n'ait pas pu être identifiée, celle-ci ne semble pas réagir lors de la réaction de cycloaddition avec un composé azidé puisqu'elle est retrouvée à l'identique.

Ainsi, nous sommes parvenus à retravailler les conditions proposées dans la littérature afin d'obtenir le BCN-TMPP. Néanmoins, il est important de souligner que cette synthèse est complexe et que sa reproductibilité reste variable, dépendant grandement de la qualité des réactifs.

4.2.2.TMTI

Bien que nous soyons parvenus à obtenir le BCN-TMPP, ce dernier présente une structure imposante, une synthèse complexe, une importante hydrophobie mais également, du fait de l'usage du BCN, une réactivité plutôt faible. Ainsi, nous avons voulu nous orienter vers un autre marqueur de masse permettant de pallier ces différents inconvénients et avons choisi le TMTI.⁴²¹ Cette molécule, dérivée du TMTH, est en effet beaucoup plus compacte, avec une synthèse plus simple et une réactivité accrue du fait d'un cycle à sept chainons et non huit.

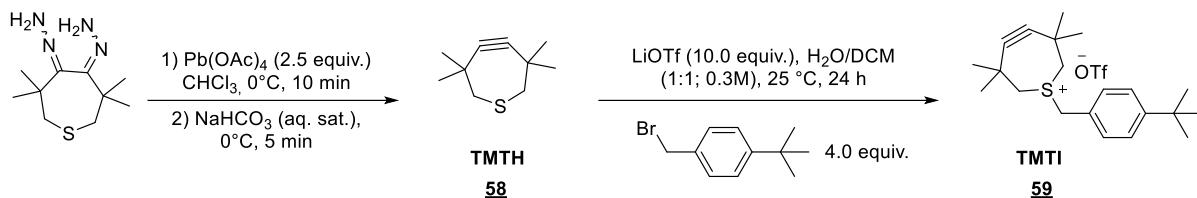


Schéma 29. Conditions réactionnelles pour l'obtention du TMTI avec le TMTH comme composé intermédiaire.

La synthèse du TMTI, se déroule en deux étapes comme présenté dans le **Schéma 29**. Tout d'abord une oxydation du précurseur du TMTH grâce à l'acétate de plomb, qui mène à la formation du TMTH **58** suivie par une alkylation douce du soufre, conduisant au TMTI **59**. Le rendement global est variable puisqu'il dépend de la qualité de manipulation lors de la première étape. En effet, le TMTH étant très volatile, il est indispensable lors du traitement et de la purification de travailler avec de la verrerie préalablement refroidie à -20°C . Également, lors de l'évaporation du solvant, il est important de ne pas appliquer un vide inférieur à 200 mbar et le bain doit être thermostaté à 20°C . Néanmoins, il s'agit de la seule difficulté que présente cette synthèse, la rendant plus simple et plus reproductible que celle du BCN-TMPP.

4.3. Mise au point des méthodes d'analyse de LC-MS/MS

L'ensemble des travaux d'analyses par LC-MS et LC-MS/MS qui seront expliqués dans ce chapitre ont été réalisés par l'équipe de François Fenaille et Benoit Colsch du CEA de Paris Saclay, en particulier par le Dr. Ahmad NAIM.

Toutes les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées sur des rétinoïdes non-azidés car l'objectif premier était la mise en place et l'optimisation des

méthodes d'extraction et d'analyse. Également, l'azoture ne devrait pas modifier de façon significative les résultats obtenus. Cette hypothèse sera toutefois vérifiée avant de procéder aux études métabolomiques ultérieures.

4.3.1. Système d'extraction

4.3.1.1. Technique d'extraction

Dans la littérature, trois méthodes sont couramment utilisées pour l'extraction de molécules d'intérêt depuis diverses matrices biologiques, à savoir l'extraction liquide-liquide, l'extraction en phase solide et la précipitation des protéines de la matrice.

Concernant l'extraction liquide-liquide (**Figure 80**), il s'agit d'extraire les molécules d'intérêt de la matrice biologique à l'aide d'un solvant organique pour lequel elles ont une affinité. Bien que possédant une haute sélectivité de séparation, la capacité de produire des grandes quantités d'échantillons avec un faible coût et une mise en place rapide de la technique, cette approche présente de faibles sensibilité et reproductibilité.⁴²³

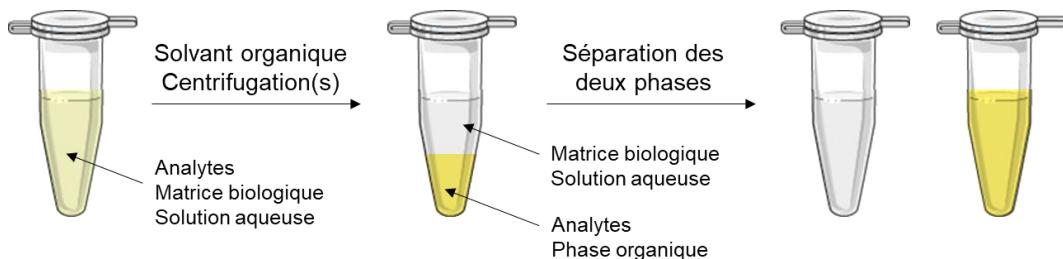


Figure 80. Illustration de l'extraction liquide-liquide de molécules d'intérêt depuis une matrice biologique. Le solvant organique a été arbitrairement choisi comme étant plus dense que la phase aqueuse.

Pour ce qui est de l'extraction en phase solide, elle consiste en plusieurs étapes illustrées dans la **Figure 81**. Tout d'abord, l'échantillon est chargé sur une phase solide préalablement choisie en fonction de la matrice et des analytes. Le conditionnement et le rinçage de la phase solide ne sont pas illustrés ici mais sont effectués avant le chargement de l'échantillon. Ensuite, les éléments interférents de la matrice sont éliminés par un solvant (ou mélange de solvants) ne permettant pas l'élution des analytes d'intérêt. Enfin, ces derniers sont élués avec un solvant adéquat. Cette technique est applicable à de nombreuses matrices biologiques, est reproductible et

conduit à des taux de récupération des molécules d'intérêt élevés. Toutefois, elle requiert une longue mise au point et sa sélectivité et sensibilité sont limitées.⁴²⁴

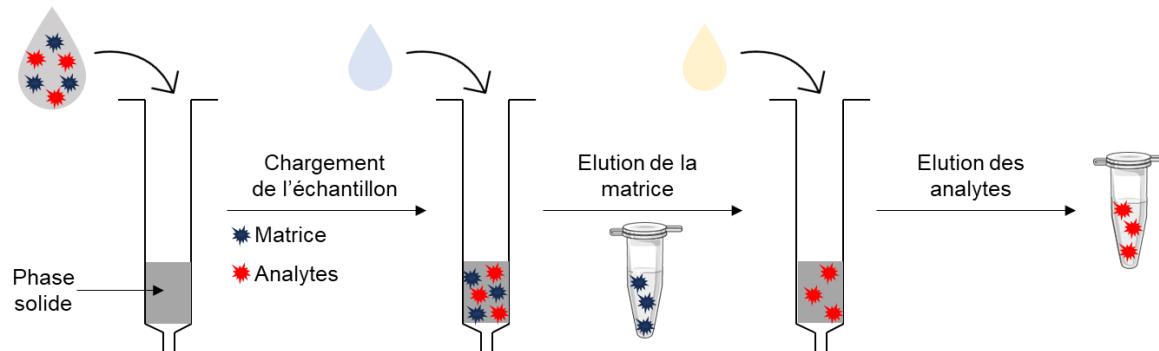


Figure 81. Illustration de l'extraction en phase solide de molécules d'intérêt. Les gouttes bleue et jaune représentent les solvants permettant les élutions respectives des interférents de la matrice et des molécules d'intérêt.

Pour finir, la précipitation des protéines repose sur l'ajout, dans l'échantillon contenant les analytes et la matrice, d'un solvant organique permettant la précipitation des protéines de celle-ci (**Figure 82**). En effet, en induisant la dénaturation des protéines de la matrice, le solvant entraîne leur précipitation. Une fois la matrice précipitée, il est possible de récupérer le surnageant contenant les molécules d'intérêt. Il s'agit d'une technique qui permet d'éliminer la majorité des protéines de la matrice, pour laquelle il est possible de moduler le solvant de précipitation selon les molécules étudiées et dont le coût est faible. Néanmoins, il est nécessaire de réaliser une optimisation quant au solvant de précipitation qui nécessite parfois des mélanges de plusieurs solvants, divers sels et l'ajout d'un ou plusieurs acides.^{425,426}

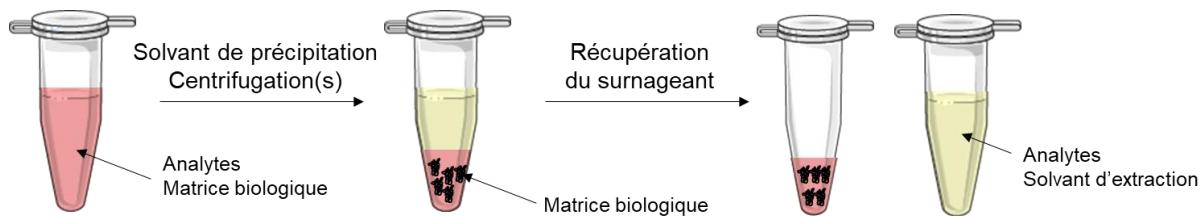


Figure 82. Illustration de la méthode de précipitation des protéines de la matrice pour l'extraction les

Dans notre cas, les rétinoïdes sont des petites molécules hydrophobes ayant la capacité de se lier aux phospholipides ainsi qu'aux sites hydrophobes des protéines de la matrice (par exemple l'albumine), conduisant à une forte interaction avec celle-ci. De plus, l'objectif était de mettre en place une méthode d'extraction reproductible avec une sensibilité élevée afin de palier la faible concentration endogène des

rétinoïdes. Également, il était nécessaire que la méthode soit simple à mettre en œuvre de sorte à pouvoir travailler facilement à l'abri de la lumière. Ainsi, c'est la précipitation des protéines de la matrice qui a été retenue pour nos études métabolomiques des rétinoïdes.

4.3.1.2. Choix du solvant pour la précipitation des protéines de la matrice

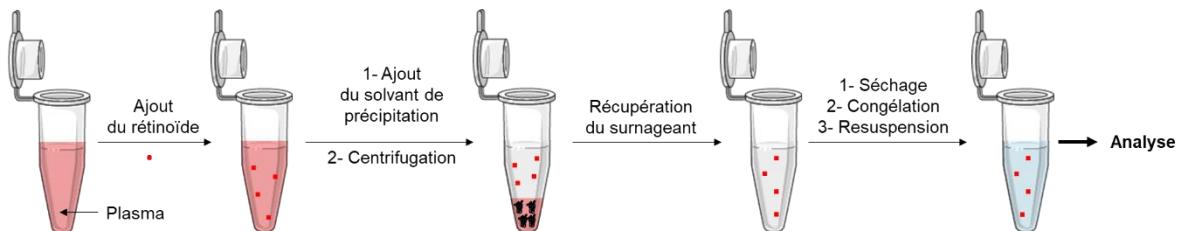
Après avoir choisi la méthode d'extraction des rétinoïdes dans les matrices biologiques, il a été nécessaire de l'optimiser. En particulier, le solvant de précipitation a dû être choisi. De façon générale, ce sont l'acétonitrile et le méthanol (ou un mélange des deux) qui sont utilisés. Dans leurs travaux, Czuba *et al.* rapportent l'emploi de l'acétonitrile comme solvant de précipitation. Toutefois, il faut noter que, selon le tissu étudié, ce ne sont pas les mêmes rétinoïdes qui sont extraits, apportant une limitation à cette approche.⁴²⁷

Cherchant à développer une technique applicable à l'ensemble des rétinoïdes, quel que soit le tissu ou le fluide traité, plusieurs solvants et mélanges de solvants usuels ont été testés afin de déterminer le plus adapté. Ces expériences ont été réalisées avec différents rétinoïdes commerciaux sous leur forme *all-trans*, à savoir l'acide rétinoïque (*atAR*), le rétinal (*atRAL*), le rétinol (*atROL*) et le palmitate de rétinyle (*atPR*). En effet, l'ensemble des molécules que l'on cherche à détecter étant leurs métabolites, leur comportement lors de l'extraction devrait être extrapolable. Également, le palmitate de rétinyle a été retenu pour servir de modèle d'ester de rétinol. Pour ce qui est de la matrice biologique, c'est le plasma humain qui a été choisi puisqu'il nous a permis de faire une mise au point de nos méthodes sans avoir à effectuer une homogénéisation des tissus, source d'incertitude pour les mesures.

Les travaux menés ont été séparés en deux catégories : les extractions et les contrôles (**Figure 83**). Pour ce qui est des extractions, chaque rétinoïde a été ajouté à hauteur de 10 nanomoles dans du plasma humain avant l'ajout des solvants d'extraction. Après centrifugation, récupération, séchage et congélation à -20 °C du surnageant, celui-ci a été resuspendu dans une solution d'éthanol contenant 5 mM de formiate d'ammonium. Ce dernier a pour rôle d'aider à l'ionisation des rétinoïdes en favorisant la formation d'ions adduits. Concernant les expériences contrôles, les solvants

d'extraction ont été ajoutés dans le plasma puis la solution a été centrifugée avant que le surnageant ne soit récupéré, séché et congelé à -20 °C. La solution de formiate d'ammonium a ensuite été ajoutée suivie par le rétinoïde étudié.

Les extractions



Les contrôles

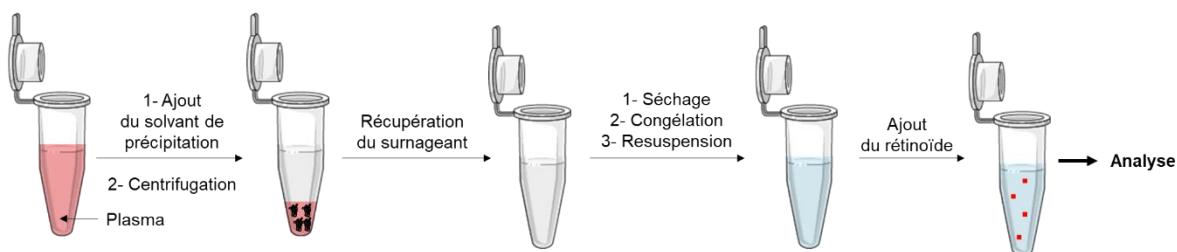


Figure 83. Les différentes étapes de la préparation des deux types d'échantillons. Le liquide transparent illustre le solvant d'extraction. Le liquide bleu clair montre la solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol. En rouge est représenté le rétinoïde étudié. En noir sont représentées les protéines de la matrice.

Les analyses ont ici été réalisées avec un quadripôle couplé à un temps de vol (Q-TOF, Impact HD, Bruker) en infusion directe, c'est-à-dire qu'aucune chromatographie liquide n'a été réalisée en amont de l'analyse par spectrométrie de masse. De ce fait, les valeurs d'intensités obtenues ne correspondent pas à des aires de pics mais uniquement à des valeurs d'intensité de détection, les rendant moins précises.

La qualité de l'extraction par chacun des solvants a été évaluée avec le rendement d'extraction, selon la **Formule 3**.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Intensité de l'ion extrait}}{\text{Intensité de l'ion contrôle}} \times 100$$

Formule 3. Formule pour le calcul du rendement d'extraction de chaque rétinoïde dans les différents solvants.

L'intensité de l'ion extrait correspond à l'intensité détectée pour l'ion cible lors de l'expérience « extraction ». L'intensité de l'ion contrôle se rapporte à l'intensité

détectée pour l'ion cible lors de l'expérience « contrôle ». Le plasma humain a été utilisé comme contrôle négatif. Chacune des expériences a été réalisée en triplicat.

Sur la **Figure 84** ont été rapportés les rendements d'extraction pour l'acide rétinoïque dans l'ensemble des solvants testés. On note que pour l'isopropanol et l'acétonitrile seuls ainsi que pour le mélange acétonitrile/méthanol, l'extraction permet de récupérer presque l'intégralité de l'AR injecté. Concernant le méthanol et le mélange acétonitrile/isopropanol, une perte moyenne de 15% est observée, avec d'importantes variations. Cela écarte donc ces solvants d'un usage ultérieur pour l'extraction des rétinoïdes des matrices biologiques.

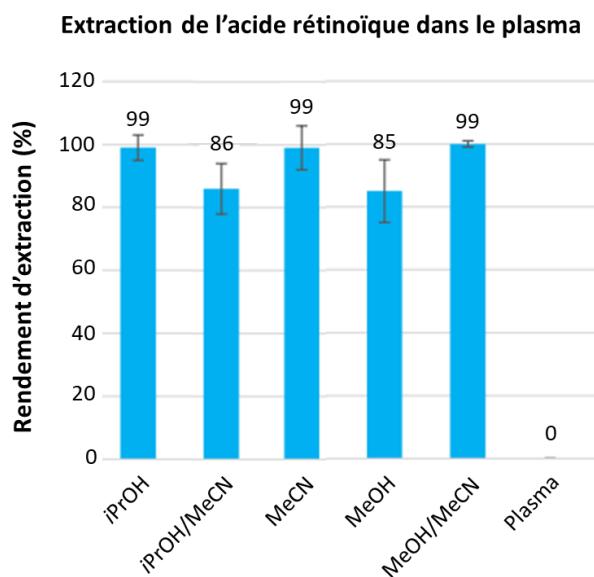


Figure 84. Rendements de l'extraction de l'acide rétinoïque du plasma humain en fonction du solvant ou du mélange de solvants utilisé. L'ion cible $[M+H]^+$ présente un m/z de 301.2184.

Concernant le rétinol, on remarque des rendements inférieurs et disparates (**Figure 85**). En effet, le rendement maximal obtenu est de 82% par extraction à l'acétonitrile. Pour l'isopropanol et son mélange avec l'acétonitrile, environ 25% de pertes sont observées. Le méthanol, quant à lui, ne permet pas de récupérer plus de 30% du ROL initialement ajouté. Toutefois, une fois mélangé à l'acétonitrile, ce taux double, montrant une synergie des deux solvants. Il est possible que la faible extraction observée avec le méthanol provienne d'une précipitation plus difficile, ne permettant pas de libérer l'intégralité du rétinal lié par interactions hydrophobes aux molécules de la matrice.

Extraction du rétinol dans le plasma

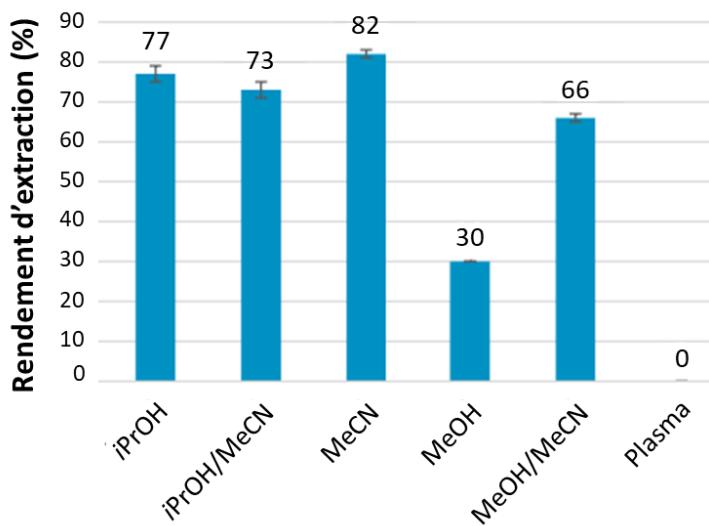


Figure 85. Rendements de l'extraction du rétinol du plasma humain en fonction en fonction du solvant ou du mélange de solvants utilisé. L'ion cible $[M-H]^+$ présente un m/z de 285.2217.

Nous avons poursuivi avec le rétinal pour lequel les résultats sont encore plus faibles et hétérogènes que pour le rétinol (**Figure 86**). De fait, le rendement d'extraction n'excède pas les 75%, atteint avec l'isopropanol. Lorsqu'il est mélangé à l'acétonitrile, cette valeur tombe sous la barre des 40%, concordant avec la faible capacité d'extraction de ce dernier, à savoir 25%. Le méthanol amenant un rendement de 2%, il ne permet presque aucune extraction. Cette valeur est toutefois multipliée par dix grâce à l'ajout d'acétonitrile. Encore une fois, on observe une synergie entre ces deux solvants. On note néanmoins que l'isopropanol mène à une extraction satisfaisante avec une marge d'erreur relativement faible. Une fois encore, l'hypothèse est que les solvants ne parviennent que très peu à libérer le RAL emprisonné dans la matrice.

Extraction du rétinal dans le plasma

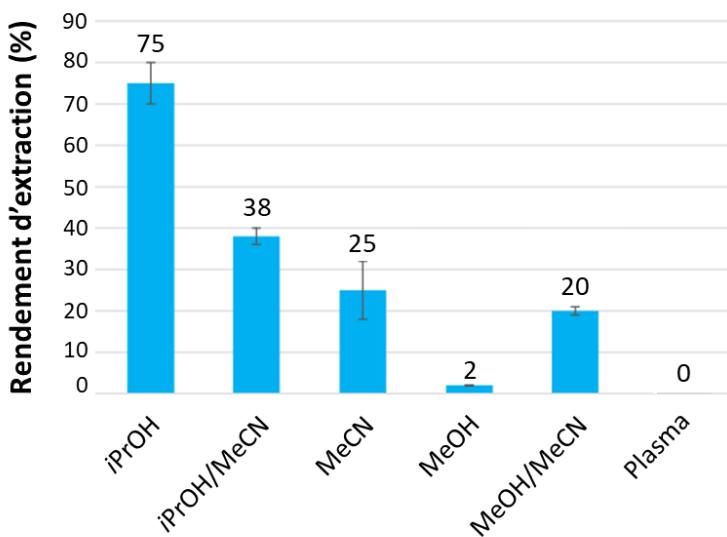


Figure 86. Rendements de l'extraction du rétinal du plasma humain en fonction en fonction du solvant ou du mélange de solvants utilisé. L'ion cible $[M+H]^+$ présente un m/z de 285.2225.

Enfin, c'est l'extraction du palmitate de rétinyle qui a été étudiée (Figure 87). Une nouvelle fois, l'isopropanol possède la capacité d'extraire ce composé mais avec un rendement à peine supérieur à 50%. L'acétonitrile ainsi que le mélange de ces deux solvants conduisent à des rendements inférieurs à 15% tandis que le méthanol et son mélange avec l'acétonitrile ne permettent aucune extraction. Cela pourrait s'expliquer par la forte apolarité du palmitate de rétinyle, majoritairement due à la chaîne alkyle à quinze carbones qui compose la partie ester.

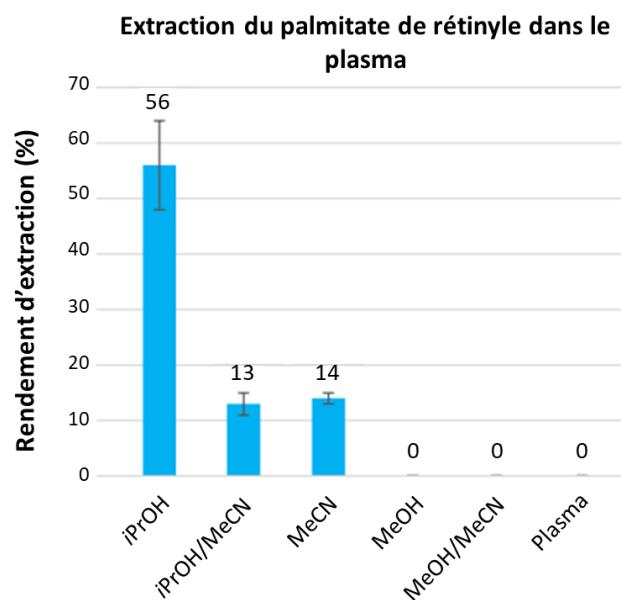


Figure 87. Rendements de l'extraction du palmitate de rétinyle du plasma humain en fonction en fonction du solvant ou du mélange de solvants utilisé. L'ion cible $[M+Na]^+$ présente un m/z de 547.4486.

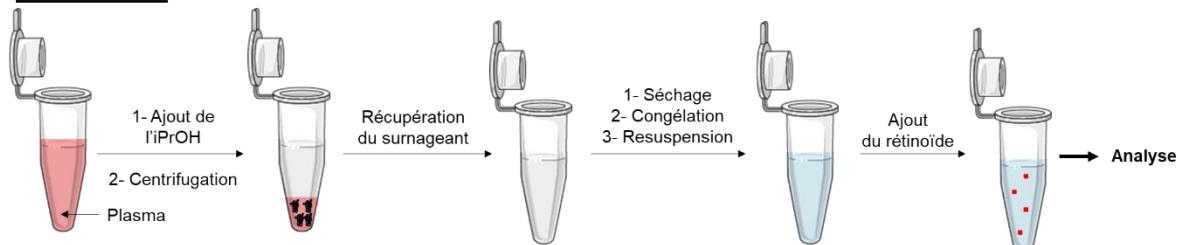
En conclusion, la méthode la plus adaptée à l'extraction de l'ensemble des rétinoïdes depuis une matrice biologique complexe, ici le plasma, est la précipitation des protéines à l'aide de l'isopropanol. Par manque de temps, l'expérience n'a pas été réalisée sur le rétinal azidé pour contrôler l'extrapolation des conditions.

4.3.2. Effet de matrice

Après avoir mis au point la méthode d'extraction des rétinoïdes à partir d'une matrice biologique, il a été nécessaire d'évaluer l'effet de cette matrice. En effet, les tissus biologiques utilisés sont susceptibles de contenir divers composés ayant la possibilité de co-éluer avec les analytes d'intérêt, altérant ainsi leur ionisation en amplifiant ou en réduisant celle-ci. C'est ce que l'on appelle l'effet de matrice. Son évaluation est donc nécessaire afin d'ajuster la préparation des échantillons, la technique d'ionisation ainsi que le système d'élution.

Pour déterminer l'effet de matrice, deux catégories d'expériences ont été menées : les matrices et les contrôles. Les protocoles pour chacune des catégories sont illustrés dans la **Figure 88**. Pour ce qui est des matrices, l'isopropanol a été ajouté dans le plasma puis la solution a été centrifugée avant que le surnageant ne soit récupéré, séché et congelé à -20 °C. La solution de formiate d'ammonium a ensuite été additionnée suivie par le rétinoïde (10 nanomoles). Concernant les expériences contrôles, le rétinoïde a simplement été mis en solution dans du formiate d'ammonium dans l'éthanol.

Les matrices



Les contrôles



Figure 88. Les différentes étapes de la préparation des deux types d'échantillons. Le liquide transparent illustre l'isopropanol. Le liquide bleu clair montre la solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol. En rouge est représenté le rétinoïde étudié. En noir sont illustrées les protéines de la matrice.

Les analyses ont été réalisées avec un Q-TOF en infusion directe. L'effet de matrice a été calculé selon la **Formule 4** pour chacun des rétinoïdes analysés.

$$\text{Effet de matrice (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Intensité moyenne de l'ion extrait de la matrice (Ie)}}{\text{Intensité moyenne de l'ion dans l'éthanol (Ic)}} \right) \times 100$$

Formule 4. Formule pour le calcul de l'effet de matrice en %.

L'intensité moyenne de l'ion extrait de la matrice correspond à l'intensité détectée pour l'ion cible lors de l'expérience « extraction ». L'intensité moyenne de l'ion dans l'éthanol se rapporte à l'intensité détectée pour l'ion cible lors de l'expérience « contrôle ». Le plasma humain a été utilisé comme contrôle négatif. Chacune des

expériences a été réalisée en triplicat. Les résultats obtenus sont visibles dans le **Tableau 13**.

Entrée	Rétinoïde	m/z de l'ion cible	I_e	I_c	Effet de matrice (%)
1	AR	301.2184 ^a	3 286	707 464	100
2	ROL	285.2217 ^b	423	37 124	99
3	RAL	285.2225 ^a	3 486	3 659 106	100
4	PR	547.4486 ^c	568	26 704	98

Tableau 13. Evaluation de l'effet de matrice de chacun des rétinoïdes étudiés. ^a: le pic intégré correspond à l'ion $[M+H]^+$; ^b: le pic intégré correspond à l'ion $[M-H]^+$; ^c: le pic intégré correspond à l'ion $[M+Na]^+$. I_e correspond à l'intensité moyenne de l'ion extrait de la matrice ; I_c correspond à l'intensité moyenne de l'ion dans l'éthanol. Les valeurs d'intensités ont été obtenues par triplicat. L'effet de matrice a été calculé selon la **Formule 4**.

On remarque que la valeur de l'effet de matrice se situe entre 98 à 100% pour les quatre rétinoïdes, montrant un impact très fort de la matrice sur la détection des ions cibles. Ainsi, pour la suite des travaux, il a été nécessaire d'utiliser une séparation chromatographique préalable à l'analyse par masse et donc de définir un gradient d'élution. Il était nécessaire que ce dernier conduise à une bonne séparation des différents composés, que ce soient des rétinoïdes exogènes ou des molécules de la matrice, afin de minimiser l'impact de cette dernière.

4.3.3. Mise en place d'une méthode de séparation par chromatographie en phase liquide

Après avoir déterminé la méthode la plus adaptée pour l'extraction des rétinoïdes et évalué l'effet de matrice, il a fallu trouver des conditions chromatographiques permettant une séparation des différentes molécules.

Les premiers travaux ont été réalisés sur un appareillage composé d'une chromatographie liquide (LC) couplée à un Q-TOF. En nous basant sur la littérature, les deux phases mobiles ont été choisies comme suit : une première phase composée à 60% d'eau et 40% de méthanol et, une seconde, contenant 90% d'isopropanol et

10% de méthanol. Chacune d'elle est additionnée de 0.1% d'acide formique. Différents paramètres ont été modulés au cours de l'optimisation : proportions initiales en chacune des phases mobiles, vitesse du gradient ainsi que le type de colonne (C8, C30). Il en est ressorti une méthode optimisée, notée M4 (**Figure 89**), retenue pour sa capacité à séparer les rétinoïdes. En effet, le RAL présente un temps de rétention de 33.6 min, le ROL de 34.4 min, l'AR de 34.6 min et le PR de 50.5 min.

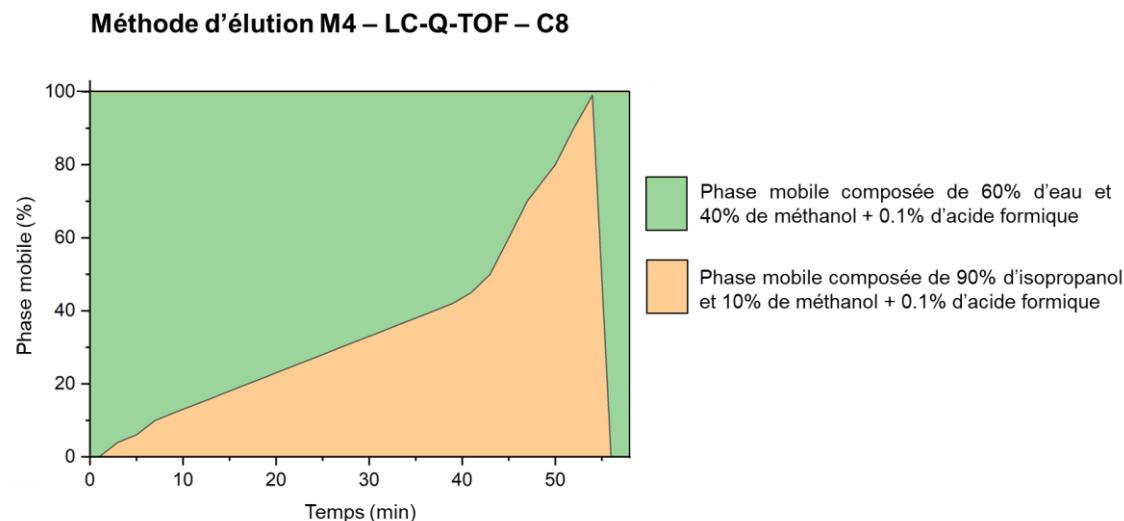


Figure 89. Méthode optimisée avec l'appareillage LC-Q-TOF, pour une colonne C8 en mode électrospray positif. La durée totale du gradient est de 58 minutes.

Malheureusement, cet instrument est ensuite tombé en panne, nous amenant à effectuer nos analyses sur un système chromatographique couplé à un spectre de masse de type Orbitrap (Orbitrap Fusion). Les phases mobiles ont été conservées, tout comme le type de colonne. Le gradient de chromatographie liquide a quant à lui été réoptimisé à partir de M4, de façon à être plus court tout en permettant une détection distincte des rétinoïdes. L'avantage majeur de l'utilisation de l'Orbitrap est que, du fait de ses très hautes résolutions (500 000 pour un *m/z* de 200) et précision de mesure de masse (<2 ppm en routine), il n'est pas indispensable que les rétinoïdes isobares soient parfaitement séparés lors de la chromatographie liquide. En effet, il est possible de sélectionner une valeur unique de *m/z* pour chaque molécule. C'est de cette façon que deux méthodes ont été retenues : l'une de 15 minutes, notée Opti 5 (**Figure 90, A**) et l'autre de 25 min, appelée M2 (**Figure 90, B**). Les temps de rétention pour chaque rétinoïde avec les deux méthodes sont inscrits dans le **Tableau 14**.

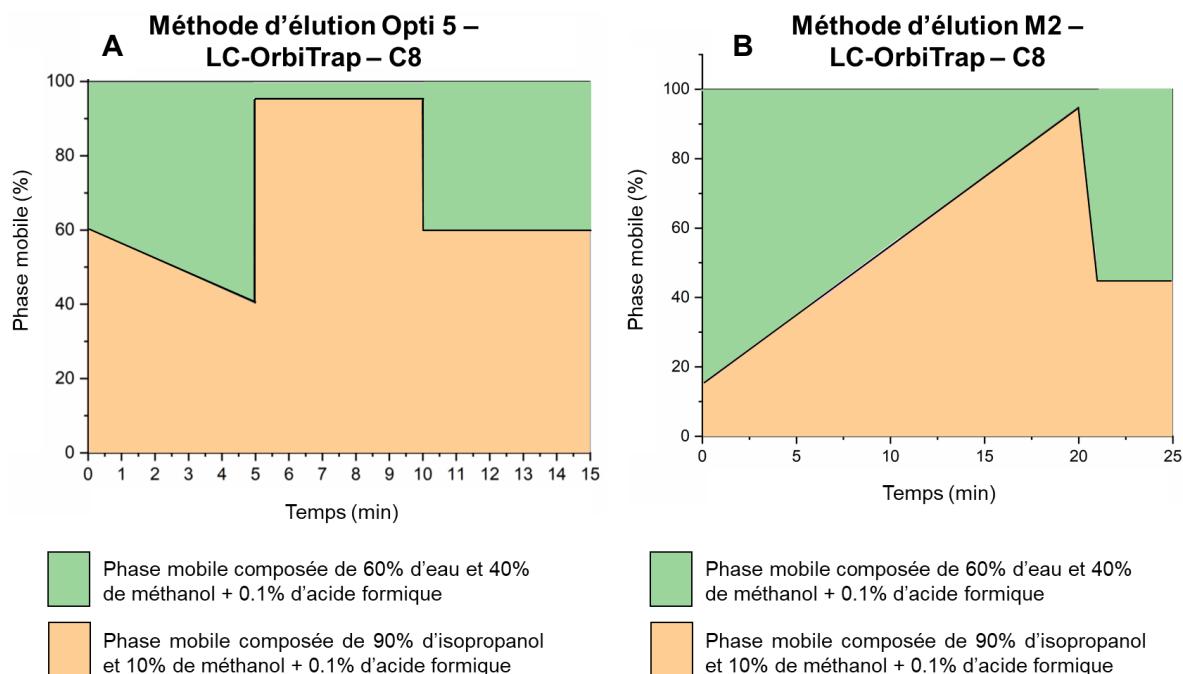


Figure 90. A- Gradient de la méthode Opti 5 sur un instrument LC-OrbitTrap avec une colonne C8. Durée totale de la méthode : 15 minutes. B- Gradient de la méthode M2 sur un instrument LC-OrbitTrap avec une colonne C8. Durée totale de la méthode : 25 minutes.

Molécule	R _t (min) – Opti 5	R _t (min) – M2
AR	1.48	12.10
RAL	1.52	10.63
ROL	1.53	10.88
PR	7.26	17.74

Tableau 14. Temps de rétention de chaque rétinoïde avec les deux méthodes optimisées sur l'instrument LC-Orbitrap, avec une colonne C8. R_t désigne le temps de rétention des ions cibles.

Au cours des travaux qui seront rapportés dans les prochains paragraphes, les deux méthodes ont systématiquement été utilisées. Toutefois, c'est la méthode M2 qui a donné les meilleurs résultats. Ainsi, sauf mention du contraire, les résultats présentés correspondent à ceux obtenus avec l'approche M2.

Pour conclure, nous sommes parvenus à mettre en place une méthodologie permettant l'extraction efficace de l'ensemble des rétinoïdes *all-trans*. Il devrait donc être possible, par extension, d'extraire les formes azidées ainsi que de nouveaux métabolites. Également, nous avons mis au point un gradient d'élution pour la chromatographie liquide amenant à détecter spécifiquement chaque rétinoïde.

4.4. Détection et analyse des rétinoïdes naturels

Après avoir mis en place les méthodes d'extraction et de séparation des rétinoïdes, des analyses de spectrométrie de masse haute résolution (MS) et en tandem (MS²) ont été réalisées sur le PR, l'AR, le RAL et le ROL afin de voir si ces quatre molécules pouvaient être discernées au sein d'un mélange et quels sont les ions formés pour chacune d'elles. L'objectif était de parvenir à visualiser pour chacun d'eux des ions diagnostics, c'est-à-dire des ions propres à chaque molécule. Cela permettra par la suite de lier un métabolite nouvellement détecté à un métabolite parent.

Nos travaux ont débuté avec l'analyse d'un mélange équimolaire de PR, AR, RAL et ROL dans l'éthanol. La concentration finale de chaque rétinoïde dans la solution analysée était de 10 µg/mL. Les échantillons ont été analysés à la suite d'une infusion directe. Le spectre de masse obtenu pour le mélange est présenté dans la **Figure 91**.

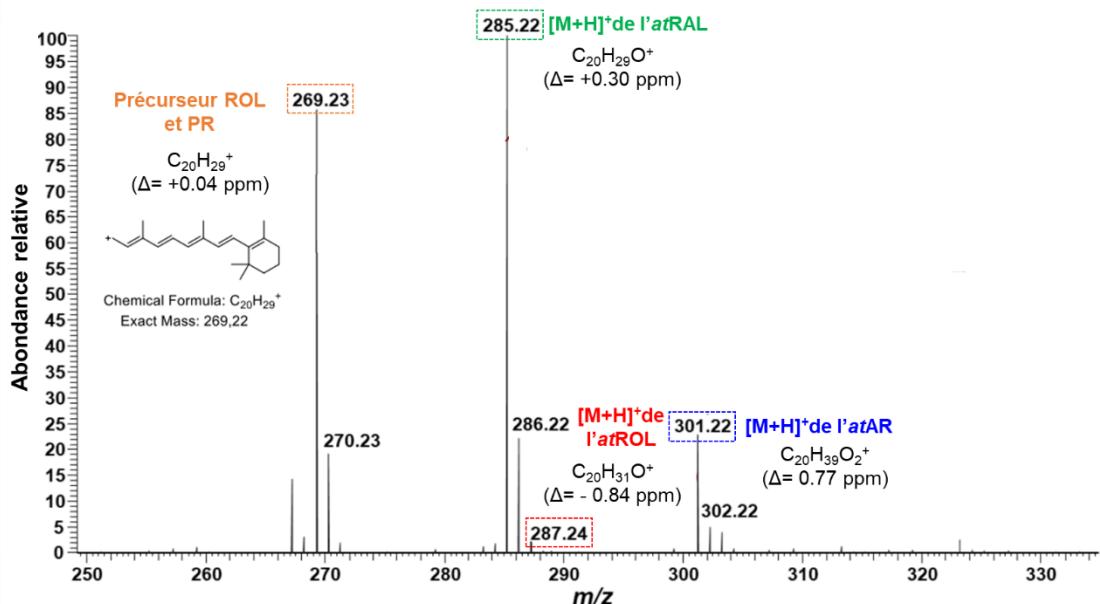


Figure 91. Analyse par masse d'un mélange équimolaire d'acide rétinoïque, de rétinal, de rétinol et de palmitate de rétinyle. Les signaux ont été attribués à chaque molécule et l'écart entre la masse exacte attendue et la masse expérimentale a été calculé en ppm.

On peut voir que le RAL est le rétinoïde le mieux détecté, suivi par le précurseur du ROL et du PR. L'AR est détecté avec une abondance relative correcte tandis que pour le ROL, l'ion protoné est faiblement décelable. L'ion protoné de PR a également été détecté mais n'a pas été représenté ici.

Chacun des ions protonés a ensuite été sélectionné pour être à nouveau fragmenté afin d'accéder aux profils MS². Seul l'ion correspondant au précurseur du ROL et du PR n'a pas été considéré.

Pour le palmitate de rétinyle, très peu de signaux sont visibles (**Figure 92**).

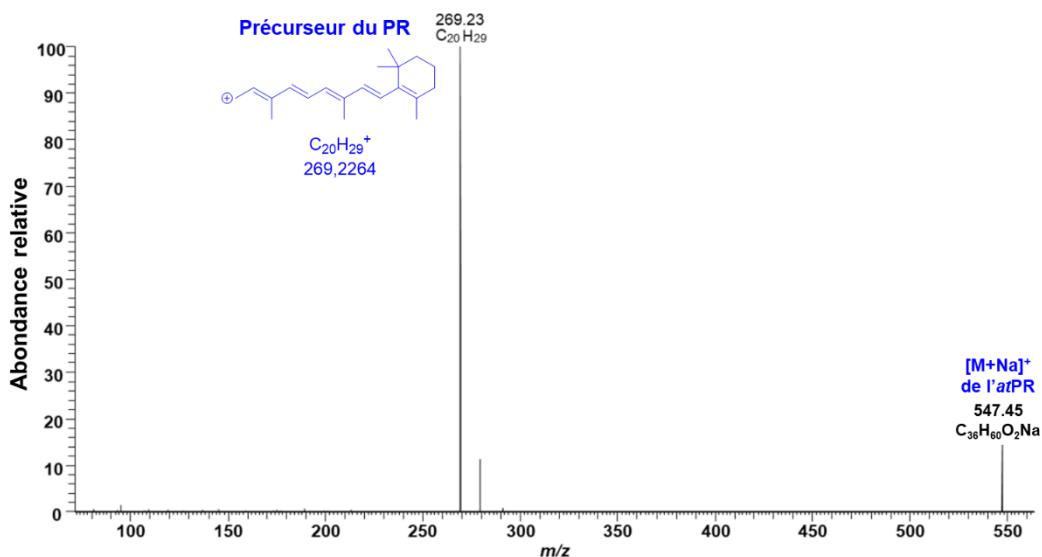


Figure 92. Spectre MS² du palmitate de rétinyle obtenu avec une énergie de collision normalisée de 7%.

Cela peut s'expliquer par une faible capacité d'ionisation de cette molécule. Toutefois, c'est un résultat intéressant car lorsque des métabolites inconnus seront étudiés, ce spectre type permettra de facilement lier le métabolite à un ester de rétinol. Deux signaux sur les trois ont pu être attribués : le premier à m/z 269.23 correspond à l'ion fragment tandis que l'ion parent protoné est visible à m/z 547.45. A noter qu'il est également envisageable d'augmenter l'énergie de collision afin d'accroître la fragmentation et de rendre d'autres ions diagnostics décelables. Ces travaux seront réalisés ultérieurement afin d'évaluer l'impact de l'énergie de collision sur le spectre MS² du PR.

Pour ce qui est de l'acide rétinoïque, on constate la formation de très nombreux fragments (**Figure 93**). On note que sur les treize ions qui ont pu être attribués, huit ne présentent plus ni le cyclohexène ni l'acide. Pour les trois qui ont vu leur carbone préservé, seule la double liaison carbone oxygène est encore présente. Ces derniers pourraient être une signature intéressante lors de l'étude des nouveaux métabolites.

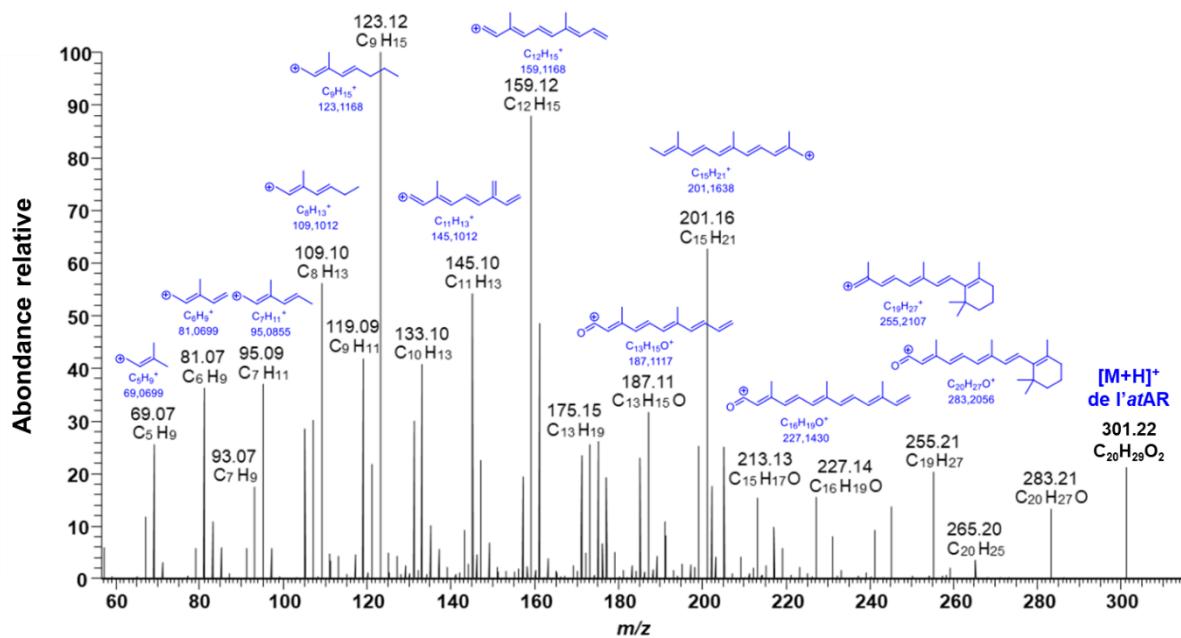


Figure 93. Spectre MS^2 de l'acide rétinoïque obtenu avec une énergie de collision normalisée de 32%.

L'analyse MS^2 du rétinal est présentée en Figure 94.

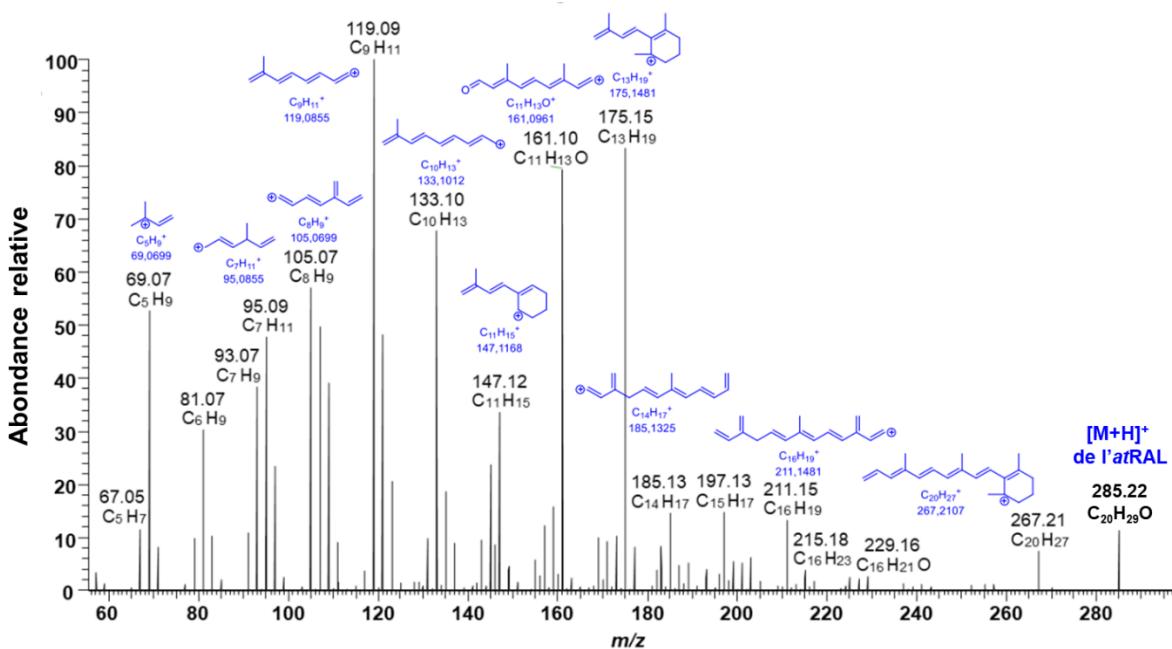


Figure 94. Spectre MS/MS du rétinal obtenu avec une énergie de collision normalisée de 32%.

Une nouvelle fois, la chaîne polyénique montre une importante fragmentation. Dans le cas de l'aldéhyde, aucun ion détecté ne conserve son carbonyle. Également, seuls trois des douze ions décelés ont gardé le cycle à six chainons. On note que de nombreux ions sont identiques à ceux résultant de la fragmentation de l'acide rétinoïque. Toutefois, il semble possible de distinguer les deux grâce à leur intensité.

Par exemple, l'ion à m/z 175.15 présente une intensité de 30 UA pour l'AR contre une intensité d'environ 85 UA pour le rétinal. Également, certains ions semblent signatures du rétinal tels que ceux à m/z 147.12, 211.15 ou encore 267.21.

Enfin, l'analyse MS^2 du rétinol a été effectuée (**Figure 95**). Une fois encore, la fragmentation est très importante, en particulier au niveau de la chaîne polyénique. Au contraire de l'AR et du RAL, les ions les plus détectés sont ceux dont les valeurs de m/z sont inférieures à 120, ce qui en fait une signature pour les métabolites du rétinol.

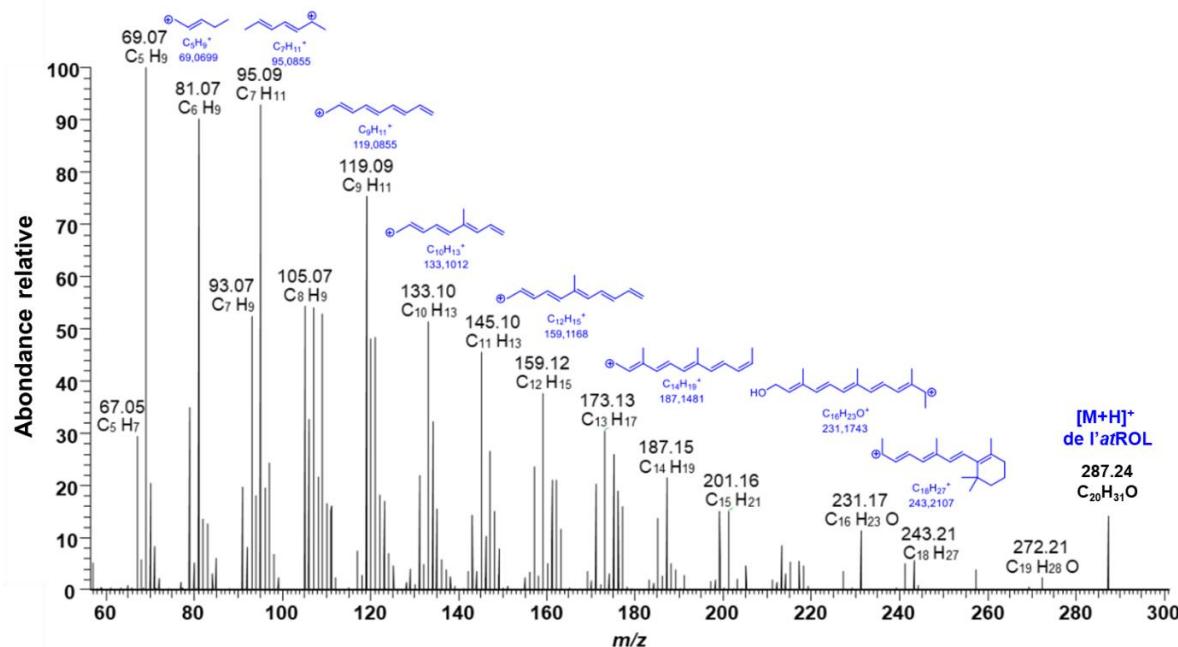


Figure 95. Spectre MS^2 du rétinol obtenu avec une énergie de collision normalisée de 32%.

Afin de faciliter l'attribution ultérieure des signaux des nouveaux métabolites, le **Tableau 15** a été réalisé. On y voit l'ensemble des masses des ions qui ont pu être détectés lors de la MS^2 de l'AR, du RAL et du ROL. Le PR n'a pas été inclus, son ionisation étant typique, avec des masses bien distinctes. On remarque que les ions identifiés pour des m/z compris entre 69 et 95 sont communs aux trois rétinoïdes et ne pourront donc pas servir de référence pour l'association d'un métabolite à son précurseur. En revanche, les ions ayant des m/z supérieurs à 180 sont majoritairement attribuables à un seul des rétinoïdes, en faisant des ions diagnostics de chacun d'eux.

Massé	AR	RAL	ROL	Massé	AR	RAL	ROL
67.05		✓	✓	187.15			✓
69.07	✓	✓	✓	197.13		✓	
81.07	✓	✓	✓	201.16	✓		✓
93.07	✓	✓	✓	211.15		✓	
95.09	✓	✓	✓	213.13	✓		
105.07		✓	✓	215.18		✓	
109.10	✓			227.14	✓		
119.09	✓	✓	✓	229.16		✓	
123.12	✓			231.17			✓
133.10		✓	✓	243.21			✓
145.10	✓		✓	255.21	✓		
147.12		✓		265.20	✓		
159.12	✓		✓	267.21		✓	
161.10		✓		272.21			✓
173.13			✓	283.21	✓		
175.15	✓	✓		285.22		✓	
185.13		✓		287.24			✓
187.11	✓			301.22	✓		

Tableau 15. Ensemble des ions détectés en MS² de l'AR, du RAL et du ROL.

Ainsi, nous sommes parvenus à détecter les quatre rétinoïdes principaux dans un mélange équimolaire. Les ions de chacun d'eux ont été attribués puis la MS² a pu être effectuée. Celle-ci a permis de mettre en avant les ions diagnostics de chacun des rétinoïdes, qui seront indispensables pour caractériser des métabolites inconnus et les relier à leur précurseur.

4.5. Détection et analyse du N₃ RAL et des adduits du N₃ RAL avec les sondes de masse

4.5.1. Analyse de l'azido rétinal

Comme pour les rétinoïdes naturels, les analyses MS et MS² de l'azido rétinal ont été effectuées. Pour ce faire, l'azido rétinal a été mis en solution dans l'éthanol à une concentration de 10 µg/mL avant d'être introduit directement dans la source du spectromètre de masse, amenant une bonne détection de la molécule. L'analyse par MS n'ayant donné que l'ion [M+Na]⁺, seul le profil MS² sera discuté ici (Figure 96).

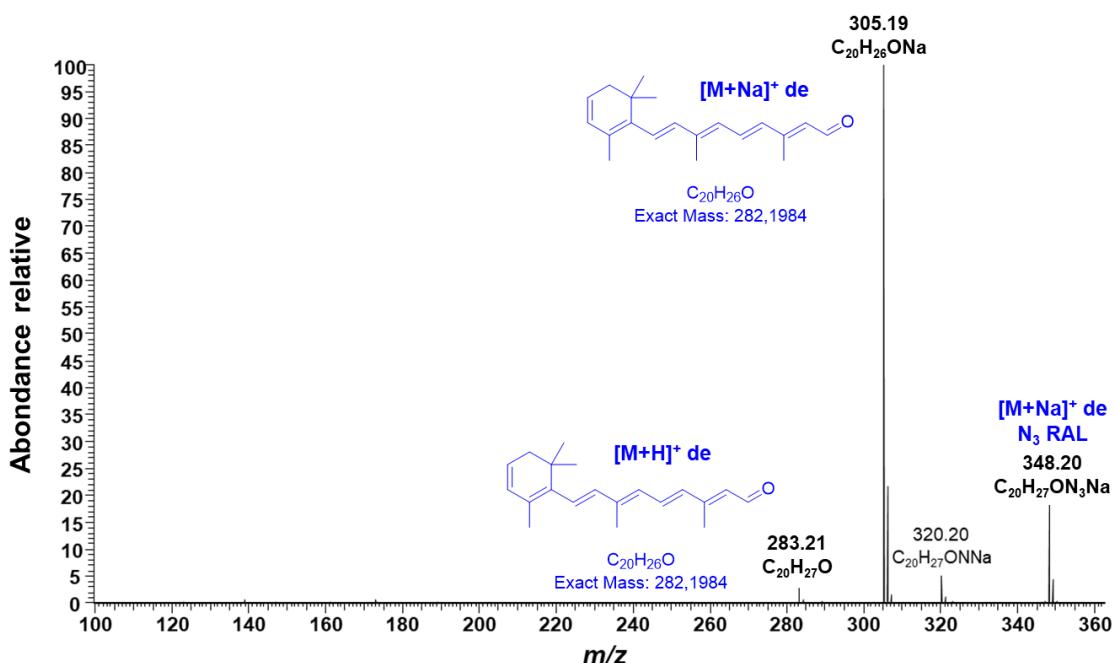
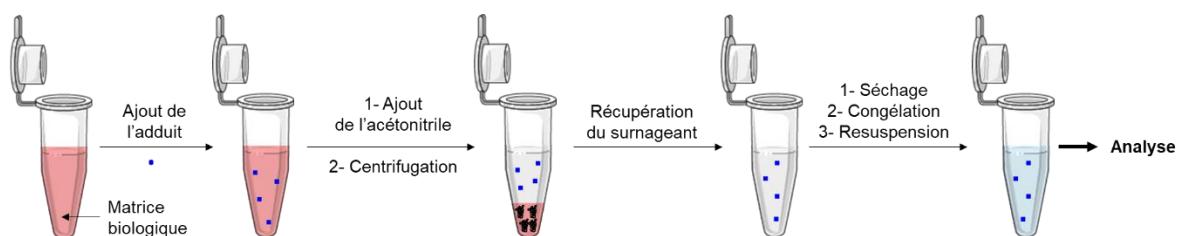


Figure 96. Spectre MS² de l'azido rétinal obtenu avec une énergie de collision normalisée de 13%.

On note que très peu d'ions sont formés et que la caractéristique de ces derniers est la perte de l'azoture, qui conduit à la formation d'une double liaison supplémentaire dans le cycle à six chainons. L'absence d'ions de basses masses est probablement due à la faible énergie de collision appliquée dans ce cas (13%). Par manque de temps, la détection de l'azido rétinal dans les matrices biologiques n'a pas été réalisée, au profit de la détection des adduits.

4.5.2. Détection et analyses par MS et MS² des adduits

Pour que nos études métabolomiques soient réalisables, il est indispensable que les adduits formés entre l'azido rétinal et les sondes de masse puissent être extraits, détectés et analysés dans diverses matrices biologiques. Ces différents points ont donc été étudiés en travaillant avec les adduits BCN-TMPP-N₃ RAL et TMTI-N₃ RAL préalablement synthétisés. Deux matrices biologiques ont été utilisées, à savoir le plasma et le foie de souris, tous deux fournis par Alexia Kindler (IGBMC, Strasbourg). Les expériences ont été réalisées selon le protocole illustré en **Figure 97**.



Les contrôles

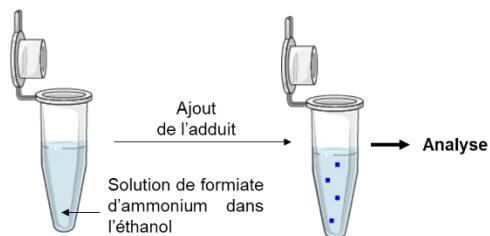


Figure 97. Les différentes étapes de la préparation des échantillons et des contrôles. Le liquide transparent illustre l'acétonitrile. Le liquide bleu clair montre la solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol. En bleu est représenté l'adduit. En noir sont représentées les protéines de la matrice.

Les adduits ont été ajoutés dans la matrice biologique à hauteur de 1 µmole suivis par l'acétonitrile. Après centrifugation, récupération, séchage et congélation à -80 °C du surnageant, celui-ci a été resuspendu dans une solution d'éthanol contenant du formiate d'ammonium puis analysé. Les expériences contrôles ont été conduites dans l'éthanol, en suivant le protocole illustré dans la **Figure 97**.

Pour ce qui est des solvants d'extraction, des travaux identiques à ceux présentés en **4.3.1.**, ont été menés sur chacun des adduits. Seuls l'isopropanol et l'acétonitrile ont été comparés. Dans le cas du BCN-TMPP-N₃ RAL, les rendements d'extraction et les effets de matrice se sont révélés sensiblement identiques. En revanche, pour le TMTI-N₃ RAL, le rendement d'extraction s'est montré beaucoup plus important avec

l'acétonitrile (100% contre 30% pour l'isopropanol). De ce fait, c'est l'acétonitrile qui a été retenu pour l'extraction de ces deux composés.

4.5.2.1. Adduit BCN-TMPP-N₃ RAL

Premièrement, la bonne détection de l'adduit dans les matrices biologiques a été vérifiée. Les résultats sont présentés dans la **Figure 98**. Les analyses ayant été conduites avec une chromatographie liquide préalable à l'analyse par masse, il a été possible d'intégrer l'aire sous les pics pour chacune des expériences. On note que l'adduit, que ce soit dans le foie ou le plasma, est détecté avec une intensité dix fois inférieure à celle du contrôle.

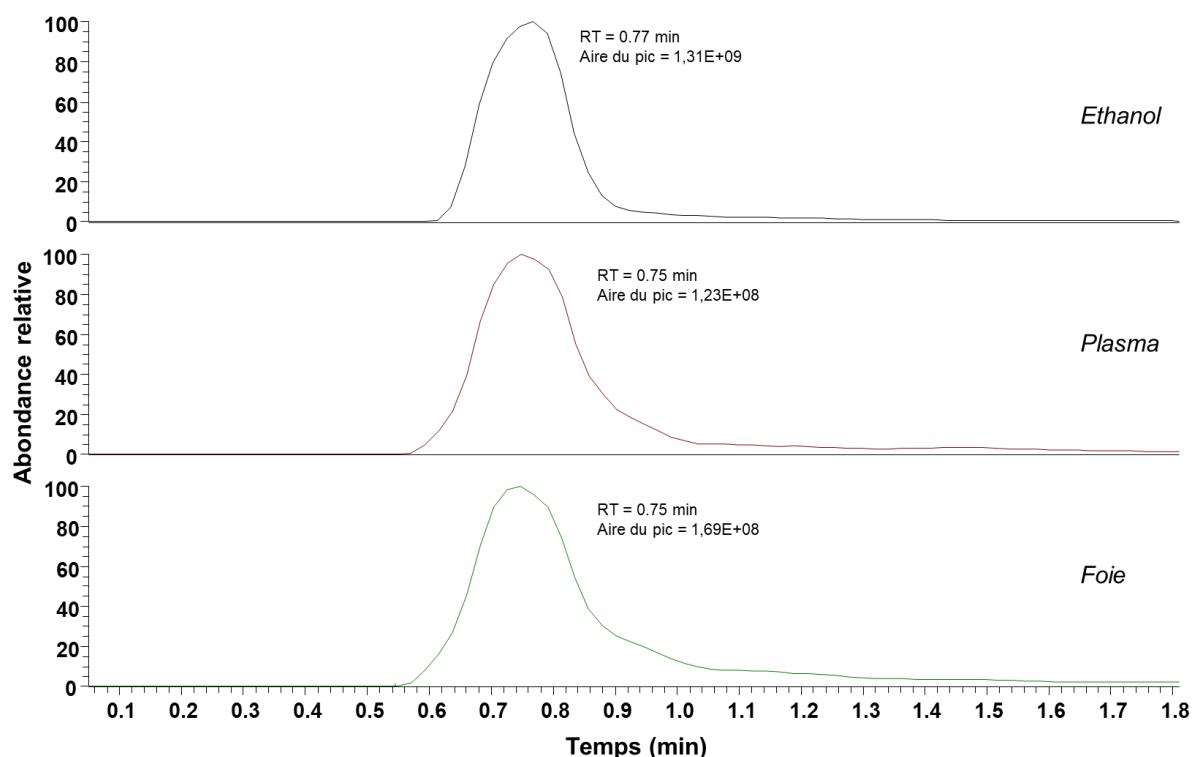


Figure 98. Pics de l'adduit BCN-TMPP-N₃ RAL détectés dans l'éthanol (contrôle), le plasma et le foie de souris. Le temps de rétention est noté RT. L'aire du pic est donnée en unités arbitraires (UA).

Par la suite, le spectre de masse obtenu pour l'expérience dans le plasma, visible sur la **Figure 99**, a été étudié. Le même spectre a été acquis pour l'étude avec le foie.

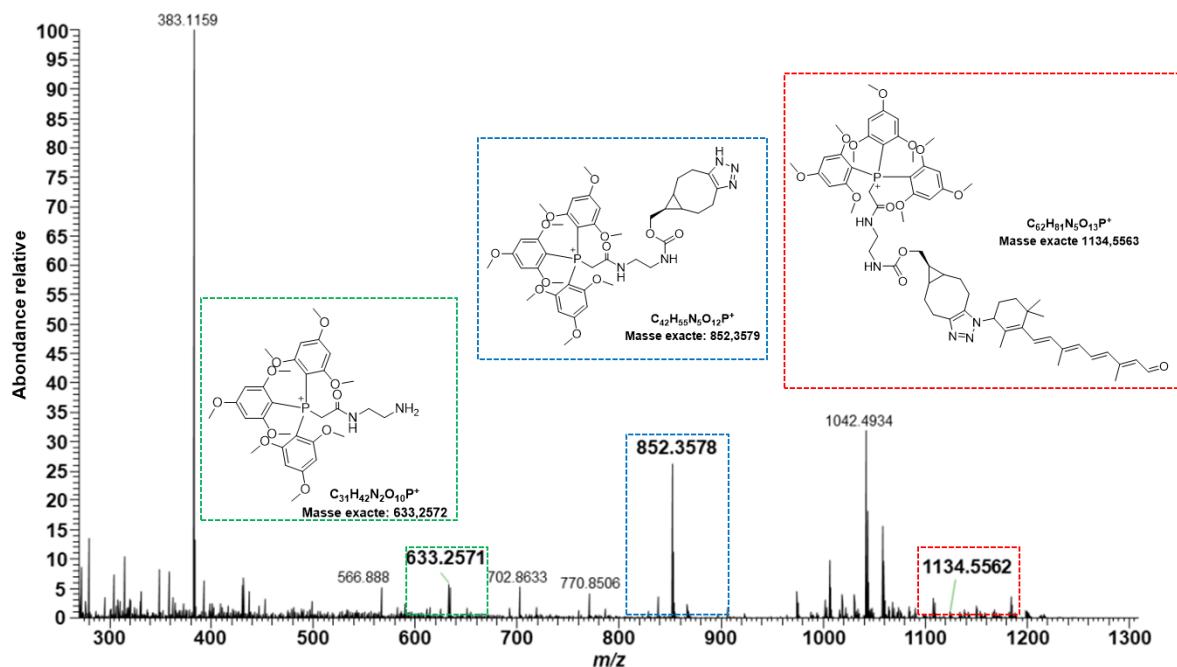


Figure 99. Spectre de masse du BCN-TMPP-N₃ RAL. En vert, bleu et rouge sont encadrées les masses des ions in-source d'intérêt avec leurs structures associées. Ce spectre a été obtenu pour l'adduit extrait du plasma de souris.

Trois fragments in-source – c'est-à-dire formés dans la source du spectromètre de masse – ont pu être identifiés parmi l'ensemble des signaux. Cette fragmentation est généralement dû à la fragilité des molécules étudiées. On note d'abord l'ion correspondant à l'adduit lui-même, détecté avec un *m/z* 1134.5562 (encadré rouge). Ensuite, l'ion à *m/z* 852.3578 correspond à l'adduit ayant perdu l'intégralité du rétinoïde, à l'exception de l'azoture probablement resté sous la forme du triazole (encadré bleu). Enfin, le TMPP portant uniquement le bras espaceur a été observé à *m/z* 633.2571 (encadré vert). Ce dernier ne présente que peu d'intérêt pour les études métabolomiques puisqu'il ne montre aucune trace de liaison à un rétinoïde.

L'ion correspondant à l'adduit intact a été sélectionné pour subir une seconde fragmentation, amenant au spectre MS² (**Figure 100**). On note que ce dernier ne nous apporte pas plus d'informations que le spectre MS, les ions détectés étant les mêmes, à l'exception de ceux à *m/z* de 181.09 et 677.25. Cependant, ils ne montrent que le TMPP ou un fragment triméthoxybenzène de celui-ci, ne donnant aucune information quant au rétinoïde avec lequel il était clické.

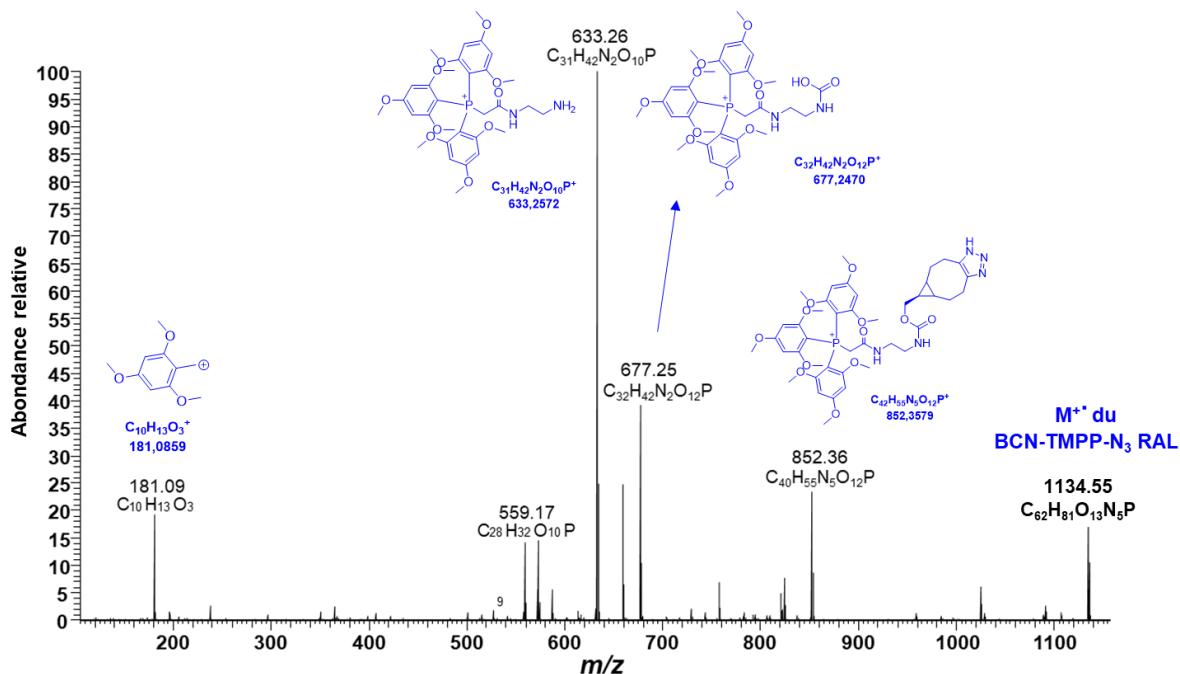


Figure 100. Spectre MS² du BCN-TMPP-N₃ RAL obtenu avec une énergie de collision normalisée de 40%.

4.5.2.2. Adduit TMTI-N₃ RAL

Les mêmes travaux ont été réalisés sur le TMTI-N₃ RAL. La détection par LC-MS de cette molécule dans le plasma et le foie de souris est présentée dans la **Figure 101**. Les analyses ayant été conduites avec une chromatographie liquide préalable à l'analyse par masse, il a été possible d'intégrer l'aire sous les pics pour chacune des expériences. On note que l'adduit est détecté de façon cinquante fois plus faible dans le plasma par rapport au contrôle contre cinq fois pour le foie. Il semblerait ainsi que l'extraction et/ou la détection de cette molécule soit plus complexe dans le plasma.

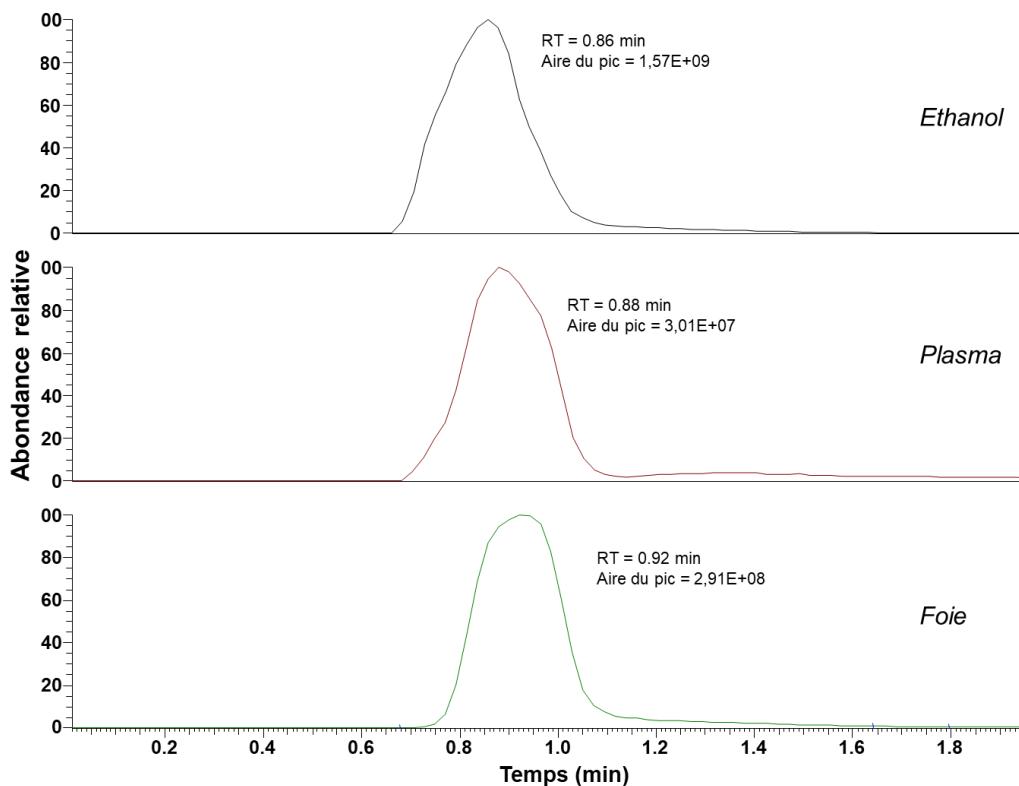


Figure 101. Pics de l'adduit TMTI-N₃ RAL détectés dans l'éthanol (contrôle), le plasma et le foie de souris. Le temps de rétention est noté RT. L'aire du pic est donnée en unités arbitraires (UA).

La suite des travaux a porté sur le spectre de masse obtenu pour l'expérience dans le plasma (**Figure 102**). Le même spectre a été acquis pour l'étude avec le foie.

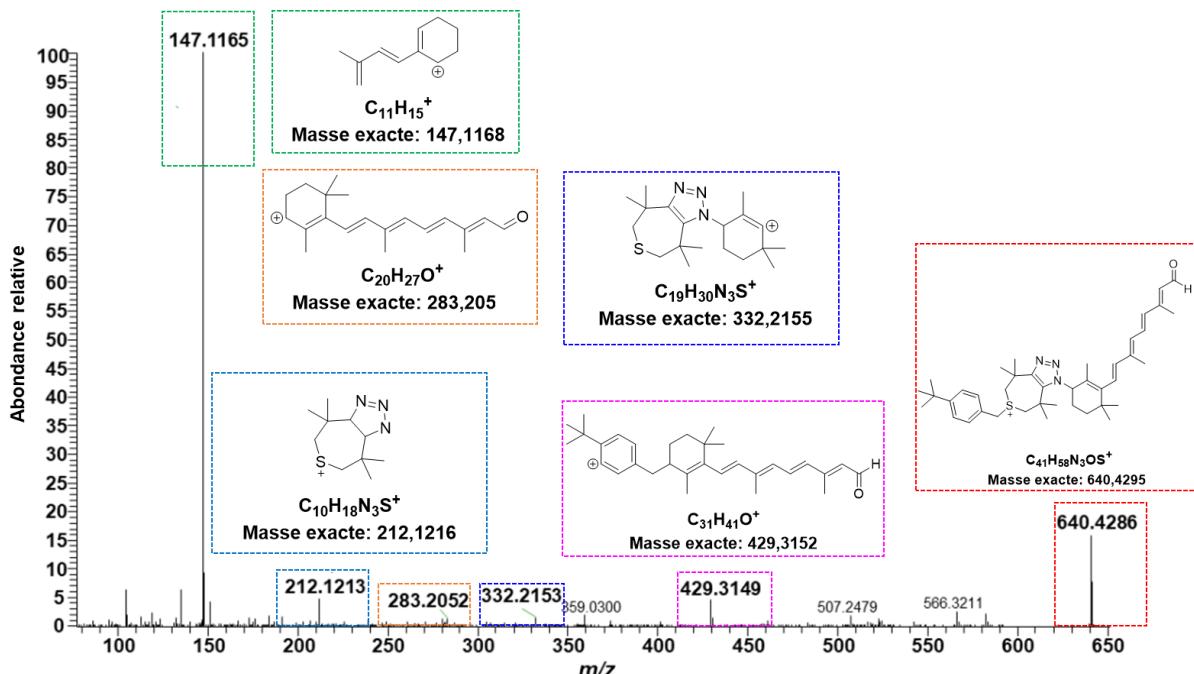


Figure 102. Spectre de masse du TMTI-N₃ RAL. En couleur sont encadrées les masses des ions in-source d'intérêt avec leurs structures associées. Ce spectre a été obtenu pour l'adduit extrait du plasma de souris.

Cette fois, six ions in-source ont été détectés et attribués. A m/z 147.1165, on trouve un fragment du rétinal (encadré vert). L'ion détecté à m/z 212.1213 correspond probablement au bicycle triazole/cycloheptyne (encadré bleu clair). Le rétinal ayant perdu son substituant en C4 est présent à m/z 283.2052 (encadré orange). Il peut s'agir soit du rétinal azidé dont l'azoture a été éliminé lors de la fragmentation soit du produit de click pour lequel la fragmentation n'a laissé que le rétinal nu. L'ion présentant le bicycle triazole/cycloheptyne lié au cyclohexène du rétinal est observé à m/z 332.2155 (encadré bleu foncé). L'ion à m/z 429.3149 provient probablement d'une recombinaison de radicaux puisqu'il se compose du rétinal sur lequel se trouve, en position C4, le groupement benzyle *tert*-butyle, initialement porté par la sonde de masse (encadré rose). Enfin, l'adduit lui-même a été identifié à m/z 640.4286 (encadré rouge). L'ensemble de ces ions, à l'exception de celui à m/z 212.1216, présente un intérêt pour l'identification de nouveaux métabolites de la vitamine A. En effet, ils montrent tous une partie ou l'intégralité du rétinoïde impliqué dans le produit clické, donnant ainsi accès à la structure de celui-ci.

L'ion correspondant à l'adduit intact a été sélectionné pour subir une seconde fragmentation, amenant au profil MS^2 (**Figure 103**). On note toutefois qu'aucun ion supplémentaire n'a pu être attribué à des fragments de l'adduit.

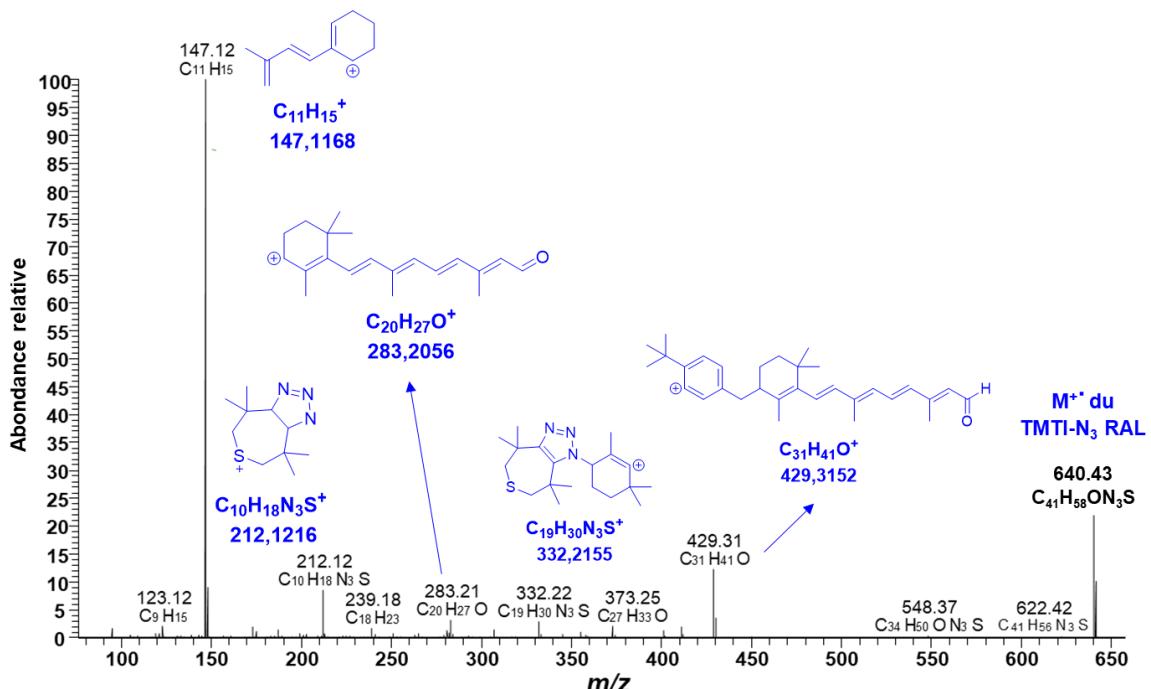


Figure 103. Spectre MS^2 du TMTI-N₃ RAL obtenu avec une énergie de collision normalisée de 40%.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences nous a permis de voir que les deux adduits sont correctement détectés dans le plasma et le foie de souris mais aussi de faire une première comparaison entre les deux marqueurs de masse. En effet, on note que le BCN-TMPP-N₃ RAL ne produit que trois ions diagnostics, tandis que le TMTI-N₃ RAL en génère six. Malgré leur plus faible intensité, les ions diagnostics du TMTI-N₃ RAL donnent davantage d'informations sur la structure du rétinoïde clické. L'objectif de nos études métabolomiques étant de détecter et d'attribuer la structure de nouveaux métabolites de la vitamine A, le TMTI semble plus pertinent. Pour compléter ces travaux, il serait nécessaire de travailler avec d'autres tissus, tels que le cerveau, mais également d'autres rétinoïdes azidés, tels que l'acétate de rétinyle.

4.5.3. Courbes de calibration

Afin d'être en mesure de quantifier les adduits détectés dans les milieux biologiques qui seront ultérieurement étudiés, des courbes de calibration externes ont été réalisées. Celle de l'azido rétinal a également été générée en tant que référence. Pour cela, chacune des molécules a été mise en solution dans le plasma à des concentrations précises (**Tableau 16**) choisies selon la gamme de concentrations que l'on devrait retrouver au sein des matrices biologiques. Ces solutions ont ensuite été analysées par LC-MS. Chacun des points a été extrait et analysé en triplicat, conduisant aux différentes courbes de calibration voulues.

Point	1	2	3	4	5	6
Concentration (µM)	0.1	0.3	0.6	1.0	5.0	10

Tableau 16. Concentrations utilisées pour les tracés des courbes de calibration du N₃ RAL et des deux adduits.

C'est la courbe de calibration de l'azido rétinal qui a été tracée en premier (**Figure 104**). On note que la courbe de tendance représentée n'est pas idéale puisqu'elle n'inclut pas correctement les faibles concentrations. Ainsi, deux autres courbes ont été créées à partir des mêmes données : l'une pour concentrations inférieures ou égale à 1 µM (**Figure 105**) et l'autre pour les concentrations supérieures ou égale à 1 µM (**Figure 106**). On remarque une amélioration non négligeable des coefficients de corrélation. Ainsi, il sera nécessaire lors des travaux ultérieurs de considérer la gamme

de concentrations adéquate afin de choisir la bonne courbe de calibration de sorte à être au plus juste de la concentration réelle en azido rétinal.

Courbe de calibration du N₃ RAL dans le plasma

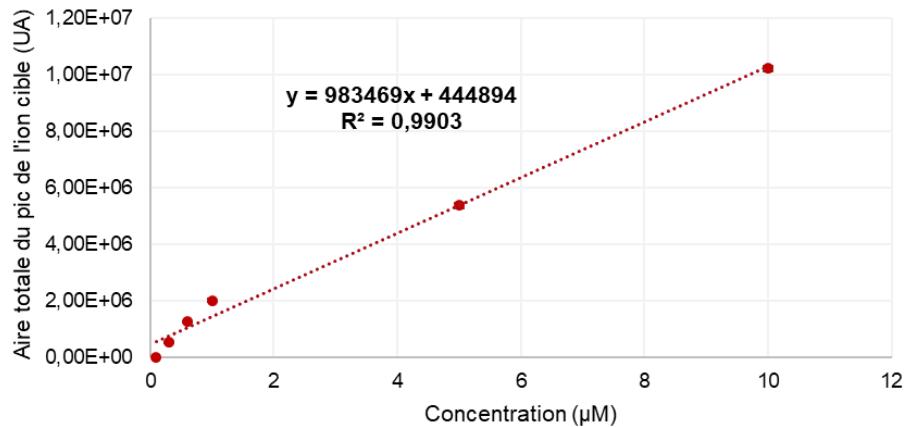


Figure 104. Courbe de calibration de l'azido rétinal dans le plasma de souris pour l'ensemble des concentrations étudiées. Les aires des pics sont données en unités arbitraires UA. L'ion cible a un m/z de 305.1881 et le temps de rétention est de 2.75 minutes.

Courbe de calibration du N₃ RAL dans le plasma

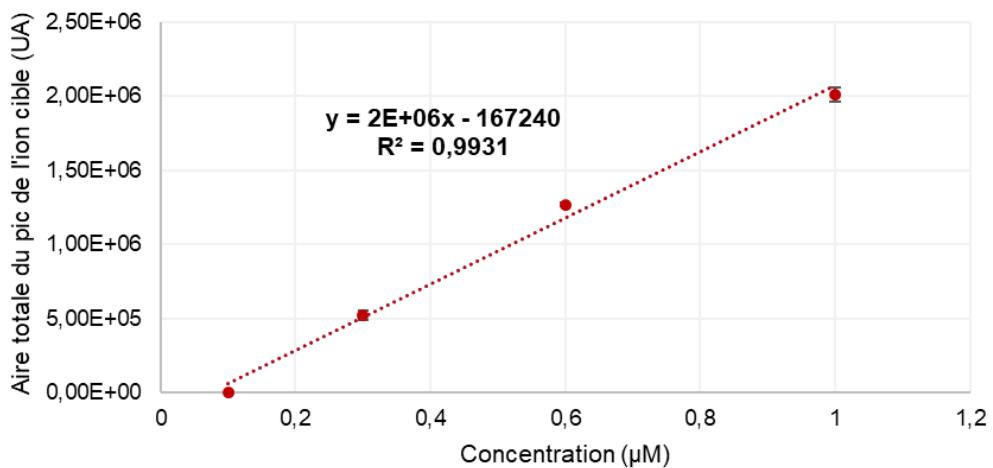


Figure 105. Courbe de calibration de l'azido rétinal dans le plasma de souris pour les concentrations étudiées inférieures ou égales à 1 μM. Les aires des pics sont données en unités arbitraires UA. L'ion cible a un m/z de 305.1881 et le temps de rétention est de 2.75 minutes.

Courbe de calibration du N₃ RAL dans le plasma

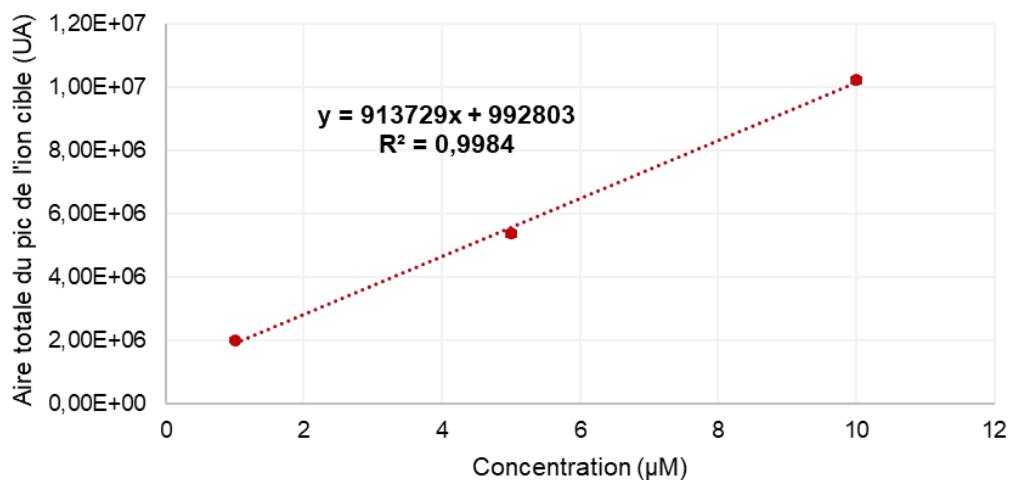


Figure 106. Courbe de calibration de l'azido rétinal dans le plasma de souris pour les concentrations étudiées supérieures ou égales à 1 μM. Les aires des pics sont données en unités arbitraires UA. L'ion cible a un m/z de 305.1881 et le temps de rétention est de 2.75 minutes.

Nous avons ensuite construit la courbe de calibration de l'adduit BCN-TMPP-N₃ RAL (**Figure 107**). On remarque cette fois que le coefficient de corrélation est égal à 1, indiquant une parfaite corrélation linéaire. Il est donc possible de se servir de cette droite modèle pour le calcul des concentrations des molécules détectées avec un minimum d'incertitude. Il faut néanmoins souligner que le point à 5 μM a été retiré car il était aberrant. Pour confirmer cette droite, il faudrait donc idéalement reproduire l'expérience avec des concentrations comprises entre 1 et 10 μM.

Courbe de calibration du BCN-TMPP-N₃ RAL dans le plasma

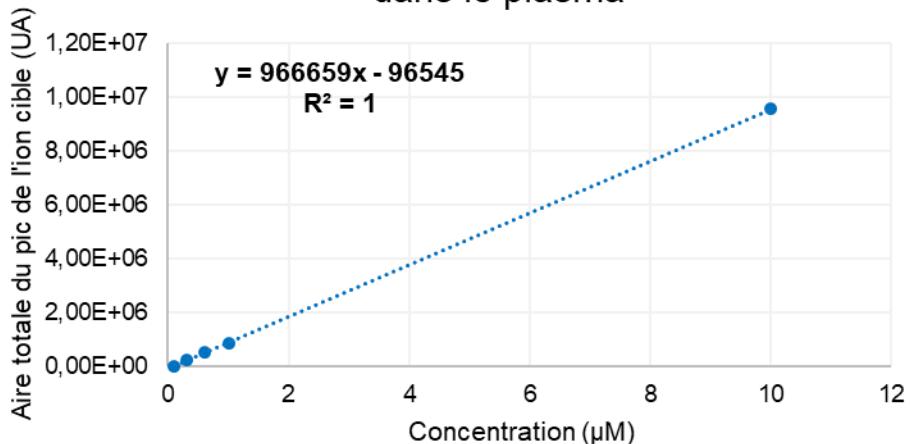


Figure 107. Courbe de calibration du BCN-TMPP-N₃ RAL dans le plasma de souris. Les aires des pics sont données en unités arbitraires UA. L'ion cible a un m/z de 852.3579 et le temps de rétention est de 0.85 minutes. Le point à 5 μM a été retiré car aberrant.

Enfin, c'est la courbe de calibration du TMTI-N₃ RAL qui a été tracée (**Figure 108**). Comme pour l'autre adduit, on note un coefficient de corrélation (R^2) élevé, signe d'une forte corrélation entre la droite théorique et les valeurs de concentrations qui seront obtenues par calculs en utilisation l'équation de cette droite. Cependant, le point à 5 μM a été retiré car il était aberrant. Pour confirmer cette droite, il faudrait donc idéalement reproduire l'expérience avec des concentrations comprises entre 1 et 10 μM .

Figure 108. Courbe de calibration du TMTI-N₃ RAL dans le plasma

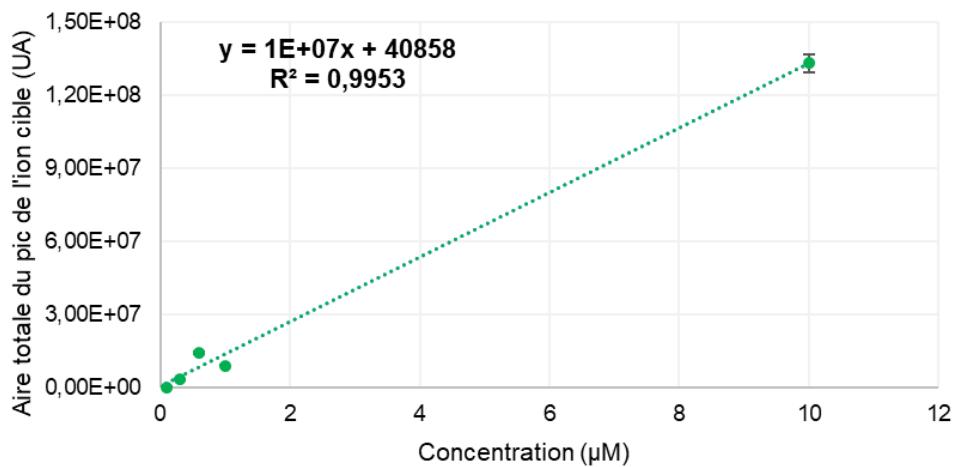


Figure 108. Courbe de calibration du BCN-TMPP-N₃ RAL dans le plasma de souris. Les aires des pics sont données en unités arbitraires UA. L'ion cible a un m/z de 640.4295 et le temps de rétention est de 1.06 minutes. Le point à 5 μM a été retiré car aberrant.

Ainsi, les droites de calibration de trois molécules d'intérêt, à savoir N₃ RAL, BCN-TMPP-N₃ RAL et TMTI-N₃ RAL, ont été construites. Elles permettront d'accéder aux concentrations des espèces qui seront détectées dans les échantillons biologiques par simple intégration de l'aire sous le pic associé à chacune des molécules.

4.5.4. Détermination des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) du N₃ RAL et des adduits

Les trois composés pouvant être correctement extraits de tissus biologiques puis détectés et analysés, il a ensuite été nécessaire de déterminer leurs limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ). La LOD correspond à la concentration minimale d'un analyte pouvant être détectée et la LOQ se réfère à la concentration

minimale d'un analyte pouvant être quantifiée. Ces valeurs sont dépendantes des appareillages utilisés. Ces calculs avaient également pour but d'affiner la comparaison entre les deux marqueurs de masse en évaluant le gain de sensibilité apporté par chacun d'eux pour la détection du N₃ RAL.

Pour pouvoir calculer les LOD et LOQ des trois composés, il a été nécessaire d'utiliser les courbes de calibration précédemment tracées (4.5.2.). En effet, les formules des LOD et LOQ font appel à la valeur de la pente de la courbe de calibration (**Formules 5 et 6**). Il est essentiel de noter que ces calculs sont une estimation et non une détermination précise, celle-ci n'étant pas nécessaire ici.

$$\text{LOD} = \frac{3s}{m} \text{ avec } s \text{ l'écart-type des blancs et } m \text{ la pente de la courbe de calibration}$$

Formule 5. Formule pour le calcul de la LOD.

$$\text{LOD} = \frac{10s}{m} \text{ avec } s \text{ l'écart-type des blancs et } m \text{ la pente de la courbe de calibration}$$

Formule 6. Formule pour le calcul de la LOQ.

Les LOD et LOQ des trois molécules ont donc été calculées et sont présentées dans le **Tableau 17**.

Molécule	Valeur de s	Valeur de m	LOD (pM)	LOQ (pM)
N ₃ RAL (faibles concentrations)	1E+06	2E+06	1.5	5.0
N ₃ RAL (hautes concentrations)	1E+06	913 729	3.3	11
BCN-TMPP- N ₃ RAL	1E+06	966 659	3.1	10.3
TMTI-N ₃ RAL	1E+06	1E+07	0.3	1.0

Tableau 17. Valeurs des LOD et LOQ pour le rétinal azidé, le BCN-TMPP-N₃ RAL et le TMTI-N₃ RAL dans le plasma de souris. S correspond à l'écart-type des blancs et m à la pente de la droite de calibration de l'espèce considérée.

On remarque que pour l'azido rétinal, les deux courbes de calibration donnent des limites de détection et de quantification allant du simple au double. Néanmoins, ces valeurs restent en adéquation avec les données de la littérature concernant le rétinal naturel.⁴²⁸ Que l'on considère la valeur haute ou la valeur basse, l'utilisation du BCN-TMPP ne permet pas d'améliorer la détection et la quantification de l'azido rétinal. Ce

résultat est surprenant mais pourrait s'expliquer par un temps de rétention très faible pour ce composé, impactant la précision des mesures réalisées pour la courbe de calibration. En revanche, le TMTI engendre un gain de sensibilité d'un facteur cinq en comparaison du rétinal azidé seul.

En conclusion, les limites de détection et de quantification de l'adduit TMTI-N₃ RAL devraient permettre la détection de nouveaux métabolites, les concentrations endogènes en rétinoïdes variant de quelques picomoles/gramme de tissu jusqu'à une nanomole/gramme (**paragraphe 4.1.2.**). Également, il sera possible de travailler sur des quantités minimales de tissus. Nous avons ainsi montré que le TMTI augmente significativement la sensibilité de détection et de quantification de l'azido rétinal, au contraire du BCN-TMPP. On note donc une fois encore que ce nouveau marqueur de masse possède des propriétés plus intéressantes que le BCN-TMPP pour les travaux sur les rétinoïdes.

4.6. Etude de la cinétique de cycloaddition entre le N₃ RAL et les sondes de masse

L'objectif de cet axe du projet étant de réaliser la capture de métabolites marqués de la vitamine A au sein d'échantillons biologiques *via* une réaction de cycloaddition, il est indispensable d'étudier la cinétique de celle-ci. Il nous faut parvenir à déterminer l'ordre de la réaction (0, 1 ou 2), de sorte à connaître l'équation de la vitesse ainsi que le temps de demi-vie afin d'être en mesure d'ajuster nos paramètres expérimentaux (concentrations et temps d'incubation des réactifs).

Pour les cinétiques réalisées dans l'éthanol, le protocole présenté dans la **Figure 109** a été suivi. Le N₃ RAL a été mis en solution dans de l'éthanol à différentes concentrations, à savoir 50 nM, 500 nM et 5 µM. Ces concentrations ont été choisies de manière arbitraire, sur un panel assez large de sorte à esquisser des premières réponses aux questions cinétiques. La sonde a ensuite été ajoutée en large excès, à savoir 10 équivalents pour pallier les potentiels problèmes d'hydrolyse et/ou de dégradation de celle-ci, puis la réaction a été agitée à 25 °C pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 3 heures. A chaque point temporel, un échantillon a été prélevé et

neutralisé avec 100 équivalents d'acide azido benzoïque. Le solvant a été évaporé puis les échantillons ont été congelés à -80 °C jusqu'à leur analyse. Ils ont alors été resuspendus dans une solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol puis analysés par LC-MS et LC-MS/MS.

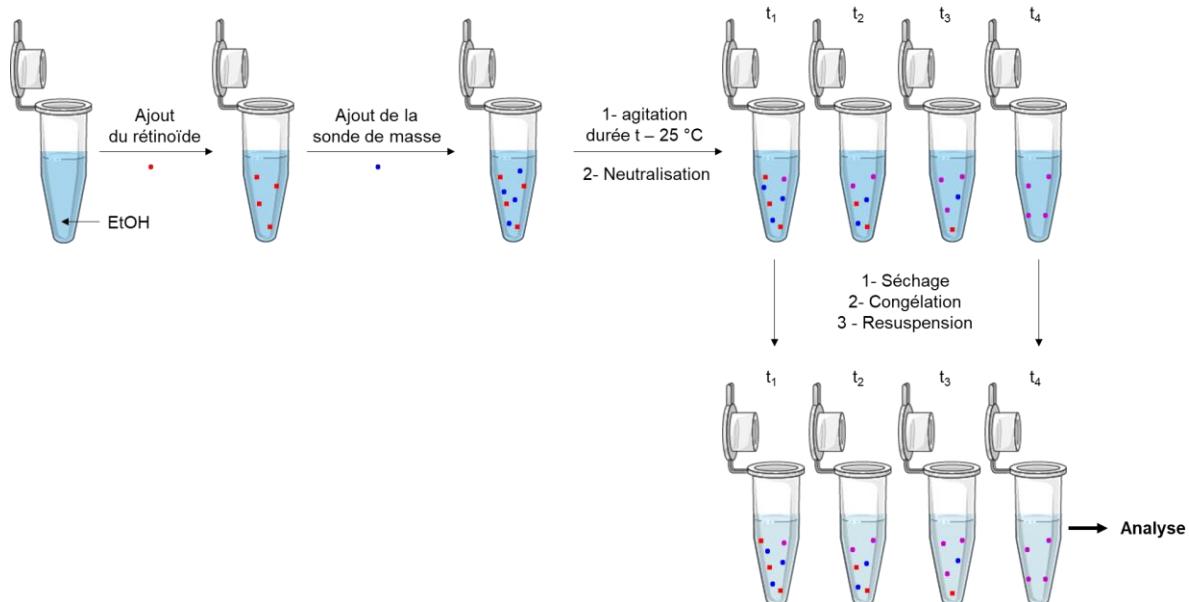


Figure 109. Les différentes étapes de la préparation des échantillons pour la cinétique dans l'éthanol. Le liquide bleu clair montre la solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol. t varie de 30 minutes à 3 heures.

4.6.1. Cinétique de formation de l'adduit BCN-TMPP-N₃ RAL dans l'éthanol

Le BCN-TMPP étant notre sonde de masse de référence, nous avons débuté les études cinétiques avec celui-ci. Dans la **Figure 110** est représentée l'évolution des concentrations mesurées en N₃ RAL et en adduit au cours du temps pour une concentration initiale en N₃ RAL de 50 nM. Le calcul des concentrations a été fait grâce à la mesure de l'aire sous le pic de l'adduit détecté et à la courbe de calibration préalablement établie.

On remarque qu'aucune trace de l'adduit n'est détectée avant 1 heure de réaction, les variations de concentration du N₃ RAL calculées avant n'étant pas significatives. Toutefois, les résultats obtenus au-delà d'une heure sont incohérents. En effet, la concentration calculée en adduit au bout de 2 heures est quatre fois supérieure à la concentration initiale de N₃ RAL. Par la suite, une importante diminution de cette

concentration est observée, provenant potentiellement d'une dégradation de l'adduit. Il serait nécessaire de réitérer ces expériences afin de valider ou non les valeurs des points à 2 et 3 heures. De plus, l'ajout de plusieurs points entre 1 h et 2 h permettrait de préciser l'évolution de la cinétique.

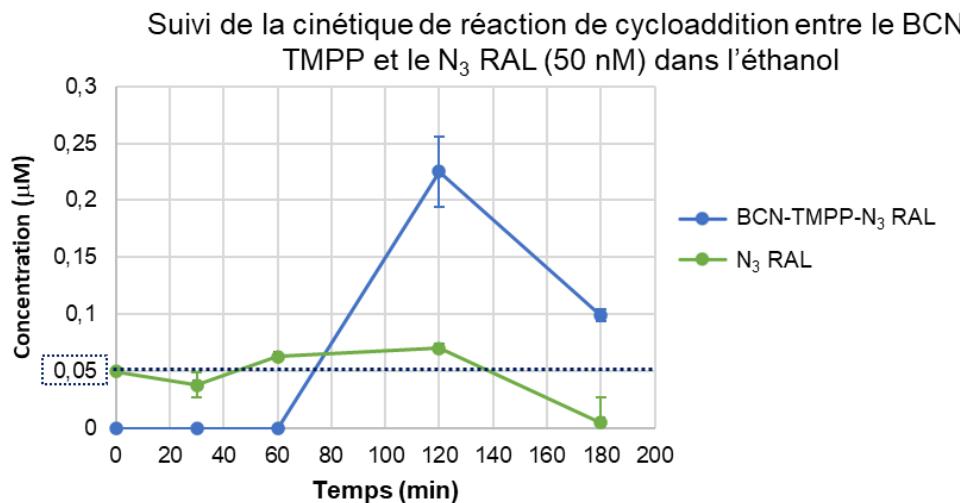


Figure 110. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le BCN-TMPP et le N₃ RAL (50 nM) dans l'éthanol. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.78 min).

Pour ce qui est de la cinétique de la cycloaddition avec une concentration initiale d'azido rétinal de 500 nM (**Figure 111**), les résultats obtenus ne sont pas interprétables et requièrent une nouvelle série d'expériences. En effet, dès les premières minutes, la concentration en N₃ RAL augmente alors qu'elle devrait diminuer. Aussi, au bout d'une heure de réaction, la concentration calculée en adduit est proche de 500 nM tandis que celle du N₃ RAL est de 800 nM, sachant que la concentration initiale de celui-ci était de 500 nM. Une explication probable est un lavage insuffisant du système d'analyse entre chaque injection. En effet, il est possible que l'azido rétinal reste lié à la colonne et qu'il soit, par la suite, progressivement relargué dans les injections ultérieures, induisant de fortes variations des quantités mesurées, en particulier à très petite échelle. Il est donc indispensable de répéter cette expérience, aucune conclusion ne pouvant être tirée ici.

Suivi de la cinétique de réaction de cycloaddition entre le BCN-TMPP et le N₃ RAL (500 nM) dans l'éthanol

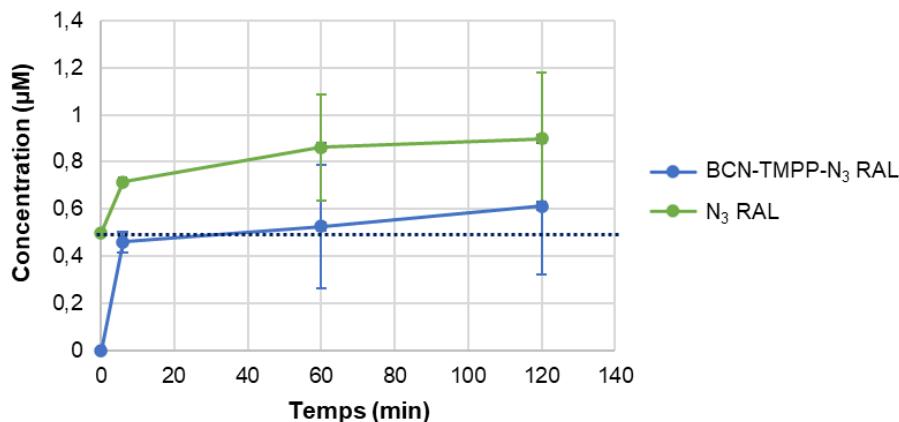


Figure 111. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le BCN-TMPP et le N₃ RAL (500 nM) dans l'éthanol. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.78 min). L'expérience n'a pas été poursuivie au-delà de 2 heures, les résultats obtenus étant incohérents.

Enfin, l'étude cinétique avec une concentration initiale de N₃ RAL de 5 μM est représentée en **Figure 112**.

Suivi de la cinétique de réaction de cycloaddition entre le BCN-TMPP et le N₃ RAL (5 μM) dans l'éthanol

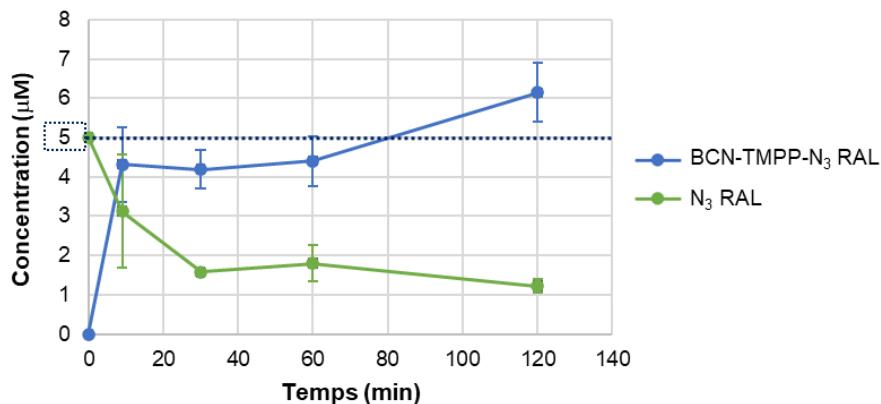


Figure 112. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le BCN-TMPP et le N₃ RAL (5 μM) dans l'éthanol. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.78 min). L'expérience n'a pas été poursuivie au-delà de 2 heures, les résultats obtenus étant incohérents.

On note une tendance globale en adéquation avec nos attentes, à savoir une réaction d'ordre 2. En effet, la concentration calculée de N₃ RAL diminue dès les premières minutes de réaction tandis que celle de l'adduit augmente. Toutefois, par manque de temps, l'équation de la vitesse n'ayant pas pu être déterminée, cela reste une hypothèse. Comme pour la première expérience, on remarque une concentration d'adduit supérieure à 5 µM au bout de 2 heures mais il est possible que cette légère différence soit due à des erreurs de manipulation lors de la préparation des échantillons.

Pour conclure, ces suivis cinétiques ne nous apportent que peu d'informations quant à la vitesse de la réaction entre le BCN-TMPP et le N₃ RAL. Il semblerait qu'en dessous de 5 µM de rétinal azidé initialement introduits, les mesures manquent grandement de précision, entraînant des résultats peu cohérents. Il serait nécessaire de refaire l'ensemble de ces expériences, en ajoutant des mesures entre 1 heure et 2 heures afin d'affiner les profils obtenus. Également, procéder à des mesures cinétiques pour des concentrations comprises entre 0.5 µM et 5 µM et au-delà de 5 µM amènerait à mieux appréhender la concentration requise pour que la réaction se déroule proprement. L'incohérence de certains résultats pourrait s'expliquer par la présence d'impuretés dans le BCN-TMPP utilisé (86% de pureté selon HPLC analytique). Au vu de ces résultats et par manque de temps, les mesures dans le plasma n'ont pas été conduites.

4.6.2. Cinétique de formation de l'adduit TMTI-N₃ RAL dans l'éthanol

Nous avons poursuivi les études cinétiques avec la sonde TMTI. Dans un premier temps, la vitesse de réaction a été suivie dans l'éthanol.

Pour la concentration de 50 nM en N₃ RAL, on note que l'adduit se forme dès les premières minutes de la réaction, consommant intégralement le N₃ RAL (**Figure 113**). Ainsi, à cette concentration, la réaction est complète au bout de 40 minutes. On remarque toutefois qu'au-delà de 10 minutes de réaction, la concentration en N₃ RAL apparaît nulle tandis que celle de l'adduit continue d'augmenter. Cela indique qu'il reste du N₃ RAL dans le milieu mais que sa concentration est inférieure à la limite de

détection. Également, le fait que la quantité d'adduit détectée dépasse la concentration initiale de N_3 RAL est surprenant. Néanmoins, la différence étant au maximum de 0.35 μM , cela pourrait s'expliquer par des imprécisions lors de la préparation des échantillons.

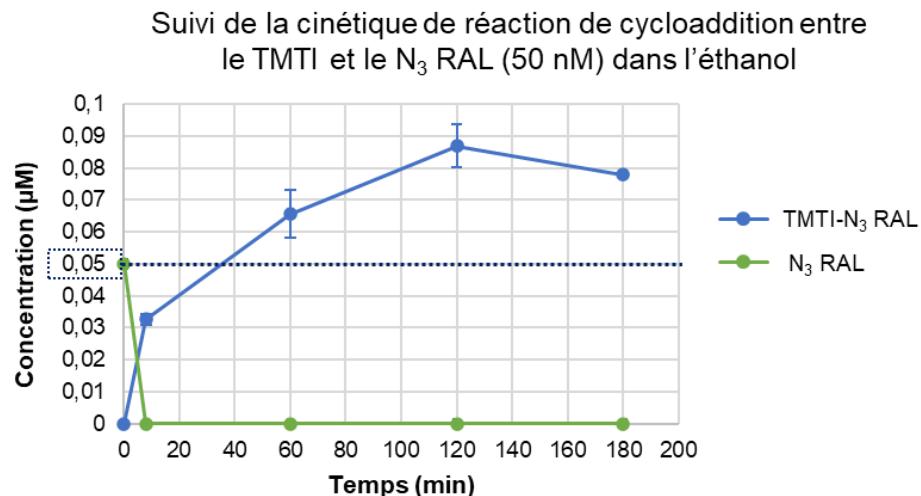


Figure 113. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N_3 RAL (50 nM) dans l'éthanol. En vert, on suit la concentration détectée de N_3 RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N_3 RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N_3 RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.81 min).

Lorsque l'on augmente la concentration à 500 nM de N_3 RAL, l'adduit est également détecté dès le début de réaction mais l'azido rétinal n'est pas consommé dans sa totalité (**Figure 114**). On constate une évolution des concentrations en adéquation avec la réaction d'ordre 2 attendue, la différence entre les points à 20 et 60 minutes n'étant pas significative. Également, la réaction atteint compléition au bout de 2 heures. La valeur de concentration calculée en adduit à 3 heures n'est pas significativement différente de celle calculée au bout de 2 h.

Suivi de la cinétique de réaction de cycloaddition entre le
TMTI et le N₃ RAL (500 nM) dans l'éthanol

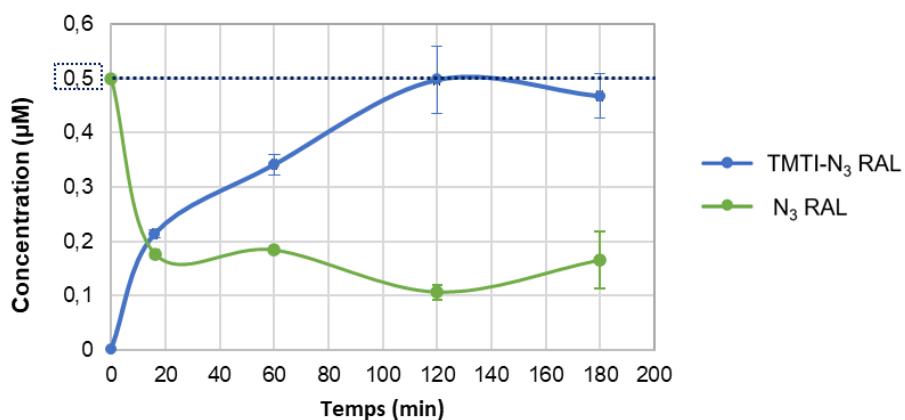


Figure 114. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL (500 nM) dans l'éthanol. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.81 min).

Enfin, la cinétique de la réaction a été suivie pour une concentration en N₃ RAL initiale de 5 μM. Une fois encore, l'adduit est formé dès les premières minutes de réaction, sans toutefois amener à la consommation de l'intégralité du rétinal azidé (**Figure 115**). On remarque par la suite une évolution corrélée des concentrations de l'adduit et du N₃ RAL. Une fois encore, cela amène à penser à une cinétique d'ordre 2. On note néanmoins que la complétion de la réaction n'est pas atteinte, la concentration maximale détectée pour l'adduit étant de 3 μM au bout de 3 heures. Ceci pourrait s'expliquer par une éventuelle dégradation des réactifs dans le temps qu'il faudrait confirmer par des expériences de stabilité au cours du temps.

Suivi de la cinétique de réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL (5 µM) dans l'éthanol

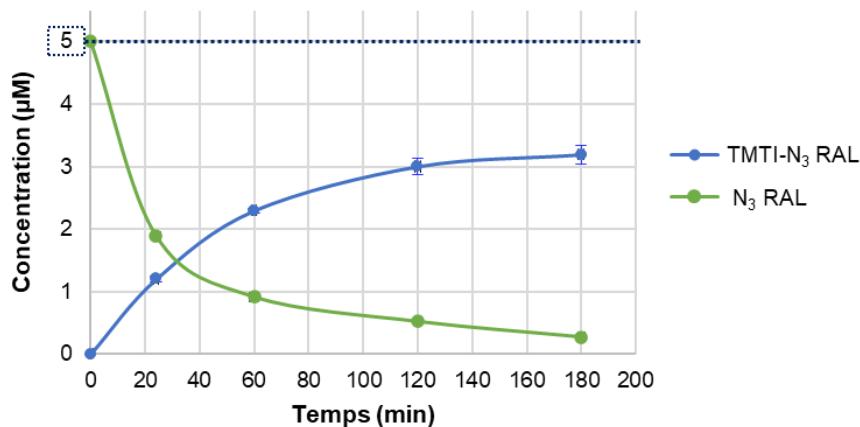


Figure 115. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL (5 µM) dans l'éthanol. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.81 min).

Ainsi, nous avons montré que la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL est rapide dans l'éthanol. On note que la concentration en rétinal azidé joue un rôle important quant à la vitesse et la complétiion de la réaction, étayant une fois de plus l'hypothèse d'une réaction d'ordre 2. Il semble que sa concentration adéquate se situe entre 50 et 500 nM. En effet, à 50 nM la réaction atteint trop rapidement la complétiion pour que les mesures soient fiables. En revanche, à 500 nM, cela demande 2 heures, qui pourraient, dans certaines matrices, être trop lent et conduire à la dégradation des réactifs et/ou du produit. Des expériences avec des concentrations intermédiaires seraient nécessaires pour affiner la gamme de concentration menant à une cinétique suffisamment rapide pour permettre le marquage des métabolites tout en étant assez lente pour permettre des mesures précises.

4.6.3. Cinétique de formation de l'adduit TMTI-N₃ RAL dans le plasma

Après avoir étudié la cinétique de la cycloaddition dans l'éthanol, il a été nécessaire d'en faire de même dans une matrice biologique. Ces tests ont été réalisés dans le

plasma, matrice ne nécessitant pas d'homogénéisation, réduisant ainsi les incertitudes. Le protocole illustré en **Figure 116** a été suivi.

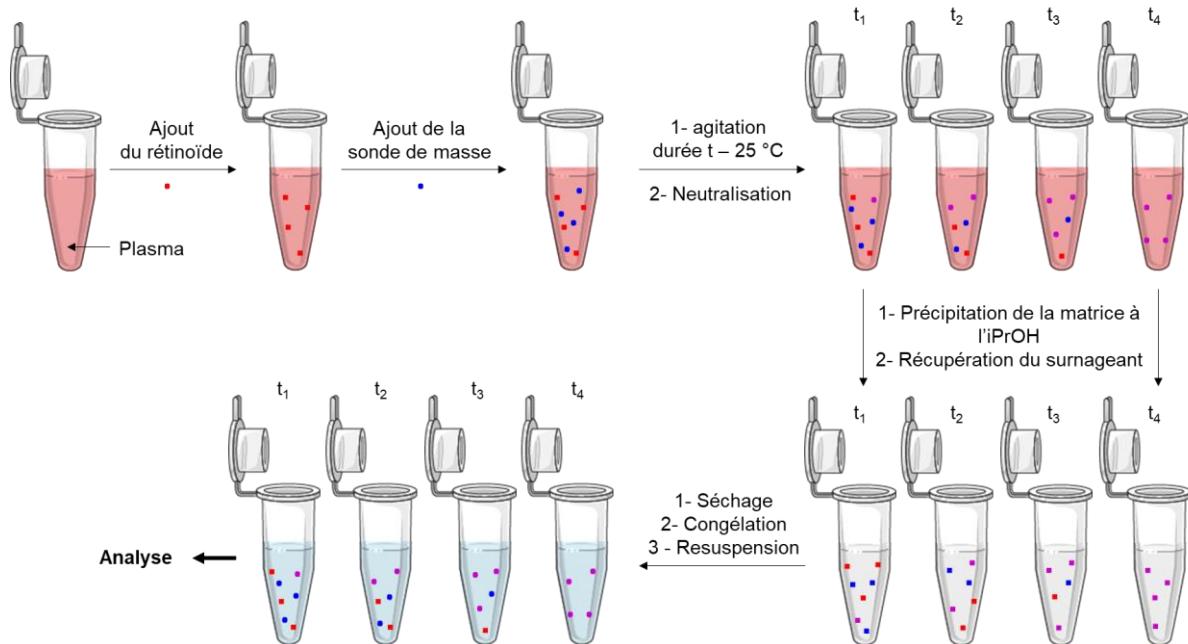


Figure 116. Les différentes étapes de la préparation des échantillons pour la cinétique dans le plasma de souris. Le liquide bleu clair montre la solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol. t varie de 30 minutes à 3 heures.

Le N₃ RAL a été mis en solution dans un mélange de plasma et d'eau en proportions 1:2, afin de faciliter son extraction par la suite. Après ajout de 10 équivalents de la sonde de masse, la réaction a été agitée à 25 °C pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 3 heures. A chaque point temporel, un échantillon a été prélevé et neutralisé avec 100 équivalents d'acide azido benzoïque. La matrice a été précipitée grâce à l'isopropanol. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré, le solvant évaporé et les échantillons ont été congelés à -80 °C jusqu'à leur analyse. Ils ont alors été resuspendus dans une solution de formiate d'ammonium dans l'éthanol puis analysés par LC-MS et LC-MS/MS.

Sur la **Figure 117** est représentée l'évolution des concentrations en N₃ RAL et en adduit pour une quantité initiale en N₃ RAL de 50 nM. On remarque que l'adduit est formé dès le début de la réaction et que celle-ci est complète en quelques minutes si l'on se fie au point obtenu pour $t \sim 0$ min. Toutefois, celui-ci n'est pas fiable puisque la concentration calculée pour l'adduit à ce point temporel est deux fois plus importante que celle initialement introduite en N₃ RAL. On peut tout de même voir que le rétinal azidé semble totalement consommé après 5 min de réaction. La diminution de

concentration visible pour l'adduit pourrait s'expliquer par une dégradation de celui-ci par les composants de la matrice biologique. Également, il se pourrait que cela provienne d'une précipitation hétérogène entre les différents échantillons. Néanmoins, les mesures présentent des marges d'erreur importantes, en particulier pour les points à 2 et 3 heures. Il serait donc nécessaire de répéter ces analyses afin d'améliorer leur précision.

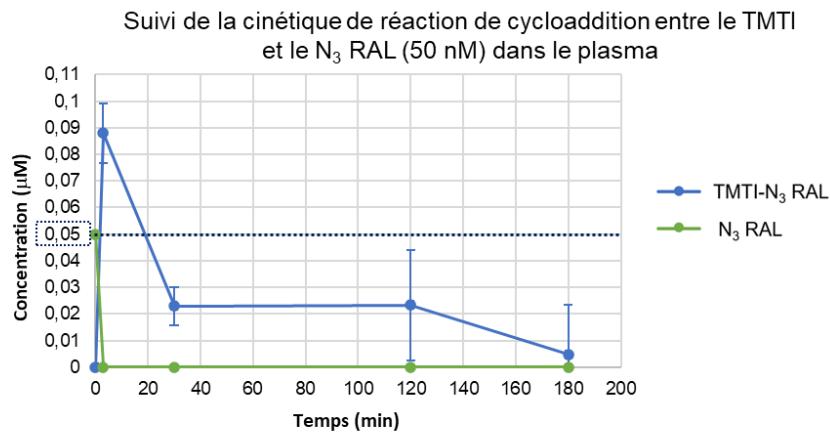


Figure 117. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL (50 nM) dans le plasma. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.81 min).

Par la suite, nous avons travaillé avec une concentration initiale de 500 nM en N₃ RAL. Une fois encore, l'adduit est présent dès le début de la réaction avec une consommation totale du N₃ RAL (**Figure 118**). Comme pour la concentration précédente, les premiers points font état d'une quantité d'adduit supérieure à celle du réactif, avec une grande variabilité des résultats. Également, une diminution de la quantité d'adduit formé est visible après 10 min de réaction, pouvant une nouvelle fois provenir d'une potentielle dégradation de la molécule. Une fois encore, il est indispensable de répéter l'expérience, en particulier sur les premiers points temporels, afin de préciser les valeurs obtenues.

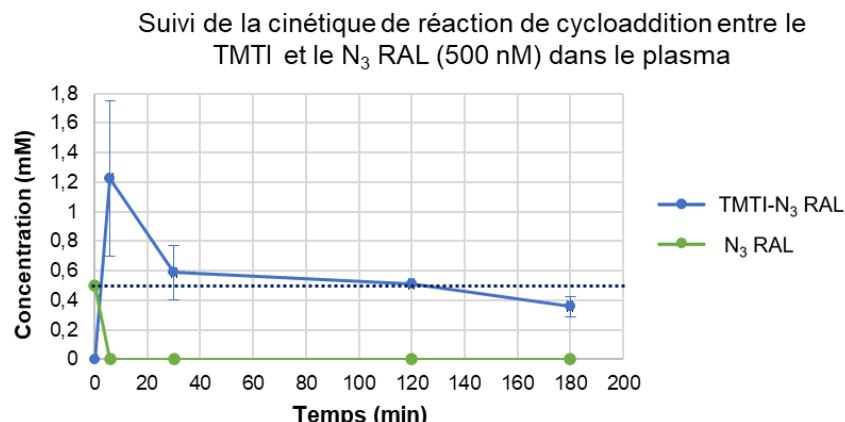


Figure 118. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL (500 nM) dans le plasma. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.81 min).

Nous avons terminé avec la concentration initiale de 5 μ M d'azido rétinal (**Figure 119**). On note une évolution des concentrations très similaire à celle observée pour la concentration de 500 nM, pouvant être expliquée de la même façon.

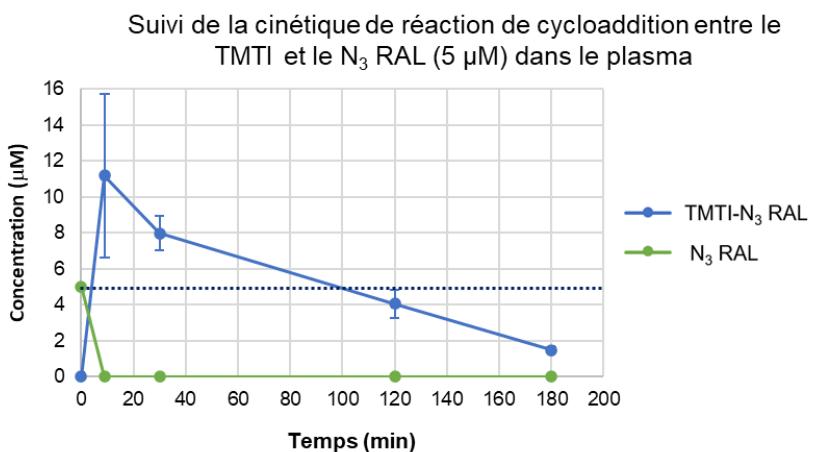


Figure 119. Suivi cinétique de la réaction de cycloaddition entre le TMTI et le N₃ RAL (5 μ M) dans le plasma. En vert, on suit la concentration détectée de N₃ RAL. En bleu, on suit la concentration détectée de l'adduit. En pointillés noirs a été marquée la concentration initiale de N₃ RAL. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les concentrations ont été calculées grâce à l'intégration des pics correspondant respectivement au N₃ RAL (temps de rétention : 2.77 min) et à l'adduit (temps de rétention : 0.81 min).

En conclusion, les études cinétiques dans le plasma se sont révélées difficiles à interpréter, une partie des données n'étant pas cohérentes et présentant de fortes variabilités probablement en raison de la complexité de la matrice plasma. Il serait ainsi nécessaire de reproduire ces expériences de sorte à avoir une meilleure

précision, en particulier sur des temps inférieurs à 20 minutes. Également, il faudrait réaliser des études de stabilité des réactifs et des adduits dans diverses matrices biologiques dans le temps afin de savoir si les diminutions de concentrations observées sont le résultat ou non d'une dégradation induite par la matrice.

4.7. Conclusion

Pour conclure, après de nombreuses difficultés, nous sommes parvenus à synthétiser la sonde BCN-TMPP. Toutefois, celle-ci possède des inconvénients majeurs tels que son hydrophobie, sa taille importante et sa difficulté de synthèse, qui nous ont poussés à la préparation d'une nouvelle sonde de masse, palliant ces inconvénients. Nous y sommes parvenus avec le TMTI, molécule compacte et facile à synthétiser. Ces deux sondes ont ensuite été comparées pour la détection de l'azido rétinal dans le plasma de souris. La formation de l'adduit entre le N₃ RAL et le TMTI a permis de diviser la LOD et la LOQ par cinq, amenant une meilleure sensibilité de détection et de quantification du rétinoïde azidé. Par la suite, ce sont les profils de MS et MS² des adduits qui ont été analysés, montrant une fragmentation plus intéressante de l'adduit TMTI-N₃ RAL en comparaison avec l'adduit BCN-TMPP-N₃ RAL. En effet, lors de l'ionisation, le TMTI permet d'obtenir six ions diagnostics tandis que le BCN-TMPP n'en apporte que trois. Également, les ions diagnostics du TMTI exhibent une partie ou la totalité de la structure du rétinoïde clické alors que le BCN-TMPP ne présente pas cet avantage.

Nous avons ensuite tenté de comparer la cinétique de réaction de chacune des sondes avec l'azido rétinal. Nous sommes parvenus à mettre en lumière que la réaction suit une cinétique d'ordre 2, qui reste à confirmer par la détermination de l'équation de la vitesse. Également, nous avons vu que, dans l'éthanol, la formation de l'adduit TMTI-N₃ RAL se fait proprement. En revanche, dans le plasma, il semblerait qu'il subisse une dégradation. Pour le BCN-TMPP, il se pourrait que sa pureté impacte la formation de l'adduit et ainsi le suivi cinétique. Des expériences supplémentaires doivent donc être réalisées afin de compléter et d'étayer les résultats obtenus jusqu'à présent. Lorsque celles-ci auront été faites, il sera alors nécessaire de basculer vers d'autres matrices biologiques telles que le foie et le cerveau. Également, des tests avec

d'autres rétinoïdes azidés synthétiques devront être effectués de sorte à valider les précédents résultats. Une fois l'ensemble de ces travaux réalisés, il sera possible d'utiliser la méthodologie mise au point pour la détection de nouveaux métabolites dans des tissus biologiques.

CHAPITRE 5 – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1. Conclusions

Pour conclure, au cours de cette thèse, nous sommes parvenus à mettre au point une nouvelle méthode d'insertion tardive d'azoture en position allylique de composés polyéniques tels que les rétinoïdes. Bien que cette stratégie semble ne pouvoir être utilisée qu'avec des molécules aux longues chaînes polyinsaturées, il a été possible de l'appliquer à l'ensemble des entrées de la cascade métabolique connue de la vitamine A. Également, cette méthode a pu être extrapolée à l'insertion sur la position C4 d'autres nucléophiles tels qu'un acétate ou un isocyanate. On peut ajouter que, par modulation de la source halogénée dans la réaction, l'aldéhyde du rétinal a été transformé en nitrile. De cette façon, vingt sondes moléculaires rétinoïdes distinctes ont pu être synthétisées. La moitié d'entre elles a été testée biologiquement de sorte à évaluer sa capacité à activer la transcription du récepteur RAR α , principal récepteur de l'acide rétinoïque naturel. Grâce aux diverses structures de sondes, en particulier aux différents esters d'acide rétinoïque, il a été possible d'accéder à une sonde azidée ayant une activité quasiment identique à celle de l'acide rétinoïque naturel. Ainsi, elle pourra être employée pour des études ultérieures du métabolisme de la vitamine A.

Par la suite, le rétinal azidé, rétinoïde ayant servi de référence durant l'ensemble de la thèse, a été utilisé pour l'imagerie cellulaire. Cet axe du projet visant à étudier la biodistribution et le stockage des rétinoïdes aux niveaux cellulaire et subcellulaire a également nécessité des sondes fluorescentes. Trois sondes distinctes ont ainsi été synthétisées avec succès puis testées sur cellules vivantes et fixées. Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas ceux qui étaient escomptés. En effet, l'une des sondes ne parvient pas à entrer dans les cellules, la seconde n'a pas une luminosité suffisante pour être visible tandis que la dernière conduit à un important marquage aspécifique. De cette façon, malgré la variété structurale des sondes, aucune n'a permis la visualisation intracellulaire des rétinoïdes.

Enfin, dans le but de répondre au second axe du projet, à savoir la détection et l'identification de nouveaux métabolites de la vitamine A, deux sondes de masses ont été synthétisées. Elles ont ensuite été comparées quant à leur impact sur la détection

et la quantification de l'azido rétinal mais également sur la fragmentation de l'adduit. Cela a mis en lumière que la nouvelle seconde, le TMTI, était plus performante pour nos études que le classique BCN-TMPP. Ainsi, nous sommes parvenus à synthétiser une nouvelle sonde de masse avec des performances adaptées à la détection et à l'analyse de nouveaux métabolites de la vitamine A. La cinétique de cycloaddition avec chacune des sondes a également été étudiée, révélant une cinétique d'ordre 2 mais les travaux à ce sujet restent incomplets.

5.2. Perspectives

5.2.1. Axes 1 et 2

Concernant les sondes moléculaires rétinoïdes, neuf d'entre elles n'ont pas encore été biologiquement testées. Les résultats qui seront obtenus sont déterminants pour la suite du projet. En effet, selon l'impact de chacune des modifications, il sera possible d'orienter de futures variations afin d'étendre la librairie de sondes. A titre d'exemple, le remplacement de l'aldéhyde par un nitrile pourrait conduire au développement d'une librairie d'antagonistes de RAR α . De façon intéressante, il faudrait alors tester son activité sur d'autres récepteurs (RAR β , RAR γ , RXRs...) pour voir si cette catégorie de molécules pourrait permettre d'en apprendre plus sur le fonctionnement de la vitamine A avec des récepteurs distincts de RAR α .

Pour ce qui est des sondes fluorescentes, plusieurs voies sont à explorer. Tout d'abord, les études visant à comprendre la sélectivité de marquage de la sonde TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 sont à poursuivre afin de pouvoir exploiter cette sélectivité. Ensuite, il est nécessaire de considérer l'usage de la CuAAC pour un premier niveau de visualisation des rétinoïdes dans les compartiments cellulaires et subcellulaires. Cela pourrait être fait avec les deux rétinoïdes synthétisés à cet effet décrits en 2.7.3. Enfin, les résultats obtenus tout au long de ces travaux nous ont conduit à penser que les propriétés physico-chimiques des sondes utilisées n'étaient pas adaptées à l'imagerie intracellulaire. Ainsi, il serait nécessaire de préparer une librairie de sondes avec une variation de différents paramètres de sorte à affiner progressivement les critères structuraux indispensables à la fonctionnalité recherchée de la sonde.

Pour finir, au sujet des analyses par masse, des expériences supplémentaires doivent donc être réalisées afin de compléter et d'étayer les résultats obtenus jusqu'à présent. En effet, la détection des rétinoïdes doit être étendue à d'autres matrices biologiques telles que le cerveau mais aussi à d'autres rétinoïdes azidés tels que l'azido acétate de rétinyle. Également, les études de la cinétique de cycloaddition doivent être reproduites et complétées. Une fois la méthodologie et les expériences préliminaires achevées, il sera possible de basculer sur la détection de nouveaux métabolites dans les tissus.

5.2.2. Troisième axe

Comme expliqué en introduction, le projet a été découpé en trois axes dont le dernier n'a pas pu être réellement exploré durant cette thèse. Celui-ci porte sur l'étude des partenaires d'interaction endogènes de la vitamine A. Pour permettre ces travaux, nous avons choisi une approche de protéomique avec un marquage par photoaffinité. Ce type de marquage possède l'avantage majeur de former des liens covalents entre le groupement photoréactif utilisé et les protéines avec lesquelles il réagit. La sonde de protéomique devant porter l'ensemble des fonctions nécessaires, nous avons choisi de dérivatiser un rétinoïde (**Figure 120**).

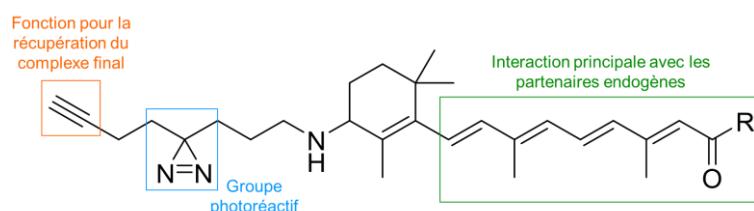


Figure 120. Structure choisie pour la sonde polyfonctionnelle dans les études protéomiques.

Comme illustré sur la **Figure 120**, ce rétinoïde a été équipé en position C4 d'un bras polyfonctionnel qui porte un groupement photoréactif et une fonction pour la récupération finale du complexe rétinoïde-protéines. Concernant cette dernière, il a été choisi d'insérer un alcyne terminal qui pourra, une fois la capture des partenaires effectuées, réagir avec une biotine azidée. Par la suite, les partenaires protéiques seront récupérées *via* un processus classique d'affinité biotine-streptavidine tel que présenté par Smith et Collins.⁴²⁹ Pour ce qui est du groupement photoréactif, c'est la diazirine qui a été retenue parmi les motifs existants. En effet, elle est de petite taille, forme un carbène hautement réactif et requiert une courte irradiation à de hautes

longueurs d'ondes (350 à 355 nm). Il s'agit également d'un motif stable à la température, au pH ainsi qu'aux conditions rédox.⁴²⁹

Durant les derniers mois de la thèse, la synthèse de cette sonde a donc été entamée. Pour cela, deux synthons ont été retenus (**Schéma 30**). Ces synthons seront ensuite mis en réaction dans les conditions optimisées décrites dans le chapitre 2.

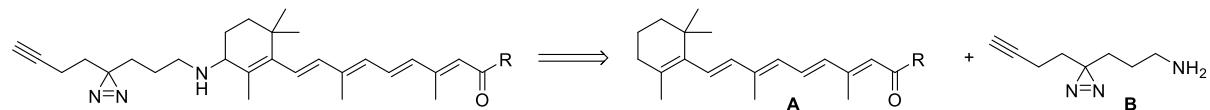


Schéma 30. Synthons pour la formation de la sonde de protéomique.

Bien que le synthon **B** tel que présenté ici soit commercial, son prix est très élevé pour une quantité trop faible pour nos besoins, nous amenant à le synthétiser nous-même. C'est ce qui a été débuté en suivant le **Schéma 31**, résultat de différents travaux publiés dans la littérature.^{430,431,432}

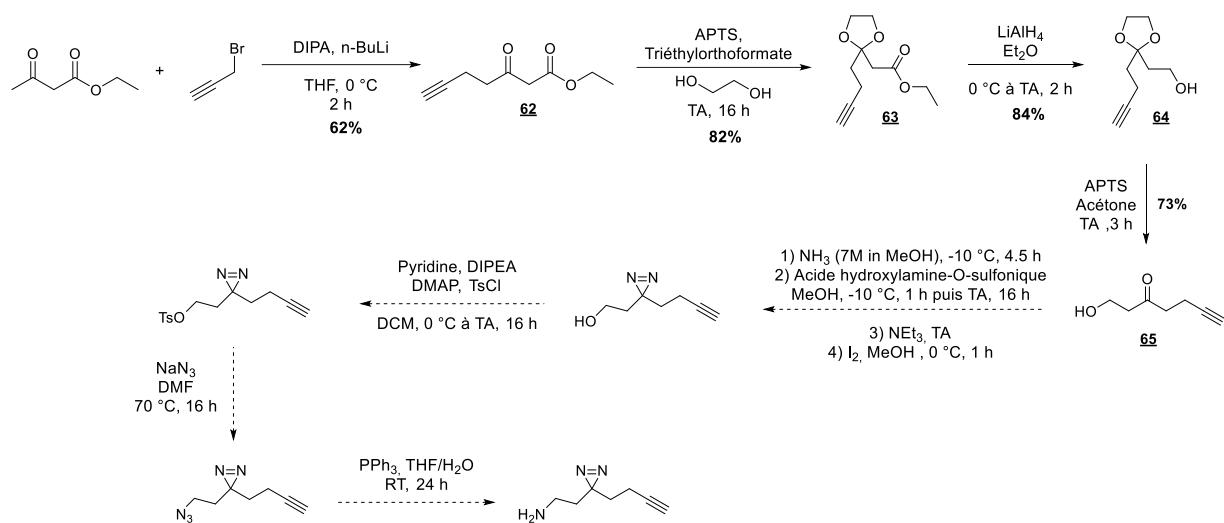


Schéma 31. Schéma de synthèse du synthon **B**.

Les quatre premières étapes ont été réalisées avec succès, avec des rendements proches de ceux de la littérature. En revanche, la formation du motif diazirine s'est révélée problématique. En effet, lors des deux premières tentatives, une dégradation du réactif a été observée. Lors du dernier essai, un produit propre a pu être isolé mais il n'a pas été possible de confirmer par analyses qu'il s'agissait ou non du produit. Des analyses complémentaires auraient dû être menées mais par manque de temps cela n'a pas été possible. La synthèse de ce synthon ainsi que de la sonde seront donc à faire dans la suite du projet.

CHAPITRE 6 - PARTIE EXPÉRIMENTALE

6.1. Chemistry

Unless otherwise indicated, reactions were carried out under an argon atmosphere in flame-dried glassware with magnetic stirring. Air and/or moisture-sensitive liquids were transferred via syringe. When required, solutions were degassed by argon bubbling through a needle. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-80 °C and 15- 30 torr. Volume ratios are indicated when referring to mixtures of solvents (e.g. DCM/MeOH 95:5).

6.1.1. Materials

All reagents were obtained from commercial sources and used without prior purifications. Dry solvents were obtained from Merck. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from aluminium sheets (ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 from Macherey-Nagel). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an appropriate staining solution. Silica gel for column chromatography was purchased from Merck (Geduran® Si 60, 40-63 µm). Column flash chromatography was carried out using silica gel G-25, G-12 or G-4 (40- 63 µm) from Macherey-Nagel or Büchi.

6.1.2. Instrumentation and methods associated

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 23 °C on Bruker Avance III - 400 MHz / 500 MHz spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual nondeuterated solvent. Data are represented as follows: chemical shift, integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad, app = apparent), coupling constant (J, Hz) and assignment for ¹H NMR data.

Analytical LC-MS analyses were carried out on Waters 2695 separations module equipped with Waters 2487 UV detector, Waters Acquity QDa mass detector and CORTECS, 2.7 µm, C18, 50 x 4.6 mm column. The flow rate was 1 mL/min and the solvent system was composed as follows: solvent A: 0.05% TFA in water; solvent B:

acetonitrile. Unless indicated otherwise, the gradient run was 0 to 5 min. – 5% to 95% B; 5 to 6 min. – 95% B; 6 to 7 min. – 5% B. Mass detector was operated in positive MS Scan mode with 600 °C probe temperature, 1.5 kV capillary voltage and 10 V cone voltage.

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF (time of flight) 6520.

IR spectra were recorded in a Thermo-Nicolet FT/IR-380 spectrometer. Spectra were interpreted with OMNIC 9 software and are reporter in cm^{-1} . The abbreviations used are w (weak), m (medium), s (strong).

Purifications by preparative HPLC were carried out on a Waters 600 controller system (pumps: Waters Delta 600; detector: Waters 2489 UV/Vis) equipped with a SunFire™ Prep C18 OBD 5 μM 19×150 mm column (Waters), using water (0.1% TFA, solvent A) and acetonitrile (solvent B) as a solvent system with a flow rate of 17 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Purifications by Flash Chromatography were carried out on a Buchi Pure C-815 Flash.

6.1.3. General information

All the work on retinoids was performed in the dark, under red light. They were stored at -20 °C, under Argon, in flask perfectly covered with aluminum foil.

All the azido retinoids, except for azido retinal, were obtained as a mixture of isomers. According to proton NMR, based on the integration of the proton in α position of the azide, the isomerization ratio between all-trans retinoid and the second isomer is 85/15.

All reactions including photosensitive molecules were conducted in the dark.

All the reactions with scale inferior or equal to 1 mg were conducted in plastic Eppendorfs.

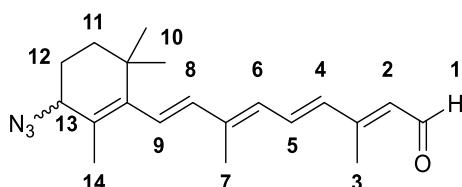
For all the reactions using PEGs, starting PEGs were previously dried for 1 hour at 50 °C under vacuum.

6.1.4. General procedure for Sonogashira couplings

In a flask previously dried at 100 °C for 24 h were put the solvent and the base. The mixture was then frozen in liquid nitrogen and put under strong vacuum. When the mixture was fully liquid again, a bubbling of Argon was done for 2 minutes. This operation was repeated three times. In another dry flask were put the stirring bar, the two catalysts and one of the two starting materials. The previously degassed mixture was then added, and the total mixture was degassed four times following the same procedure. The mixture was finally let to warm up to room temperature and the second starting material was added. In the case of a reaction conducted under reflux, the reflux system was previously dried and flushed with Argon. The entire system was then put under Argon.

6.1.5. Chemical syntheses and characterizations

Compound 1 - (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethyl-nona-2,4,6,8-tetraenal



To a stirred solution of all-trans retinal (150 mg, 0.53 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.5 mL) was added NBS (103.2 mg, 0.58 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. After 10 min of stirring at -20 °C, a suspension of TBAN₃ (658.5 mg, 2.65 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (4.1 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (30 mL) and diethyl ether (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography (95/5 to 85/15 Pentane/Et₂O) to afford **1** (38.9 mg, 0.12 mmol, 22% yield) as a yellow oil.

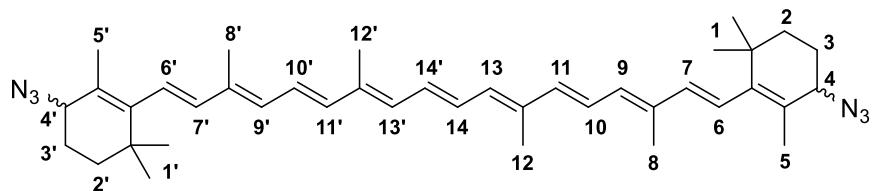
R_f = 0.40 (80/20 Pentane/Et₂O).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 10.10 (1H, d, *J*= 8.1 Hz, H1), 7.11 (1H, dd, *J*= 15.1, 11.5 Hz, H5), 6.39 (1H, d, *J*= 15.1 Hz, H4), 6.30 – 6.15 (3H, m, H6, H8, H9), 5.97 (1H, d, *J*= 8.1 Hz, H2), 3.70 (1H, t, *J*= 4.6 Hz, H13), 2.32 (3H, d, *J*= 1.1 Hz, H3), 2.02 (3H, d, *J*= 1.2 Hz, H7), 1.95 (1H, m, H12), 1.89 – 1.83 (1H, m, H12), 1.82 (3H, s, H14), 1.71 – 1.61 (1H, m, H11), 1.46 (1H, m, H11), 1.04 (6H, d, *J*= 6.5 Hz, H10).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 191.2, 154.6, 144.3, 140.4, 138.8, 135.5, 132.2, 130.7, 129.5, 128.0, 126.1, 62.5, 34.8, 34.8, 29.4, 27.5, 25.8, 19.9, 13.2, 13.1.

LRMS (ESI+) calc. for C₂₀H₂₇N₃O ([M+H]⁺): 326.22; found: 326.23.

Compound 2 - 2,2'-(*(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaene-1,18-diyl*)bis(6-azido-1,3,3-trimethylcyclohexene)



To a stirred solution of all-trans beta carotene (250 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (2.6 mL) was added NBS (183.3 mg, 1.03 mmol, 2.2 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. After 10 min of stirring at -20 °C, a solution of TBAN₃ (1.34 g, 4.7 mmol, 10.0 equiv.) in dry DCM (2.6 mL) was added. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (70 mL) and diethyl ether (70 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Petroleum ether for 3 min then 100% Petroleum ether to 98/2 Petroleum ether/Ethyl Acetate in 30 min) to afford **2** (126.6 mg, 0.35 mmol, 94% yield) as a dark red oil.

R_f= 0.38 (98/2 PET/ EtOAc).

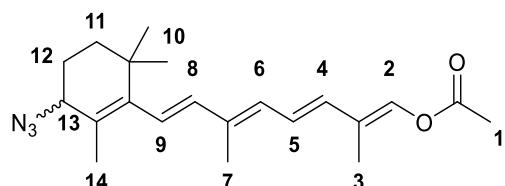
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.74 – 6.58 (4H, m, H6, H6', H10, H10'), 6.44 – 6.04 (10H, m, H7, H7', H9, H9', H11, H11', H13, H13', H14, H14'), 3.77 – 3.67 (2H, m, H4, H4'), 2.00 – 1.92 (14H, m, H3, H3', H8, H8', H12, H12'), 1.90 – 1.86 (2H, m, H3, H3'),

1.84 (6H, s, H5, H5'), 1.66 (2H, m, H2, H2'), 1.51 – 1.42 (2H, m, H2, H2'), 1.05 (12H, d, J = 7.1 Hz, H1, H1').

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ_{C} 144.7, 139.6, 138.2, 135.6, 135.4, 133.0, 132.3, 130.4, 125.3, 125.1, 125.0, 62.8, 34.9, 34.8, 29.5, 27.5, 25.9, 20.0, 13.0, 13.1.

HRMS (APPI+) calc. for $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_6$ ($[\text{M}-\text{H}_2\text{N}_3+\text{H}^+]$): 576.43; found: 576.44.

Compound 3 - ($2E,4E,6E,8E$)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-7-methylnona-2,4,6,8-tetraenyl acetate



To a stirred solution of retinyl acetate (100 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.1 mL) was added NBS (58.7 mg, 0.33 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. After 10 min of stirring at -20 °C, a solution of TBAN₃ (426.7 mg, 1.5 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.2 mL) was added. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (20 mL) and diethyl ether (20 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/ Ethyl acetate in 30 min) to afford **3** (22.8 mg, 0.06 mmol, 21% yield) as a slightly yellow oil.

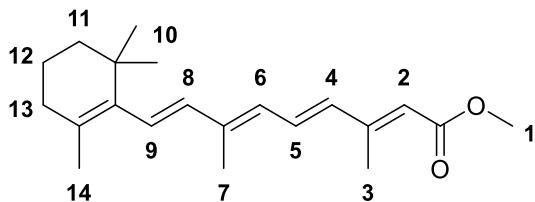
R_f = 0.31 (96/4 CyH/EtOAc).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 6.71 – 6.57 (1H, m, H6), 6.36 – 6.07 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.67 – 5.45 (1H, m, H3), 4.73 (2H, m, H2), 3.70 (1H, t, J = 4.2 Hz, H14), 2.09 – 2.04 (3H, m, H1), 1.96 (3H, s, H8), 1.89 (3H, s, H4), 1.83 (3H, s, H15), 1.72 – 1.60 (2H, m, H13), 1.54 – 1.39 (2H, m, H12), 1.04 (6H, dd, J = 6.1, 4.0 Hz, H11).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} 171.1, 144.6, 139.3, 139.0, 136.8, 135.9, 131.4, 125.6, 125.4, 125.3, 125.2, 62.6, 61.4, 34.8, 29.5, 27.5, 25.8, 21.1, 19.9, 12.8.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 370.2489; found: 370.2499.

Compound 4 - Methyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl) nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (250 mg, 0.83 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (3.2 mL) and dry THF (10 mL) was added trimethylsilyldiazomethane (4.2 mL, 0.6 M in hexane, 2.50 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred at RT for 1 h then concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **4** (226 mg, 0.72 mmol, 87% yield) as a yellow solid.

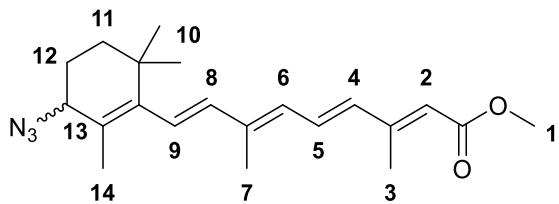
R_f = 0.33 (96/4 CyH/EtOAc)

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.00 (1H, dd, J = 15.0, 11.4 Hz, H5), 6.30 (1H, d, J = 3.8 Hz, H4), 6.27 (1H, d, J = 4.9 Hz, H9), 6.15 (1H, s, H6), 6.13 (1H, d, J = 5.7 Hz, H8), 5.78 (1H, s, H2), 3.71 (3H, s, H1), 2.36 (3H, s, H3), 2.05 – 2.01 (2H, m, H13), 2.00 (3H, s, H7), 1.71 (3H, s, H14), 1.65 – 1.58 (2H, m, H12), 1.49 – 1.45 (2H, m, H11), 1.03 (6H, s, H10)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C 167.8, 153.2, 139.8, 137.8, 137.4, 135.2, 131.3, 130.2, 129.6, 128.9, 118.2, 51.1, 39.7, 34.4, 33.3, 29.1, 21.9, 19.4, 14.0, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{21}H_{30}O_2$ ($[M+H]^+$): 315.2319; found: 315.2330.

Compound 5 - Methyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of methyl retinoate **4** (120 mg, 0.38 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.4 mL) was added NBS (74.8 mg, 0.42 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (543.4 mg, 1.91 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.7 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (20 mL) and diethyl ether (20 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 5 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **5** (77.2 mg, 0.22 mmol, 57% yield) as a yellow oil.

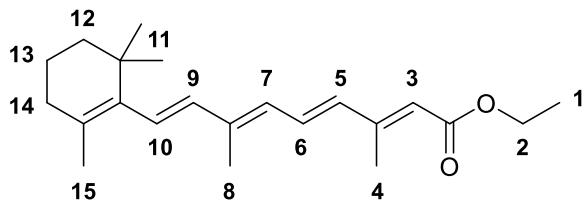
R_f = 0.33 (96/4 CyH/EtOAc)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H 7.08 – 6.91 (1H, m, H5), 6.71 – 6.06 (4H, m, H4, H6, H8, H9), 5.82 – 5.64 (1H, m, H2), 3.75 (1H, t, *J* = 4.3 Hz, H13), 3.70 (3H, d, *J* = 3.0 Hz, H1), 2.38 – 2.04 (3H, m, H3), 1.99 (3H, dd, *J* = 3.1, 1.2 Hz, H7), 1.97 – 1.86 (2H, m, H12), 1.86 – 1.80 (3H, m, H14), 1.65 (1H, m, H11), 1.45 (1H, m, H11), 1.08 – 1.00 (6H, m, H10).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ _C 167.7, 152.9, 144.4, 139.2, 139.1, 138.9, 136.1, 130.9, 127.1, 125.8, 118.8, 62.6, 51.2, 34.8, 29.5, 27.5, 25.8, 19.9, 14.0, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₁H₂₉N₃O₂ ([M+Na]⁺): 378.2152; found: 378.2162.

Compound 6 - Ethyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (250 mg, 0.83 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (8.3 mL) was added cesium carbonate (324.5 mg, 1.00 mmol, 1.2 equiv.). After 10 min of stirring at RT, ethyl iodide (80 μ L, 1.00 mmol, 1.2 equiv.) was added and the resulting mixture stirred at RT for 16 h. The crude was diluted in DCM (30 mL), brine was added (80 mL). Phases were separated and organic phase washed with brine (4x80 mL). Organic phases were dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 20 min) to afford **6** (233.1 mg, 0.71 mmol, 86% yield) as a yellow oil.

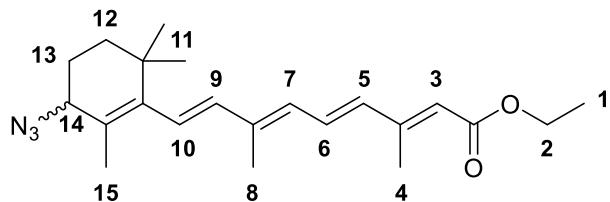
R_f = 0.40 (100% CyH).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_H 6.98 (1H, dd, J = 15.1, 11.4 Hz, H6), 6.28 (1H, s, H5), 6.25 (1H, d, J = 5.1 Hz, H10), 6.14 (1H, s, H7), 6.11 (1H, d, J = 4.9 Hz, H9), 5.76 (1H, s, H3), 4.16 (2H, q, J = 7.2 Hz, H2), 2.34 (3H, s, H4), 2.01 (2H, d, J = 6.5 Hz, H14), 1.99 (3H, s, H8), 1.70 (3H, s, H15), 1.63 – 1.57 (2H, m, H13), 1.48 – 1.43 (2H, m, H12), 1.27 (3H, t, J = 7.1 Hz, H1), 1.02 (6H, s, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ_C 167.3, 152.8, 139.6, 137.8, 137.4, 135.3, 131.0, 130.0, 129.6, 128.7, 118.7, 59.7, 39.7, 34.4, 33.2, 29.1, 21.8, 19.3, 14.5, 13.9, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 329.2475; found: 329.2483.

Compound 7 - Ethyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of ethyl retinoate **6** (120 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.5 mL) was added NBS (78.3 mg, 0.44 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (526 mg, 1.85 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.5 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (25 mL) and diethyl ether (25 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl Acetate in 20 min) to afford **7** (128.3 mg, 0.35 mmol, 94% yield) as a yellow oil.

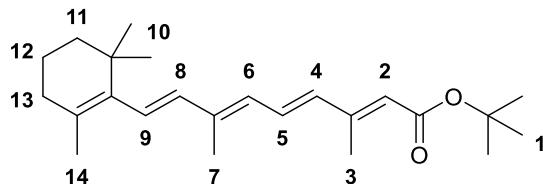
R_f = 0.35 (99/1 CyH/EtOAc).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.09 – 6.87 (1H, m, H6), 6.72 – 6.02 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.84 – 5.60 (1H, m, H3), 4.15 (2H, qd, *J* = 7.1, 2.6 Hz, H2), 3.76 – 3.65 (1H, m, H14), 2.36 – 2.02 (3H, m, H4), 1.99 (3H, m, H8), 1.96 – 1.85 (2H, m, H13), 1.86 – 1.77 (3H, m, H15), 1.64 (1H, m, H12), 1.50 – 1.40 (1H, m, H12), 1.27 (3H, td, *J* = 7.1, 1.3 Hz, H1), 1.06 – 1.00 (6H, m, H11).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 167.2, 152.5, 139.1, 139.0, 138.7, 136.1, 130.8, 130.6, 127.0, 125.7, 119.2, 62.5, 59.8, 34.7, 29.4, 27.4, 25.8, 19.8, 14.4, 13.9, 12.9.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₂H₃₁N₃O₂ ([M+Na]⁺): 392.2308; found: 392.2314.

Compound 8 - Tert-butyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (1 g, 3.33 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (34 mL) were added oxalyl chloride (314 μ L, 3.66 mmol, 1.1 equiv.) and dry DMF (20 μ L, 0.33 mmol, 0.1 equiv.) at 0 $^{\circ}$ C. After 30 min of stirring at 0 $^{\circ}$ C, tert-butanol (15.8 mL, 166.50 mmol, 50.0 equiv.) and dry pyridine (0.8 mL, 9.99 mmol, 3.0 equiv.) were added. The resulting mixture was stirred at 35 $^{\circ}$ C for 16 h then concentrated under vacuum. The crude was diluted in DCM (30 mL), brine was added (30 mL). Phases were separated and product extracted with DCM (3x30 mL). Organic phases were dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (25 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **8** (1.09 g, 3.06 mmol, 92% yield) as a yellow oil.

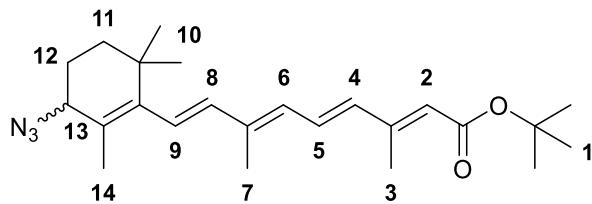
R_f = 0.34 (100% CyH).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H 6.95 (1H, dd, J = 15.0, 11.3 Hz, H5), 6.28 (1H, s, H4), 6.24 (1H, s, H9), 6.15 (1H, s, H6), 6.11 (1H, s, H8), 5.70 (1H, s, H2), 2.31 (3H, d, J = 1.2 Hz, H3), 2.04-2.00 (2H, m, H13), 1.99 (3H, s, H7), 1.71 (3H, s, H14), 1.66 – 1.57 (2H, m, H12), 1.49 (9H, s, H1), 1.47 – 1.43 (2H, m, H11), 1.02 (6H, s, H10).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ_C 166.9, 151.5, 139.2, 137.9, 137.5, 135.6, 130.5, 130.0, 129.8, 128.5, 120.8, 79.9, 39.8, 34.4, 33.2, 29.1, 28.5, 21.9, 19.4, 13.8, 13.2.

LRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_2$ ([M+H $^+$]): 357.28; found: 357.28.

Compound 9 - Tert-butyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of tert-butyl retinoate **8** (1.26 g, 3.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (20 mL) was added NBS (685.3 mg, 3.9 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (4.98 g, 17.5 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (17 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (50 mL) and Et₂O (50 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (25 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 5 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl Acetate in 40 min) to afford **9** (859.3 mg, 2.16 mmol, 62% yield) as a yellow oil.

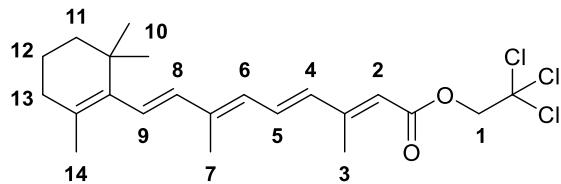
R_f = 0.35 (99/1 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.95 (1H, m, H5), 6.72 – 6.03 (4H, m, H4, H6, H8, H9), 5.77 – 5.53 (1H, m, H2), 3.77 – 3.65 (1H, m, H13), 2.44 – 2.01 (3H, m, H3), 1.98 (3H, m, H7), 1.96 – 1.86 (2H, m, H12), 1.85 – 1.79 (3H, m, H14), 1.71 – 1.59 (1H, m, H11), 1.48 (9H, s, H1), 1.44 (1H, m, H11), 1.07 – 1.01 (6H, m, H10).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 166.8, 151.2, 139.3, 139.1, 138.4, 136.5, 131.0, 130.1, 126.8, 125.7, 121.3, 80.0, 62.6, 34.9, 34.8, 29.5, 28.5, 21.0, 19.9, 13.8, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₄H₃₅N₃O₂ ([M+Na]⁺): 420.2621; found: 420.2631.

Compound 10 - 2,2,2-trichloroethyl (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohexenyl)-nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (150 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (5.1 mL) were added oxalyl chloride (47 μ L, 0.55 mmol, 1.1 equiv.) and dry DMF (4 μ L, 0.05 mmol, 0.1 equiv.) at 0 $^{\circ}$ C. After 30 min of stirring at 0 $^{\circ}$ C, 2-methylbut-3-en-2-ol (2.6 mL, 25.0 mmol, 50.0 equiv.) and dry pyridine (121 μ L, 1.50 mmol, 3.0 equiv.) were added. The resulting mixture was stirred at 35 $^{\circ}$ C overnight then concentrated to dryness. The crude was diluted in ethyl acetate (20 mL), brine was added (20 mL). Phases were separated and product extracted with ethyl acetate (3x20 mL). Organic phases were dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 20 min) to afford **10** (201.8 mg, 0.47 mmol, 93% yield) as a yellow oil.

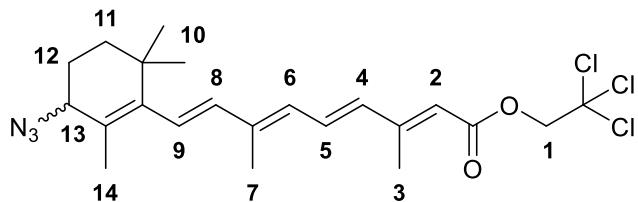
R_f = 0.27 (100% CyH).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H 7.07 (1H, dd, J = 15.0, 11.4 Hz, H5), 6.32 (2H, m, H4, H9), 6.15 (2H, m, H6, H8), 5.89 (1H, s, H2), 4.79 (2H, s, H1), 2.40 (3H, s, H3), 2.05 – 2.00 (5H, m, H7, H13), 1.72 (3H, s, H14), 1.66 – 1.58 (2H, m, H12), 1.50 – 1.44 (2H, m, H11), 1.03 (6H, s, H10).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ_C 165.3, 155.9, 140.7, 137.8, 137.3, 134.7, 132.4, 130.4, 129.4, 116.5, 95.6, 73.8, 39.8, 34.4, 33.3, 29.1, 21.9, 19.4, 14.4, 13.1.

HRMS (APCI) calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{Cl}_3\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 431.1306 ; found: 431.1314.

Compound 11 - 2,2,2-trichloroethyl (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of **10** (125 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.0 mL) was added NBS (57 mg, 0.32 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (412.5 mg, 1.45 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.1 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (30 mL) and diethyl ether (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **11** (91.7 mg, 0.19 mmol, 65% yield) as a yellow oil.

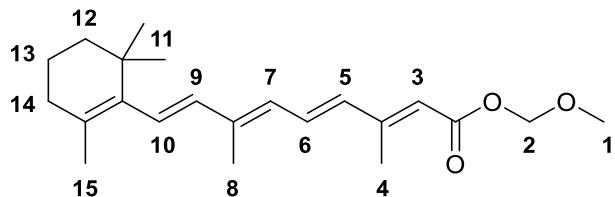
R_f = 0.30 (99/1 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.05 (1H, m, H5), 6.72 – 6.08 (4H, m, H4, H6, H8, H9), 5.93 – 5.73 (1H, m, H2), 4.79 (2H, s, H1), 3.78 – 3.68 (1H, m, H13), 2.40 (2H, s, H3), 2.13 (1H, s, H3), 2.02 (3H, s, H7), 1.99 – 1.87 (2H, m, H11, H12), 1.83 (3H, s, H14), 1.66 (1H, m, H12), 1.46 (1H, m, H11), 1.09 – 0.93 (6H, m, H10).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 165.2, 155.6, 144.3, 139.6, 138.9, 135.5, 133.2, 131.9, 130.7, 127.6, 125.9, 117.0, 95.5, 73.8, 62.6, 34.8, 29.5, 27.5, 25.8, 19.9, 14.4, 13.1.

HRMS (APCI) calc. for C₂₂H₂₈Cl₃N₃O₂ ([M+H]⁺): 429.1149 ; found: 429.1149.

Compound 12 - Methoxymethyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclo-hexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (150 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (7.5 mL) was added chloromethyl methyl ether (60 μ L, 0.75 mmol, 1.5 equiv.) at 0 °C. DIPEA (135 μ L, 1.0 mmol, 2.0 equiv.) was slowly added at 0 °C and the resulting mixture stirred overnight at RT. Water (15 mL) was added to the mixture then phases separated. Organic phases were washed with HCl (1M aq., 15 mL), water (15 mL), NaOH (1M aq., 15 mL), brine (15 mL) then dried on MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (4 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl Acetate in 20 min) to afford **12** (169.5 mg, 0.49 mmol, 98% yield) as a yellow oil.

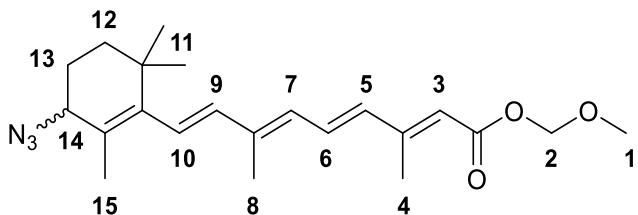
R_f = 0.31 (97/3 CyH/EtOAc).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H 7.03 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.4 Hz, H6), 6.31 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H5), 6.28 (1H, d, *J* = 5.9 Hz, H10), 6.16 (1H, s, H7), 6.13 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H9), 5.80 (1H, s, H3), 5.28 (2H, s, H2), 3.48 (3H, s, H1), 2.38 (3H, s, H4), 2.06 – 2.02 (2H, m, H14), 2.01 (3H, s, H8), 1.72 (3H, s, H15), 1.65 – 1.59 (2H, m, H13), 1.49 – 1.45 (2H, m, H12), 1.03 (6H, s, H11).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ _C 166.6, 154.5, 140.2, 137.8, 137.4, 135.1, 131.7, 130.3, 129.5, 129.1, 117.8, 89.9, 57.6, 39.8, 34.4, 33.3, 29.1, 21.9, 19.4, 14.2, 13.1.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₂H₃₂O₃ ([M+Na]⁺): 367.2244; found: 367.2263.

Compound 13 - Methoxymethyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexen-yl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **12** (100 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.0 mL) was added NBS (57 mg, 0.32 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (412.5 mg, 1.45 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.1 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (20 mL) and diethyl ether (20 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 93/7 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **13** (82.3 mg, 0.21 mmol, 74% yield) as a yellow oil.

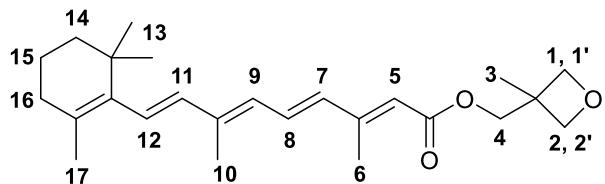
R_f = 0.31 (95/5 CyH/EtOAc).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.12 – 6.94 (1H, m, H6), 6.36 – 6.09 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.84 – 5.63 (1H, m, H3), 5.28 (2H, d, *J* = 2.5 Hz, H2), 3.77 – 3.68 (1H, m, H14), 3.48 (3H, d, *J* = 2.5 Hz, H1), 2.40 – 2.07 (3H, m, H4), 2.00 (3H, d, *J* = 5.1 Hz, H8), 1.97 – 1.86 (2H, m, H12), 1.86 – 1.81 (3H, m, H15), 1.66 (1H, m, H13), 1.50 – 1.44 (1H, m, H13), 1.07 – 1.02 (6H, m, H11).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 166.5, 154.2, 144.4, 139.3, 139.0, 135.9, 131.3, 130.8, 127.3, 125.9, 118.4, 90.0, 62.6, 57.6, 34.8, 29.5, 27.5, 25.8, 19.9, 14.1, 13.1.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₂H₃₂N₃O₃ ([M+Na]⁺): 408.2258; found: 408.2272.

Compound 14 - (3-methyloxetan-3-yl)methyl(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl) nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (200 mg, 0.67 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (6.7 mL) were added DCC (152.7 mg, 0.74 mmol, 1.1 equiv.), DMAP (81.9 mg, 0.67 mmol, 1.0 equiv.) and (3-methyloxetan-3-yl)methanol (74 μ L, 0.74 mmol, 1.1 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT for 2 h then DCM (30 mL) and water (30 mL) were added. Phases were separated, product extracted with DCM (3x30 mL). Organic phases were washed with brine (30 mL), dried on MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **14** (188 mg, 0.49 mmol, 73% yield) as a yellow oil.

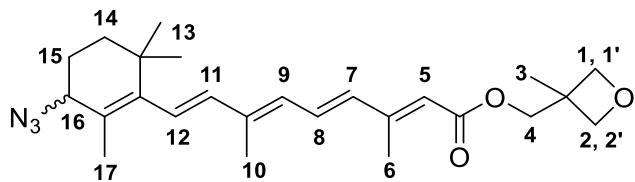
R_f = 0.31 (90/10 CyH/EtOAc).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_H 7.02 (1H, dd, J = 15.0, 11.4 Hz, H8), 6.31 (1H, s, H7), 6.27 (1H, d, J = 2.8 Hz, H12), 6.16 (1H, s, H9), 6.13 (1H, d, J = 3.5 Hz, H11), 5.82 (1H, s, H5), 4.56 (2H, d, J = 5.9 Hz, H1, H2), 4.39 (2H, d, J = 6.0 Hz, H1', H2'), 4.20 (2H, s, H4), 2.37 (3H, s, H6), 2.03 (2H, m, H16), 2.01 (3H, s, H10), 1.71 (3H, s, H17), 1.66 – 1.58 (2H, m, H15), 1.50 – 1.44 (2H, m, H14), 1.36 (3H, s, H3), 1.03 (6H, s, H13).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ_C 167.1, 153.3, 144.3, 139.0, 138.9, 135.8, 131.0, 130.7, 127.1, 125.7, 118.4, 79.7, 68.1, 62.5, 39.2, 34.7, 29.4, 27.4, 25.7, 21.3, 19.8, 14.0, 12.9.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 385.2737; found: 385.2747.

Compound 15 - (3-methyloxetan-3-yl)methyl(2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona- 2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **14** (188 mg, 0.49 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.8 mL) was added NBS (96.1 mg, 0.54 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (697 mg, 2.45 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (3.5 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (30 mL) and diethyl ether (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 80/20 Cyclohexane/Ethyl acetate in 35 min) to afford **15** (133.1 mg, 0.31 mmol, 64% yield) as a yellow oil.

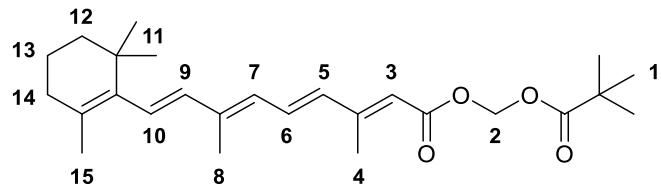
R_f = 0.33 (85/15 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δH 7.10 – 6.91 (1H, m, H8), 6.38 – 6.05 (4H, m, H7, H9, H11, H12), 5.87 – 5.69 (1H, m, H5), 4.56 (2H, d, J = 5.9 Hz, H1', H2'), 4.40 (2H, d, J = 5.9 Hz, H1, H2), 4.20 (2H, s, H4), 3.76 – 3.68 (1H, m, H16), 2.37 (2H, d, J = 1.2 Hz, H6), 2.09 (1H, d, J = 1.2 Hz, H6), 2.01 (3H, s, H10), 1.98 – 1.87 (2H, m, H14, H15), 1.87 – 1.77 (3H, m, H17), 1.66 (1H, m, H14), 1.47 (1H, m, H15), 1.36 (3H, s, H3), 1.07 – 1.02 (6H, m, H13).

¹³C NMR (176 MHz, CDCl₃) δC 167.1, 153.3, 144.3, 138.9, 135.8, 132.2, 131.5, 131.0, 130.7, 127.1, 118.4, 79.7, 68.1, 62.5, 39.2, 34.7, 29.4, 27.4, 25.7, 21.3, 19.8, 14.0, 12.9.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₅H₃₅N₃O₃ ([M+Na]⁺): 448.2571; found: 448.2582.

Compound 16 - (Pivaloyloxy)methyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (150 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (5 mL) was added DIPEA (170 μ L, 1.0 mmol, 2.0 equiv.) and chloromethyl pivalate (120 μ L, 0.84 mmol, 1.7 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT overnight then diluted in DCM (40 mL). Organic phase was washed with brine (5x50 mL), dried on MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **16** (129 mg, 0.31 mmol, 62% yield) as a yellow oil.

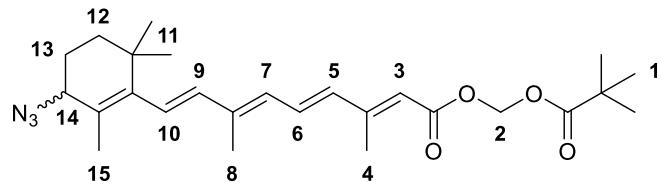
$R_f = 0.23$ (98/2 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.04 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.4 Hz, H6), 6.31 (1H, d, *J* = 5.7 Hz, H5), 6.27 (1H, d, *J* = 4.7 Hz, H10), 6.16 (1H, s, H7), 6.12 (1H, d, *J* = 4.4 Hz, H9), 5.80 (2H, s, H2), 5.78 (1H, s, H8), 2.36 (3H, s, H4), 2.05 – 1.97 (5H, m, H8, H14), 1.71 (3H, s, H15), 1.65 – 1.57 (2H, m, H13), 1.50 – 1.43 (2H, m, H12), 1.21 (9H, s, H1), 1.02 (6H, s, H11).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 177.5, 165.4, 155.5, 140.5, 137.8, 137.3, 134.8, 132.1, 130.3, 129.5, 129.2, 116.9, 79.3, 39.7, 38.9, 34.4, 33.2, 29.1, 27.0, 21.9, 19.3, 14.2, 13.1.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₆H₃₈O₄ ([M+H]⁺): 415.2843; found: 415.2855.

Compound 17 - (Pivaloyloxy)methyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **16** (129 mg, 0.31 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.1 mL) was added NBS (60.5 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (444 mg, 1.56 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.2 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (25 mL) and diethyl ether (25 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **17** (97 mg, 0.21 mmol, 69% yield) as a yellow oil.

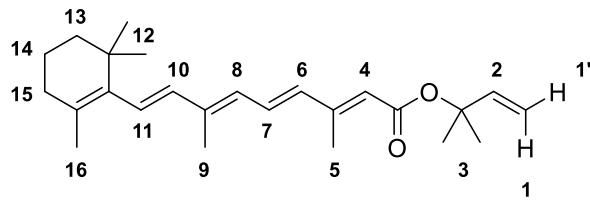
R_f = 0.33 (85/15 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.01 (1H, m, H6), 6.74 – 6.03 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.84 – 5.62 (3H, m, H2, H3), 3.77 – 3.67 (1H, m, H14), 2.35 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H4), 2.07 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H4), 2.02 – 1.97 (3H, s, H8), 1.97 – 1.85 (2H, m, H12, H13), 1.81 (3H, s, H15), 1.65 (1H, m, H13), 1.45 (1H, m, H12), 1.20 (9H, s, H1), 1.06 – 1.00 (6H, m, H11).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 177.4, 165.3, 155.2, 144.3, 139.5, 138.9, 135.6, 131.7, 130.7, 127.4, 125.9, 117.4, 79.3, 62.5, 38.9, 34.7, 29.4, 27.5, 27.0, 25.8, 19.9, 14.2, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₆H₃₇N₃O₄ ([M+Na]⁺): 478.2676; found: 478.2664.

Compound 18 - 2-methylbut-3-en-2-yl (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*) -3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (150 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (5.1 mL) were added oxalyl chloride (47 μ L, 0.55 mmol, 1.1 equiv.) and dry DMF (4 μ L, 0.05 mmol, 0.1 equiv.) at 0 $^{\circ}$ C. After 30 min of stirring at 0 $^{\circ}$ C, 2-methylbut-3-en-2-ol (2.6 mL, 25.0 mmol, 50.0 equiv.) and dry pyridine (121 μ L, 1.50 mmol, 3.0 equiv.) were added. The resulting mixture was stirred at 35 $^{\circ}$ C overnight then concentrated to dryness. The crude was diluted in ethyl acetate (20 mL), brine was added (20 mL). Phases were separated and product extracted with ethyl acetate (3x20 mL). Organic phases were dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **18** (84.3 mg, 0.23 mmol, 46% yield) as a yellow oil.

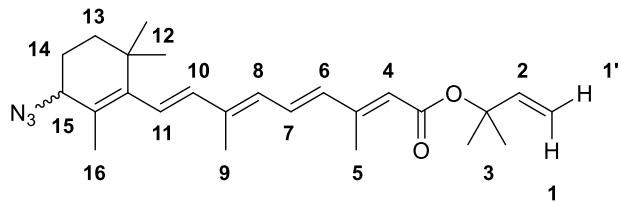
R_f = 0.43 (99/1 CyH/EtOAc).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_H 6.97 (1H, dd, J = 15.0, 11.3 Hz, H7), 6.28 (1H, s, H6), 6.25 (1H, s, H11), 6.18 – 6.08 (3H, m, H8, H10 and H2), 5.73 (1H, s, H4), 5.18 (1H, dd, J = 17.5, 0.9 Hz, H1), 5.08 (1H, dd, J = 10.9, 0.9 Hz, H1'), 2.32 (3H, s, H5), 2.05 – 2.00 (2H, m, H15), 1.99 (3H, s, H9), 1.71 (3H, s, H16), 1.65 – 1.59 (2H, m, H14), 1.55 (6H, s, H3), 1.50 – 1.42 (2H, m, H13), 1.03 (6H, s, H12).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ_C 166.4, 152.3, 143.3, 139.5, 137.9, 137.5, 135.5, 130.8, 130.1, 129.7, 128.7, 120.1, 112.4, 80.3, 39.8, 34.4, 33.3, 29.1, 26.9, 21.9, 19.4, 13.9, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 391.2608; found: 391.2611.

Compound 19 - 2-methylbut-3-en-2-yl (2E,4E,6E,8E) 9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **18** (84.3 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (0.8 mL) was added NBS (44.5 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (327.2 mg, 1.15 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (1.7 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (15 mL) and diethyl ether (15 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (4 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **19** (47.6 mg, 0.12 mmol, 51% yield) as a yellow oil.

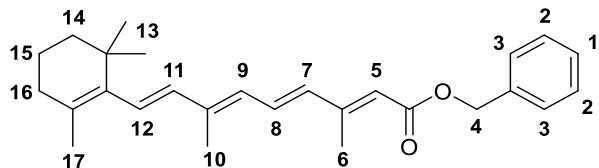
R_f = 0.37 (99/ CyH/EtOAc).

¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ_H 6.94 (1H, m, H7), 6.33 – 6.08 (5H, m, H2, H6, H8, H10, H11), 5.77 – 5.59 (1H, m, H4), 5.18 (1H, dd, *J* = 17.5, 2.9 Hz, H1), 5.09 (1H, dd, *J* = 10.9, 0.9 Hz, H1'), 3.78 – 3.68 (1H, m, H15), 2.31 (2H, d, *J* = 13.1 Hz, H5), 2.04 (1H, d, *J* = 11 Hz, H5), 1.99 (3H, d, *J* = 9.3 Hz, H9), 1.97 – 1.92 (1H, m, H14), 1.87 (1H, m, H14), 1.85- 1.80 (3H, m, H16), 1.66 (1H, m, H13), 1.55 (6H, s, H3), 1.47 (1H, m, H13), 1.07 – 1.00 (6H, m, H12).

¹³C NMR (176 MHz, CDCl₃) δ_C 166.3, 152.0, 143.2, 139.1, 138.6, 136.3, 131.8, 131.0, 130.4, 126.9, 125.7, 120.5, 112.5, 80.3, 62.6, 34.8, 29.5, 27.5, 26.9, 25.8, 21.0, 19.9, 13.8, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₅H₃₆N₃O₂ ([M+Na]⁺): 432.2621; found: 432.2639.

Compound 20 - Benzyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (100 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (3.3 mL) was added cesium carbonate (130.3 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv.). After 10 min of stirring at RT, benzyl bromide (48 μ L, 0.40 mmol, 1.2 equiv.) was added. Final mixture was stirred at RT overnight then diluted in DCM (30 mL). Brine (30 mL) was added, phases were separated, and product extracted with DCM (3x30 mL). Organic phase was washed with brine (5 x 30 mL), dried on MgSO_4 , concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Ethyl acetate in 20 min) to afford **20** (126 mg, 0.32 mmol, 98% yield) as a yellow oil.

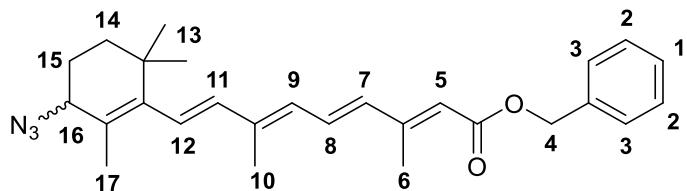
R_f = 0.4 (98/2 CyH/EtOAc).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.43 – 7.29 (5H, m, H1, H2, H3), 7.02 (1H, dd, J = 15.0, 11.4 Hz, H8), 6.31 (1H, s, H7), 6.27 (1H, s, H12), 6.14 (2H, dd, J = 15.9, 11.7 Hz, H9, H11), 5.84 (1H, s, H5), 5.17 (2H, s, H4), 2.38 (3H, s, H10), 2.02 (5H, m, H6, H16), 1.72 (3H, s, H17), 1.66 – 1.58 (2H, m, H15), 1.51 – 1.45 (2H, m, H14), 1.04 (6H, s, H13).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} 166.9, 153.5, 139.8, 137.8, 137.4, 136.6, 135.1, 131.3, 130.1, 129.6, 128.8, 128.6, 128.2, 128.1, 118.2, 65.6, 39.7, 34.3, 33.2, 29.1, 21.8, 19.3, 14.0, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 391.2632; found: 391.2633.

Compound 21 - Benzyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **20** (126 mg, 0.32 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.1 mL) was added NBS (62.3 mg, 0.35 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (455 mg, 1.6 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.3 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (30 mL) and diethyl ether (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Diethyl ether in 30 min) to afford **21** (93 mg, 0.22 mmol, 67% yield) as a yellow oil.

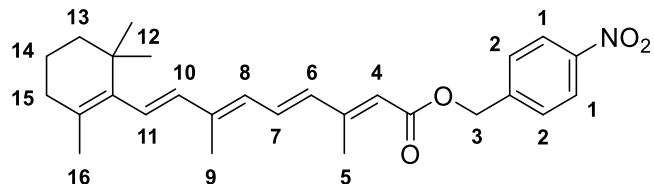
R_f = 0.36 (98/2 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.46 – 7.28 (5H, m, H1, H2, H3), 6.99 (1H, m, H8), 6.73 – 6.08 (4H, m, H7, H9, H11, H12), 5.91 – 5.67 (1H, m, H5), 5.17 (2H, s, H4), 3.81 – 3.65 (1H, m, H16), 2.37 (d, J = 7.2 Hz, H6), 2.07 (1H, d, J = 6.0 Hz, H6), 2.02 – 2.00 (3H, m, H10), 1.98 – 1.87 (2H, m, H14, H15), 1.87 – 1.82 (3H, m, H17), 1.67 (1H, m, H15), 1.47 (1H, m, H14), 1.13 – 0.95 (6H, m, H13).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 166.9, 153.2, 144.3, 139.1, 139.0, 136.5, 136.0, 131.6, 130.9, 130.8, 130.2, 128.6, 128.2, 128.1, 127.1, 118.7, 65.7, 62.5, 34.7, 29.4, 27.5, 25.8, 19.8, 14.0, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₇H₃₃N₃O₂ ([M+Na]⁺): 454.2465; found: 454.2472.

Compound 22 - 4-nitrobenzyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclo-hexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of retinoic acid (100 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (3.4 mL) were added oxalyl chloride (31 μ L, 0.36 mmol, 1.1 equiv.) and dry DMF (2.3 μ L, 0.03 mmol, 0.1 equiv.) at 0 °C. After 30 min of stirring at 0 °C, 4-nitrobenzyl alcohol (2.53 g, 16.5 mmol, 50.0 equiv.) and dry pyridine (80 μ L, 0.99 mmol, 3.0 equiv.) were added. The resulting mixture was stirred at RT for 16 h then concentrated under vacuum. The crude was diluted in DCM (30 mL), brine was added (30 mL). Phases were separated and product extracted from aqueous phase with DCM (3x30 mL). Organic phases were dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 95/5 Cyclohexane/Diethyl ether in 30 min) to afford **22** (123 mg, 0.28 mmol, 86% yield) as a yellow solid.

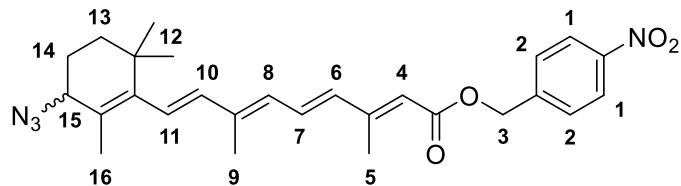
R_f = 0.26 (96/4 CyH/Et₂O).

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_H 8.21 (2H, d, J = 8.8 Hz, H1), 7.53 (2H, d, J = 8.8 Hz, H2), 7.04 (1H, dd, J = 15.0, 11.4 Hz, H7), 6.32 (1H, s, H6), 6.28 (1H, s, H11), 6.14 (2H, ds, J = 16.1, 11.1 Hz, H8, H10), 5.85 (1H, s, H4), 5.24 (2H, s, H3), 2.37 (3H, s, H5), 2.05 – 1.99 (5H, m, H9, H15), 1.71 (3H, s, H16), 1.65 – 1.58 (2H, m, H14), 1.49 – 1.44 (2H, m, H13), 1.03 (s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ_C 166.5, 154.7, 147.7, 144.1, 140.4, 137.8, 137.3, 134.8, 131.9, 130.3, 129.4, 129.2, 128.3, 123.9, 117.2, 64.1, 39.7, 34.4, 33.2, 29.1, 21.8, 19.3, 14.1, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 436.2482; found: 436.2481.

Compound 23 - 4-nitrobenzyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **22** (123 mg, 0.28 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (2 mL) was added NBS (55.2 mg, 0.31 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBAN₃ (401 mg, 1.41 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (30 mL) and diethyl ether (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Diethyl ether in 30 min) to afford **23** (127 mg, mmol, 95% yield) as a yellow oil.

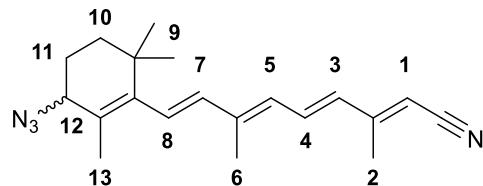
R_f 0.26 (94/6 CyH/Et₂O).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 8.21 (2H, d, J = 8.8 Hz, H1), 7.53 (2H, d, J = 8.8 Hz, H2), 7.02 (1H, m, H7), 6.72 – 6.07 (4H, m, H6, H8, H10, H11), 5.92 – 5.70 (1H, m, H4), 5.25 (2H, s, H3), 3.78 – 3.67 (1H, m, H15), 2.36 (2H, d, J = 7.1 Hz, H5), 2.09 (1H, d, J = 7.1 Hz, H5), 2.01 (3H, s, H9), 1.97 – 1.86 (2H, m, H13, H14), 1.85 – 1.79 (3H, m, H16), 1.66 (1H, m, H14), 1.46 (1H, m, H13), 1.06 – 1.02 (6H, m, H12).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 166.4, 154.4, 147.6, 144.0, 139.4, 138.9, 135.6, 132.7, 131.5, 130.6, 128.3, 127.4, 127.0, 123.8, 117.6, 64.1, 62.5, 34.7, 29.4, 27.4, 25.7, 19.8, 14.0, 12.9.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₇H₃₂N₄O₄ ([M+Na]⁺): 499.2316; found: 499.2326.

Compound 24 - (2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenenitrile



To a stirred solution of retinal (120 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.5 mL) was added a NBS (81.9 mg, 0.46 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TMSN₃ (276 µL, 2.10 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (3.0 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (30 mL) and diethyl ether (30 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **24** (59.8 mg, 0.19 mmol, 44% yield) as a yellow oil.

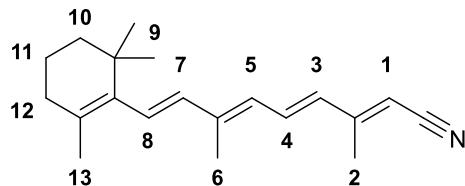
R_f = 0.30 (98/2 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.94 (1H, m, H4), 6.69 – 5.99 (4H, m, H3, H5, H7, H8), 5.25 – 5.05 (1H, m, H1), 3.69 (1H, m, H12), 2.20 (2H, s, H2), 2.06 (1H, s, H2), 2.00 (3H, s, H6), 1.95 – 1.84 (2H, m, H10, H11), 1.84 – 1.79 (3H, m, H13), 1.64 (1H, m, H11), 1.45 (1H, m, H10), 1.07 – 0.98 (6H, m, H9).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 156.9, 144.2, 140.5, 138.7, 132.2, 132.1, 130.0, 127.9, 126.0, 118.1, 97.1, 62.4, 34.7, 29.4, 27.4, 25.7, 19.8, 16.7, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₀H₂₆N₄ ([M+Na]⁺): 345.2050 ; found: 345.2053.

Compound 25 - (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl) nona-2,4,6,8-tetraenenitrile



To a stirred solution of retinal (100 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.4 mL) was added NIS (87.7 mg, 0.39 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TMSN₃ (230 µL, 1.75 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.4 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short silica pad, rinsed with DCM (50 mL) and diethyl ether (50 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **25** (10.4 mg, 37 µmol, 11% yield) as a yellow oil.

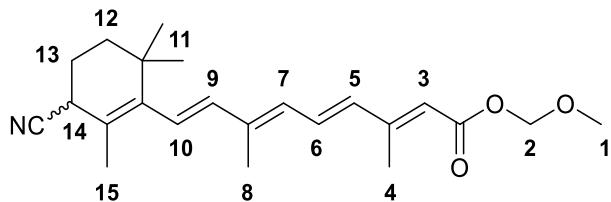
R_f = 0.31 (98/2 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.13 – 6.87 (1H, m, H4), 6.66 – 5.94 (4H, m, H3, H5, H7, H8), 5.24 – 4.96 (1H, m, H1), 2.21 (2H, d, *J* = 6.1 Hz, H2), 2.07 (1H, s, H2), 2.06 – 2.02 (2H, m, H12), 2.01 (3H, s, H6), 1.76 – 1.70 (3H, m, H13), 1.61 (2H, m, H11), 1.51 – 1.43 (2H, m, H10), 1.06 – 1.01 (6H, m, H9).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 157.1, 141.5, 137.7, 137.1, 132.6, 131.4, 130.6, 129.8, 128.9, 118.4, 96.6, 39.7, 34.4, 33.3, 29.1, 21.9, 19.3, 16.8, 13.1.

HRMS (APCI) calc. for C₂₀H₂₇N ([M+H]⁺): 282.2216; found: 282.2208.

Compound 26 - Methoxymethyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-cyano-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **12** (120 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.3 mL) was added NBS (69.4 mg, 0.39 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBACN (469.8 mg, 1.75 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.5 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. The crude was diluted in DCM (25 mL) and water was added (25 mL). Phases were separated and product extracted with DCM (3 x 20 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 93/7 Cyclohexane/Ethyl acetate in 35 min) to afford **26** (50 mg, 0.14 mmol, 39% yield) as a yellow oil.

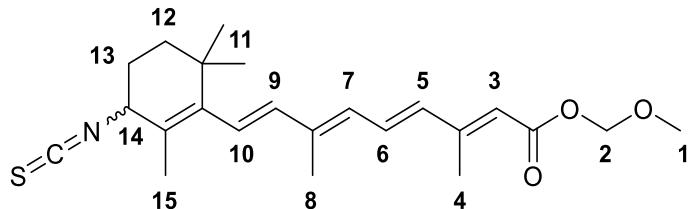
R_f = 0.24 (97/3 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.99 – 6.01 (6H, m, H3, H5, H6, H7, H9, H10), 5.23 (2H, s, H2), 3.45 (3H, m, H1), 3.14 (1H, s, H14), 2.33 (2H, m, H13), 2.24 (3H, s, H4), 1.96 (3H, s, H8), 1.94 (3H, s, H15), 1.54 (2H, m, H12), 1.29 (6H, s, H11).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 170.9, 149.4, 142.9, 139.9, 137.5, 132.1, 129.7, 128.5, 126.7, 125.6, 120.6, 108.4, 90.7, 57.8, 45.4, 39.6, 34.7, 28.8, 25.0, 20.0, 17.4, 12.5.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₃H₃₁NO₃ ([M+H⁺]): 370.2377; found: 370.2384.

Compound 27 - Methoxymethyl (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-9-(3-isothiocyanato-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **12** (120 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.2 mL) was added NBS (67.6 mg, 0.38 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of TBANCS (523 mg, 1.74 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.5 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. The crude was diluted in DCM (25 mL) and water was added (25 mL). Phases were separated and product extracted with DCM (3 x 20 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 93/7 Cyclohexane/Ethyl acetate in 35 min) to afford **27** (88 mg, 0.22 mmol, 63% yield) as a yellow oil.

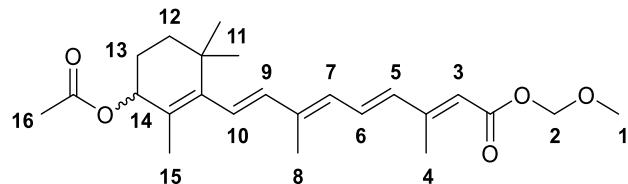
R_f = 0.22 (95/5 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.01 (1H, m, H6), 6.69 – 6.07 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.84 – 5.65 (1H, m, H3), 5.27 (2H, s, H2), 4.11 (1H, m, H14), 3.46 (3H, s, H1), 2.36 (2H, s, H4), 2.08 (1H, s, H4), 1.99 (3H, s, H8), 1.96 – 1.86 (2H, m, H12, H13), 1.86 – 1.79 (3H, m, H15), 1.69 (1H, m, H13), 1.47 (1H, m, H12), 1.12 – 0.96 (6H, m, H11).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 166.4, 154.1, 143.4, 139.2, 139.0, 136.0, 131.4, 131.2, 131.0, 126.8, 125.0, 118.4, 89.9, 58.6, 57.6, 34.8, 29.1, 27.5, 26.7, 19.5, 14.1, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₃H₃₁NO₃S ([M+Na]⁺): 424.1917; found: 424.1983.

Compound 28 - Methoxymethyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-isocyanato-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona -2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of **12** (120 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.3 mL) was added NBS (69.4 mg, 0.39 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of tetrabutylammonium acetate (527.6 mg, 1.75 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.5 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. It was then filtered on a short celite pad, rinsed with DCM (20 mL). The filtrate was concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **28** (107 mg, 0.27 mmol, 76% yield) as a yellow oil.

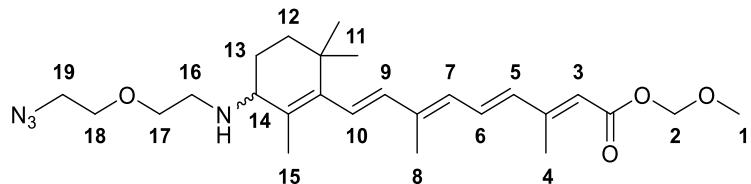
R_f = 0.26 (95/5 CyH/EtOAc).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H 7.01 (1H, m, H6), 6.74 – 6.05 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.86 – 5.65 (1H, m, H3), 5.28 (2H, d, J = 2.2 Hz, H2), 5.24 (1H, t, J = 4.8 Hz, H14), 3.48 (3H, d, J = 1.9 Hz, H1), 2.37 (2H, s, H4), 2.10 (1H, m, H4), 2.09 (3H, s, H16), 2.00 (3H, d, J = 4.1 Hz, H8), 1.96 – 1.86 (1H, m, H13), 1.79 – 1.72 (1H, m, H13), 1.70 (3H, s, H15), 1.67 – 1.59 (1H, m, H12), 1.44 (1H, m, H12), 1.10 – 1.01 (6H, m, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ_C 171.1, 166.4, 154.2, 144.1, 139.3, 138.7, 135.7, 131.3, 130.6, 127.5, 126.6, 118.2, 89.8, 72.6, 57.5, 34.8, 29.0, 27.4, 25.3, 21.4, 18.5, 14.0, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_4$ ([2M+Na] $^+$): 827.4705; found: 827.4711.

Compound 29 - Methoxymethyl (2E,4E,6E,8E)-9-(3-((2-(2-azidoethoxy)ethyl)amino)-2,6,6-(trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution **12** (120 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.3 mL) was added NBS (69.4 mg, 0.39 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of DIPEA (183 µL, 1.05 mmol, 3.0 equiv.) and 2-(2-azidoethoxy)ethanamine **34** (227.8 mg, 1.75 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (2.5 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. The crude was diluted in DCM (20 mL) and water was added (20 mL). Phases were separated and product extracted with DCM (3 x 20 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 20/80 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **29** (116 mg, 0.25 mmol, 70% yield) as a yellow oil.

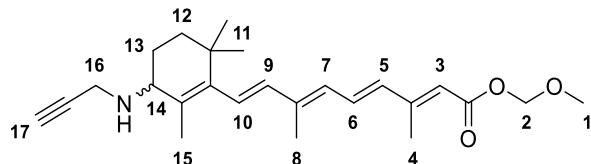
R_f = 0.25 (98/2 DCM/MeOH).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.10 – 6.91 (1H, m, H6), 6.46 – 6.05 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.87 – 5.56 (1H, m, H3), 5.28 (2H, s, H2), 3.72 – 3.59 (m, 4H, H17, H18), 3.48 (3H, s, H1), 3.38 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, H19), 3.01 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H, H14), 2.90 (1H, m, H16), 2.80 – 2.72 (1H, m, H16), 2.37 (2H, s, H4), 2.09 (1H, s, H4), 1.99 (3H, m, H8), 1.80 (3H, s, H15), 1.72 (2H, m, H12), 1.63 (1H, m, H13), 1.39 (1H, m, H13), 1.02 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, H11).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 166.4, 154.3, 141.1, 139.7, 138.0, 135.3, 131.5, 130.5, 129.9, 128.7, 117.9, 89.8, 71.1, 70.0, 58.0, 57.5, 50.8, 46.7, 35.3, 34.7, 29.1, 28.1, 19.30, 14.02, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₆H₄₀N₄O₄ ([M+H]⁺): 473.3122; found: 473.3124.

Compound 30 - Methoxymethyl (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-3-(prop-2-ynylamino)cyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate



To a stirred solution of **12** (150 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (1.6 mL) was added NBS (85.4 mg, 0.48 mmol, 1.1 equiv.) in one portion as a solid at -20 °C. The mixture was stirred for 10 min at -20 °C then a solution of DIPEA (224.5 µL, 1.32 mmol, 3.0 equiv.) and propargyl amine (141 µL, 2.2 mmol, 5.0 equiv.) in dry DCM (3.1 mL) was added dropwise at -20 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h, allowed to warm up to 3-5 °C. The crude was concentrated under vacuum then purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 88/12 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **30** (88 mg, 0.22 mmol, 50% yield) as a yellow oil.

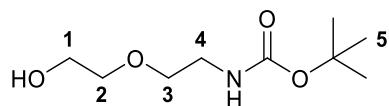
R_f = 0.25 (88/12 CyH/EtOAc).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.00 (1H, m, H6), 6.68 – 6.03 (4H, m, H5, H7, H9, H10), 5.90 – 5.61 (1H, m, H3), 5.27 (2H, s, H2), 3.57 – 3.36 (5H, m, H1, H16), 3.16 (1H, t, J = 4.1 Hz, H14), 2.36 (2H, s, H4), 2.22 (1H, t, J = 2.4 Hz, H17), 2.08 (1H, s, H4), 1.99 (3H, d, J = 3.8 Hz, H8), 1.80 (3H, s, H15), 1.74 – 1.58 (3H, m, H12, H13), 1.37 (1H, m, H12), 1.07 – 0.96 (6H, m, H11).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ_C 166.5, 154.3, 141.7, 139.7, 138.2, 135.4, 131.4, 130.1, 129.6, 128.5, 118.1, 89.9, 82.7, 71.3, 57.6, 56.8, 36.2, 34.9, 34.8, 29.4, 27.8, 23.7, 19.4, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{25}H_{35}NO_3$ ($[M+H]^+$): 398.2690; found: 398.2705.

Compound 31 - Tert-butyl ((hydroxymethoxy)methyl)carbamate



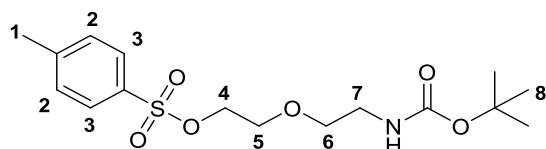
R_f = 0.26 (97/3 DCM/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 3.73 (2H, t, *J* = 4.4 Hz, H1), 3.57 (2H, t, *J* = 4.6 Hz, H2), 3.55 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, H3), 3.33 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, H4), 1.44 (9H, s, H5).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 156.2, 79.6, 72.3, 70.4, 61.9, 40.6, 28.5.

HRMS (ESI+) calc. for C₉H₁₉NO₄ ([M+H]⁺): 206.1387; found: 206.1383.

Compound 32 - 2-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate



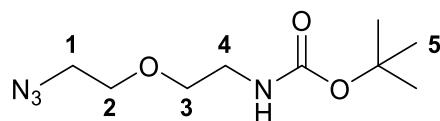
R_f = 0.25 (70/30 CyH/EtOAc).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.80 (2H, d, *J*= 8.3 Hz, H3), 7.35 (2H, d, *J*= 7.9 Hz, H2), 4.16 (2H, t, *J*= 4.6 Hz, H4), 3.63 (2H, t, *J*= 4.8 Hz, H5), 3.45 (2H, t, *J*= 5.2 Hz, H6), 3.23 (2H, q, *J*= 5.3 Hz, H7), 2.45 (3H, s, H1), 1.45 (9H, s, H8).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 156.0, 145.0, 133.2, 130.0, 128.1, 79.5, 70.5, 69.2, 68.5, 40.4, 28.6, 21.8.

HRMS (ESI+) calc. for C₁₆H₂₇NO₆S ([M+Na]⁺): 382.1295; found: 382.1293.

Compound 33 - Tert-butyl (2-(2-azidoethoxy)ethyl)carbamate



To a stirred solution of 2-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **32** (5.6 g, 15.6 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (29 mL) were added sodium azide (2.0 g, 31.2 mmol, 2 equiv.) in one portion as a solid. Resulting mixture was stirred at 60 °C overnight then allowed to cool down to RT. Crude product was filtered on a celite pad, rinsed with cold DCM (5 x 30 mL) and concentrated under vacuum. The filtration was repeated until no more salts present (5 times) to afford **33** (3.3 g, 14.3 mmol, 92% yield) as a yellow oil.

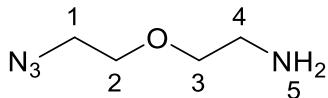
R_f= 0.07 (100% DCM).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 3.65 (2H, t, *J*=4.8 Hz, H2), 3.55 (2H, t, *J*= 5.2 Hz, H3), 3.38 (2H, t, *J*= 5.1 Hz, H1), 3.33 (2H, q, *J*= 5.0 Hz, H4), 1.45 (9H, s, H5).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 156.1, 79.5, 70.5, 70.1, 50.8, 40.6, 28.6.

HRMS (ESI+) calc. for C₉H₁₈N₄O₃ ([M+Na]⁺): 253.1271; found: 253.1277.

Compound 34 - 2-(2-azidoethoxy)ethanamine



To a stirred solution of tert-butyl (2-(2-azidoethoxy)ethyl)carbamate **34** (3.3 g, 14.3 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (25.5 mL) was added HCl (4 M in dioxane, 43 mL, 172 mmol, 12 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT for 2 h then concentrated under vacuum. Crude product was resuspended in DCM (15 mL), a solution of ammonia was added (10% in methanol, 15 mL) and concentrated again. Crude product was purified by Column Chromatography (40 g deactivated silica, solid loading, 100% DCM for 3 min then 100% DCM to 90/9/1 DCM/MeOH/NH₄OH in 35 min) to afford **34** (1.6 g, 12.4 mmol, 87% yield) as a yellow oil.

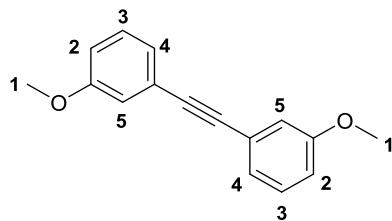
R_f = 0.31 (92/7.2/0.8 DCM/MeOH/NH₄OH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 3.66 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, H2), 3.57 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, H3), 3.40 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, H1), 3.02 (2H, s, H5), 2.94 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, H4).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 71.4, 69.9, 50.7, 41.0.

HRMS (ESI+) calc. for C₄H₁₀N₄O ([M+H]⁺): 131.0927; found: 131.0933.

Compound 35 - Bis(3-methoxyphenyl)ethyne



The procedure for Sonogashira couplings was followed. In the first flask, DIPEA (0.99 mL, 5.68 mmol, 3.0 equiv.) was put in solution in dry THF (9.5 mL). In the second flask were put iodo-3-methoxybenzene (225.1 μ L, 1.89 mmol, 1.0 equiv.), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (109.8 mg, 95.0 μ mol, 0.05 equiv.) and copper iodide (36.2 mg, 0.19 mmol, 0.1 equiv.). 1-ethynyl-3-methoxybenzene (289 μ L, 2.27 mmol, 1.2 equiv.) was finally added. The resulting mixture was stirred under reflux for 16 h then allowed to cool to room temperature before being concentrated under

vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane to 85/15 Cyclohexane/Ethyl acetate in 20 min) to afford **35** (387.5 mg, 1.63 mmol, 86 % yield) as a translucent oil.

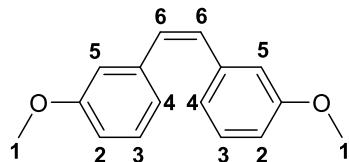
R_f = 0.35 (100% CyH).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.26 (2H, t, J = 7.7 Hz, H3), 7.14 (2H, dt, J = 7.5, 1.2 Hz, H4), 7.07 (2H, dd, J = 2.7, 1.4 Hz, H5), 6.90 (2H, ddd, J = 8.3, 2.6, 1.0 Hz, H2), 3.83 (6H, s, H1).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C 159.5, 129.6, 124.4, 124.3, 116.5, 115.2, 89.3, 55.4.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{16}H_{14}O_2$ ($[M+H]^+$): 239.1067; found: 239.1087.

Compound 36 - (*Z*)-3,3'-Dimethoxystilbene



A stirred solution of bis(3-methoxyphenyl)ethyne **35** (387.5 mg, 1.63 mmol, 1.0 equiv.), Lindlar's catalyst (77.9 mg, 20% w/w, 5% Pd on $CaCO_3$) and quinoline (0.42 mL, 3.59 mmol, 2.2 equiv.) in dry cyclohexane (9.8 mL) was prepared and degassed via a bubbling of Argon for 10 min. The mixture was put under atmosphere of H_2 , stirred at 25 °C for 16 h then filtered on a celite pad, rinsed with ethyl acetate (3x25 mL) and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/Ethyl acetate in 20 min) to afford **36** (303 mg, 1.26 mmol, 86 % yield) as a colorless oil.

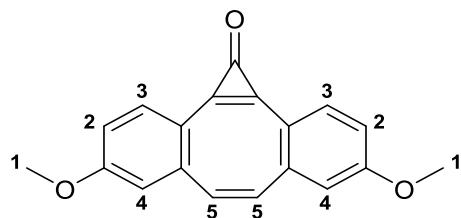
R_f = 0.34 (98/2 CyH/EtOAc).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.15 (2H, t, J = 7.9 Hz, H3), 6.86 (2H, dt, J = 7.7, 1.3 Hz, H4), 6.81 (2H, m, H5), 6.75 (2H, ddd, J = 8.1, 2.7, 1.0 Hz, H2), 6.58 (2H, s, H6), 3.67 (6H, s, H1).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ_C 159.5, 138.7, 130.5, 129.3, 121.7, 114.0, 113.5, 55.2.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{16}H_{16}O_2$ ($[M+H]^+$): 241.1223; found: 241.1227.

Compound 37 - 4,9-Dimethoxy-1*H*-dibenzo[*a,e*]cyclopropa[*c*]cyclooctenone



A solution of aluminum chloride (504 mg, 3.78 mmol, 3.0 equiv.) and tetrachlorocyclopropene (191.8 μ L, 1.51 mmol, 1.2 equiv.) in dry DCM (18.9 mL) was prepared and stirred at 25 $^{\circ}$ C for 20 min before being cooled at -20 $^{\circ}$ C. A solution of (Z)-3,3'-Dimethoxystilbene **36** (303 mg, 1.26 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (6.3 mL) was added dropwise. The final mixture was stirred at -20 $^{\circ}$ C for 1 h then allowed to warm up to 25 $^{\circ}$ C over 2 h and let stirred at 25 $^{\circ}$ C for 1 h. Water (25.2 mL) was added, and the mixture stirred for 30 min at 25 $^{\circ}$ C. The phases were separated then product extracted with DCM (3x30 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% DCM to 98/2 DCM/MeOH in 15 min) to afford **37** (182.3 mg, 0.63 mmol, 50 % yield) as a dark yellow solid.

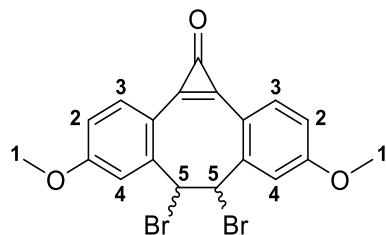
R_f 0.33 (100% DCM).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.50 (2H, d, *J*= 8.4 Hz, H3), 6.70 (2H, dd, *J*= 8.4, 2.6 Hz, H2), 6.60 (2H, d, *J*= 2.6 Hz, H4), 5.98 (2H, s, H5), 3.82 (6H, s, H1).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 163.8, 152.3, 147.1, 140.2, 136.5, 131.8, 122.0, 114.9, 113.5, 55.7.

HRMS (ESI+) calc. for C₁₉H₁₄O₃ ([M+H]⁺): 291.1016; found: 291.1046.

Compound 38 - 6,7-dibromo-4,9-dimethoxy-6,7-dihydro-1*H*-dibenzo[*a,e*]cyclopropa[*c*][8]annulenone



To a stirred solution of Br_2 (48.4 μL , 0.95 mmol, 1.5 equiv.) in dry DCM (4.1 mL) was added a solution of 6,7-dibromo-4,9-dimethoxy-6,7-dihydro-1*H*-dibenzo[*a,e*]cyclopropa[*c*][8]annulenone **37** (182.3 mg, 0.63 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (8.1 mL) dropwise at 0 $^{\circ}\text{C}$. The resulting mixture was allowed to warm up to room temperature RT and was then stirred for 4 h. A solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (aq. sat., 12 mL) was added and the mixture was then stirred for 5 min. The phases were separated, and product extracted with DCM (3x20 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% DCM to 95/5 DCM/MeOH in 20 min then 5 min at 95/5 DCM/MeOH) to afford **38** (154 mg, 0.34 mmol, 54 % yield) as a slightly yellow solid.

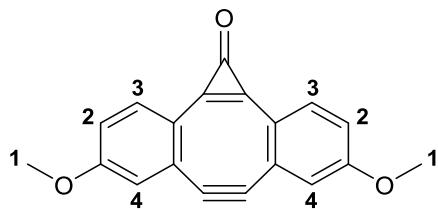
R_f = 0.22 (99/1 DCM/MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H 8.07 (2H, d, J = 8.5 Hz, H3), 7.05 (2H, dd, J = 8.5, 2.5 Hz, H2), 6.97 (2H, d, J = 2.5 Hz, H4), 5.76 (2H, s, H5), 3.92 (6H, s, H1).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ_C 162.8, 152.7, 143.0, 141.8, 137.2, 118.3, 115.8, 114.2, 55.9, 50.5.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 448.9382; found: 448.9385.

Compound 39 - 4,9-Dimethoxy-6,7-didehydro-1*H*-dibenzo[*a,e*]cyclopropa[*c*]cyclooctenone



To a stirred solution of 6,7-dibromo-4,9-dimethoxy-6,7-dihydro-1*H*-dibenzo[*a,e*]cyclopropa[*c*][8]annulenone **38** (50 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) in ethanol (5.2 mL) was added a solution of KOH (61.7 mg, 1.1 mmol, 10 equiv.) in ethanol (1.1 mL) in one portion. The resulting mixture was stirred at 25 °C overnight then the reaction was quenched with a solution of HCl (aq., 1 M, until pH=6). The product was then extracted with DCM (3x10 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (4 g silica, solid loading, 100% DCM to 98/2 DCM/MeOH in 20 min) to afford **39** (19.1 mg, 0.07 mmol, 60 % yield) as a bright yellow solid.

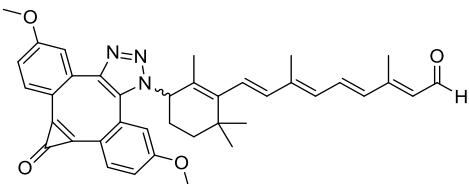
R_f = 0.29 (99/1 DCM/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.47 (2H, d, *J*= 8.4 Hz, H3), 6.63 (2H, dd, *J*= 8.5, 2.6 Hz, H2), 6.45 (2H, d, *J*= 2.6 Hz, H4), 3.81 (6H, s, H1).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 163.4, 153.8, 146.5, 136.8, 126.9, 125.4, 114.8, 113.7, 106.8, 55.8.

HRMS (ESI+) calc. for C₁₉H₁₂O₃ ([M+H]⁺): 289.0859; found: 289.0919.

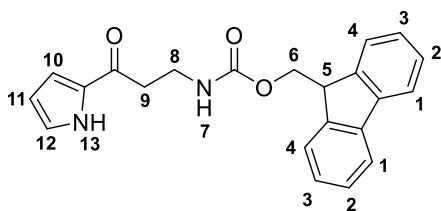
Compound 40 - (2E,4E,6E,8E)-9-(3-(5,11-dimethoxy-8-oxodibenzo[3,4:7,8]cyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-d] [1,2,3]triazol-1(8H)-yl)-2,6,6-trimethylcyclohexenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenal



To a stirred solution of 4,9-Dimethoxy-6,7-didehydro-1*H*-dibenzo[*a,e*]cyclopropa[*c*]cyclooctenone **39** (10 mg, 34.7 μ mol, 1 equiv.) in dry DCM (2.78 mL) and dry MeOH (0.69 mL) was added azido retinal **1** (22.6 mg, 69.4 μ mol, 2 equiv). The mixture was stirred at 25 $^{\circ}$ C overnight, concentrated under vacuum then purified by Preparative HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **40** (3.53 mg, 5.8 μ mol, 17% yield) as a yellow solid.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{39}H_{39}N_3O_4$ ($[M+H]^+$): 614.3013; found: 614.3008.

Compound 41 - (9H-fluoren-9-yl)methyl (3-oxo-3-(1H-pyrrol-2-yl) propyl) carbamate



To a stirred solution of Fmoc- β -Ala-OH (1.50 g, 4.82 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (32 mL) were added 2,2'-dipyridyl disulfide (1.59 g, 7.23 mmol, 1.5 equiv.) and triphenylphosphine (2.53 g, 9.64 mmol, 2.0 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT for 24 h under Argon atmosphere. In a separated flask, to a stirred solution of pyrrole (2.0 mL, 28.92 mmol, 6.0 equiv.) in dry THF (30 mL) at -78 $^{\circ}$ C was added methylmagnesium bromide (7.2 mL, 21.7 mmol, 4.5 equiv.). This second mixture was stirred at -78 $^{\circ}$ C for 30 min then at -20 $^{\circ}$ C for 30 min. Finally, the first solution was added dropwise in the second at -78 $^{\circ}$ C. Resulting mixture was stirred at -78 $^{\circ}$ C for 30

min then at RT for another 30 min. The reaction was quenched with NaHCO_3 (aq. sat., 50 mL) then diluted in ethyl acetate (50 mL). Phases were separated then organic phase washed with water (3x80 mL), brine (100 mL), dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (24 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 50/50 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min) to afford **41** (1.32 g, 3.66 mmol, 76 % yield) as a white solid.

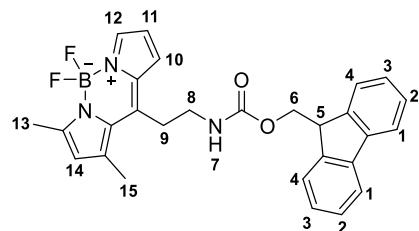
R_f 0.30 (70/30 CyH/EtOAc).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H 9.44 (1H, bs, H13), 7.75 (2H, d, J = 7.5 Hz, H1), 7.57 (2H, d, J = 7.5 Hz, H4), 7.38 (2H, t, J = 7.5 Hz, H3), 7.32 – 7.26 (2H, m, H2), 7.04 (1H, s, H12), 6.94 (1H, s, H11), 6.29 (1H, d, J = 3.3 Hz, H10), 5.41 (1H, m, H7), 4.37 (2H, d, J = 7.1 Hz, H6), 4.20 (1H, t, J = 7.1 Hz, H5), 3.60 (2H, q, J = 6.0 Hz, H8), 3.05 (2H, t, J = 5.8 Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ_C 189.2, 156.6, 144.1, 141.4, 131.8, 127.8, 127.2, 125.2, 125.0, 120.1, 117.0, 111.1, 66.8, 47.4, 37.7, 36.5.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 361.1547; found: 361.1551.

Compound 42 - (9H-fluoren-9-yl)methyl (2-(5,5-difluoro-1,3-dimethyl-5H-4I4,5I4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f] [1,3,2]diazaborinin-10-yl)ethyl)carbamate



To a stirred solution of (9H-fluoren-9-yl)methyl (3-oxo-3-(1H-pyrrol-2-yl)propyl)carbamate **41** (1.32 g, 3.66 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (24.4 mL) was added 2,4-dimethylpyrrole (0.6 mL, 5.86 mmol, 1.6 equiv.) at 0 °C. After 10 min of stirring at 0 °C, POCl_3 (0.68 mL, 7.32 mmol, 2.0 equiv.) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h then at 35 °C for 20 h. Afterwards, DIPEA (2.5 mL, 14.6 mmol, 4.0 equiv.) and BF_3OEt_2 (1.8 mL, 14.6 mmol, 4.0 equiv.) were

added and the final mixture stirred at RT for 4 h. The crude product was concentrated under vacuum then purified by Column Chromatography (40 g silica, solid loading, 100% Cyclohexane for 3 min then 100% Cyclohexane to 70/30 Cyclohexane/Ethyl acetate in 30 min then 70/30 Cyclohexane/Ethyl acetate for 15 min) to afford **42** (1.21 g, 2.49 mmol, 68 % yield) as an iridescent green-orange solid.

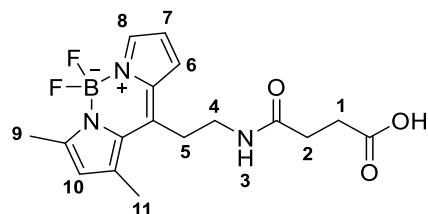
R_f = 0.31 (70/30 CyH/EtOAc).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.77 (2H, d, J = 7.6 Hz, H1), 7.61 (1H, s, H12), 7.56 (2H, d, J = 7.5 Hz, H4), 7.41 (2H, t, J = 7.5 Hz, H3), 7.31 (2H, t, J = 7.5, H2), 7.11 (1H, s, H10), 6.42 (1H, s, H11), 6.17 (1H, s, H14), 5.04 (1H, s, H7), 4.44 (2H, d, J = 6.9 Hz, H6), 4.20 (1H, t, J = 6.8 Hz, H5), 3.52 (2H, q, J = 7.0 Hz, H8), 3.20 (2H, t, J = 7.2 Hz, H9), 2.58 (3H, s, H13), 2.47 (3H, s, H15).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C 161.4, 156.5, 143.9, 142.5, 141.5, 138.4, 134.2, 127.9, 127.2, 125.2, 124.2, 124.0, 120.2, 116.3, 67.0, 47.4, 43.0, 30.3, 16.4, 15.2.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{28}H_{26}BF_2N_3O_2$ ([M-F]): 466.2102; found: 466.2119.

Compound 43 - 4-((2-(5,5-difluoro-1,3-dimethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f]1,3,2]diazaborinin-10-yl)ethyl)amino)-4-oxobutanoic acid



To a stirred solution of **42** (350 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (18 mL) was added DBU (107 μ L, 0.72 mmol, 1 equiv.) dropwise. The reaction mixture was stirred for 30 min at RT then succinic anhydride (144 mg, 1.44 mmol, 2 equiv.) was added in one portion as a solid. Final mixture was stirred at RT overnight then concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% DCM for 3 min then 100% DCM to 98/2 DCM/MeOH in 40 min) to afford **43** (99.6 mg, 0.27 mmol, 38 % yield) as a sparkling orange solid.

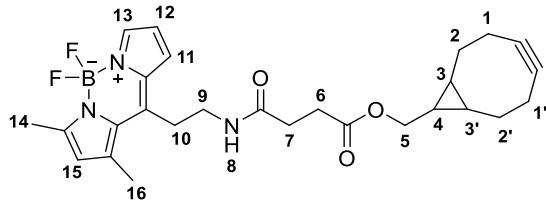
R_f = 0.29 (96/4 DCM/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.58 (1H, s, H8), 7.12 (1H, s, H6), 6.46 (1H, bs, H3), 6.42 (1H, s, H7), 6.16 (1H, s, H10), 3.54 – 3.44 (2H, m, H4), 3.14 (2H, t, J = 7.1 Hz, H5), 2.63 (2H, s, H1), 2.55 (3H, s, H9), 2.42 (5H, m, H2, H11).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 172.8, 161.4, 145.5, 142.7, 138.3, 134.2, 134.1, 124.4, 124.0, 116.2, 41.5, 30.8, 29.6, 27.1, 16.3, 15.1.

HRMS (ESI+) calc. for C₁₇H₂₀BF₂N₃O₃ ([M-F]): 344.1582; found: 344.1594.

Compound 44 - Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl 4-((2-(5,5-difluoro-1,3-dimethyl-5H-4I4,5I4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f] [1,3,2]diazaborinin-10-yl)ethyl) amino)-4-oxobutanoate



To a stirred solution of **43** (99.6 mg, 0.27 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (4.2 mL) were added BCN-OH (48.1 mg, 0.32 mmol, 1.2 equiv.), EDCI (88.5 mg, 0.57 mmol, 2.1 equiv.) and DMAP (17.1 mg, 0.14 mmol, 0.5 equiv.). The resulting mixture was stirred at RT overnight then water was added (10 mL). Phases were separated, product extracted with DCM (3x 25 mL), organic phase washed with brine (25 mL), dried on MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% DCM for 3 min then 100% DCM to 95/5 DCM/MeOH in 30 min) to afford **44** (74 mg, 0.15 mmol, 55 % yield) as an orange red oil.

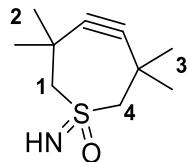
R_f 0.45 (99/1 DCM/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.62 (1H, s, H13), 7.15 (1H, d, J = 4.0 Hz, H11), 6.45 (1H, q, J = 2.1 Hz, H12), 6.19 (1H, s, H15), 5.94 (1H, t, J = 6.3 Hz, H7), 4.18 (2H, d, J = 8.1 Hz, H5), 3.55 (2H, q, J = 6.8 Hz, H9), 3.19 (2H, t, J = 7.1 Hz, H10), 2.67 (2H, t, J = 6.7 Hz, H6), 2.58 (3H, s, H14), 2.48 (3H, s, H16), 2.43 (2H, t, J = 6.8 Hz, H7), 2.32 – 2.15 (4H, m, H1, H1'), 1.64 – 1.49 (2H, m, H2, H2'), 1.43 – 1.30 (3H, m, H2, H2', H4), 1.06 – 0.89 (2H, m, H3, H3').

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.2, 171.9, 161.4, 145.3, 142.7, 138.5, 134.3, 124.4, 124.0, 116.2, 98.9, 63.0, 60.2, 41.5, 31.1, 29.8, 29.5, 29.2, 21.5, 20.3, 17.5, 16.4, 15.2.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_3$ ([M-F]): 476.2521; found: 476.2532.

Compound 45 - Imino-3,3,6,6-tetramethyl-4,5-didehydro-2,3,6,7-tetrahydro-1H-1*λ*⁶-thiepine oxide (TMTHSI)



A stirred solution of $[(4E,5E)$ -5-hydrazinylidene-3,3,6,6-tetramethylthiepan-4-ylidene]hydrazine (400 mg, 1.75 mmol, 1.0 equiv.) and ammonium acetate (1.08 g, 14.0 mmol, 8.0 equiv.) in dry MeOH (1.6 mL) was prepared and cooled at 5 °C. A suspension of PIDA (1.97 g, 6.13 mmol, 3.5 equiv.) in dry MeOH (1.6 mL) and dry DCM (4.0 mL) was added dropwise, following carefully the release of N_2 . Resulting mixture was stirred at RT for 1 h. Brine (40 mL) was added then product extracted with ethyl acetate (3x35 mL). Organic layers were combined, dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum (bath at 20 °C, vacuum above 200 mbar: volatile compound). Crude product was purified by Flash Column Chromatography (12 g silica, 100% Cyclohexane to 100% EtOAc in 25 min) to afford **45** (128 mg, 0.64 mmol, 87% purity, 32% yield) as a slightly yellow solid.

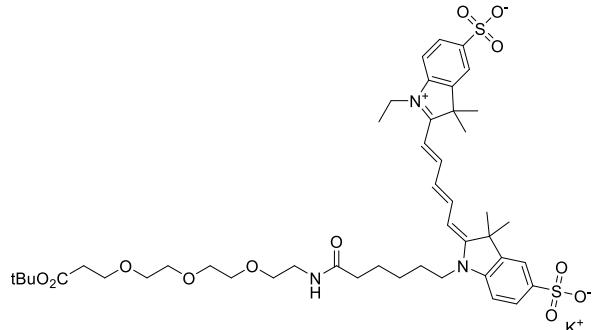
R_f = 0.30 (100% EtOAc).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3.22 (2H, d, J = 14.0 Hz, H1,H4), 3.12 (2H, d, J = 14.1 Hz, H1,H4), 1.39 (6H, s, H3), 1.23 (6H, s, H2).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} 101.7, 71.2, 34.8, 27.7, 26.7.

LRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NOS}$ ([M+H] $^+$): 200.11; found: 200.96.

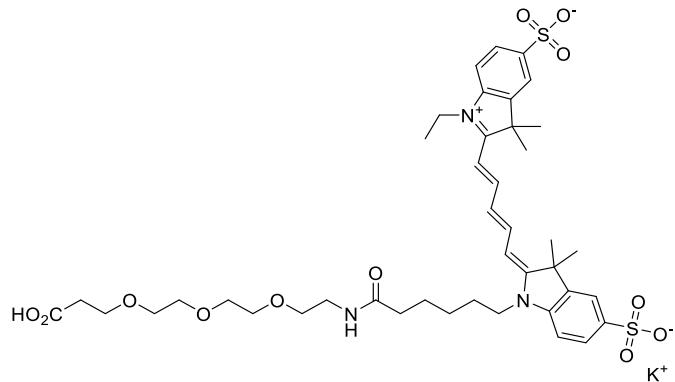
Compound 46 - 2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-(2,2-dimethyl-4,17-dioxo-3,7,10,13-tetraoxa-16-azadocosan-22-yl)-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dienyl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indolium-5-sulfonate



To a stirred solution of 2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (30.0 mg, 45.7 μ mol, 1.0 equiv.) in dry DMF (200 μ L), a solution of HATU (19.1 mg, 50.3 μ mol, 1.1 equiv) in dry DMF (100 μ L) was added. DIPEA (24 μ L, 137.1 μ mol, 3 equiv.) was then added and the resulting mixture was stirred at 25 °C for 15 min. A solution of tert-butyl 3-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)propanoate **51** (25.4 mg, 91.4 μ mol, 2.0 equiv.) in dry DMF was added (300 μ L). The mixture was then stirred at 25 °C for 1 h then directly purified by Preparative HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **46** (20 mg, 21.0 μ mol, 46% yield) as a blue solid.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{46}H_{64}N_3O_{12}S_2$ ($[M+H]^+$): 914.3937; found: 914.3911.

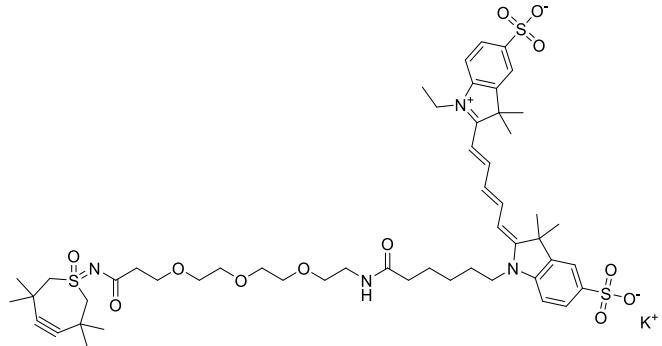
Compound 47 - 2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-(carboxy-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-yl)-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dienyl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indolium-5-sulfonate



To a stirred solution of **46** (20 mg, 21 μ mol, 1 equiv.) in MeOH (125 μ L), a solution of LiOH (5.0 mg, 210 μ mol, 10 equiv) in mQ water (125 μ L) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 20 h then directly purified by Preparative HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **47** (11.4 mg, 12.7 μ mol, 60% yield) as a blue solid.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{42}H_{56}N_3O_{12}S_2$ ($[M+H]^+$): 859.3384; found: 859.3385.

Compound 48 - TMTHSI-PEG₃-diSulfoCy5

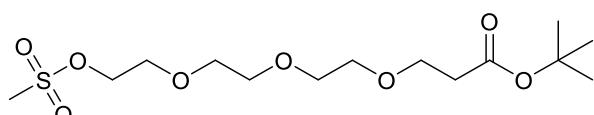


Solutions of EDC hydrochloride (0.72 mg, 3.75 μ mol, 1.0 equiv.) in dry DMF (12 μ L), HOEt (0.56 mg, 4.13 μ mol, 1.1 equiv.) in dry DMF (12 μ L), triethylamine (2.6 μ L, 18.8 μ mol, 5.0 equiv.) in dry DMF (12 μ L) and **47** (3.22 mg, 3.75 μ mol, 1.0 equiv.) in dry DMF (15 μ L) were mixed and resulting mixture was stirred at 25 °C for 15 min. A solution of TMTHSI **45** (3.7 mg, 18.8 μ mol, 5.0 equiv.) in dry DMF (16 μ L) was added then the final mixture stirred at 37 °C for 20 h before being purified by Preparative

HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **48** (1.89 mg, 1.75 μ mol, 49% yield) as a blue solid.

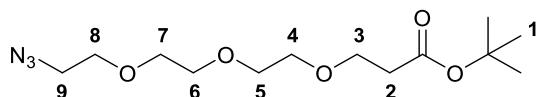
HRMS (ESI+) calc. for $C_{52}H_{71}N_4O_{12}S_3$ ($[M+H]^+$): 1040.4309; found: 1040.4281.

Compound 49 - Tert-butyl 3-(2-(2-((methylsulfonyl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxypropanoate



To a stirred solution of tert-butyl 3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)propanoate (1 g, 3.61 mmol, 1.0 equiv.) and triethylamine (2.5 mL, 18.0 mmol, 5.0 equiv.) in dry DMF (12 mL) was added dropwise mesyl chloride (0.56 mL, 7.19 mmol, 2.0 equiv.) at 0 °C. Resulting mixture was stirred at RT for 2 h then diluted in ethyl acetate (40 mL). Organic phase was washed with brine (5x50 mL) then dried on MgSO₄, filtered, concentrated under vacuum. **49** was obtained as a translucent oil (1.29 g) and directly used for the next step.

Compound 50 - Tert-butyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate



To a stirred solution of tert-butyl 3-(2-(2-((methylsulfonyl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoate **49** (1.29 g, 3.61 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (11.2 mL) was added NaN₃ (469.4 mg, 7.22 mmol, 2.0 equiv.). Resulting mixture was stirred at 60 °C overnight then cooled to RT, filtered on a long celite pad, rinsed with cold DCM (5x20 mL) and concentrated under vacuum to afford **50** (935 mg, 3.08 mmol, 85% yield) as a slightly yellow oil.

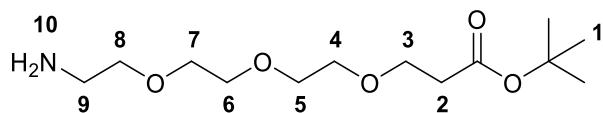
R_f = 0.25 (98/2 DCM/MeOH).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 3.75 – 3.58 (12H, m, H3, H4, H5, H6, H7, H8), 3.39 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, H9), 2.50 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H2), 1.45 (9H, s, H1).

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{C} 171.1, 80.7, 70.9, 70.8, 70.8, 70.5, 70.2, 67.1, 50.9, 36.4, 28.2.

LRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 326.17; found: 326.17.

Compound 51 - Tert-butyl 3-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)propanoate



Tert-butyl 3-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)propanoate **50** (935 mg, 3.08 mmol, 1.00 equiv.) was solubilized in degassed dry MeOH (71 mL). Pd/C (22.5 mg, 0.03 mmol, 0.01 equiv.) was added and atmosphere flushed with Argon before being replaced by H_2 . Mixture was stirred at RT overnight, filtered on a celite pad, rinsed with MeOH (5 x 50 mL), concentrated under vacuum. Crude product was purified by Flash Column Chromatography (24 g silica, 100% DCM to 90/0/1 DCM/ $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ in 30 min) to afford **51** (592 mg, 2.13 mmol, 70% yield) as a yellow oil.

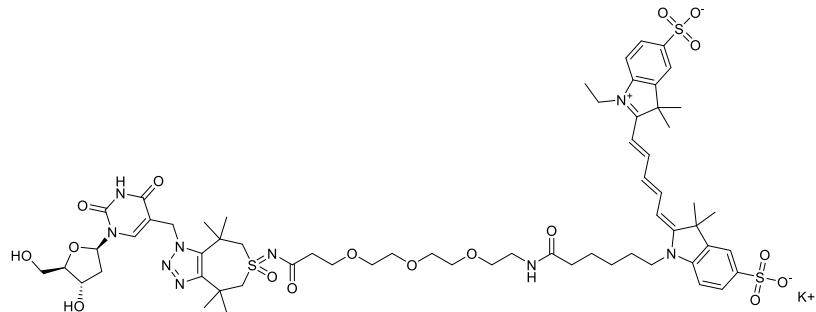
R_f = 0.25 (95/5 DCM/ MeOH).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3.71 (2H, t, J = 6.5 Hz, H3), 3.67 – 3.59 (8H, m, H4, H5, H6, H7), 3.51 (2H, t, J = 5.3 Hz, H8), 2.87 (2H, t, J = 5.1 Hz, H9), 2.50 (2H, t, J = 6.5 Hz, H2), 1.60 (2H, bs, H10), 1.44 (9H, s, H1).

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{C} 171.1, 80.7, 73.4, 70.7, 70.7, 70.5, 70.4, 67.0, 41.9, 36.4, 28.2.

LRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 278.20 ; found: 278.21.

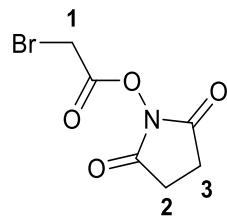
Compound 52 - Ethyl-2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-(1-((1-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)methyl)-4,4,8,8-tetramethyl-6-oxido-4,5,7,8-tetrahydro-1*H*-6 λ^4 -thiepino[4,5-d][1,2,3]triazol-6-ylidene) amino)-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-13-azanonadecan-19-yl)-3,3-dimethyl-5-sulfonatoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dienyl)-3,3-dimethyl-3*H*-indolium-5-sulfonate



To a stirred solution of **48** (0.87 mg, 0.84 μ mol, 1 equiv.) in dry DCM (36.4 μ L), a solution of 5-AmdU in DMSO (47.6 μ L of a solution at 35.3 mM, 1.68 μ mol, 2 equiv.) was added. The mixture was stirred at 25 °C overnight then directly purified by Preparative HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **52** (0.72 mg, 0.54 μ mol, 65% yield) as a blue solid.

HRMS (ESI-) calc. for $C_{62}H_{84}N_9O_{17}S_3^-$ ($[M-H]^-$): 1322.5153; found: 1322.5098.

Compound 53 - 2,5-dioxopyrrolidinyl 2-bromoacetate



To a stirred solution of bromoacetic acid (0.52 mL, 7.2 mmol, 1.0 equiv.) in dry 1,4-dioxane (7 mL) was added N-hydroxysuccinimide (994.4 mg, 8.6 mmol, 1.2 equiv.). After complete solubilization, a suspension of DCC (1.63 g, 7.9 mmol, 1.1 equiv.) in dry 1,4-dioxane (1.2 mL) was added. The resulting mixture was stirred at RT for 1.5 h, filtered, solid rinsed with EtOAc (2x 25 mL) and concentrated under vacuum. White

solid obtained was resuspended in DCM, heated at 40 °C until full solubilization of the solid. After cooling down the mixture, it was filtered, solid rinsed with cold DCM (2 x 10 mL) and concentrated under vacuum to afford **53** (1.6 g, 6.78 mmol, 94% yield) as a white solid.

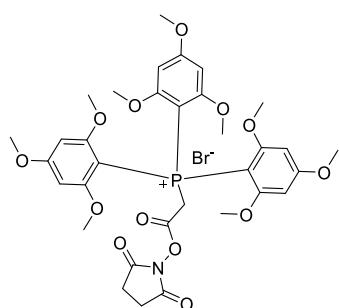
R_f 0.22 (50/50 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 4.10 (2H, s, H1), 2.85 (4H, s, H2, H3).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 168.6, 163.1, 25.7, 21.3.

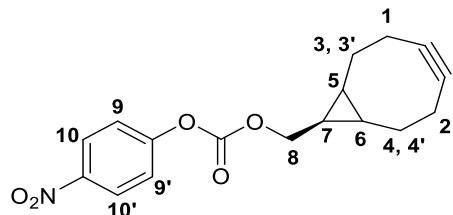
HRMS (ESI+) calc. for C₆H₆BrNO₄ ([M+H]⁺): 235.9553; found: 295.9563.

Compound 54 - (2-((2,5-dioxopyrrolidinyl)oxy)-2-oxoethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide



To a stirred solution of 2,5-dioxopyrrolidinyl 2-bromoacetate **53** (66.5 mg, 0.28 mmol, 1.0 equiv.) in dry toluene (1.4 mL) was added tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphane (150 mg, 0.28 mmol, 1.0 equiv.) in one portion as a solid. The resulting mixture was stirred at RT for 3 h, crude cooled at -20 °C for 2.5 hours then filtered. Solid was rinsed with cold toluene (5 x 10 mL) and well dried to obtain **54** as a white solid (174 mg) directly used for the next step.

Compound 55 - ((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate



To a stirred solution of ((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methanol (120 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (3 mL) were added 4-nitrophenyl chloroformate (193.5 mg, 0.96 mmol, 1.2 equiv.) and dry pyridine (0.64 mL, 8.0 mmol, 10.0 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT overnight. The crude was concentrated under vacuum, resuspended in ethyl acetate (20 mL) then NH₄Cl (aq. sat., 20 mL) was added. Phases were separated and product extracted with ethyl acetate (3x 20 mL). Organic phase was washed with brine (20 mL), dried on MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g silica, 100% Cyclohexane to 90/10 Cyclohexane/ Ethyl acetate) to afford **55** (193.7 mg, 0.61 mmol, 77% yield,) as a white solid.

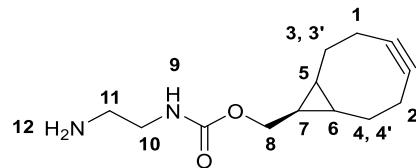
*R*_F 0.32 (95/5 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ _H 8.28 (2H, ddd, *J* = 15.6, 9.3, 4.8 Hz, H9, H9'), 7.39 (2H, ddd, *J* = 15.6, 9.3, 4.8 Hz, H10, H10'), 4.41 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H8), 2.39 – 2.19 (6H, m, H1, H2, H3, H4), 1.65 – 1.46 (3H, m, H3', H4', H7), 1.12 – 1.01 (2H, m, H5, H6).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ _C 155.6, 152.5, 145.3, 125.2, 121.7, 98.7, 67.9, 29.0, 21.3, 20.5, 17.2.

HRMS (ESI+) calc. for C₁₇H₁₇NO₅ ([M+H]⁺): 316.1179; found: 316.1181.

Compound 56 - ((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (2-aminoethyl) carbamate



To a stirred solution of ethylene diamine (0.21 mL, 3.2 mmol, 10.0 equiv.) and triethylamine (0.44 mL, 3.2 mmol, 10.0 equiv.) in dry DMF (0.4 mL) was added a solution of ((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate **55** (102 mg, 0.32 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (0.4 mL) dropwise. Resulting mixture was stirred at RT for 2 h, concentrated under vacuum. Crude was diluted in DCM (5 mL), NaH₂PO₄ was added (aq. sol., 1 M, 2 mL), phases were separated then product extracted with DCM (3 x 5 mL). Aqueous layer was basified to pH= 9 with NaOH (aq. sol., 1 M, 2 mL) then product extracted with DCM (3 x 5 mL). Organic layers were washed with brine (10 mL), dried on MgSO₄, filtered, concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (12 g deactivated silica, 100% DCM to 90/9/1 DCM/MeOH/NH₄OH in 30 min) to afford **56** (50.5 mg, 0.21 mmol, 71% yield) as a yellow oil.

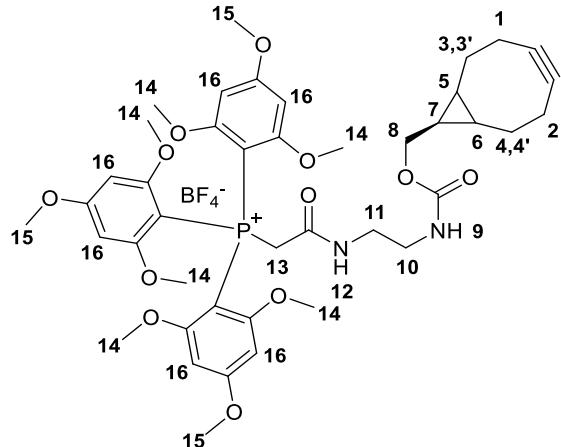
*R*_f = 0.28 (70/30 CyH/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 5.13 (1H, bs, H9), 4.13 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H8), 3.22 (2H, q, *J* = 5.9 Hz, H10), 2.81 (2H, t, *J* = 5.9 Hz, H11), 2.34 – 2.14 (6H, m, H1, H2, H3, H4), 1.62 – 1.47 (4H, m, H3', H4', H12), 1.34 (1H, p, *J* = 8.5 Hz, H7), 0.93 (2H, m, H5, H6).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 157.1, 98.9, 62.8, 43.8, 41.8, 29.2, 21.5, 20.2, 17.9.

HRMS (ESI+) calc. for C₁₃H₂₀N₂O₂ ([M+H]⁺): 237.1598 found: 237.1601.

Compound 57 - (2-((2-((((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)-2-oxoethyl) tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium (BCN-TMPP)



To a stirred solution of (2-((2,5-dioxopyrrolidinyl)oxy)-2-oxoethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide **54** (174 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.) in dry dioxane (1.4 mL) was added a solution of ((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (2-aminoethyl)carbamate **56** (54.4 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.) in dry dioxane (1.5 mL). After 3 h of stirring at RT, a solution of AgBF₄ (44.5 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.) in dry dioxane (1 mL) and MeCN (0.18 mL) was added dropwise. Resulting mixture was stirred at RT for 1 h, cooled to -20 °C for 0.5 h then filtered. Solid was rinsed with cold diethyl ether (5 x 10 mL), well dried to obtain **57** as a white solid (147 mg, 0.16 mmol, 59% yield).

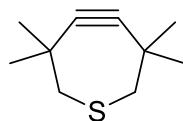
*R*_f = 0.24 (98/2 DCM/MeOH).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.38 (1H, bs, H12), 6.06 (6H, m, H16), 5.82 (1H, bs, H9), 4.36 (2H, m, H13), 4.07 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H8), 3.84 (9H, m, H15), 3.61 (18H, d, *J* = 9.6 Hz, H14), 3.21 (2H, m, H10), 2.63 (2H, m, H11), 2.36 – 1.97 (6H, m, H1, H2, H3, H4), 1.54 (2H, m, H3', H4'), 1.33 (1H, m, H7), 0.89 (2H, m, H5, H6).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_C 165.5, 163.8, 157.1, 117.9, 99.0, 91.0, 62.2, 56.0, 55.6, 49.0, 40.9, 39.9, 29.2, 21.5, 20.2, 17.9.

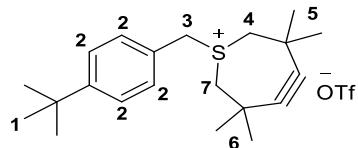
HRMS (ESI+) calc. for C₄₂H₅₄N₂O₁₂P⁺ ([M]): 809,3409; found: 809.3416.

Compound 58 - 3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne (TMTH)



Pb(OAc)₄ (975.4 mg, 2.2 mmol, 2.5 equiv.) was dissolved in CHCl₃ (20 mL), cooled to 0 °C then added to a solution of (1Z,1'Z)-(3,3,6,6-tetramethylthiepane-4,5-diylidene)bis(hydrazine) (200 mg, 0.88 mmol, 1.0 equiv.) in CHCl₃ (20 mL) at 0 °C. Mixture was stirred at 0 °C for 10 min, quenched with NaHCO₃ (aq. sat., 20 mL) and stirred for 5 min at 0 °C. Layers were separated, product extracted with DCM (3x30 mL). Organic phases were washed with brine, dried on MgSO₄, concentrated under vacuum (bath at 20 °C, vacuum above 200 mbar: very volatile compound). Crude product was purified on a silica pad (100% DCM) then concentrated under vacuum with same precautions as before. As it was not possible to fully dry the product, it was used without further analyses.

Compound 59 - 1-[4-(methoxycarbonyl)benzyl]-3,3,6,6-tetramethyl-4,5-didehydro-2,3,6,7 tetrahydrothiepinium trifluoromethanesulfonate (TMTI)



LiOTf (1.37 g, 8.80 mmol, 10.0 equiv.) and bromomethyl-4-(tert-butyl)benzene (0.65 mL, 3.52 mmol, 4.0 equiv.) were dissolved in water (1.5 mL) then added to a stirred solution of TMTH **58** (148.1 mg, 0.88 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (1.5 mL). The resulting mixture was stirred at RT for 24 h, fast enough to create an emulsion. Phases were then separated, product extracted with DCM (3x20 mL). Organic phases were washed with brine (20 mL), dried on MgSO₄, filtered, concentrated under vacuum. Crude product was purified by Flash Column Chromatography (12 g silica, solid loading, 100% DCM for 3 min then 100% to 90/10 DCM/MeOH in 20 min) to afford **59** (154 mg, 0.33 mmol, 38% yield) as a white solid.

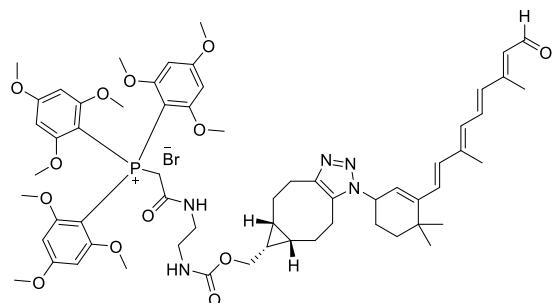
R_f = 0.29 (98/2 DCM/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.44 – 7.38 (4H, m, H2), 4.84 (2H, s, H3), 4.09 (2H, d, J= 12.5 Hz, H4), 3.64 (2H, d, J= 12.4 Hz, H7), 1.33 (6H, s, H5), 1.28 (9H, s, H1), 1.26 (6H, s, H6).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 153.8, 130.4, 127.0, 124.1, 106.3, 61.6, 44.2, 35.0, 34.7, 31.3, 26.5, 25.5.

HRMS (ESI+) calc. for C₂₁H₃₁S⁺ ([M]): 315.2141; found: 315.2145.

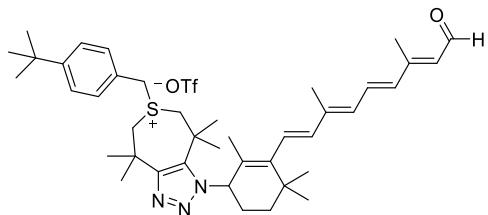
Compound 60 - (2-((2-(((((5aR,6S,6aS)-1-(3-((1E,3E,5E,7E)-3,7-dimethyl-9-oxonona-1,3,5,7-tetraen-1-yl)-4,4-dimethylcyclohex-2-enyl)-1,4,5,5a,6,6a,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-6-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide



To a stirred solution of azido retinal **1** (3.5 mg, 10.8 μmol, 1.0 equiv.) was added BCN-TMPP **57** (10.6 mg, 12.9 μmol, 1.2 equiv.) then mixture diluted in dry DCM (1.3 mL). The mixture was stirred at 25 °C overnight then directly purified by Preparative HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **60** (2.5 mg, 2.1 μmol, 19% yield) as a yellow solid.

HRMS (ESI+) calc. for C₆₁H₇₉N₃O₁₃P⁺ ([M]): 1134.5563; found: 1134.5543.

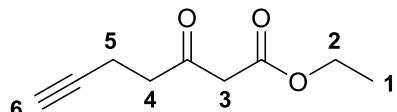
Compound 61 - 6-(4-(tert-butyl)benzyl)-1-(3-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*)-3,7-dimethyl-9-oxonona-1,3,5,7-tetraen-1-yl)-2,4,4- trimethylcyclohex-2-en-1-yl)-4,4,8,8-tetramethyl-1,4,5,6,7,8-hexahydrothiepino[4,5-*d*][1,2,3]triazol-6-ium trifluoromethylsulfonate



To a stirred solution of azido retinal **1** (3 mg, 9 μ mol, 1.0 equiv.) was added TMTI **59** (5 mg, 10 μ mol, 1.1 equiv.) then mixture diluted in dry DCM (0.9 mL). The mixture was stirred at 25 °C overnight then directly purified by Preparative HPLC (95/5 Water 0.1% TFA/ MeCN to 5/95 Water 0.1% TFA/ MeCN in 25 min) and lyophilized overnight to afford **61** (4.6 mg, 5.9 μ mol, 65% yield) as a yellow solid.

HRMS (ESI+) calc. for $C_{41}H_{58}N_3OS^+$ ([M]): 640.4295; found: 640.4310.

Compound 62 - ethyl 3-oxohept-6-ynoate



To a stirred solution of DIPA (2.18 mL, 15.4 mmol, 2 equiv.) in dry THF (14.4 mL) at 0 °C was added n-BuLi (2.5 M in hexane, 6.2 mL, 15.4 mmol, 2 equiv.). Mixture was stirred at 0 °C for 30 min then ethylacetacetate (0.97 mL, 7.7 mmol, 1 equiv.) was added. After 30 min of stirring at 0 °C, propargyl bromide (0.84 mL, 7.7 mmol, 1 equiv.) was added then the mixture was stirred at 0 °C for 1 h. Reaction was quenched at 0 °C with acetic acid (0.88 mL, 15.4 mmol, 2 equiv.) followed by water (25 mL). Resulting mixture was diluted in Et_2O (25 mL), phases were separated, product extracted with Et_2O (3x 25 mL), organic phase washed with brine (25 mL), dried on $MgSO_4$, filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (24 g silica, solid loading, 100% CyH for 3 min then 100% CyH to 87/13 CyH/EtOAc in 30 min) to afford **62** (811 mg, 4.8 mmol, 62% yield) as a slightly yellow oil.

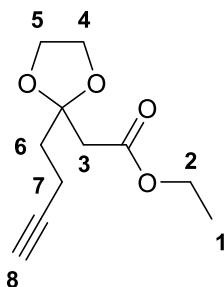
R_f 0.22 (95/5 CyH/EtOAc).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_H 4.20 (2H, q, J = 7.1 Hz, H2), 3.46 (2H, s, H3), 2.81 (2H, t, J = 7.0 Hz, H4), 2.47 (2H, td, J = 7.2, 2.7 Hz, H5), 1.95 (1H, t, J = 2.7 Hz, H6), 1.28 (3H, t, J = 7.1 Hz, H1).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ_C 200.7, 167.0, 82.7, 69.1, 61.6, 49.4, 41.7, 14.2, 13.0.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 169.0859; found: 169.0873.

Compound 63 - ethyl 2-(2-(but-3-ynyl)-1,3-dioxolan-2-yl)acetate



To a stirred solution of triethylorthoformate (1.58 mL, 9.52 mmol, 2.0 equiv.) in ethylene glycol (1.06 mL, 19.0 mmol, 4.0 equiv.) was added ethyl 3-oxohept-6-ynoate **62** (800 mg, 4.76 mmol, 1.0 equiv.) followed by APTS (82.7 mg, 0.48 mmol, 0.1 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT overnight then NaHCO_3 (aq. sat., 5 mL) was added. Phases were separated, product extracted with Et_2O (3x 15 mL), organic phase washed with brine (15 mL), dried on MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (24 g silica, solid loading, 100% CyH for 3 min then 100% CyH to 85/15 CyH/EtOAc in 30 min) to afford **63** (826 mg, 3.89 mmol, 82% yield) as a translucent oil.

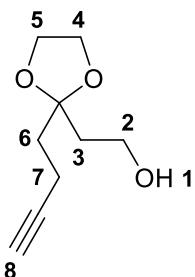
R_f 0.30 (85/15 CyH/EtOAc)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_H 4.15 (2H, q, J = 7.1 Hz, H2), 4.02 – 3.96 (4H, m, H4, H5), 2.65 (2H, s, H3), 2.34 – 2.27 (2H, m, H7), 2.16 – 2.08 (2H, m, H6), 1.93 (1H, t, J = 2.6 Hz, H8), 1.27 (3H, t, J = 7.1 Hz, H1).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ_C 169.3, 108.4, 84.1, 68.2, 65.3, 60.8, 42.8, 36.5, 14.3, 12.9.

HRMS (ESI+) calc. for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 213.1121; found: 213.1127.

Compound 64 - 2-(2-(but-3-ynyl)-1,3-dioxolan-2-yl)ethanol



To a stirred solution of ethyl 2-(2-(but-3-ynyl)-1,3-dioxolan-2-yl)acetate **63** (2.1g, 9.9 mmol, 1.0 equiv.) in Et₂O (5.6 mL) was added LiAlH₄ (4M in Et₂O, 2.7 mL, 10.9 mmol, 1.1 equiv.) dropwise at 0 °C. Resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h then allowed to warm up to RT for another hour. Reaction was then quenched carefully at 0 °C by dropwise addition of EtOAc over 15 min (25 mL). Aluminum salts were then quenched by a dropwise addition of Rochelle's salt (aq. sat., 25 mL) over 10 min under strong stirring. Phases were separated, product extracted with Et₂O (3x 50 mL), organic phase washed with brine (50 mL), dried on MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (40 g silica, solid loading, 100% CyH for 3 min then 100% CyH to 60/40 CyH/EtOAc in 30 min) to afford **64** (1.42 g, 8.3 mmol, 84% yield) as a translucent oil.

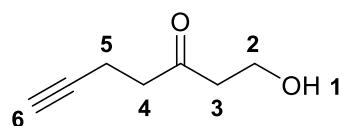
R_f = 0.23 (65/35 CyH/EtOAc)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 4.08 – 3.94 (4H, m, H4, H5), 3.76 (2H, t, J = 5.6 Hz, H2), 2.31 – 2.22 (2H, m, H7), 1.98 – 1.88 (5H, m, H3, H6, H8).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ_C 111.2, 84.1, 68.4, 65.1, 58.8, 38.4, 36.0, 13.3.

HRMS (ESI+) calc. for C₉H₁₄O₃ ([M+H]⁺): 171.1016 ; found: 171.1022

Compound 65 - Hydroxyhept-6-yn-3-one



To a stirred solution of 2-(2-(but-3-ynyl)-1,3-dioxolan-2-yl)ethanol **64** (1.79 g, 10.5 mmol, 1.0 equiv.) in acetone (18 mL) was added APTS monohydrate (180.8 mg, 1.05 mmol, 0.1 equiv.). Resulting mixture was stirred at RT overnight then NaHCO₃ (aq.

sat., 20 mL) was added, followed by EtOAc (30 mL). Phases were separated, product extracted with EtOAc (3x 30 mL), organic phase washed with brine (30 mL), dried on MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. Crude product was purified by Column Chromatography (25 g silica, solid loading, 100% CyH for 3 min then 100% CyH to 50/50 CyH/EtOAc in 30 min) to afford **65** (964 mg, 7.6 mmol, 73% yield) as a slightly yellow oil.

R_f = 0.22 (65/35 CyH/EtOAc)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H 3.87 (2H, t, J = 5.4 Hz, H2), 2.76 – 2.66 (4H, m, H3, H4), 2.47 (2H, td, J = 7.2, 2.6 Hz, H5), 1.96 (1H, t, J = 2.7 Hz, H6).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ _C 209.2, 82.9, 69.0, 57.8, 44.7, 41.9, 12.9.

HRMS (ESI+) calc. for C₇H₁₀O₂ ([M+H]⁺): 127.0754 ; found: 127.0754.

6.1.6. Detection and attribution of intermediates in azidation mechanism

These experiments were carried out at the Institute of Supramolecular Science and Engineering (ISIS) in Strasbourg with Cyril Antheaume.

6.1.6.1. NMR

The NMR analyses were performed on a Bruker 500 MHz NMR with 24 positions and an Advance Neo console. The instrument is equipped with a Cryo-Probe Prodigy X-1H 5mm (with 31P < X < 15N).

6.1.6.2. Mass

Mass analyses were performed on a ThermoFisher Ultimate3000 UPLC with reversed-phase column. The column used was a 3 μ m Thermo Fisher C18 Accuore RP-MS, 2.1 \times 150 mm, 2.6 μ m. The instrument is equipped with two detectors: a ThermoFisher Vanquish PDA and a ThermoFisher Orbitrap: Exactive Plus with Extend Mass Range: Source HESI II.

Mass spectra were recorded in full-scan MS mode from *m/z* 50 to *m/z* 6000 at a temperature of 4 °C in ESI (positive and negative). The mass resolution is set to <3 ppm for *m/z* 350–6000.

The gradient used is the following: 0-0.25 min - 98% of A ; 0.25-7 min - 98% to 0% of A ; 7 to 9 min - 0% of A ; 9 to 9.5min - 0% to 98% of A ; 9.5 to 10 min - 98% of A ; with A : H₂O MQ+0,05% Formic acid and B : ACN +0,05% Formic acid.

6.2. Biology

6.2.1. Culture and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells for fluorescent microscopy

P19 embryonal carcinoma cells (from LGME, Strasbourg, France) were cultured undifferentiated in T-75 dishes (BD Falcon) with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low in glucose (1 g/L) containing 5% fetal serum (FCS 3396) and 5% delipidated fetal serum (dFCS) supplemented with 40 µg/mL gentamicin. At 80% confluence, the cells were passaged twice weekly. The cells were first washed in phosphate-buffered saline (PBS) and then lysed with 1 mL of 0.001% trypsin for 1 minute at 37°C. The reaction was then stopped by adding 9 mL of DMEM culture medium, and the suspended cells were collected and centrifuged at 1,000 rpm for 5 min at room temperature. The cell pellet was then resuspended in DMEM culture medium and the cells were seeded in 10 mL of DMEM culture medium per T-75 flask for a proliferation phase of undifferentiated cells in an incubator at 37°C with 5% CO₂.

A third '+' passage per week was also performed to avoid auto differentiation of the P19 cells. In this case, the same procedure as above was followed, but the cells were resuspended at the end at a density of 3x10⁶ cells per P10 Petri dish for 24 h at 37°C in the incubator. After the formation of embryoid bodies in suspension (self-differentiated cells adhering to the bottom of the Petri dish), these cell aggregates were collected by sedimentation and washed with PBS before being incubated in 1 mL of trypsin in a water bath at 37°C with vigorous shaking for 3 minutes. 9 mL of DMEM culture medium was then added to inactivate the trypsin and mechanically dissociated aggregates. The dissociated cells were then filtered, centrifuged and seeded at the

desired density for a new proliferation phase in undifferentiated form in DMEM culture medium.

To induce differentiation, cells were treated as for the '+' passage until they were seeded at a density of 3×10^6 cells per Petri dish in 10 mL of alpha-MEM 1900 medium (Gibco ref. 22571-038) supplemented with 10% FCS. At this time, retinoids were added directly to the cell medium at a final concentration of 5 μ M. After mixing, the cells were incubated for 16 hours in a 37°C incubator with 5% CO₂.

The various retinoids studied were resuspended in DMSO at a stock concentration of 10⁻² M for short-term storage in the freezer at -20°C. For these treatments on cells in the dark, different concentrations were tested, ranging from 10⁻⁶ M to 10⁻⁹ M by dilution in the cell culture medium. DMSO was used as a negative control in these experiments, incubated under the same conditions as the treatments. 5-AmdU (5-azidomethyl-2'-deoxyuridine; Jena Bioscience, ref. CLK064) was used as a positive control in these experiments, as it is an azide-containing thymidine analogue that can react with a probe functionalized with a strained alkyne group for SPAAC. It was then added to the cell medium at a final concentration of 10 μ M and incubated for 2 hours at 37°C.

After incubation with the different treatments, the cell aggregates were collected by sedimentation and then dissociated in the same way as after a "+" passage. The cells were then seeded at a concentration of 1×10^5 cells per well in a glass-bottomed Petri dish separated into 4 compartments (Cellvis, ref. D35C4-20-1.5-N) for real-time imaging or 1.5×10^5 cells per coverslip (Assitent ref. 41001112) for imaging on fixed cells. In both cases, the seeding surfaces were previously coated with poly-L-lysine (Sigma ref. P8920) and incubated for 16 hours, then rinsed with deionized water and dried before adding the cultured cells.

Cells were resuspended in differentiation medium consisting of DMEM-GLUTAMAX I-HAM-F1 (1:1) supplemented with 100 μ L N₂ and 10 μ L fibronectin (Sigma, ref. F11-41) per 10 mL of medium. They were then incubated at 37°C for 3 h for short seeding or 24 h for long seeding, depending on the conditions tested, before being used for the click reaction.

6.2.2. *In vitro SPAAC and cell labelling for fluorescence microscopy*

The click reaction was performed both on live cells and on previously fixed cells.

6.2.2.1. *Living cells*

In living cells, the functionalized probes under investigation were incubated at different concentrations depending on the experiment, ranging from 0.1 μ M to 100 μ M final in the cell culture medium. 4 functionalized probes were tested for fluorescence imaging: one commercial, BCN-CF650 (Biotium, ref. 96027), and three synthetic. Each fluorescent probe was diluted in serum-reduced Opti-MEM without red phenol to avoid interference (ThermoFisher, ref. 11058021), from stock solutions of the probes at 10⁻² M in DMSO. Reaction times ranging from 30 min to 1 h were tested, followed by a rapid rinse in Opti-MEM to remove excess probes, then 2x30 min washes in cell differentiation medium. Experiments where the functionalized probe was added directly under the microscope at the time of imaging were also carried out at different probe concentrations to monitor internalization over 2 h at a rate of one image every 5 min.

In the case of the profluorescent probe and TMTHSI, adducts of the functionalized probe already clicked with N₃ RAL were also incubated in P19 cells. Different incubation times for these adducts were tested, ranging from 30 minutes to 2 hours, with adducts even being added directly under the microscope at the time of imaging and images taken every 5 minutes.

In each experiment, cells were labelled with Hoechst 33342 at 0.1 μ g/mL, with 5 to 10 minutes being sufficient to label the nuclei. Lysosomes were labelled with LysoTracker Green DND-26 (Thermofisher, ref. L7526, stock solution in DMSO) and mitochondria with MitoTracker Orange CMTMRos (Thermofisher, ref. M7510, stock solution in DMSO), both at a final concentration of 100 nM in cell culture medium for 1 h incubation.

6.2.2.2. *Fixed cells*

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences, ref. 15710) for 10 min at room temperature before rinsing with PBS for 3 x 5 min. In some experiments, cell permeabilisation conditions were also used with 0.1% Triton X-100

(Sigma, ref. T8787). The study fluorescent probe was then incubated on fixed cells at different concentrations and incubation times using the same procedure as described for live cells. Only LysoTracker Green labelling had to be performed on live cells prior to fixation. Nuclear labelling was performed on cells fixed with DAPI at 0.1 µg/mL for 5-10 minutes. The coverslips were then mounted onto glass slides for microscopic imaging using AquaPolyMount (Biovalley, ref. 18606-20).

6.2.3. Proof of concept of SPAAC *in vitro*

This experiment was performed on P19 embryonal carcinoma cells cultured as described above. Briefly, 24 h after seeding in glass-bottomed Petri dishes previously coated with poly-L-lysine, P19 cells were washed twice with methionine-free DMEM medium (Gibco, ref. 21013024) to remove excess methionine. P19 cells were then treated with 50 µM L-azidohomoalanine (AHA, TCI Chemicals, réf. A3550), an azide-containing amino acid analogue, diluted in methionine-free DMEM (Met-) and supplemented with 10% dialysed FBS (Gibco, ref. 26400044). Control cells were incubated in methionine-containing DMEM (Met+) supplemented with 10% FBS. After 4 h treatment at 37°C, the cells were washed twice in methionine-containing DMEM before being incubated for 1 h in DMEM (Met+) at 37°C. The fluorescent probe (1 µM TMTHSI) was then clicked onto the cells for 30 min at 37°C, rinsed and imaged under the microscope.

6.2.4. Optical and analytical images

Most images were taken using a Nikon spinning disk inverted confocal microscope, x100 oil objective. DAPI and Hoechst were excited at 405 nm, LysoTracker Green at 488 nm, MitoTracker Orange at 561 nm, the BCN-CF650 probe and the TMTHSI-PEG3-SulfoCy5 probe at 635 nm, while the BODIPY probe required a wavelength of 488 nm. As the profluorescent probe required UV excitation, only the SP8 UV inverted confocal microscope could be used, with images taken using the x63 oil objective. To avoid wavelength overlap, Draq5 (BioLegend, ref. 424101) was used to label the nuclei

at a wavelength of 645 nm at a final concentration of 5 μ M in the cell culture medium. Microscopic images were then analyzed using ImageJ software.

6.2.5. Fluorescent immunocytochemistry (FIC)

In the case of the TMTHSI-PEG₃-SulfoCy5 probe study, specific cell labelling was also performed after the click reaction on fixed cells. Cells were permeabilized with 0.05% PBS-Tween (Sigma, ref. P2287) and aspecific antibody binding was blocked with 10% FCS for 30 min at room temperature. Cells were then incubated with primary antibodies (**Table 1**) for 1 h at room temperature. After washing with 0.05% PBS-Tween for 3x5 min, the cells were incubated with secondary antibodies for 1 h in the dark at room temperature. After washing for 3x5 min, the coverslips were remounted on glass slides using AquaPolyMount (Biovalley, ref. 18606) and imaged using a Nikon inverted confocal spinning disk microscope, x100 objective in oil. Two coverslips per condition were prepared and 5 random fields per coverslip were imaged.

Antibody	Host	Reference	Supplier	FIC
Anti-TUJ1 β III	Mouse IgG2a	801201	BioLegend	1/500
Anti-MASH1	Mouse IgG1	556604	Synaptic Systems	1/1000
Anti-mouse IgG2a 488 nm	Goat	A21131	Invitrogen	1/1000
Anti-mouse IgG1 488 nm	Goat	A21121	Invitrogen	1/1000

Table 1 : References and concentrations of primary and secondary antibodies used for fluorescence immunocytochemistry (FIC).

6.2.6. Synchronization of P19 cells

P19 cells were seeded for 24 h before chemical treatment with 100 μ M Monastrol (Euromedex, ref. S8439-10mg) for 16 h. The cells were then collected and reseeded with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) on poly-L-lysine-coated coverslips. The cells were then fixed with 4% PFA at 5 different time points: t0=0 min; t1= 30 min; t2= 1 h; t3= 1 h30 and t4= 2 h. Finally, all fixed cells were incubated with the TMTHSI

probe at 10 μ M for 30 min at room temperature. The coverslips were mounted on glass slides using AquaPolyMount (Biovalley, ref. 18606) for imaging with a Nikon inverted confocal spinning disk microscope, x100 objective in oil. Two coverslips were used per time point, with 5 random fields imaged per coverslip.

6.2.7. Culture of HEK 293T cells

Easily transfectable HEK 293T cells (from the German Cancer Research Centre, DKFZ, in Heidelberg, Germany) were used for the luciferase and MTT assays in the biological validation section of the modified esters. After synthesis, the different retinoid esters were diluted in DMSO to a stock concentration of 10⁻² M and stored at -20°C. HEK 293T cells were cultured in T-75 dishes (BD Falcon) using low glucose DMEM (1 g/L) containing 10% fetal serum (FCS 8407) supplemented with 50 AU/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin. Cells were passaged twice a week.

6.2.8. Luciferase assay on HEK 293T cells

Transcriptional activity was measured using the Dual-Glo Luciferase Assay Kit (E2920 Promega). HEK 293T cells were seeded at a density of 20,000 cells/well in 96-well plates. 5 h after seeding, cells were transfected with Gal4-RAR α -DEF, 17mx5-b-Glob-Luc and pGL4.75 plasmids using Fugene HD transfection reagent (E2311 Promega). 16 h after transfection, cells were treated for 5 h with the different azide and non-azide esters diluted to a final concentration of 10-6 M in HEK 293T cell culture medium. Luciferase activity was then measured by luminescence emission on a luminometer using a GloMax multiple detection system (Promega). Data were presented as the ratio of firefly luciferase luminescence measurements to Renilla (used to standardise transfection efficiency) and normalised to the vehicle condition (DMSO).

6.2.9. Cell viability assay on HEK 293T cells

HEK 293T cells were seeded in 96-well flat-bottomed plates at a density of 104 cells/well and allowed to proliferate for 24 h in a 37°C incubator with 5% CO₂ before

being treated with the different esters. After 16 hours of incubation at 37°C, the cells were tested for viability by adding a solution of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) at 5 mg/mL in PBS to each well. After incubation for 3 hours at 37°C, 100 µL of DMSO was added to the wells to dissolve the formazan crystals that had formed. Optical densities were finally measured at 570 nm using a Multiskan GO microplate spectrophotometer (Thermo Scientific). A second measurement was made at 720 nm to subtract the background noise of the cells and thus obtain a ratio of the optical density of each compound. 4 measurements were made for each condition. DMSO was used as a vehicle control to normalise the results obtained.

6.2.10. Tissue samples

Adult male WT mice were collected to serve as biological matrices for MS analysis of azide retinoids. Mice were CO₂ asphyxiated prior to blood collection by cardiac puncture. Tubes containing heparin (Microvette 500 Lithium Heparin), an anticoagulant, were used for blood collection. After 20 minutes, the tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at room temperature. The supernatant, i.e. plasma, was then collected, with an average of 250 µL of plasma collected per animal, before being frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C. Samples of half-brain (without cerebellum or olfactory bulbs) and liver (approximately 200 mg collected per tube) were also collected and weighed, then frozen in liquid nitrogen and finally stored at -80°C.

6.2.11. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9.3.1 software. Experiments were performed in triplicate for luciferase assays and in triplicate for MTT assays. The different conditions were compared by one-way ANOVA analysis, followed by Brown-Forsythe and Welch post-hoc tests. Data are presented as mean ± SEM (Standard Errors of Means).

6.3. Mass analyses

6.3.1. Clicked retinoids analyses

Analysis of spiked retinoid samples was performed on an UltiMate 3000 liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a high-resolution Thermo Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The chromatographic separation was performed on a Phenomenex Kinetex C8 column (150 x 2.1 mm, 2.6 μ m) at 0.4 mL/min, 60°C, using an injection volume of 10 μ L. Mobile phases A and B were H₂O/MeOH 60:40 (v/v), 0.1% formic acid and isopropanol/MeOH 90:10 (v/v), 0.1% formic acid, respectively, in positive ionization mode. The gradient program was as follows: solvent B was maintained at 15% for 0 min, and from 0 to 20 min it was increased to 95%, and from 20 to 21 min solvent B was decreased to 45% and then maintained for 4 min for column re-equilibration. The mass resolving power of the mass spectrometer was 240,000 (full width at half maximum) for MS experiments. Samples were analyzed only in positive ionization mode. The ESI source parameters were as follows: the spray voltage was set to 5 kV in positive ionization mode. The heated capillary was kept at 320°C, and the sheath and auxiliary gas flow were set to 50 and 15 (arbitrary units), respectively. Mass spectra were recorded in full-scan MS mode from *m/z* 100 to *m/z* 1500. After LC-HRMS analysis of samples and annotation of features, QC samples were reinjected for higher-energy collisional dissociation (HCD) MS/MS experiments in positive ion mode on the same instrument set in targeted mode using inclusion lists. The isolation width was set at *m/z* 3.8, the stepped normalized collision energy for TMTI-N₃ RAL and BCN-TMPP-N₃ RAL was set at 25 % \pm 10% and 60 % \pm 20%, respectively. The mass resolution was set at 30,000 full width at half maximum at *m/z* 200. HCD mass spectra were inspected manually in order to confirm annotations

6.3.2. Extraction for spiked samples

All sample preparation steps for retinoid analysis were performed under red light to prevent clicked retinoids (TMTI-RAL and BCN-TMPP-RAL) isomerization and degradation. Mouse plasma (V=200 mL) was transferred to a 2 mL Eppendorf tube

and spiked with 5 mL standard solution of TMTI-N₃ RAL or BCN-TMPP-N₃ RAL (0.2 mM). Then 400 mL of acetonitrile was added to the suspension, and vortexed before centrifugation. After the sample was centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes at 5°C to pellet the plasma protein, the supernatant was collected. The supernatant was then dried in the dark using N₂ at 30 °C. The samples were stored in a freezer at -80°C for one day. Resuspension was performed using 100 mL of ammonium formate in ethanol (5 mM) for LC-MS and LC-MS/MS analysis of TMTI-N₃ RAL or BCN-TMPP-N₃ RAL. All experiments were performed in triplicate.

6.3.3. Analyses kinetics of the reaction in ethanol

The kinetics of the reaction of TMTI and BCN-TMPP with N₃ RAL was studied in ethanol and mouse plasma (as biological matrix). The procedure in EtOH was performed as follows, N₃ RAL was added to an Eppendorf tube (1.5 mL) on ice to reach a final concentration of 5 mM (V_{total} = 600 mL). The N₃ RAL solution was then vortexed and placed on ice for the click step. The TMTI or BCN-TMPP probe was added to achieve a final concentration of 10-fold excess of N₃ RAL (*i.e.*, [probe]_{final} = 50 mM). For this purpose, an intermediate solution 100 times more concentrated than the intended final solution was used to ensure minimal error. The reaction was vortexed and incubated at 37 °C, then 100 mL were collected at five different times (t= 0 min, 30 min, 1h, 2h, and 3h). The collected samples was immediately quenched with 100-fold excess (use 100 times more concentrated intermediary solution as for the probe) of azido-benzoic acid relative to the final concentration of N₃ RAL (*i.e.* [azido-benzoic acid]_{final} = 500 mM). The quenched aliquots were vortexed and dried using N₂ at 30 °C. The dried samples were then stored in a freezer at -80 °C for analysis. Resuspension was performed using ammonium formate in ethanol (V= 100 mL, [] = 5 mM) for LC-MS and LC-MS/MS analysis. All experiments were performed in triplicate and in dark using red light.

6.3.4. Analyses kinetics of the reaction in mouse plasma

The kinetics of the reaction for TMTI and N₃-RAL were also investigated in mouse plasma. The procedure is very similar to the previous procedure in ethanol, except that 200 mL mouse plasma and 400 mL H₂O are used instead of ethanol (as solvent). After

quenching the collected aliquots (containing plasma) with 100-fold excess of azido-benzoic acid, the samples were vortexed and placed on ice until extraction. 140 mL of acetonitrile was added to pellet plasma proteins after centrifugation at 4000 rpm for 5 min (5 °C). The supernatant was transferred to an amber Eppendorf tube (1.5 mL). The samples were then dried in the dark using N₂ at 30 °C. The samples were then stored in a freezer at -80 °C until analysis. Resuspension was performed similarly using ammonium formate in ethanol (V= 100 mL, []= 5 mM) for LC-MS and LC-MS/MS analysis. All experiments were performed in triplicate and in dark using red light.

6.3.5. Data processing

The data files from LC-MS and LC-MS/MS analysis of spiked samples and kinetic experiments were processed using Xcalibur (V 4.1.50) to extract chromatograms based on the *m/z* of each clicked retinoid. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were based on calibration curves using the equations (3s/m) and (10s/m), respectively, where s represent the standard deviation of the blanks and m is the slope of the calibration curve.

RÉFÉRENCES

- (1) Drummond, J. C.; Coward, K. H. Researches on the Fat-Soluble Accessory Substance. III: Technique for Carrying out Feeding Tests for Vitamin A (Fat-Soluble A). *Biochemical Journal* **1920**, *14* (5), 661–664. <https://doi.org/10.1042/bj0140661>.
- (2) Edisbury, J. R.; Morton, R. A.; Simpkins, G. W. A Possible Vitamin A2. *Nature* **1937**, *140* (3536), 234–234. <https://doi.org/10.1038/140234a0>.
- (3) Törmä, H.; Vahlquist, A. Biosynthesis of 3-Dehydroretinol (Vitamin A2) from All-Trans-Retinol (Vitamin A1) in Human Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **1985**, *85* (6), 498–500. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12277290>.
- (4) Babino, D.; Golczak, M.; Kiser, P. D.; Wyss, A.; Palczewski, K.; Von Lintig, J. The Biochemical Basis of Vitamin A₃ Production in Arthropod Vision. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (4), 1049–1057. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00967>.
- (5) Corson, D. W.; Cornwall, M. C.; MacNichol, E. F.; Mani, V.; Crouch, R. K. Transduction Noise Induced by 4-Hydroxy Retinals in Rod Photoreceptors. *Biophysical Journal* **1990**, *57* (1), 109–115. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82511-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82511-X).
- (6) Kręzel, W.; Rivas, A.; Szklenar, M.; Ciancia, M.; Alvarez, R.; De Lera, A. R.; Rühl, R. Vitamin A5/X, a New Food to Lipid Hormone Concept for a Nutritional Ligand to Control RXR-Mediated Signaling. *Nutrients* **2021**, *13* (3), 925. <https://doi.org/10.3390/nu13030925>.
- (7) Semba, R. D. On the ‘Discovery’ of Vitamin A. *Ann Nutr Metab* **2012**, *61* (3), 192–198. <https://doi.org/10.1159/000343124>.
- (8) Heilbron, I. M.; Morton, R. A.; Webster, E. T. The Structure of Vitamin A. *Biochemical Journal* **1932**, *26* (4), 1194–1196. <https://doi.org/10.1042/bj0261194>.
- (9) Holmes, H. N.; Corbet, R. E. A Crystalline Vitamin A Concentrate. *Science* **1937**, *85* (2195), 103–103. <https://doi.org/10.1126/science.85.2195.103.a>.
- (10) Wald, G. Carotenoids and the Vitamin A Cycle in Vision. *Nature* **1934**, *134* (3376), 65–65. <https://doi.org/10.1038/134065a0>.
- (11) Morton, R. A. Chemical Aspects of the Visual Process. *Nature* **1944**, *153* (3872), 69–71. <https://doi.org/10.1038/153069a0>.
- (12) Sporn, M. B.; Dunlop, N. M.; Newton, D. L.; Smith, J. M. Prevention of Chemical Carcinogenesis by Vitamin A and Its Synthetic Analogs (Retinoids). *Fed Proc* **1976**, *35* (6), 1332–1338.
- (13) Saari, J. C. Vitamin A and Vision. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*; Asson-Batres, M. A., Rochette-Egly, C., Eds.; Subcellular Biochemistry;

- Springer Netherlands: Dordrecht, 2016; Vol. 81, pp 231–259.
https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_9.
- (14) Cascella, M.; Bärfuss, S.; Stocker, A. Cis-Retinoids and the Chemistry of Vision. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2013, 539 (2), 187–195.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.06.003>.
- (15) Beltrán-de-Miguel, B.; Estévez-Santiago, R.; Olmedilla-Alonso, B. Assessment of Dietary Vitamin A Intake (Retinol, α -Carotene, β -Carotene, β -Cryptoxanthin) and Its Sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009–2010). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2015, 66 (6), 706–712. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077787>.
- (16) Saini, R. K.; Nile, S. H.; Park, S. W. Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities. *Food Research International* 2015, 76, 735–750.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>.
- (17) Matsuda-Hirose, H.; Sho, Y.; Yamate, T.; Nakamura, Y.; Saito, K.; Takeo, N.; Nishida, H.; Ishii, K.; Sugiura, K.; Hatano, Y. Acute Generalized Exanthematous Pustulosis Induced by Hydroxychloroquine Successfully Treated with Etretinate. *J Dermatol* 2020, 47 (2). <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15185>.
- (18) Maj, J.; Morzycki, J. W.; Rárová, L.; Wasilewski, G.; Wojtkiewicz, A. A Cross-Metathesis Approach to the Synthesis of New Etretinate Type Retinoids, Ethyl Retinoate and Its 9Z-Isomer. *Tetrahedron Letters* 2012, 53 (40), 5430–5433.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.07.122>.
- (19) Andriamialisoa, Z.; Valla, A.; Cartier, D.; Labia, R. [No Title Found]. *HCA* 2002, 85 (9), 2926–2929. [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(200209\)85:9<2926::AID-HLCA2926>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1522-2675(200209)85:9<2926::AID-HLCA2926>3.0.CO;2-5).
- (20) Liu, Z.; Xiang, J. A High Yield and Pilot-Scale Process for the Preparation of Adapalene. *Org. Process Res. Dev.* 2006, 10 (2), 285–288.
<https://doi.org/10.1021/op050223f>.
- (21) Frigoli, S.; Fuganti, C.; Malpezzi, L.; Serra, S. A Practical and Efficient Process for the Preparation of Tazarotene. *Org. Process Res. Dev.* 2005, 9 (5), 646–650. <https://doi.org/10.1021/op050080x>.
- (22) Winum, J.-Y.; Baghdigian, S.; Commes, T.; Leydet, A.; Montero, J.-L. Synthesis of New Targretin® Analogues That Induce Apoptosis in Leukemia HL-60 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002, 12 (24), 3529–3532.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00803-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00803-X).
- (23) Carazo, A.; Macáková, K.; Matoušová, K.; Krčmová, L. K.; Protti, M.; Mladěnka, P. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients* 2021, 13 (5), 1703.
<https://doi.org/10.3390/nu13051703>.

- (24) O'Byrne, S. M.; Blaner, W. S. Retinol and Retinyl Esters: Biochemistry and Physiology. *Journal of Lipid Research* 2013, 54 (7), 1731–1743. <https://doi.org/10.1194/jlr.R037648>.
- (25) Plau, J.; Golczak, M.; Paik, J.; Calderon, R. M.; Blaner, W. S. Retinol-Binding Protein 2 (RBP2): More than Just Dietary Retinoid Uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 2022, 1867 (8), 159179. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2022.159179>.
- (26) Blaner, W. S.; Li, Y.; Brun, P.-J.; Yuen, J. J.; Lee, S.-A.; Clugston, R. D. Vitamin A Absorption, Storage and Mobilization. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*; Asson-Batres, M. A., Rochette-Egly, C., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer Netherlands: Dordrecht, 2016; Vol. 81, pp 95–125. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_4.
- (27) Abumrad, N. A.; Davidson, N. O. Role of the Gut in Lipid Homeostasis. *Physiological Reviews* 2012, 92 (3), 1061–1085. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2011>.
- (28) Vieira, M.; Saraiva, M. J. Transthyretin: A Multifaceted Protein. *BioMolecular Concepts* 2014, 5 (1), 45–54. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0038>.
- (29) Chen, Y.; Clarke, O. B.; Kim, J.; Stowe, S.; Kim, Y.-K.; Assur, Z.; Cavalier, M.; Godoy-Ruiz, R.; Von Alpen, D. C.; Manzini, C.; Blaner, W. S.; Frank, J.; Quadro, L.; Weber, D. J.; Shapiro, L.; Hendrickson, W. A.; Mancia, F. Structure of the STRA6 Receptor for Retinol Uptake. *Science* 2016, 353 (6302), aad8266. <https://doi.org/10.1126/science.aad8266>.
- (30) Moran, N. E.; Mohn, E. S.; Hason, N.; Erdman, J. W.; Johnson, E. J. Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Absorption, Metabolism, and Health Effects of Dietary Carotenoids. *Advances in Nutrition* 2018, 9 (4), 465–492. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy025>.
- (31) Borel, P.; Lietz, G.; Goncalves, A.; Szabo De Edelenyi, F.; Lecompte, S.; Curtis, P.; Goumidi, L.; Caslake, M. J.; Miles, E. A.; Packard, C.; Calder, P. C.; Mathers, J. C.; Minihane, A. M.; Tourniaire, F.; Kesse-Guyot, E.; Galan, P.; Hercberg, S.; Breidenassel, C.; González Gross, M.; Moussa, M.; Meirhaeghe, A.; Reboul, E. CD36 and SR-BI Are Involved in Cellular Uptake of Provitamin A Carotenoids by Caco-2 and HEK Cells, and Some of Their Genetic Variants Are Associated with Plasma Concentrations of These Micronutrients in Humans. *The Journal of Nutrition* 2013, 143 (4), 448–456. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172734>.
- (32) Lobo, G. P.; Amengual, J.; Baus, D.; Shivedasani, R. A.; Taylor, D.; Von Lintig, J. Genetics and Diet Regulate Vitamin A Production via the Homeobox Transcription Factor ISX. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288 (13), 9017–9027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444240>.
- (33) Grumet, L.; Taschler, U.; Lass, A. Hepatic Retinyl Ester Hydrolases and the Mobilization of Retinyl Ester Stores. *Nutrients* 2016, 9 (1), 13. <https://doi.org/10.3390/nu9010013>.

- (34) Sears, A. E.; Palczewski, K. Lecithin:Retinol Acyltransferase: A Key Enzyme Involved in the Retinoid (Visual) Cycle. *Biochemistry* **2016**, *55* (22), 3082–3091. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00319>.
- (35) Yang, Y.; Luo, J.; Yu, D.; Zhang, T.; Lin, Q.; Li, Q.; Wu, X.; Su, Z.; Zhang, Q.; Xiang, Q.; Huang, Y. Vitamin A Promotes Leydig Cell Differentiation via Alcohol Dehydrogenase 1. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 644. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00644>.
- (36) Molotkov, A.; Deltour, L.; Foglio, M. H.; Cuenca, A. E.; Duester, G. Distinct Retinoid Metabolic Functions for Alcohol Dehydrogenase Genes *Adh1* and *Adh4* in Protection against Vitamin A Toxicity or Deficiency Revealed in Double Null Mutant Mice. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (16), 13804–13811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112039200>.
- (37) Molotkov, A.; Fan, X.; Deltour, L.; Foglio, M. H.; Martras, S.; Farrés, J.; Parés, X.; Duester, G. Stimulation of Retinoic Acid Production and Growth by Ubiquitously Expressed Alcohol Dehydrogenase *Adh3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99* (8), 5337–5342. <https://doi.org/10.1073/pnas.082093299>.
- (38) Kedishvili, N. Y. Enzymology of Retinoic Acid Biosynthesis and Degradation. *Journal of Lipid Research* **2013**, *54* (7), 1744–1760. <https://doi.org/10.1194/jlr.R037028>.
- (39) Zhang, M.; Hu, P.; Krois, C. R.; Kane, M. A.; Napoli, J. L. Altered Vitamin A Homeostasis and Increased Size and Adiposity in the *Rdhl-null* Mouse. *FASEB J.* **2007**, *21* (11), 2886–2896. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7964com>.
- (40) Tong, M.-H.; Yang, Q.-E.; Davis, J. C.; Griswold, M. D. Retinol Dehydrogenase 10 Is Indispensible for Spermatogenesis in Juvenile Males. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110* (2), 543–548. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214883110>.
- (41) Arregi, I.; Climent, M.; Iliev, D.; Strasser, J.; Gouignard, N.; Johansson, J. K.; Singh, T.; Mazur, M.; Semb, H.; Artner, I.; Minichiello, L.; Pera, E. M. Retinol Dehydrogenase-10 Regulates Pancreas Organogenesis and Endocrine Cell Differentiation via Paracrine Retinoic Acid Signaling. *Endocrinology* **2016**, *157* (12), 4615–4631. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1745>.
- (42) Porté, S.; Xavier Ruiz, F.; Giménez, J.; Molist, I.; Alvarez, S.; Domínguez, M.; Alvarez, R.; De Lera, A. R.; Parés, X.; Farrés, J. Aldo-Keto Reductases in Retinoid Metabolism: Search for Substrate Specificity and Inhibitor Selectivity. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *202* (1–3), 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.11.014>.
- (43) Coronel, J.; Yu, J.; Pilli, N.; Kane, M. A.; Amengual, J. The Conversion of β -Carotene to Vitamin A in Adipocytes Drives the Anti-Obesogenic Effects of β -Carotene in Mice. *Molecular Metabolism* **2022**, *66*, 101640. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101640>.

- (44) Harper, A. R.; Wiechmann, A. F.; Moiseyev, G.; Ma, J.-X.; Summers, J. A. Identification of Active Retinaldehyde Dehydrogenase Isoforms in the Postnatal Human Eye. *PLoS ONE* 2015, 10 (3), e0122008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122008>.
- (45) Kumar, S.; Sandell, L. L.; Trainor, P. A.; Koentgen, F.; Duester, G. Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases: Retinoid Metabolic Effects in Mouse Knockout Models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 2012, 1821 (1), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.04.004>.
- (46) Napoli, J. L. Functions of Intracellular Retinoid Binding–Proteins. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*; Asson–Batres, M. A., Rochette–Egly, C., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer Netherlands: Dordrecht, 2016; Vol. 81, pp 21–76. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_2.
- (47) Isoherranen, N.; Zhong, G. Biochemical and Physiological Importance of the CYP26 Retinoic Acid Hydroxylases. *Pharmacology & Therapeutics* 2019, 204, 107400. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107400>.
- (48) Roberts, C. Regulating Retinoic Acid Availability during Development and Regeneration: The Role of the CYP26 Enzymes. *JDB* 2020, 8 (1), 6. <https://doi.org/10.3390/jdb8010006>.
- (49) Catharine Ross, A.; Zolfaghari, R. Cytochrome P450s in the Regulation of Cellular Retinoic Acid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2011, 31 (1), 65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145127>.
- (50) Kane, M. A.; Folias, A. E.; Napoli, J. L. HPLC/UV Quantitation of Retinal, Retinol, and Retinyl Esters in Serum and Tissues. *Analytical Biochemistry* 2008, 378 (1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.038>.
- (51) Blaner, W. S.; O’Byrne, S. M.; Wongsiriroj, N.; Kluwe, J.; D’Ambrosio, D. M.; Jiang, H.; Schwabe, R. F.; Hillman, E. M. C.; Piantedosi, R.; Libien, J. Hepatic Stellate Cell Lipid Droplets: A Specialized Lipid Droplet for Retinoid Storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 2009, 1791 (6), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.11.001>.
- (52) Shmarakov, I. O.; Gusarova, G. A.; Islam, M. N.; Marhuenda–Muñoz, M.; Bhattacharya, J.; Blaner, W. S. Retinoids Stored Locally in the Lung Are Required to Attenuate the Severity of Acute Lung Injury in Male Mice. *Nat Commun* 2023, 14 (1), 851. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36475-3>.
- (53) Frigo, D. E.; Bondesson, M.; Williams, C. Nuclear Receptors: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Essays in Biochemistry* 2021, 65 (6), 847–856. <https://doi.org/10.1042/EBC20210020>.
- (54) Unsworth, A. J.; Flora, G. D.; Gibbins, J. M. Non–Genomic Effects of Nuclear Receptors: Insights from the Anucleate Platelet. *Cardiovascular Research* 2018, 114 (5), 645–655. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy044>.

- (55) Taylor, E.; Heyland, A. Evolution of Non-Genomic Nuclear Receptor Function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2022**, *539*, 111468. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111468>.
- (56) Mattei, M.-G.; Rivière, M.; Krust, A.; Ingvarsson, S.; Vennström, B.; Islam, M. Q.; Levan, G.; Kautner, P.; Zelent, A.; Chambon, P.; Szpirer, J.; Szpirer, C. Chromosomal Assignment of Retinoic Acid Receptor (RAR) Genes in the Human, Mouse, and Rat Genomes. *Genomics* **1991**, *10* (4), 1061–1069. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90199-O](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90199-O).
- (57) Giguere, V.; Ong, E. S.; Segui, P.; Evans, R. M. Identification of a Receptor for the Morphogen Retinoic Acid. *Nature* **1987**, *330* (6149), 624–629. <https://doi.org/10.1038/330624a0>.
- (58) Petkovich, M.; Brand, N. J.; Krust, A.; Chambon, P. A Human Retinoic Acid Receptor Which Belongs to the Family of Nuclear Receptors. *Nature* **1987**, *330* (6147), 444–450. <https://doi.org/10.1038/330444a0>.
- (59) Brand, N.; Petkovich, M.; Krust, A.; Chambon, P.; De Thé, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A. Identification of a Second Human Retinoic Acid Receptor. *Nature* **1988**, *332* (6167), 850–853. <https://doi.org/10.1038/332850a0>.
- (60) Krust, A.; Kastner, P.; Petkovich, M.; Zelent, A.; Chambon, P. A Third Human Retinoic Acid Receptor, hRAR-Gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86* (14), 5310–5314. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5310>.
- (61) Haffez, H.; Chisholm, D. R.; Valentine, R.; Pohl, E.; Redfern, C.; Whiting, A. The Molecular Basis of the Interactions between Synthetic Retinoic Acid Analogues and the Retinoic Acid Receptors. *Med. Chem. Commun.* **2017**, *8* (3), 578–592. <https://doi.org/10.1039/C6MD00680A>.
- (62) Samarut, E.; Gaudin, C.; Hughes, S.; Gillet, B.; De Bernard, S.; Jouve, P.-E.; Buffat, L.; Allot, A.; Lecompte, O.; Berekelya, L.; Rochette-Egly, C.; Laudet, V. Retinoic Acid Receptor Subtype-Specific Transcriptotypes in the Early Zebrafish Embryo. *Molecular Endocrinology* **2014**, *28* (2), 260–272. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1358>.
- (63) Lehmann, J. M.; Zhang, X. K.; Pfahl, M. RAR Gamma 2 Expression Is Regulated through a Retinoic Acid Response Element Embedded in Sp1 Sites. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12* (7), 2976–2985. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.7.2976>.
- (64) Nagpal, S.; Zelent, A.; Chambon, P. RAR-Beta 4, a Retinoic Acid Receptor Isoform Is Generated from RAR-Beta 2 by Alternative Splicing and Usage of a CUG Initiator Codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89* (7), 2718–2722. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2718>.
- (65) Rastinejad, F. Retinoic Acid Receptor Structures: The Journey from Single Domains to Full-Length Complex. *Journal of Molecular Endocrinology* **2022**, *69* (4), T25–T36. <https://doi.org/10.1530/JME-22-0113>.

- (66) Mangelsdorf, D. J.; Ong, E. S.; Dyck, J. A.; Evans, R. M. Nuclear Receptor That Identifies a Novel Retinoic Acid Response Pathway. *Nature* **1990**, *345* (6272), 224–229. <https://doi.org/10.1038/345224a0>.
- (67) Mangelsdorf, D. J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R. A.; Zhou, J. Y.; Ong, E. S.; Oro, A. E.; Kakizuka, A.; Evans, R. M. Characterization of Three RXR Genes That Mediate the Action of 9-Cis Retinoic Acid. *Genes Dev.* **1992**, *6* (3), 329–344. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.329>.
- (68) Watanabe, M.; Kakuta, H. Retinoid X Receptor Antagonists. *IJMS* **2018**, *19* (8), 2354. <https://doi.org/10.3390/ijms19082354>.
- (69) Heyman, R. A.; Mangelsdorf, D. J.; Dyck, J. A.; Stein, R. B.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Thaller, C. 9-Cis Retinoic Acid Is a High Affinity Ligand for the Retinoid X Receptor. *Cell* **1992**, *68* (2), 397–406. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90479-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90479-V).
- (70) Leal, A. S.; Reich, L. A.; Moerland, J. A.; Zhang, D.; Liby, K. T. Potential Therapeutic Uses of Rixinoids. In *Advances in Pharmacology*; Elsevier, 2021; Vol. 91, pp 141–183. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.01.004>.
- (71) Moutier, E.; Ye, T.; Choukrallah, M.-A.; Urban, S.; Osz, J.; Chatagnon, A.; Delacroix, L.; Langer, D.; Rochel, N.; Moras, D.; Benoit, G.; Davidson, I. Retinoic Acid Receptors Recognize the Mouse Genome through Binding Elements with Diverse Spacing and Topology. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (31), 26328–26341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361790>.
- (72) Millard, C. J.; Watson, P. J.; Fairall, L.; Schwabe, J. W. R. An Evolving Understanding of Nuclear Receptor Coregulator Proteins. *Journal of Molecular Endocrinology* **2013**, *51* (3), T23–T36. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0227>.
- (73) Westin, S.; Rosenfeld, M. G.; Glass, C. K. Nuclear Receptor Coactivators. In *Advances in Pharmacology*; Elsevier, 1999; Vol. 47, pp 89–112. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60110-6](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60110-6).
- (74) Perissi, V.; Rosenfeld, M. G. Controlling Nuclear Receptors: The Circular Logic of Cofactor Cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6* (7), 542–554. <https://doi.org/10.1038/nrm1680>.
- (75) Chen, H. P.; Zhao, Y. T.; Zhao, T. C. Histone Deacetylases and Mechanisms of Regulation of Gene Expression. *Crit Rev Oncog* **2015**, *20* (1–2), 35–47. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2015012997>.
- (76) Bestor, T. H.; Edwards, J. R.; Boulard, M. Notes on the Role of Dynamic DNA Methylation in Mammalian Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (22), 6796–6799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415301111>.
- (77) Dilworth, F. J.; Chambon, P. Nuclear Receptors Coordinate the Activities of Chromatin Remodeling Complexes and Coactivators to Facilitate Initiation of Transcription. *Oncogene* **2001**, *20* (24), 3047–3054. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204329>.

- (78) Farboud, B.; Hauksdottir, H.; Wu, Y.; Privalsky, M. L. Isotype-Restricted Corepressor Recruitment: A Constitutively Closed Helix 12 Conformation in Retinoic Acid Receptors β and γ Interferes with Corepressor Recruitment and Prevents Transcriptional Repression. *Molecular and Cellular Biology* 2003, 23 (8), 2844–2858. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2844-2858.2003>.
- (79) Hauksdottir, H.; Farboud, B.; Privalsky, M. L. Retinoic Acid Receptors β and γ Do Not Repress, But Instead Activate Target Gene Transcription in Both the Absence and Presence of Hormone Ligand. *Molecular Endocrinology* 2003, 17 (3), 373–385. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0340>.
- (80) Ritter, M. J.; Amano, I.; Imai, N.; Soares De Oliveira, L.; Vella, K. R.; Hollenberg, A. N. Nuclear Receptor CoRepressors, NCOR1 and SMRT, Are Required for Maintaining Systemic Metabolic Homeostasis. *Molecular Metabolism* 2021, 53, 101315. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101315>.
- (81) Kang, Z.; Fan, R. PPAR α and NCOR/SMRT Corepressor Network in Liver Metabolic Regulation. *FASEB J.* 2020, 34 (7), 8796–8809. <https://doi.org/10.1096/fj.202000055RR>.
- (82) Hou, Z.; Peng, H.; White, D. E.; Negorev, D. G.; Maul, G. G.; Feng, Y.; Longmore, G. D.; Waxman, S.; Zelent, A.; Rauscher, F. J. LIM Protein Ajuba Functions as a Nuclear Receptor Corepressor and Negatively Regulates Retinoic Acid Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107(7), 2938–2943. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908656107>.
- (83) Al Tanoury, Z.; Piskunov, A.; Rochette-Egly, C. Vitamin A and Retinoid Signaling: Genomic and Nongenomic Effects. *Journal of Lipid Research* 2013, 54 (7), 1761–1775. <https://doi.org/10.1194/jlr.R030833>.
- (84) Chebaro, Y.; Sirigu, S.; Amal, I.; Lutting, R.; Stote, R. H.; Rochette-Egly, C.; Rochel, N.; Dejaegere, A. Allosteric Regulation in the Ligand Binding Domain of Retinoic Acid Receptor. *PLoS ONE* 2017, 12(1), e0171043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171043>.
- (85) Zhu, B.; Gates, L. A.; Stashi, E.; Dasgupta, S.; Gonzales, N.; Dean, A.; Dacso, C. C.; York, B.; O’Malley, B. W. Coactivator-Dependent Oscillation of Chromatin Accessibility Dictates Circadian Gene Amplitude via REV-ERB Loading. *Molecular Cell* 2015, 60 (5), 769–783. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.024>.
- (86) Szwarc, M. M.; Kommagani, R.; Lessey, B. A.; Lydon, J. P. The P160/Steroid Receptor Coactivator Family: Potent Arbiters of Uterine Physiology and Dysfunction1. *Biology of Reproduction* 2014, 91 (5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125021>.
- (87) Bour, G.; Gaillard, E.; Bruck, N.; Lalevée, S.; Plassat, J.-L.; Busso, D.; Samama, J.-P.; Rochette-Egly, C. Cyclin H Binding to the RAR α Activation Function (AF)-2 Domain Directs Phosphorylation of the AF-1 Domain by Cyclin-Dependent

- Kinase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102 (46), 16608–16613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505556102>.
- (88) Zhao, J.; Zhang, Z.; Vucetic, Z.; Soprano, K. J.; Soprano, D. R. HACE1: A Novel Repressor of RAR Transcriptional Activity. *J. Cell. Biochem.* 2009, 107 (3), 482–493. <https://doi.org/10.1002/jcb.22146>.
- (89) Wang, F.; Soprano, K. J.; Soprano, D. R. Role of Acinus in Regulating Retinoic Acid-Responsive Gene Pre-mRNA Splicing: SPLICING OF RAR-REGULATED TRANSCRIPTS AND ACINUS. *J. Cell. Physiol.* 2015, 230 (4), 791–801. <https://doi.org/10.1002/jcp.24804>.
- (90) Le Maire; Teyssier; Balaguer; Bourguet; Germain. Regulation of RXR–RAR Heterodimers by RXR– and RAR–Specific Ligands and Their Combinations. *Cells* 2019, 8 (11), 1392. <https://doi.org/10.3390/cells8111392>.
- (91) Nadendla, E.; Teyssier, C.; Delfosse, V.; Vivat, V.; Krishnasamy, G.; Gronemeyer, H.; Bourguet, W.; Germain, P. An Unexpected Mode Of Binding Defines BMS948 as A Full Retinoic Acid Receptor β (RAR β , NR1B2) Selective Agonist. *PLoS ONE* 2015, 10 (5), e0123195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123195>.
- (92) Wei, L.-N.; Hu, X.; Chandra, D.; Seto, E.; Farooqui, M. Receptor–Interacting Protein 140 Directly Recruits Histone Deacetylases for Gene Silencing. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275 (52), 40782–40787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004821200>.
- (93) Carrier, M.; Joint, M.; Lutzing, R.; Page, A.; Rochette-Egly, C. Retinoic Acid Signaling in Human Breast Cancer Cells: A Phosphoproteomic Approach. *Annals of Oncology* 2015, 26, iii10. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv116.16>.
- (94) Kojetin, D. J.; Matta-Camacho, E.; Hughes, T. S.; Srinivasan, S.; Nwachukwu, J. C.; Cavett, V.; Nowak, J.; Chalmers, M. J.; Marciano, D. P.; Kamenecka, T. M.; Shulman, A. I.; Rance, M.; Griffin, P. R.; Bruning, J. B.; Nettles, K. W. Structural Mechanism for Signal Transduction in RXR Nuclear Receptor Heterodimers. *Nat Commun* 2015, 6 (1), 8013. <https://doi.org/10.1038/ncomms9013>.
- (95) Chandra, V.; Huang, P.; Hamuro, Y.; Raghuram, S.; Wang, Y.; Burris, T. P.; Rastinejad, F. Structure of the Intact PPAR- γ -RXR- α Nuclear Receptor Complex on DNA. *Nature* 2008, 456 (7220), 350–356. <https://doi.org/10.1038/nature07413>.
- (96) Neels, J. G.; Grimaldi, P. A. Physiological Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β . *Physiological Reviews* 2014, 94 (3), 795–858. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2013>.
- (97) Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J. P.; Chatterjee, V. K.; Glass, C. K.; Gonzalez, F. J.; Grimaldi, P. A.; Kadowaki, T.; Lazar, M. A.; O’Rahilly, S.; Palmer, C. N. A.; Plutzky, J.; Reddy, J. K.; Spiegelman, B. M.; Staels, B.; Wahli, W. International

- Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 2006, 58 (4), 726–741. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.5>.
- (98) Janani, C.; Ranjitha Kumari, B. D. PPAR Gamma Gene – A Review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2015, 9 (1), 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>.
- (99) Noy, N. Non-Classical Transcriptional Activity of Retinoic Acid. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*; Asson-Batres, M. A., Rochette-Egly, C., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer Netherlands: Dordrecht, 2016; Vol. 81, pp 179–199. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_7.
- (100) Grygiel-Górniak, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Ligands: Nutritional and Clinical Implications – a Review. *Nutr J* 2014, 13 (1), 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>.
- (101) Zhang, S.; Liu, H.; Li, H.; Wu, M.; Yu, Y.; Li, F.; Cheng, X. Differential CRABP-II and FABP5 Expression Patterns and Implications for Medulloblastoma Retinoic Acid Sensitivity. *RSC Adv.* 2018, 8 (25), 14048–14055. <https://doi.org/10.1039/C8RA00744F>.
- (102) Zhang, Y.; Luo, X.; Wu, D.; Xu, Y. ROR Nuclear Receptors: Structures, Related Diseases, and Drug Discovery. *Acta Pharmacol Sin* 2015, 36 (1), 71–87. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.120>.
- (103) Jetten, A. M.; Kurebayashi, S.; Ueda, E. The ROR Nuclear Orphan Receptor Subfamily: Critical Regulators of Multiple Biological Processes. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Elsevier, 2001; Vol. 69, pp 205–247. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)69048-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)69048-2).
- (104) Santori, F. R.; Huang, P.; van de Pavert, S. A.; Douglass, E. F.; Leaver, D. J.; Haubrich, B. A.; Keber, R.; Lorbek, G.; Konijn, T.; Rosales, B. N.; Rozman, D.; Horvat, S.; Rahier, A.; Mebius, R. E.; Rastinejad, F.; Nes, W. D.; Littman, D. R. Identification of Natural ROR γ Ligands That Regulate the Development of Lymphoid Cells. *Cell Metabolism* 2015, 21 (2), 286–298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.004>.
- (105) Stehlin-Gaon, C.; Willmann, D.; Zeyer, D.; Sanglier, S.; Van Dorsselaer, A.; Renaud, J.-P.; Moras, D.; Schüle, R. All-Trans Retinoic Acid Is a Ligand for the Orphan Nuclear Receptor ROR β . *Nat Struct Mol Biol* 2003, 10 (10), 820–825. <https://doi.org/10.1038/nsb979>.
- (106) Amann, P. M.; Eichmuller, S. B.; Schmidt, J.; Bazhin, A. V. Regulation of Gene Expression by Retinoids. *CMC* 2011, 18 (9), 1405–1412. <https://doi.org/10.2174/092986711795029618>.
- (107) Haushalter, C.; Schuhbaur, B.; Dollé, P.; Rhinn, M. Meningeal Retinoic Acid Contributes to Neocortical Lamination and Radial Migration during Mouse Brain Development. *Biology Open* 2016, bio.021063. <https://doi.org/10.1242/bio.021063>.

- (108) Lara-Ramírez, R.; Zieger, E.; Schubert, M. Retinoic Acid Signaling in Spinal Cord Development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013, 45 (7), 1302–1313. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.002>.
- (109) Duester, G. Retinoid Signaling in Control of Progenitor Cell Differentiation during Mouse Development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2013, 24 (10–12), 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.08.001>.
- (110) Valdivia, L. E.; Lamb, D. B.; Horner, W.; Wierzbicki, C.; Tafessu, A.; Williams, A. M.; Gestri, G.; Krasnow, A. M.; Vleeshouwer-Neumann, T. S.; Givens, M.; Young, R. M.; Lawrence, L. M.; Stickney, H. L.; Hawkins, T. A.; Schwarz, Q. P.; Cavodeassi, F.; Wilson, S. W.; Cerveny, K. L. Antagonism between Gdf6a and Retinoic Acid Pathways Controls Timing of Retinal Neurogenesis and Growth of the Eye in Zebrafish. *Development* 2016, dev.130922. <https://doi.org/10.1242/dev.130922>.
- (111) Cepko, C. Intrinsically Different Retinal Progenitor Cells Produce Specific Types of Progeny. *Nat Rev Neurosci* 2014, 15 (9), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrn3767>.
- (112) Gudas, L. J. Retinoids Induce Stem Cell Differentiation via Epigenetic Changes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2013, 24 (10–12), 701–705. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.08.002>.
- (113) Zieger, E.; Schubert, M. New Insights Into the Roles of Retinoic Acid Signaling in Nervous System Development and the Establishment of Neurotransmitter Systems. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Elsevier, 2017; Vol. 330, pp 1–84. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.09.001>.
- (114) Koubova, J.; Hu, Y.-C.; Bhattacharyya, T.; Soh, Y. Q. S.; Gill, M. E.; Goodheart, M. L.; Hogarth, C. A.; Griswold, M. D.; Page, D. C. Retinoic Acid Activates Two Pathways Required for Meiosis in Mice. *PLoS Genet* 2014, 10 (8), e1004541. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004541>.
- (115) Jørgensen, A.; Rajpert-De Meyts, E. Regulation of Meiotic Entry and Gonadal Sex Differentiation in the Human: Normal and Disrupted Signaling. *Biomolecular Concepts* 2014, 5 (4), 331–341. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0014>.
- (116) Rodríguez-Marí, A.; Cañestro, C.; BreMiller, R. A.; Catchen, J. M.; Yan, Y.-L.; Postlethwait, J. H. Retinoic Acid Metabolic Genes, Meiosis, and Gonadal Sex Differentiation in Zebrafish. *PLoS ONE* 2013, 8 (9), e73951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073951>.
- (117) Hiemstra, I. H.; Beijer, M. R.; Veninga, H.; Vrijland, K.; Borg, E. G. F.; Olivier, B. J.; Mebius, R. E.; Kraal, G.; Den Haan, J. M. M. The Identification and Developmental Requirements of Colonic CD169 + Macrophages. *Immunology* 2014, 142 (2), 269–278. <https://doi.org/10.1111/imm.12251>.
- (118) Shrestha, S.; Kim, S.-Y.; Yun, Y.-J.; Kim, J.-K.; Lee, J. M.; Shin, M.; Song, D.-K.; Hong, C.-W. Retinoic Acid Induces Hypersegmentation and Enhances

- Cytotoxicity of Neutrophils against Cancer Cells. *Immunology Letters* 2017, 182, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.01.001>.
- (119) Huang, Z.; Liu, Y.; Qi, G.; Brand, D.; Zheng, S. Role of Vitamin A in the Immune System. *JCM* 2018, 7(9), 258. <https://doi.org/10.3390/jcm7090258>.
- (120) Sun, X.; Xiao, Y.; Zeng, Z.; Shi, Y.; Tang, B.; Long, H.; Kanekura, T.; Wang, J.; Wu, H.; Zhao, M.; Lu, Q.; Xiao, R. All-Trans Retinoic Acid Induces CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells by Increasing FOXP3 Demethylation in Systemic Sclerosis CD4+ T Cells. *Journal of Immunology Research* 2018, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/8658156>.
- (121) Chen, L.; Lau, A. G.; Sarti, F. Synaptic Retinoic Acid Signaling and Homeostatic Synaptic Plasticity. *Neuropharmacology* 2014, 78, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.12.004>.
- (122) Dumetz, F.; Ginieis, R.; Bure, C.; Marie, A.; Alfos, S.; Pallet, V.; Bosch-Bouju, C. Neuronal Morphology and Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Vitamin A Deficient Rats. *Nutritional Neuroscience* 2022, 25 (4), 779–790. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1809877>.
- (123) De Jonge, E. A. L.; Kiefte-de Jong, J. C.; Campos-Obando, N.; Booij, L.; Franco, O. H.; Hofman, A.; Uitterlinden, A. G.; Rivadeneira, F.; Zillikens, M. C. Dietary Vitamin A Intake and Bone Health in the Elderly: The Rotterdam Study. *Eur J Clin Nutr* 2015, 69 (12), 1360–1368. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.154>.
- (124) Polcz, M. E.; Barbul, A. The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutr in Clin Prac* 2019, 34 (5), 695–700. <https://doi.org/10.1002/ncp.10376>.
- (125) Chen, W.; Chen, G. The Roles of Vitamin A in the Regulation of Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism. *JCM* 2014, 3 (2), 453–479. <https://doi.org/10.3390/jcm3020453>.
- (126) Geisler, C. E.; Renquist, B. J. Hepatic Lipid Accumulation: Cause and Consequence of Dysregulated Glucoregulatory Hormones. *Journal of Endocrinology* 2017, 234 (1), R1–R21. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0513>.
- (127) Hammerling, U. Retinol as Electron Carrier in Redox Signaling, a New Frontier in Vitamin A Research. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2016, 5 (1), 15–28. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2016.01.02>.
- (128) Kim, Y.-K.; Hammerling, U. The Mitochondrial PKCδ/Retinol Signal Complex Exerts Real-Time Control on Energy Homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 2020, 1865 (11), 158614. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158614>.
- (129) Rochette-Egly, C. Retinoic Acid Signaling and Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation: Cross Talk between Genomic and Non-Genomic Effects of RA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 2015, 1851 (1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.04.003>.
- (130) Kim, S.-M.; Yokoyama, T.; Ng, D.; Ulu, F.; Yamazaki, Y. Retinoic Acid-Stimulated ERK1/2 Pathway Regulates Meiotic Initiation in Cultured Fetal Germ

- Cells. *PLoS ONE* 2019, 14(11), e0224628.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224628>.
- (131) Persaud, S. D.; Park, S. W.; Ishigami-Yuasa, M.; Koyano-Nakagawa, N.; Kagechika, H.; Wei, L.-N. All Trans-Retinoic Acid Analogs Promote Cancer Cell Apoptosis through Non-Genomic Crabp1 Mediating ERK1/2 Phosphorylation. *Sci Rep* 2016, 6(1), 22396. <https://doi.org/10.1038/srep22396>.
- (132) Piskunov, A.; Rochette-Egly, C. A Retinoic Acid Receptor RAR α Pool Present in Membrane Lipid Rafts Forms Complexes with G Protein α Q to Activate p38MAPK. *Oncogene* 2012, 31 (28), 3333-3345.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.499>.
- (133) Salesse, C. Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel. *Journal Français d'Ophtalmologie* 2017, 40 (3), 239-250.
<https://doi.org/10.1016/j.jfo.2016.12.006>.
- (134) Kukura, P.; McCamant, D. W.; Yoon, S.; Wandschneider, D. B.; Mathies, R. A. Structural Observation of the Primary Isomerization in Vision with Femtosecond-Stimulated Raman. *Science* 2005, 310 (5750), 1006-1009.
<https://doi.org/10.1126/science.1118379>.
- (135) Maeda, T.; Golczak, M.; Maeda, A. Retinal Photodamage Mediated by All-Trans -Retinal \dagger . *Photochemistry and Photobiology* 2012, 88 (6), 1309-1319.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01143.x>.
- (136) Kaylor, J. J.; Yuan, Q.; Cook, J.; Sarfare, S.; Makshanoff, J.; Miu, A.; Kim, A.; Kim, P.; Habib, S.; Roybal, C. N.; Xu, T.; Nusinowitz, S.; Travis, G. H. Identification of DES1 as a Vitamin A Isomerase in Müller Glial Cells of the Retina. *Nat Chem Biol* 2013, 9(1), 30-36.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1114>.
- (137) Leigh, R. S.; Kaynak, B. L. Vitamin A as a Transcriptional Regulator of Cardiovascular Disease. *Hearts* 2020, 7 (2), 126-145.
<https://doi.org/10.3390/hearts1020013>.
- (138) Trasino, S. E.; Gudas, L. J. Vitamin A: A Missing Link in Diabetes? *Diabetes Management* 2015, 5 (5), 359-367. <https://doi.org/10.2217/dmt.15.30>.
- (139) Kim, J. A.; Jang, J.-H.; Lee, S.-Y. An Updated Comprehensive Review on Vitamin A and Carotenoids in Breast Cancer: Mechanisms, Genetics, Assessment, Current Evidence, and Future Clinical Implications. *Nutrients* 2021, 13 (9), 3162. <https://doi.org/10.3390/nu13093162>.
- (140) Trumbo, P.; Yates, A. A.; Schlicker, S.; Poos, M. Dietary Reference Intakes. *Journal of the American Dietetic Association* 2001, 101 (3), 294-301.
[https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(01\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(01)00078-5).
- (141) Mody, N. Alterations in Vitamin A/Retinoic Acid Homeostasis in Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Proc. Nutr. Soc.* 2017, 76 (4), 597-602.
<https://doi.org/10.1017/S0029665117001069>.

- (142) Meléndez-Martínez, A. J. An Overview of Carotenoids, Apocarotenoids, and Vitamin A in Agro-Food, Nutrition, Health, and Disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63* (15), 1801045. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801045>.
- (143) Moise, A. R.; Noy, N.; Palczewski, K.; Blaner, W. S. Delivery of Retinoid-Based Therapies To Target Tissues. *Biochemistry* **2007**, *46* (15), 4449–4458. <https://doi.org/10.1021/bi7003069>.
- (144) Zhao, T.; Liu, S.; Zhang, R.; Zhao, Z.; Yu, H.; Pu, L.; Wang, L.; Han, L. Global Burden of Vitamin A Deficiency in 204 Countries and Territories from 1990–2019. *Nutrients* **2022**, *14* (5), 950. <https://doi.org/10.3390/nu14050950>.
- (145) Awasthi, S.; Peto, R.; Read, S.; Clark, S.; Pande, V.; Bundy, D.; The Devta (Deworming And Enhanced Vitamin A) Team. Vitamin A Supplementation Every 6 Months with Retinol in 1 Million Pre-School Children in North India: DEVTA, a Cluster-Randomised Trial. *The Lancet* **2013**, *381* (9876), 1469–1477. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62125-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62125-4).
- (146) Khan, Z.; Cox, V.; Creagmile, J.; Oboh-Weilke, A. Nyctalopia and Xerophthalmia in a Patient With Crohn’s Induced Vitamin A Deficiency. *Cureus* **2023**. <https://doi.org/10.7759/cureus.42961>.
- (147) Baume, L. J.; Franquin, J.-C.; Körner, W. W. The Prenatal Effects of Maternal Vitamin A Deficiency on the Cranial and Dental Development of the Progeny. *American Journal of Orthodontics* **1972**, *62* (5), 447–460. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(72\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0002-9416(72)90021-8).
- (148) Raifen, R.; Altman, Y.; Zadik, Z. Vitamin A Levels and Growth Hormone Axis. *Horm Res* **1996**, *46* (6), 279–281. <https://doi.org/10.1159/000185101>.
- (149) Eshani Marasinghe; Sureka Chackrewathy; Chrishantha Abeysena; Shaman Rajindrajith. Micronutrient Status and Its Relationship with Nutritional Status in Preschool Children in Urban Sri Lanka. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **2015**, *24* (1). <https://doi.org/10.6133/apjcn.2015.24.1.17>.
- (150) Kandasamy, S.; Chattha, K. S.; Vlasova, A. N.; Saif, L. J. Prenatal Vitamin A Deficiency Impairs Adaptive Immune Responses to Pentavalent Rotavirus Vaccine (RotaTeq®) in a Neonatal Gnotobiotic Pig Model. *Vaccine* **2014**, *32* (7), 816–824. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.039>.
- (151) Goetghebuer, T. Significance of Very Low Retinol Levels during Severe Protein-Energy Malnutrition. *Journal of Tropical Pediatrics* **1996**, *42* (3), 158–161. <https://doi.org/10.1093/tropej/42.3.158>.
- (152) Jensen, G. L. Malnutrition and Inflammation—“Burning Down the House”: Inflammation as an Adaptive Physiologic Response Versus Self-Destruction? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **2015**, *39* (1), 56–62. <https://doi.org/10.1177/0148607114529597>.
- (153) Bernard, R. A.; Halpern, B. P. Taste Changes in Vitamin A Deficiency. *The Journal of General Physiology* **1968**, *52* (3), 444–464. <https://doi.org/10.1085/jgp.52.3.444>.

- (154) Reifen, R.; Berkovich, Z.; Mandelberg, A. Vitamin A Supplementation via Aerosol Spray in Asthmatic Children. *Pediatr Allergy Immunol* 2015, 26 (6), 578–579. <https://doi.org/10.1111/pai.12443>.
- (155) Aibana, O.; Franke, M. F.; Huang, C.-C.; Galea, J. T.; Calderon, R.; Zhang, Z.; Becerra, M. C.; Smith, E. R.; Ronnenberg, A. G.; Contreras, C.; Yataco, R.; Lecca, L.; Murray, M. B. Impact of Vitamin A and Carotenoids on the Risk of Tuberculosis Progression. *Clinical Infectious Diseases* 2017, 65 (6), 900–909. <https://doi.org/10.1093/cid/cix476>.
- (156) Yakoob, M. Y.; Qadir, M.; Hany, O. E. Vitamin A Supplementation for Prevention and Treatment of Malaria during Pregnancy and Childhood: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JEGH* 2018, 8 (1–2), 20. <https://doi.org/10.2991/j.jegh.2018.04.104>.
- (157) Wiseman, E. M.; Bar-El Dadon, S.; Reifen, R. The Vicious Cycle of Vitamin A Deficiency: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2017, 57 (17), 3703–3714. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1160362>.
- (158) Restrepo-Gallego, M.; Díaz, L. E. Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hematologic Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats. *j am assoc lab anim sci* 2020, 59 (1), 17–23. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000020>.
- (159) Konieczna, P.; Ferstl, R.; Ziegler, M.; Frei, R.; Nehrbass, D.; Lauener, R. P.; Akdis, C. A.; O'Mahony, L. Immunomodulation by Bifidobacterium Infantis 35624 in the Murine Lamina Propria Requires Retinoic Acid-Dependent and Independent Mechanisms. *PLoS ONE* 2013, 8 (5), e62617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062617>.
- (160) Logan, W. S. Vitamin A and Keratinization. *Arch Dermatol* 1972, 105 (5), 748–753.
- (161) Deo, P.; Deshmukh, R. Pathophysiology of Keratinization. *J Oral Maxillofac Pathol* 2018, 22 (1), 86. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_195_16.
- (162) Surman, S. L.; Penkert, R. R.; Sealy, R. E.; Jones, B. G.; Marion, T. N.; Vogel, P.; Hurwitz, J. L. Consequences of Vitamin A Deficiency: Immunoglobulin Dysregulation, Squamous Cell Metaplasia, Infectious Disease, and Death. *IJMS* 2020, 27 (15), 5570. <https://doi.org/10.3390/ijms21155570>.
- (163) Cañete, A.; Cano, E.; Muñoz-Chápuli, R.; Carmona, R. Role of Vitamin A/Retinoic Acid in Regulation of Embryonic and Adult Hematopoiesis. *Nutrients* 2017, 9 (2), 159. <https://doi.org/10.3390/nu9020159>.
- (164) Yee, M. M. F.; Chin, K.-Y.; Ima-Nirwana, S.; Wong, S. K. Vitamin A and Bone Health: A Review on Current Evidence. *Molecules* 2021, 26 (6), 1757. <https://doi.org/10.3390/molecules26061757>.
- (165) Mason, K. E. Differences in Testis Injury and Repair after Vitamin A-Deficiency, Vitamin E-Deficiency, and Inanition. *Am. J. Anat.* 1933, 52 (2), 153–239. <https://doi.org/10.1002/aja.1000520202>.

- (166) Pereira, A.; Adekunle, R. D.; Zaman, M.; Wan, M. J. Association Between Vitamin Deficiencies and Ophthalmological Conditions. *OPTH 2023, Volume 17*, 2045–2062. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S401262>.
- (167) Perusek, L.; Maeda, A.; Maeda, T. Supplementation with Vitamin A Derivatives to Rescue Vision in Animal Models of Degenerative Retinal Diseases. In *Rhodopsin*; Jastrzebska, B., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1271, pp 345–362. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2330-4_22.
- (168) Aygün, B. T. Xerophthalmia: From Eye to Fatal Intestinal Disease. *Beyoglu Eye J* 2020. <https://doi.org/10.14744/bej.2020.93063>.
- (169) Beckenbach, L.; Baron, J. M.; Merk, H. F.; Löffler, H.; Amann, P. M. Retinoid Treatment of Skin Diseases. *European Journal of Dermatology* 2015, 25 (5), 384–391. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2544>.
- (170) Khalil, S.; Bardawil, T.; Stephan, C.; Darwiche, N.; Abbas, O.; Kibbi, A. G.; Nemer, G.; Kurban, M. Retinoids: A Journey from the Molecular Structures and Mechanisms of Action to Clinical Uses in Dermatology and Adverse Effects. *Journal of Dermatological Treatment* 2017, 28 (8), 684–696. <https://doi.org/10.1080/09546634.2017.1309349>.
- (171) Ruiz-Lozano, R. E.; Hernández-Camarena, J. C.; Garza-Garza, L. A.; Bustamante-Arias, A.; Colorado-Zavala, M. F.; Cardenas-de La Garza, J. A. Isotretinoin and the Eye: A Review for the Dermatologist. *Dermatologic Therapy* 2020, 33 (6). <https://doi.org/10.1111/dth.14029>.
- (172) Baldwin, H. E.; Nighland, M.; Kendall, C.; Mays, D. A.; Grossman, R.; Newburger, J. 40 Years of Topical Tretinoin Use in Review. *J Drugs Dermatol* 2013, 12 (6), 638–642.
- (173) Rivas, S.; Pandya, A. G. Treatment of Melasma with Topical Agents, Peels and Lasers: An Evidence-Based Review. *Am J Clin Dermatol* 2013, 14 (5), 359–376. <https://doi.org/10.1007/s40257-013-0038-4>.
- (174) Bama, E. S.; Grace, V. M. B.; Sundaram, V.; Jesubatham, P. D. Synergistic Effect of Co-Treatment with All-Trans Retinoic Acid and 9-Cis Retinoic Acid on Human Lung Cancer Cell Line at Molecular Level. *3 Biotech* 2019, 9 (4), 159. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1692-x>.
- (175) Lokman, N. A.; Ho, R.; Gunasegaran, K.; Bonner, W. M.; Oehler, M. K.; Ricciardelli, C. Anti-Tumour Effects of All-Trans Retinoid Acid on Serous Ovarian Cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2019, 38 (1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1017-7>.
- (176) Hałubiec, P.; Łazarczyk, A.; Szafrański, O.; Bohn, T.; Dulińska-Litewka, J. Synthetic Retinoids as Potential Therapeutics in Prostate Cancer—An Update of the Last Decade of Research: A Review. *IJMS* 2021, 22 (19), 10537. <https://doi.org/10.3390/ijms221910537>.

- (177) Hunsu, V. O.; Facey, C. O. B.; Fields, J. Z.; Boman, B. M. Retinoids as Chemo-Preventive and Molecular-Targeted Anti-Cancer Therapies. *IJMS* **2021**, *22* (14), 7731. <https://doi.org/10.3390/ijms22147731>.
- (178) Giuli, M. V.; Hanieh, P. N.; Giuliani, E.; Rinaldi, F.; Marianetti, C.; Scarpanti, I.; Checquolo, S.; Carafa, M. Current Trends in ATRA Delivery for Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (8), 707. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080707>.
- (179) Assi, S.; Hajj, H. E.; Hayar, B.; Pisano, C.; Saad, W.; Darwiche, N. Development and Challenges of Synthetic Retinoid Formulations in Cancer. *CDD* **2023**, *20* (9), 1314–1326. <https://doi.org/10.2174/1567201819666220810094708>.
- (180) Chlapek, P.; Slavikova, V.; Mazanek, P.; Sterba, J.; Veselska, R. Why Differentiation Therapy Sometimes Fails: Molecular Mechanisms of Resistance to Retinoids. *IJMS* **2018**, *19* (1), 132. <https://doi.org/10.3390/ijms19010132>.
- (181) Lerner, A. J.; Gustaw-Rothenberg, K.; Smyth, S.; Casadesus, G. Retinoids for Treatment of Alzheimer’s Disease. *BioFactors* **2012**, *38* (2), 84–89. <https://doi.org/10.1002/biof.196>.
- (182) Pampín, A.; Gómez-de La Fuente, E.; Caro Gutiérrez, M. D.; López-Estebaranz, J. L. Successful Treatment of Atypical Adult Pityriasis Rubra Pilaris with Oral Alitretinoin. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2013**, *69* (2), e105–e106. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.01.036>.
- (183) Letulé, V.; Herzinger, T.; Ruzicka, T.; Molin, S. Treatment of Darier Disease with Oral Alitretinoin. *Clinical and Experimental Dermatology* **2013**, *38* (5), 523–525. <https://doi.org/10.1111/ced.12078>.
- (184) Brunasso, A. M. G.; Massone, C. Alitretinoin Therapy for Palmoplantar Pustulosis. *Br J Dermatol* **2017**, *177* (2), 578–579. <https://doi.org/10.1111/bjd.15605>.
- (185) Blair, H. A.; Scott, L. J. Alitretinoin: A Review in Severe Chronic Hand Eczema. *Drugs* **2016**, *76* (13), 1271–1279. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0621-0>.
- (186) Ahmad, H. M. Analysis of Clinical Efficacy, Side Effects, and Laboratory Changes among Patients with Acne Vulgaris Receiving Single versus Twice Daily Dose of Oral Isotretinoin: Oral Isotretinoin for Acne Vulgaris. *Dermatol Ther* **2015**, *28* (3), 151–157. <https://doi.org/10.1111/dth.12213>.
- (187) Schaller, M.; Belge, K. Systemische Therapie der Rosazea. *Hautarzt* **2013**, *64* (7), 500–505. <https://doi.org/10.1007/s00105-012-2519-4>.
- (188) Reinholtz, M.; Tietze, J. K.; Kilian, K.; Schaller, M.; Schöfer, H.; Lehmann, P.; Zierhut, M.; Klövekorn, W.; Ruzicka, T.; Schäuber, J. Rosacea – S1 Guideline. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **2013**, *11* (8), 768–780. <https://doi.org/10.1111/ddg.12101>.

- (189) Babamiri, K.; Nassab, R. Cosmeceuticals: The Evidence Behind the Retinoids. *Aesthetic Surgery Journal* 2010, 30(1), 74–77. <https://doi.org/10.1177/1090820X09360704>.
- (190) Masini, F.; Ricci, F.; Fossati, B.; Frascione, P.; Capizzi, R.; De Waure, C.; Guerriero, C. Combination Therapy with Retinaldehyde (0.1%) Glycolic Acid (6%) and Efectiose (0.1%) in Mild to Moderate Acne Vulgaris during the Period of Sun Exposure—Efficacy and Skin Tolerability. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014, 18(16), 2283–2286.
- (191) Gustafson, C. J.; Watkins, C.; Hix, E.; Feldman, S. R. Combination Therapy in Psoriasis: An Evidence-Based Review. *Am J Clin Dermatol* 2013, 14(1), 9–25. <https://doi.org/10.1007/s40257-012-0003-7>.
- (192) Heath, M. S.; Sahni, D. R.; Curry, Z. A.; Feldman, S. R. Pharmacokinetics of Tazarotene and Acitretin in Psoriasis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2018, 14(9), 919–927. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1515198>.
- (193) Chen, P.; Li, C.; Xue, R.; Chen, H.; Tian, X.; Zeng, K.; Zhang, X.; Liang, J. Efficacy and Safety of Acitretin Monotherapy in Children with Pustular Psoriasis: Results from 15 Cases and a Literature Review. *Journal of Dermatological Treatment* 2018, 29(4), 353–363. <https://doi.org/10.1080/09546634.2017.1395798>.
- (194) Campione, E.; Paterno, E. J.; Diluvio, L.; Costanza, G.; Bianchi, L.; Carboni, I.; Chimenti, S.; Orlandi, A.; Marino, D.; Favalli, C. Tazarotene as Alternative Topical Treatment for Onychomycosis. *DDDT* 2015, 879. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S69946>.
- (195) Altomare, G.; Capella, G. L.; Fracchiolla, C.; Frigerio, E. Effectiveness of Topical Adapalene in Dowling–Degos Disease. *Dermatology* 1999, 198(2), 176–177. <https://doi.org/10.1159/000018102>.
- (196) Rusu, A.; Tanase, C.; Pascu, G.-A.; Todoran, N. Recent Advances Regarding the Therapeutic Potential of Adapalene. *Pharmaceuticals* 2020, 13(9), 217. <https://doi.org/10.3390/ph13090217>.
- (197) Rouanet, J.; Joulie, I.; Lambert, C.; D’Incan, M. Real-Life Use of Bexarotene for T-Cell Cutaneous Lymphoma Management: Efficacy and Tolerance with Low Doses. *Acta Derm Venereol* 2022, 102. <https://doi.org/10.2340/actadv.v102.718>.
- (198) Liu, Y.; Wang, P.; Jin, G.; Shi, P.; Zhao, Y.; Guo, J.; Yin, Y.; Shao, Q.; Li, P.; Yang, P. The Novel Function of Bexarotene for Neurological Diseases. *Ageing Research Reviews* 2023, 90, 102021. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102021>.
- (199) Hacioglu, C.; Kar, F.; Kacar, S.; Sahinturk, V.; Kanbak, G. Bexarotene Inhibits Cell Proliferation by Inducing Oxidative Stress, DNA Damage and Apoptosis via

- PPAR γ / NF- κ B Signaling Pathway in C6 Glioma Cells. *Med Oncol* 2021, 38 (3), 31. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01476-z>.
- (200) Heo, J.-C.; Jung, T.-H.; Lee, S.; Kim, H. Y.; Choi, G.; Jung, M.; Jung, D.; Lee, H. K.; Lee, J.-O.; Park, J.-H.; Hwang, D.; Seol, H. J.; Cho, H. Effect of Bexarotene on Differentiation of Glioblastoma Multiforme Compared with ATRA. *Clin Exp Metastasis* 2016, 33 (5), 417–429. <https://doi.org/10.1007/s10585-016-9786-x>.
- (201) Naik, P. P. Trifarotene: A Novel Therapeutic Option for Acne. *Dermatology Research and Practice* 2022, 2022, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2022/1504303>.
- (202) Cosio, T.; Di Prete, M.; Gaziano, R.; Lanna, C.; Orlandi, A.; Di Francesco, P.; Bianchi, L.; Campione, E. Trifarotene: A Current Review and Perspectives in Dermatology. *Biomedicines* 2021, 9 (3), 237. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030237>.
- (203) Rühl, R.; Krzyżosiak, A.; Niewiadomska-Cimicka, A.; Rochel, N.; Szeles, L.; Vaz, B.; Wietrzych-Schindler, M.; Álvarez, S.; Szklenar, M.; Nagy, L.; De Lera, A. R.; Kręzel, W. 9-Cis-13,14-Dihydroretinoic Acid Is an Endogenous Retinoid Acting as RXR Ligand in Mice. *PLoS Genet* 2015, 11 (6), e1005213. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005213>.
- (204) Christie, V. B.; Barnard, J. H.; Batsanov, A. S.; Bridgens, C. E.; Cartmell, E. B.; Collings, J. C.; Maltman, D. J.; Redfern, C. P. F.; Marder, T. B.; Przyborski, S.; Whiting, A. Synthesis and Evaluation of Synthetic Retinoid Derivatives as Inducers of Stem Cell Differentiation. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6 (19), 3497. <https://doi.org/10.1039/b808574a>.
- (205) Haffez, H.; Khatib, T.; McCaffery, P.; Przyborski, S.; Redfern, C.; Whiting, A. Neurogenesis in Response to Synthetic Retinoids at Different Temporal Scales. *Mol Neurobiol* 2018, 55 (3), 1942–1950. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0440-7>.
- (206) Topletz, A. R.; Tripathy, S.; Foti, R. S.; Shimshoni, J. A.; Nelson, W. L.; Isoherranen, N. Induction of CYP26A1 by Metabolites of Retinoic Acid: Evidence That CYP26A1 Is an Important Enzyme in the Elimination of Active Retinoids. *Mol Pharmacol* 2015, 87 (3), 430–441. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096784>.
- (207) Chisholm, D. R.; Tomlinson, C. W. E.; Zhou, G.-L.; Holden, C.; Affleck, V.; Lamb, R.; Newling, K.; Ashton, P.; Valentine, R.; Redfern, C.; Erostyák, J.; Makkai, G.; Ambler, C. A.; Whiting, A.; Pohl, E. Fluorescent Retinoic Acid Analogues as Probes for Biochemical and Intracellular Characterization of Retinoid Signaling Pathways. *ACS Chem. Biol.* 2019, 14 (3), 369–377. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00916>.
- (208) Napoli, J. L. Cellular Retinoid Binding-Proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on Retinoid Metabolism, Function and Related Diseases. *Pharmacology &*

- Therapeutics* 2017, 173, 19–33.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.01.004>.
- (209) Zhou, G.-L.; Tams, D. M.; Marder, T. B.; Valentine, R.; Whiting, A.; Przyborski, S. A. Synthesis and Applications of 2,4-Disubstituted Thiazole Derivatives as Small Molecule Modulators of Cellular Development. *Org. Biomol. Chem.* 2013, 11 (14), 2323. <https://doi.org/10.1039/c3ob00005b>.
- (210) Haffez, H.; Chisholm, D. R.; Tatum, N. J.; Valentine, R.; Redfern, C.; Pohl, E.; Whiting, A.; Przyborski, S. Probing Biological Activity through Structural Modelling of Ligand–Receptor Interactions of 2,4-Disubstituted Thiazole Retinoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2018, 26 (8), 1560–1572. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.002>.
- (211) Koenders, S. T. A.; Wijaya, L. S.; Erkelens, M. N.; Bakker, A. T.; Van Der Noord, V. E.; Van Rooden, E. J.; Burggraaff, L.; Putter, P. C.; Botter, E.; Wals, K.; Van Den Elst, H.; Den Dulk, H.; Florea, B. I.; Van De Water, B.; Van Westen, G. J. P.; Mebius, R. E.; Overkleeft, H. S.; Le Dévédec, S. E.; Van Der Stelt, M. Development of a Retinal-Based Probe for the Profiling of Retinaldehyde Dehydrogenases in Cancer Cells. *ACS Cent. Sci.* 2019, 5 (12), 1965–1974. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01022>.
- (212) Bos, A. V.; Erkelens, M. N.; Koenders, S. T. A.; van der Stelt, M.; van Egmond, M.; Mebius, R. E. Clickable Vitamins as a New Tool to Track Vitamin A and Retinoic Acid in Immune Cells. *Front. Immunol.* 2021, 12, 671283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.671283>.
- (213) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* 2014, 9 (3), 592–605. <https://doi.org/10.1021/cb400828a>.
- (214) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* 2006, 1 (10), 644–648. <https://doi.org/10.1021/cb6003228>.
- (215) Bednarek, C.; Wehl, I.; Jung, N.; Schepers, U.; Bräse, S. The Staudinger Ligation. *Chem. Rev.* 2020, 120 (10), 4301–4354. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00665>.
- (216) Handula, M.; Chen, K.-T.; Seimblille, Y. IEDDA: An Attractive Bioorthogonal Reaction for Biomedical Applications. *Molecules* 2021, 26 (15), 4640. <https://doi.org/10.3390/molecules26154640>.
- (217) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41 (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (218) Chen, S.-Y.; Liu, S.-T.; Lin, W.-R.; Lin, C.-K.; Huang, S.-M. The Mechanisms Underlying the Cytotoxic Effects of Copper Via Differentiated Embryonic

- Chondrocyte Gene 1. *IJMS* **2019**, *20* (20), 5225.
<https://doi.org/10.3390/ijms20205225>.
- (219) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 7122–7154.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00928>.
- (220) Guo, Y.-Y.; Zhang, B.; Wang, L.; Huang, S.; Wang, S.; You, Y.; Zhu, G.; Zhu, A.; Geng, M.; Li, L. An Efficient and Easily-Accessible Ligand for Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Bioconjugation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (92), 14401–14403. <https://doi.org/10.1039/D0CC06348G>.
- (221) Chen, X.; Varki, A. User-Friendly Bioorthogonal Reactions Click to Explore Glycan Functions in Complex Biological Systems. *Journal of Clinical Investigation* **2023**, *133* (6), e169408. <https://doi.org/10.1172/JCI169408>.
- (222) Rigolot, V.; Biot, C.; Lion, C. To View Your Biomolecule, Click inside the Cell. *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60* (43), 23084–23105.
<https://doi.org/10.1002/anie.202101502>.
- (223) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Cu-Free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272.
<https://doi.org/10.1039/b901970g>.
- (224) Müggenburg, F.; Müller, S. Azide-Modified Nucleosides as Versatile Tools for Bioorthogonal Labeling and Functionalization. *The Chemical Record* **2022**, *22* (5). <https://doi.org/10.1002/tcr.202100322>.
- (225) Knighton, R. C.; Sharma, K.; Robertson, N. S.; Spring, D. R.; Wills, M. Synthesis and Reactivity of a Bis-Strained Alkyne Derived from 1,1'-Biphenyl-2,2',6,6'-Tetrol. *ACS Omega* **2019**, *4* (1), 2160–2167.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03634>.
- (226) Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (22), 9199–9208.
<https://doi.org/10.1021/ja3000936>.
- (227) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
<https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (228) Gold, B.; Dudley, G. B.; Alabugin, I. V. Moderating Strain without Sacrificing Reactivity: Design of Fast and Tunable Noncatalyzed Alkyne–Azide Cycloadditions via Stereoelectronically Controlled Transition State Stabilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (4), 1558–1569.
<https://doi.org/10.1021/ja3114196>.
- (229) He, Y.; Liu, L.; Cheng, L. A Short Review of Research Progress on the Synthesis Approaches of Aza-Dibenzocyclooctyne Derivatives. *Molecules* **2023**, *28* (9), 3715. <https://doi.org/10.3390/molecules28093715>.

- (230) O'Brien, J. G. K.; Chintala, S. R.; Fox, J. M. Stereoselective Synthesis of Bicyclo[6.1.0]Nonene Precursors of the Bioorthogonal Reagents s-TCO and BCN. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (14), 7500–7503. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02329>.
- (231) Dones, J. M.; Abularage, N. S.; Khanal, N.; Gold, B.; Raines, R. T. Acceleration of 1,3-Dipolar Cycloadditions by Integration of Strain and Electronic Tuning. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (25), 9489–9497. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c03133>.
- (232) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top Curr Chem (Z)* **2016**, *374* (2), 16. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.
- (233) Hu, Y.; Roberts, J. M.; Kilgore, H. R.; Mat Lani, A. S.; Raines, R. T.; Schomaker, J. M. Triple, Mutually Orthogonal Bioorthogonal Pairs through the Design of Electronically Activated Sulfamate-Containing Cycloalkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (44), 18826–18835. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c06725>.
- (234) Burke, E. G.; Gold, B.; Hoang, T. T.; Raines, R. T.; Schomaker, J. M. Fine-Tuning Strain and Electronic Activation of Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloadditions with Endocyclic Sulfamates in SNO-OCTs. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (23), 8029–8037. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b03943>.
- (235) Rachel, N. M.; Toulouse, J. L.; Pelletier, J. N. Transglutaminase-Catalyzed Bioconjugation Using One-Pot Metal-Free Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (10), 2518–2523. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00509>.
- (236) Agarwal, P.; Bertozzi, C. R. Site-Specific Antibody-Drug Conjugates: The Nexus of Bioorthogonal Chemistry, Protein Engineering, and Drug Development. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (2), 176–192. <https://doi.org/10.1021/bc5004982>.
- (237) Layek, B.; Sadhukha, T.; Prabha, S. Glycoengineered Mesenchymal Stem Cells as an Enabling Platform for Two-Step Targeting of Solid Tumors. *Biomaterials* **2016**, *88*, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.024>.
- (238) Ono, K.; Sanada, Y.; Kimura, Y.; Aoyama, S.; Ueda, N.; Katayama, T.; Nagahama, K. A Thin Hydrogel Barrier Linked onto Cell Surface Sialic Acids through Covalent Bonds Induces Cancer Cell Death *in Vivo*. *Biomater. Sci.* **2020**, *8* (2), 577–585. <https://doi.org/10.1039/C9BM01758E>.
- (239) Meghani, N. M.; Amin, H. H.; Park, C.; Park, J.-B.; Cui, J.-H.; Cao, Q.-R.; Lee, B.-J. Design and Evaluation of Clickable Gelatin-Oleic Nanoparticles Using Fattigation-Platform for Cancer Therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *545* (1–2), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.047>.
- (240) Mejia Oneto, J. M.; Khan, I.; Seebald, L.; Royzen, M. In Vivo Bioorthogonal Chemistry Enables Local Hydrogel and Systemic Pro-Drug To Treat Soft Tissue

- Sarcoma. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (7), 476–482.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00150>.
- (241) Yoon, H. I.; Yhee, J. Y.; Na, J. H.; Lee, S.; Lee, H.; Kang, S.-W.; Chang, H.; Ryu, J. H.; Lee, S.; Kwon, I. C.; Cho, Y. W.; Kim, K. Bioorthogonal Copper Free Click Chemistry for Labeling and Tracking of Chondrocytes *In Vivo*. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (4), 927–936.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00010>.
- (242) Lee, S.; Yoon, H. I.; Na, J. H.; Jeon, S.; Lim, S.; Koo, H.; Han, S.-S.; Kang, S.-W.; Park, S.-J.; Moon, S.-H.; Park, J. H.; Cho, Y. W.; Kim, B.-S.; Kim, S. K.; Lee, T.; Kim, D.; Lee, S.; Pomper, M. G.; Kwon, I. C.; Kim, K. In Vivo Stem Cell Tracking with Imageable Nanoparticles That Bind Bioorthogonal Chemical Receptors on the Stem Cell Surface. *Biomaterials* **2017**, *139*, 12–29.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.050>.
- (243) Kim, W.; Yoon, H. Y.; Lim, S.; Stayton, P. S.; Kim, I.-S.; Kim, K.; Kwon, I. C. In Vivo Tracking of Bioorthogonally Labeled T-Cells for Predicting Therapeutic Efficacy of Adoptive T-Cell Therapy. *Journal of Controlled Release* **2021**, *329*, 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.002>.
- (244) Takahashi, A.; Suzuki, Y.; Suhara, T.; Omichi, K.; Shimizu, A.; Hasegawa, K.; Kokudo, N.; Ohta, S.; Ito, T. In Situ Cross-Linkable Hydrogel of Hyaluronan Produced via Copper-Free Click Chemistry. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (10), 3581–3588. <https://doi.org/10.1021/bm4009606>.
- (245) Nagahama, K.; Kimura, Y.; Takemoto, A. Living Functional Hydrogels Generated by Bioorthogonal Cross-Linking Reactions of Azide-Modified Cells with Alkyne-Modified Polymers. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 2195.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04699-3>.
- (246) Battigelli, A.; Almeida, B.; Shukla, S.; Rocha, A. D.; Shukla, A. Inducing Mesenchymal Stem Cell Attachment on Non-Cell Adhesive Hydrogels through Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (55), 7661–7664.
<https://doi.org/10.1039/D0CC03403G>.
- (247) Singh, A. S.; Agrahari, A. K.; Singh, S. K.; Yadav, M. S.; Tiwari, V. K. An Improved Synthesis of Urea Derivatives from N-Acylbenzotriazole via Curtius Rearrangement. *Synthesis* **2019**, *57* (18), 3443–3450.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1689937>.
- (248) Cui, X.; Zhang, X.; Wang, W.; Zhong, X.; Tan, Y.; Wang, Y.; Zhang, J.; Li, Y.; Wang, X. Regitz Diazo Transfer Reaction for the Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted 1,2,3-Triazoles and Subsequent Regiospecific Construction of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via C-C Bond Cleavage. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (5), 4071–4080. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02912>.
- (249) Lenstra, D. C.; Wolf, J. J.; Mecinović, J. Catalytic Staudinger Reduction at Room Temperature. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (10), 6536–6545.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00831>.

- (250) Bednarek, C.; Wehl, I.; Jung, N.; Schepers, U.; Bräse, S. The Staudinger Ligation. *Chem. Rev.* **2020**, *120*(10), 4301–4354. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00665>.
- (251) Lao, Z.; Toy, P. H. Catalytic Wittig and Aza–Wittig Reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2577–2587. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.253>.
- (252) Porta, E. O. J.; Vallejos, M. M.; Bracca, A. B. J.; Labadie, G. R. Experimental and Theoretical Studies of the [3,3]-Sigmatropic Rearrangement of Prenyl Azides. *RSC Adv.* **2017**, *7*(75), 47527–47538. <https://doi.org/10.1039/C7RA09759J>.
- (253) Fletcher, S. The Mitsunobu Reaction in the 21st Century. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2*(6), 739–752. <https://doi.org/10.1039/C5QO00016E>.
- (254) Hemetsberger Indole Synthesis. In *Indole Ring Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2016; pp 287–295. <https://doi.org/10.1002/9781118695692.ch28>.
- (255) Gao, C.; Fisher, Z. B.; Edgar, K. J. Azide Reduction by DTT or Thioacetic Acid Provides Access to Amino and Amido Polysaccharides. *Cellulose* **2019**, *26*(1), 445–462. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2195-3>.
- (256) Wu, Y.-P.; Yang, B.; Tian, J.; Yu, S.-B.; Wang, H.; Zhang, D.-W.; Liu, Y.; Li, Z.-T. Postmodification of a Supramolecular Organic Framework: Visible–Light–Induced Recyclable Heterogeneous Photocatalysis for the Reduction of Azides to Amines. *Chem. Commun.* **2017**, *53*(100), 13367–13370. <https://doi.org/10.1039/C7CC08824H>.
- (257) Tashrif, Z.; Mohammadi–Khanaposhtani, M.; Larijani, B.; Hamedifar, H.; Ansari, S.; Mahdavi, M. Vinylazides: Versatile Synthons and Magical Precursors for the Construction of N–Heterocycles. *Mol Divers* **2021**, *25*(4), 2533–2570. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10106-1>.
- (258) Chang, J. 4'–Modified Nucleosides for Antiviral Drug Discovery: Achievements and Perspectives. *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*(4), 565–578. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00697>.
- (259) Lo, M. K.; Jordan, P. C.; Stevens, S.; Tam, Y.; Deval, J.; Nichol, S. T.; Spiropoulou, C. F. Susceptibility of Paramyxoviruses and Filoviruses to Inhibition by 2'–Monofluoro– and 2'–Difluoro–4'–Azidocytidine Analogs. *Antiviral Research* **2018**, *153*, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.03.009>.
- (260) Hotard, A. L.; He, B.; Nichol, S. T.; Spiropoulou, C. F.; Lo, M. K. 4'–Azidocytidine (R1479) Inhibits Henipaviruses and Other Paramyxoviruses with High Potency. *Antiviral Research* **2017**, *144*, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.06.011>.
- (261) VanBrunt, M. P.; Shanebeck, K.; Caldwell, Z.; Johnson, J.; Thompson, P.; Martin, T.; Dong, H.; Li, G.; Xu, H.; D'Hooge, F.; Masterson, L.; Bariola, P.; Tiberghien, A.; Ezeadi, E.; Williams, D. G.; Hartley, J. A.; Howard, P. W.; Grabstein, K. H.; Bowen, M. A.; Marelli, M. Genetically Encoded Azide Containing Amino Acid in

- Mammalian Cells Enables Site-Specific Antibody–Drug Conjugates Using Click Cycloaddition Chemistry. *Bioconjugate Chem.* 2015, *26*(11), 2249–2260. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00359>.
- (262) Shi, Y.; Cao, X.; Gao, H. The Use of Azide–Alkyne Click Chemistry in Recent Syntheses and Applications of Polytriazole-Based Nanostructured Polymers. *Nanoscale* 2016, *8*(9), 4864–4881. <https://doi.org/10.1039/C5NR09122E>.
- (263) Vekariya, R. H.; Liu, R.; Aubé, J. A Concomitant Allylic Azide Rearrangement/Intramolecular Azide–Alkyne Cycloaddition Sequence. *Org. Lett.* 2014, *16*(7), 1844–1847. <https://doi.org/10.1021/o1500011f>.
- (264) Sala, R.; Loro, C.; Foschi, F.; Broggini, G. Transition Metal Catalyzed Azidation Reactions. *Catalysts* 2020, *10*(10), 1173. <https://doi.org/10.3390/catal10101173>.
- (265) Hurtado-Rodrigo, C.; Hoehne, S.; Muñoz, M. P. A New Gold–Catalysed Azidation of Allenes. *Chem. Commun.* 2014, *50*(12), 1494–1496. <https://doi.org/10.1039/C3CC48017H>.
- (266) White, J. D.; Li, Y.; Kim, J.; Terinek, M. Cyclobutane Synthesis and Fragmentation. A Cascade Route to the *Lycopodium* Alkaloid (–)-Huperzine A. *J. Org. Chem.* 2015, *80*(23), 11806–11817. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01619>.
- (267) Carlson, A. S.; Topczewski, J. J. Allylic Azides: Synthesis, Reactivity, and the Winstein Rearrangement. *Org. Biomol. Chem.* 2019, *17*(18), 4406–4429. <https://doi.org/10.1039/C8OB03178A>.
- (268) Ge, L.; Chiou, M.–F.; Li, Y.; Bao, H. Radical Azidation as a Means of Constructing C(Sp₃)-N₃ Bonds. *Green Synthesis and Catalysis* 2020, *1*(2), 86–120. <https://doi.org/10.1016/j.gresc.2020.07.001>.
- (269) Huang, X.; Bergsten, T. M.; Groves, J. T. Manganese–Catalyzed Late-Stage Aliphatic C–H Azidation. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, *137*(16), 5300–5303. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01983>.
- (270) Rabet, P. T. G.; Fumagalli, G.; Boyd, S.; Greaney, M. F. Benzylic C–H Azidation Using the Zhdankin Reagent and a Copper Photoredox Catalyst. *Org. Lett.* 2016, *18*(7), 1646–1649. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00512>.
- (271) Sankaralingam, M.; Palaniandavar, M. Tuning the Olefin Epoxidation by Manganese(III) Complexes of Bisphenolate Ligands: Effect of Lewis Basicity of Ligands on Reactivity. *Dalton Trans.* 2014, *43*(2), 538–550. <https://doi.org/10.1039/C3DT51766G>.
- (272) Huang, X.; Groves, J. T. Taming Azide Radicals for Catalytic C–H Azidation. *ACS Catal.* 2016, *6*(2), 751–759. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b02474>.
- (273) Lo, J. C.; Kim, D.; Pan, C.–M.; Edwards, J. T.; Yabe, Y.; Gui, J.; Qin, T.; Gutiérrez, S.; Giacoboni, J.; Smith, M. W.; Holland, P. L.; Baran, P. S. Fe–Catalyzed C–C Bond Construction from Olefins via Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, *139*(6), 2484–2503. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13155>.

- (274) Lu, M.-Z.; Wang, C.-Q.; Loh, T.-P. Copper-Catalyzed Vicinal Oxyazidation and Diazidation of Styrenes under Mild Conditions: Access to Alkyl Azides. *Org. Lett.* 2015, 17(24), 6110–6113. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b03130>.
- (275) Fumagalli, G.; Rabet, P. T. G.; Boyd, S.; Greaney, M. F. Three-Component Azidation of Styrene-Type Double Bonds: Light-Switchable Behavior of a Copper Photoredox Catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54 (39), 11481–11484. <https://doi.org/10.1002/anie.201502980>.
- (276) Singh, A. K. Synthesis of Oxygenated Retinoids. *Synthetic Communications* 1983, 13 (11), 919–925. <https://doi.org/10.1080/00397918308059546>.
- (277) Hashimoto, M.; Fujimoto, Y. One Step and Convenient Preparations of 4-Hydroxyretinal and 4-Oxoretinal. *Synthetic Communications* 1999, 29 (21), 3793–3797. <https://doi.org/10.1080/00397919908086018>.
- (278) Sheves, M.; Makover, A.; Edelstein, S. Photo-Affinity Label for Cellular Retinol-Binding Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984, 122 (2), 577–582. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(84\)80072-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80072-8).
- (279) Wang, K.-W.; Wang, S.-W.; Du, Q.-Z. Complete NMR Assignment of Retinal and Its Related Compounds: Complete and Unambiguous ^1H and ^{13}C NMR Chemical Shift Assignments for All-*Trans*-Retinal, 13-*Cis*-Retinal, 11-*Cis*-Retinal, 9-*Cis*-Retinal. *Magn. Reson. Chem.* 2013, 51 (7), 435–438. <https://doi.org/10.1002/mrc.3956>.
- (280) Larock, R. C.; Zhang, L. Halogenation of Alkenes and Dienes. In *Comprehensive Organic Transformations*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2018; pp 1–43. <https://doi.org/10.1002/9781118662083.cot04-003>.
- (281) Baker, S. I.; Yaghoubi, M.; Bidwell, S. L.; Pierce, S. L.; Hratchian, H. P.; Baxter, R. D. Enhanced Reactivity for Aromatic Bromination via Halogen Bonding with Lactic Acid Derivatives. *J. Org. Chem.* 2022, 87 (13), 8492–8502. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00611>.
- (282) Pal, R.; Das, A.; Jayaraman, N. Radical Halogenation-Mediated Latent-Active Glycosylations of Allyl Glycosides. *Chem. Commun.* 2018, 54 (6), 588–590. <https://doi.org/10.1039/C7CC07332A>.
- (283) Bloomfield, G. F. 43. Rubber, Polyisoprenes, and Allied Compounds. Part VI. The Mechanism of Halogen-Substitution Reactions, and the Additive Halogenation of Rubber and of Dihydromyrcene. *J. Chem. Soc.* 1944, 114. <https://doi.org/10.1039/jr9440000114>.
- (284) Adam, J.; Gosselain, P. A.; Goldfinger, P. Laws of Addition and Substitution in Atomic Reactions of Halogens. *Nature* 1953, 171 (4355), 704–705. <https://doi.org/10.1038/171704b0>.

- (285) Incremona, J. H.; Martin, J. C. N-Bromosuccinimide. Mechanisms of Allylic Bromination and Related Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (3), 627–634. <https://doi.org/10.1021/ja00706a034>.
- (286) Upadhyay, S. K.; Jursic, B. S. Microwave-Assisted NBS Bromination of *p*-Iminotoluenes: Preparation of New Alcohol, Mercapto, and Amino Protection Groups. *Synthetic Communications* **2011**, *41* (21), 3177–3185. <https://doi.org/10.1080/00397911.2010.517378>.
- (287) Saikia, I.; Borah, A. J.; Phukan, P. Use of Bromine and Bromo-Organic Compounds in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (12), 6837–7042. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00400>.
- (288) Xu, S.; Wu, P.; Zhang, W. 1,3-Dibromo-5,5-Dimethylhydantoin (DBH) Mediated One-Pot Syntheses of α -Bromo/Amino Ketones from Alkenes in Water. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (48), 11389–11395. <https://doi.org/10.1039/C6OB02200F>.
- (289) Hazarika, S.; Gogoi, P.; Barman, P. TBATB Mediated Debenzylative Cross-Coupling of Aryl Benzyl Sulfides with Electron Rich Compounds: Synthesis of Diaryl Sulfides. *RSC Adv.* **2015**, *5* (33), 25765–25767. <https://doi.org/10.1039/C5RA00677E>.
- (290) Heck, A. J. R.; Nibbering, N. M. M. Gas Phase Bimolecular Chemistry of Isomeric $C_3H_6Br^+$ Cations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6* (1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(94\)00084-D](https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)00084-D).
- (291) Damrauer, R.; Leavell, M. D.; Hadad, C. M. Computational Studies of Halonium Ions of Cyclohexene and Cyclopentene. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (25), 9476–9485. <https://doi.org/10.1021/jo981660d>.
- (292) Teberekidis, V. I.; Sigalas, M. P. Structure and Stability of Halonium Cations of Cycloalkenes. A Theoretical Study. *Tetrahedron* **2003**, *59* (26), 4749–4756. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00695-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00695-1).
- (293) Reynolds, C. H. Structure and Relative Stability of Halogenated Carbocations: The $C_2H_4X^+$ and $C_4H_8X^+$ (X = Fluoro, Chloro, Bromo) Cations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (22), 8676–8682. <https://doi.org/10.1021/ja00048a047>.
- (294) Ott, A. A.; Topczewski, J. J. On the Winstein Rearrangement: Equilibrium and Mechanism. *Arkivoc* **2019**, *2019* (1), 1–17. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p010.819>.
- (295) Rubio-Presa, R.; García-Pedrero, O.; López-Matanza, P.; Barrio, P.; Rodríguez, F. Dihalogenation of Alkenes Using Combinations of *N*-Halosuccinimides and Alkali Metal Halides. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021* (33), 4762–4766. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100811>.
- (296) Harrison, E. H. Carotenoids, β -Apocarotenoids, and Retinoids: The Long and the Short of It. *Nutrients* **2022**, *14* (7), 1411. <https://doi.org/10.3390/nu14071411>.

- (297) Zolberg Relevy, N.; Bechor, S.; Harari, A.; Ben-Amotz, A.; Kamari, Y.; Harats, D.; Shaish, A. The Inhibition of Macrophage Foam Cell Formation by 9-Cis β -Carotene Is Driven by BCMO1 Activity. *PLoS ONE* 2015, 10(1), e0115272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115272>.
- (298) Dong, H.; Pang, L.; Cong, H.; Shen, Y.; Yu, B. Application and Design of Esterase-Responsive Nanoparticles for Cancer Therapy. *Drug Delivery* 2019, 26(1), 416–432. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1588424>.
- (299) Shippy, R. R.; Lin, X.; Agabiti, S. S.; Li, J.; Zangari, B. M.; Foust, B. J.; Poe, M. M.; Hsiao, C.-H. C.; Vinogradova, O.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. Phosphinophosphonates and Their Tris-Pivaloyloxymethyl Prodrugs Reveal a Negatively Cooperative Butyrophilin Activation Mechanism. *J. Med. Chem.* 2017, 60(6), 2373–2382. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00965>.
- (300) Morlacchi, P.; Robertson, F. M.; Klostergaard, J.; McMurray, J. S. Targeting SH2 Domains in Breast Cancer. *Future Medicinal Chemistry* 2014, 6(17), 1909–1926. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.120>.
- (301) Gander, R. J.; Gurney, J. A. Retinoic Acid Derivatives. US4055659A, October 25, 1977.
- (302) Minta, E.; Boutonnet, C.; Boutard, N.; Martinez, J.; Rolland, V. Easy Saponification by Metal Silanlates: Application in SPPS and in (S)-5-Hydroxynorvaline Preparation. *Tetrahedron Letters* 2005, 46(11), 1795–1797. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.01.115>.
- (303) Choy, J.; Jaime-Figueroa, S.; Lara-Jaime, T. A Novel Practical Cleavage of Tert-Butyl Esters and Carbonates Using Fluorinated Alcohols. *Tetrahedron Letters* 2010, 51(17), 2244–2246. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.02.100>.
- (304) Pacherille, A.; Tuga, B.; Hallooman, D.; Dos Reis, I.; Vermette, M.; Issack, B. B.; Rhyman, L.; Ramasami, P.; Sunasee, R. BiCl₃ –Facilitated Removal of Methoxymethyl-Ether/Ester Derivatives and DFT Study of –O-C–O– Bond Cleavage. *New J. Chem.* 2021, 45(16), 7109–7116. <https://doi.org/10.1039/D1NJ00449B>.
- (305) Begnini, F.; Poongavanam, V.; Over, B.; Castaldo, M.; Geschwindner, S.; Johansson, P.; Tyagi, M.; Tyrchan, C.; Wissler, L.; Sjö, P.; Schiesser, S.; Kihlberg, J. Mining Natural Products for Macrocycles to Drug Difficult Targets. *J. Med. Chem.* 2021, 64(2), 1054–1072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01569>.
- (306) Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *IJMS* 2021, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.
- (307) Bull, J. A.; Croft, R. A.; Davis, O. A.; Doran, R.; Morgan, K. F. Oxetanes: Recent Advances in Synthesis, Reactivity, and Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* 2016, 116(19), 12150–12233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00274>.

- (308) Xu, L.; Hu, Y.; Zhu, X.; He, L.; Wu, Q.; Li, C.; Xia, C.; Liu, C. Momentary Click Nitrile Synthesis Enabled by an Aminoazanium Reagent. *Org. Chem. Front.* 2022, 9(13), 3420–3427. <https://doi.org/10.1039/D2QO00560C>.
- (309) Xie, R.; Dong, L.; Du, Y.; Zhu, Y.; Hua, R.; Zhang, C.; Chen, X. In Vivo Metabolic Labeling of Sialoglycans in the Mouse Brain by Using a Liposome-Assisted Bioorthogonal Reporter Strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113(19), 5173–5178. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516524113>.
- (310) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic *In Vivo* Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104(43), 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>.
- (311) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* 2008, 320 (5876), 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.1155106>.
- (312) Faucher, A.-M.; Grand-Mâitre, C. *Tris* (2-Carboxyethyl)Phosphine (TCEP) for the Reduction of Sulfoxides, Sulfonylchlorides, *N*-Oxides, and Azides. *Synthetic Communications* 2003, 33(20), 3503–3511. <https://doi.org/10.1081/SCC-120024730>.
- (313) Suthagar, K.; Fairbanks, A. J. A New Way to Do an Old Reaction: Highly Efficient Reduction of Organic Azides by Sodium Iodide in the Presence of Acidic Ion Exchange Resin. *Chem. Commun.* 2017, 53(4), 713–715. <https://doi.org/10.1039/C6CC08574A>.
- (314) Abdel Hamid, A. M. Addition-Cyclization Reactions of Furan-2-Carbonyl Isothiocyanate with Nitrogen Nucleophiles as a Synthetic Route to Novel Azines and Azoles of Potential Biological Activity. *J IRAN CHEM SOC* 2019, 16 (9), 1853–1861. <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01659-6>.
- (315) Jawabrah Al-Hourani, B.; Richter, F.; Vrobel, K.; Banert, K.; Korb, M.; Rüffer, T.; Walfort, B.; Lang, H. Synthesis of Unexpected Bifunctionalized Thiazoles by Nucleophilic Attack on Allenyl Isothiocyanate: Synthesis of Bifunctionalized Thiazoles. *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 2014(14), 2899–2906. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301851>.
- (316) Kamiyama, Y.; Naritomi, Y.; Moriya, Y.; Yamamoto, S.; Kitahashi, T.; Maekawa, T.; Yahata, M.; Hanada, T.; Uchiyama, A.; Noumaru, A.; Koga, Y.; Higuchi, T.; Ito, M.; Komatsu, H.; Miyoshi, S.; Kimura, S.; Umeda, N.; Fujita, E.; Tanaka, N.; Sugita, T.; Takayama, S.; Kurogi, A.; Yasuda, S.; Sato, Y. Biodistribution Studies for Cell Therapy Products: Current Status and Issues. *Regenerative Therapy* 2021, 18, 202–216. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.06.005>.
- (317) Cifelli, C. J.; Ross, A. C. All- *Trans* -Retinoic Acid Distribution and Metabolism in Vitamin A-Marginal Rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006, 291 (2), G195–G202. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00011.2006>.

- (318) Kane, M. A.; Folias, A. E.; Napoli, J. L. HPLC/UV Quantitation of Retinal, Retinol, and Retinyl Esters in Serum and Tissues. *Analytical Biochemistry* 2008, 378 (1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.038>.
- (319) Yokota, S.; Oshio, S. A Simple and Robust Quantitative Analysis of Retinol and Retinyl Palmitate Using a Liquid Chromatographic Isocratic Method. *Journal of Food and Drug Analysis* 2018, 26 (2), 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.002>.
- (320) Czuba, L. C.; Fay, E. E.; LaFrance, J.; Smith, C. K.; Shum, S.; Moreni, S. L.; Mao, J.; Isoherranen, N.; Hebert, M. F. Plasma Retinoid Concentrations Are Altered in Pregnant Women. *Nutrients* 2022, 14 (7), 1365. <https://doi.org/10.3390/nu14071365>.
- (321) Jeong, H.; Armstrong, A. T.; Isoherranen, N.; Czuba, L.; Yang, A.; Zumpf, K.; Ciolino, J.; Torres, E.; Stika, C. S.; Wisner, K. L. Temporal Changes in the Systemic Concentrations of Retinoids in Pregnant and Postpartum Women. *PLoS ONE* 2023, 18 (2), e0280424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280424>.
- (322) Wuertz, S.; Orban, A.; Schaefer, F. J.; Overton, J. L.; Krüger, A. Carotenoids and Retinoids in the Gonad of Brood-Stock Pikeperch: Accumulation during Vitellogenesis and Influence on Egg Quality in Farmed Pikeperch *Sander Lucioperca*. *Anim. Reprod.* 2023, 20 (1), e20220103. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2022-0103>.
- (323) Chisholm, D. R.; Tomlinson, C. W. E.; Zhou, G.-L.; Holden, C.; Affleck, V.; Lamb, R.; Newling, K.; Ashton, P.; Valentine, R.; Redfern, C.; Erostyák, J.; Makkai, G.; Ambler, C. A.; Whiting, A.; Pohl, E. Fluorescent Retinoic Acid Analogues as Probes for Biochemical and Intracellular Characterization of Retinoid Signaling Pathways. *ACS Chem. Biol.* 2019, 14 (3), 369–377. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00916>.
- (324) Bos, A. V.; Erkelens, M. N.; Koenders, S. T. A.; Van Der Stelt, M.; Van Egmond, M.; Mebius, R. E. Clickable Vitamins as a New Tool to Track Vitamin A and Retinoic Acid in Immune Cells. *Front. Immunol.* 2021, 12, 671283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.671283>.
- (325) Hatano, M.; Miyazaki, T.; Ishiwata, Y.; Nakajima, W.; Arisawa, T.; Kuroki, Y.; Kobayashi, A.; Takada, Y.; Ogawa, M.; Kawamura, K.; Zhang, M.-R.; Higuchi, M.; Taguri, M.; Kimura, Y.; Takahashi, T. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Positron Emission Tomography Probe for AMPA Receptor, [¹¹C]K-2, in Healthy Human Subjects. *Sci Rep* 2021, 11 (1), 1598. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81002-3>.
- (326) Black, K. C. L.; Wang, Y.; Luehmann, H. P.; Cai, X.; Xing, W.; Pang, B.; Zhao, Y.; Cutler, C. S.; Wang, L. V.; Liu, Y.; Xia, Y. Radioactive ¹⁹⁸ Au-Doped Nanostructures with Different Shapes for *In Vivo* Analyses of Their

- Biodistribution, Tumor Uptake, and Intratumoral Distribution. *ACS Nano* **2014**, *8* (5), 4385–4394. <https://doi.org/10.1021/nn406258m>.
- (327) Tansi, F. L.; Rüger, R.; Kollmeier, A. M.; Böhm, C.; Kontermann, R. E.; Teichgraeber, U. K.; Fahr, A.; Hilger, I. A Fast and Effective Determination of the Biodistribution and Subcellular Localization of Fluorescent Immunoliposomes in Freshly Excised Animal Organs. *BMC Biotechnol* **2017**, *17* (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0327-8>.
- (328) Meng, F.; Wang, J.; Ping, Q.; Yeo, Y. Quantitative Assessment of Nanoparticle Biodistribution by Fluorescence Imaging, Revisited. *ACS Nano* **2018**, *12* (7), 6458–6468. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02881>.
- (329) Buchberger, A. R.; DeLaney, K.; Johnson, J.; Li, L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (1), 240–265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04733>.
- (330) Liu, J.; Hu, W.; Han, Y.; Nie, H. Recent Advances in Mass Spectrometry Imaging of Single Cells. *Anal Bioanal Chem* **2023**, *415* (18), 4093–4110. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04774-9>.
- (331) Kim, Y.; Choi, M.; Seo, S.; Manjare, S. T.; Jon, S.; Churchill, D. G. A Selective Fluorescent Probe for Cysteine and Its Imaging in Live Cells. *RSC Adv.* **2014**, *4* (109), 64183–64186. <https://doi.org/10.1039/C4RA12981D>.
- (332) McGowan, J. W. D.; Bidwell, Iii, G. L. The Use of Ex Vivo Whole-Organ Imaging and Quantitative Tissue Histology to Determine the Bio-Distribution of Fluorescently Labeled Molecules. *JoVE* **2016**, No. 118, 54987. <https://doi.org/10.3791/54987>.
- (333) Refaat, A.; Yap, M. L.; Pietersz, G.; Walsh, A. P. G.; Zeller, J.; Del Rosal, B.; Wang, X.; Peter, K. In Vivo Fluorescence Imaging: Success in Preclinical Imaging Paves the Way for Clinical Applications. *J Nanobiotechnol* **2022**, *20* (1), 450. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01648-7>.
- (334) Liu, Z.; Lavis, L. D.; Betzig, E. Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level. *Molecular Cell* **2015**, *58* (4), 644–659. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.033>.
- (335) Rodríguez-Sevilla, P.; Thompson, S. A.; Jaque, D. Multichannel Fluorescence Microscopy: Advantages of Going beyond a Single Emission. *Advanced NanoBiomed Research* **2022**, *2* (5), 2100084. <https://doi.org/10.1002/anbr.202100084>.
- (336) Demchenko, A. P. Photobleaching of Organic Fluorophores: Quantitative Characterization, Mechanisms, Protection. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8* (2), 022001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365>.
- (337) Kwon, J.; Elgawish, M. S.; Shim, S. Bleaching-Resistant Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Advanced Science* **2022**, *9* (9), 2101817. <https://doi.org/10.1002/advs.202101817>.

- (338) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings 1PII of Original Article: S0169-409X(96)00423-1. The Article Was Originally Published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3-25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 46 (1-3), 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- (339) Wang, L.; Tran, M.; D'Este, E.; Roberti, J.; Koch, B.; Xue, L.; Johnsson, K. A General Strategy to Develop Cell Permeable and Fluorogenic Probes for Multicolour Nanoscopy. *Nat. Chem.* 2020, 12 (2), 165-172. <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0371-1>.
- (340) Sengel, J. T.; Wallace, M. I. Imaging the Dynamics of Individual Electropores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113 (19), 5281-5286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517437113>.
- (341) Alberto, A. V. P.; Bonavita, A. G.; Fidalgo-Neto, A. A.; Berçot, F.; Alves, L. A. Single-Cell Microinjection for Cell Communication Analysis. *JoVE* 2017, No. 120, 50836. <https://doi.org/10.3791/50836>.
- (342) Kollmannsperger, A.; Sharei, A.; Raulf, A.; Heilemann, M.; Langer, R.; Jensen, K. F.; Wieneke, R.; Tampé, R. Live-Cell Protein Labelling with Nanometre Precision by Cell Squeezing. *Nat Commun* 2016, 7 (1), 10372. <https://doi.org/10.1038/ncomms10372>.
- (343) Grimm, J. B.; Heckman, L. M.; Lavis, L. D. The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2013; Vol. 113, pp 1-34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386932-6.00001-6>.
- (344) Chyan, W.; Raines, R. T. Enzyme-Activated Fluorogenic Probes for Live-Cell and *in Vivo* Imaging. *ACS Chem. Biol.* 2018, 13 (7), 1810-1823. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00371>.
- (345) Wu, L.; Huang, C.; Emery, B. P.; Sedgwick, A. C.; Bull, S. D.; He, X.-P.; Tian, H.; Yoon, J.; Sessler, J. L.; James, T. D. Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Small-Molecule Sensors and Imaging Agents. *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49 (15), 5110-5139. <https://doi.org/10.1039/C9CS00318E>.
- (346) Kim, J. K.; Liu, Y.; Gong, M.; Li, Y.; Huang, M.; Wu, Y. A Facile Visible-Light-Induced One-Pot Synthesis of 3-Alkyl Coumarins from Simple Salicylaldehydes. *Tetrahedron* 2023, 132, 133249. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2023.133249>.
- (347) Gupta, A.; Gautam, A.; Sasmal, P. K. Photoactivatable *o*-Hydroxycinnamic Platforms for Bioimaging and Therapeutic Release: Miniperspective. *J. Med. Chem.* 2022, 65 (7), 5274-5287. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00022>.
- (348) Lukinavičius, G.; Blaukopf, C.; Pershagen, E.; Schena, A.; Reymond, L.; Derivery, E.; Gonzalez-Gaitan, M.; D'Este, E.; Hell, S. W.; Wolfram Gerlich, D.;

- Johnsson, K. SiR-Hoechst Is a Far-Red DNA Stain for Live-Cell Nanoscopy. *Nat Commun* 2015, 6 (1), 8497. <https://doi.org/10.1038/ncomms9497>.
- (349) Lukinavičius, G.; Umezawa, K.; Olivier, N.; Honigmann, A.; Yang, G.; Plass, T.; Mueller, V.; Reymond, L.; Corrêa Jr, I. R.; Luo, Z.-G.; Schultz, C.; Lemke, E. A.; Heppenstall, P.; Eggeling, C.; Manley, S.; Johnsson, K. A Near-Infrared Fluorophore for Live-Cell Super-Resolution Microscopy of Cellular Proteins. *Nature Chem* 2013, 5 (2), 132–139. <https://doi.org/10.1038/nchem.1546>.
- (350) Lukinavičius, G.; Reymond, L.; D'Este, E.; Masharina, A.; Göttfert, F.; Ta, H.; Güther, A.; Fournier, M.; Rizzo, S.; Waldmann, H.; Blaukopf, C.; Sommer, C.; Gerlich, D. W.; Arndt, H.-D.; Hell, S. W.; Johnsson, K. Fluorogenic Probes for Live-Cell Imaging of the Cytoskeleton. *Nat Methods* 2014, 11 (7), 731–733. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2972>.
- (351) Kozma, E.; Kele, P. Fluorogenic Probes for Super-Resolution Microscopy. *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17 (2), 215–233. <https://doi.org/10.1039/C8OB02711K>.
- (352) Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H. Design Strategies for Water-Soluble Small Molecular Chromogenic and Fluorogenic Probes. *Chem. Rev.* 2014, 114 (1), 590–659. <https://doi.org/10.1021/cr300508p>.
- (353) Danylchuk, D. I.; Moon, S.; Xu, K.; Klymchenko, A. S. Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-resolution Imaging of Plasma Membrane Organization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58 (42), 14920–14924. <https://doi.org/10.1002/anie.201907690>.
- (354) Li, H.; Vaughan, J. C. Switchable Fluorophores for Single-Molecule Localization Microscopy. *Chem. Rev.* 2018, 118 (18), 9412–9454. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00767>.
- (355) Grimm, J. B.; English, B. P.; Chen, J.; Slaughter, J. P.; Zhang, Z.; Revyakin, A.; Patel, R.; Macklin, J. J.; Normanno, D.; Singer, R. H.; Lionnet, T.; Lavis, L. D. A General Method to Improve Fluorophores for Live-Cell and Single-Molecule Microscopy. *Nat Methods* 2015, 12 (3), 244–250. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3256>.
- (356) Feng, L.; Chen, W.; Ma, X.; Liu, S. H.; Yin, J. Near-Infrared Heptamethine Cyanines (Cy7): From Structure, Property to Application. *Org. Biomol. Chem.* 2020, 18 (46), 9385–9397. <https://doi.org/10.1039/D0OB01962C>.
- (357) Kurutos, A.; Shindo, Y.; Hiruta, Y.; Oka, K.; Citterio, D. Near-Infrared pH Responsive Heptamethine Cyanine Platforms: Modulating the Proton Acceptor. *Dyes and Pigments* 2020, 181, 108611. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108611>.
- (358) Van Der Velde, J. H. M.; Uusitalo, J. J.; Ugen, L.-J.; Warszawik, E. M.; Herrmann, A.; Marrink, S. J.; Cordes, T. Intramolecular Photostabilization via Triplet-State Quenching: Design Principles to Make Organic Fluorophores “Self-Healing.” *Faraday Discuss.* 2015, 184, 221–235. <https://doi.org/10.1039/C5FD00114E>.

- (359) Lukinavičius, G.; Reymond, L.; Umezawa, K.; Sallin, O.; D'Este, E.; Göttfert, F.; Ta, H.; Hell, S. W.; Urano, Y.; Johnsson, K. Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (30), 9365–9368. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04782>.
- (360) Neef, A. B.; Luedtke, N. W. An Azide-Modified Nucleoside for Metabolic Labeling of DNA. *ChemBioChem* **2014**, *15* (6), 789–793. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400037>.
- (361) Si, D.; Li, Q.; Bao, Y.; Zhang, J.; Wang, L. Fluorogenic and Cell-Permeable Rhodamine Dyes for High-Contrast Live-Cell Protein Labeling in Bioimaging and Biosensing. *Angew Chem Int Ed* **2023**, *e202307641*. <https://doi.org/10.1002/anie.202307641>.
- (362) Sato, Y.; Igarashi, Y.; Suzuki, M.; Higuchi, K.; Nishizawa, S. Deep-Red Fluorogenic Cyanine Dyes Carrying an Amino Group-Terminated Side Chain for Improved RNA Detection and Nucleolar RNA Imaging. *RSC Adv.* **2021**, *11* (56), 35436–35439. <https://doi.org/10.1039/D1RA05872J>.
- (363) Yapici, I.; Lee, K. S. S.; Berbasova, T.; Nosrati, M.; Jia, X.; Vasileiou, C.; Wang, W.; Santos, E. M.; Geiger, J. H.; Borhan, B. “Turn-On” Protein Fluorescence: In Situ Formation of Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (3), 1073–1080. <https://doi.org/10.1021/ja506376j>.
- (364) He, M.; Sato, Y.; Nishizawa, S. Classical Thiazole Orange and Its Regioisomer as Fluorogenic Probes for Nucleolar RNA Imaging in Living Cells. *Analyst* **2023**, *148* (3), 636–642. <https://doi.org/10.1039/D2AN01804G>.
- (365) Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. A Fluorogenic Probe for the Catalyst-Free Detection of Azide-Tagged Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18809–18815. <https://doi.org/10.1021/ja309000s>.
- (366) Alamudi, S. H.; Satapathy, R.; Kim, J.; Su, D.; Ren, H.; Das, R.; Hu, L.; Alvarado-Martínez, E.; Lee, J. Y.; Hoppmann, C.; Peña-Cabrera, E.; Ha, H.-H.; Park, H.-S.; Wang, L.; Chang, Y.-T. Development of Background-Free Tame Fluorescent Probes for Intracellular Live Cell Imaging. *Nat Commun* **2016**, *7* (1), 11964. <https://doi.org/10.1038/ncomms11964>.
- (367) Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. BODIPY Dyes in Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (1), 77–88. <https://doi.org/10.1039/C2CS35216H>.
- (368) Bassan, E.; Gualandi, A.; Cozzi, P. G.; Ceroni, P. Design of BODIPY Dyes as Triplet Photosensitizers: Electronic Properties Tailored for Solar Energy Conversion, Photoredox Catalysis and Photodynamic Therapy. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (19), 6607–6628. <https://doi.org/10.1039/D1SC00732G>.
- (369) Kolemen, S.; Akkaya, E. U. Reaction-Based BODIPY Probes for Selective Bio-Imaging. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *354*, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.021>.

- (370) Flores-Rizo, J. O.; Esnal, I.; Osorio-Martínez, C. A.; Gómez-Durán, C. F. A.; Bañuelos, J.; López Arbeloa, I.; Pannell, K. H.; Metta-Magaña, A. J.; Peña-Cabrera, E. 8-Alkoxy- and 8-Aryloxy-BODIPYs: Straightforward Fluorescent Tagging of Alcohols and Phenols. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*(12), 5867–5877. <https://doi.org/10.1021/jo400417h>.
- (371) Radunz, S.; Wedepohl, S.; Röhr, M.; Calderón, M.; Tschiche, H. R.; Resch-Genger, U. pH-Activatable Singlet Oxygen-Generating Boron-Dipyrromethenes (BODIPYs) for Photodynamic Therapy and Bioimaging. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*(4), 1699–1708. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01873>.
- (372) Barba-Bon, A.; Calabuig, L.; Costero, A. M.; Gil, S.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Off-on BODIPY-Based Chemosensors for Selective Detection of Al³⁺ and Cr³⁺ versus Fe³⁺ in Aqueous Media. *RSC Adv.* **2014**, *4*(18), 8962–8965. <https://doi.org/10.1039/C3RA46845C>.
- (373) Kojima, R.; Takakura, H.; Ozawa, T.; Tada, Y.; Nagano, T.; Urano, Y. Rational Design and Development of Near-Infrared-Emitting Firefly Luciferins Available In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*(4), 1175–1179. <https://doi.org/10.1002/anie.201205151>.
- (374) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*(11), 4891–4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- (375) An, H.-W.; Wang, M.-D. The Self-Assembly of Cyanine Dyes for Biomedical Application In Vivo. In *In Vivo Self-Assembly Nanotechnology for Biomedical Applications*; Wang, H., Li, L.-L., Eds.; Nanomedicine and Nanotoxicology; Springer Singapore: Singapore, 2018; pp 31–55. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6913-0_2.
- (376) Herbst, E.; Shabat, D. FRET-Based Cyanine Probes for Monitoring Ligation Reactions and Their Applications to Mechanistic Studies and Catalyst Screening. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*(15), 3715–3728. <https://doi.org/10.1039/C5OB02127H>.
- (377) Luciano, M. P.; Crooke, S. N.; Nourian, S.; Dingle, I.; Nani, R. R.; Kline, G.; Patel, N. L.; Robinson, C. M.; Difilippantonio, S.; Kalen, J. D.; Finn, M. G.; Schnermann, M. J. A Nonaggregating Heptamethine Cyanine for Building Brighter Labeled Biomolecules. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*(5), 934–940. <https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00122>.
- (378) Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I. Recent Progress in the Development of Near-Infrared Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*(1), 16–29. <https://doi.org/10.1039/C3CS60271K>.
- (379) Zhang, S.; Fan, J.; Li, Z.; Hao, N.; Cao, J.; Wu, T.; Wang, J.; Peng, X. A Bright Red Fluorescent Cyanine Dye for Live-Cell Nucleic Acid Imaging, with High Photostability and a Large Stokes Shift. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*(18), 2688–2693. <https://doi.org/10.1039/C3TB21844A>.

- (380) Jeon, S. G.; Kim, Y. J.; Kim, K. A.; Mook-Jung, I.; Moon, M. Visualization of Altered Hippocampal Connectivity in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2018, 55 (10), 7886–7899. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0918-y>.
- (381) Alvarez-Bustamante, J. A.; Lemeshko, V. V. Computational Models for Monitoring the Trans-Membrane Potential with Fluorescent Probes: The DiSC3(5) Case. *Eur Biophys J* 2016, 45 (8), 815–830. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1126-1>.
- (382) Weterings, J.; Rijcken, C. J. F.; Veldhuis, H.; Meulemans, T.; Hadavi, D.; Timmers, M.; Honing, M.; Ippel, H.; Liskamp, R. M. J. TMTHSI, a Superior 7-Membered Ring Alkyne Containing Reagent for Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition Reactions. *Chem. Sci.* 2020, 11 (33), 9011–9016. <https://doi.org/10.1039/DOSC03477K>.
- (383) Levone, B. R.; Lombardi, S.; Barabino, S. M. L. Laser Microirradiation as a Tool to Investigate the Role of Liquid–Liquid Phase Separation in DNA Damage Repair. *STAR Protocols* 2022, 3 (1), 101146. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101146>.
- (384) Kong, X.; Wakida, N. M.; Yokomori, K. Application of Laser Microirradiation in the Investigations of Cellular Responses to DNA Damage. *Front. Phys.* 2021, 8, 597866. <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.597866>.
- (385) Holton, N. W.; Andrews, J. F.; Gassman, N. R. Application of Laser Micro-Irradiation for Examination of Single and Double Strand Break Repair in Mammalian Cells. *JoVE* 2017, No. 127, 56265. <https://doi.org/10.3791/56265>.
- (386) Reis, L. A.; Rocha, M. S. DNA Interaction with DAPI Fluorescent Dye: Force Spectroscopy Decouples Two Different Binding Modes. *Biopolymers* 2017, 107 (5), e23015. <https://doi.org/10.1002/bip.23015>.
- (387) Parkinson, L. M.; Gillen, S. L.; Woods, L. M.; Chaytor, L.; Marcos, D.; Ali, F. R.; Carroll, J. S.; Philpott, A. The Proneural Transcription Factor ASCL1 Regulates Cell Proliferation and Primes for Differentiation in Neuroblastoma. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022, 10, 942579. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.942579>.
- (388) Azzarelli, R.; McNally, A.; Dell'Amico, C.; Onorati, M.; Simons, B.; Philpott, A. ASCL1 Phosphorylation and ID2 Upregulation Are Roadblocks to Glioblastoma Stem Cell Differentiation. *Sci Rep* 2022, 12 (1), 2341. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06248-x>.
- (389) Duan, L.; Wang, T.-Q.; Bian, W.; Liu, W.; Sun, Y.; Yang, B.-S. Centrin: Another Target of Monastrol, an Inhibitor of Mitotic Spindle. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2015, 137, 1086–1091. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.08.050>.
- (390) Garcia-Saez, I.; Skoufias, D. A. Eg5 Targeting Agents: From New Anti-Mitotic Based Inhibitor Discovery to Cancer Therapy and Resistance. *Biochemical*

- Pharmacology* **2021**, *184*, 114364.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114364>.
- (391) Nian, K.; Liu, Y.; Brigandì, L.; Rouhanifard, S. H. *DNA-Enhanced CuAAC Ligand Enables Live-Cell Detection of Intracellular Biomolecules*; preprint; Molecular Biology, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.11.10.515969>.
- (392) Fang, Z.-Z.; Gonzalez, F. J. LC-MS-Based Metabolomics: An Update. *Arch Toxicol* **2014**, *88* (8), 1491–1502. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1234-6>.
- (393) Heiles, S. Advanced Tandem Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics—Methods and Applications. *Anal Bioanal Chem* **2021**, *413* (24), 5927–5948. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03425-1>.
- (394) Liu, M.-L.; Zheng, P.; Liu, Z.; Xu, Y.; Mu, J.; Guo, J.; Huang, T.; Meng, H.-Q.; Xie, P. GC-MS Based Metabolomics Identification of Possible Novel Biomarkers for Schizophrenia in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Mol. BioSyst.* **2014**, *10* (9), 2398–2406. <https://doi.org/10.1039/C4MB00157E>.
- (395) Hammerl, R.; Frank, O.; Hofmann, T. Quantitative Proton NMR Spectroscopy for Basic Taste Recombinant Reconstitution Using the Taste Recombinant Database. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (48), 14713–14721.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05284>.
- (396) Obrochta, K. M.; Kane, M. A.; Napoli, J. L. Effects of Diet and Strain on Mouse Serum and Tissue Retinoid Concentrations. *PLoS ONE* **2014**, *9* (6), e99435.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099435>.
- (397) Arnold, S. L. M.; Amory, J. K.; Walsh, T. J.; Isoherranen, N. A Sensitive and Specific Method for Measurement of Multiple Retinoids in Human Serum with UHPLC-MS/MS. *Journal of Lipid Research* **2012**, *53* (3), 587–598.
<https://doi.org/10.1194/jlr.D019745>.
- (398) Kane, M. A.; Napoli, J. L. Quantification of Endogenous Retinoids. In *Retinoids*; Sun, H., Travis, G. H., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 652, pp 1–54. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-325-1_1.
- (399) Szultka, M.; Krzeminski, R.; Walczak, J.; Jackowski, M.; Buszewski, B. Pharmacokinetic Study of Amoxicillin in Human Plasma by Solid-Phase Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry: Pharmacokinetic Study of Amoxicillin in Human Plasma by SPME-HPLC/MS. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28* (2), 255–264. <https://doi.org/10.1002/bmc.3014>.
- (400) Li, J.; Wang, S.; Wang, M.; Shi, W.; Du, X.; Sun, C. The Toxicity of 3-Chloropropane-1,2-Dipalmitate in Wistar Rats and a Metabonomics Analysis of Rat Urine by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *206* (2), 337–345.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.10.004>.

- (401) Kleiner-Bössaler, A.; DeLuca, H. F. Formation of Retinoic Acid from Retinol in the Kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1971, 142 (1), 371–377. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(71\)90295-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(71)90295-5).
- (402) Frolik, C. A.; Dart, L. L.; Sporn, M. B. Metabolism of All-Trans-Retinyl Acetate to Retinoic Acid in Hamster Tracheal Organ Culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism* 1981, 663 (1), 329–335. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(81\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(81)90218-6).
- (403) Puglisi, Carl. V.; De Silva, J. A. F. Determination of Retinoic Acid (13-Cis- and All-Trans-) and Aromatic Retinoic Acid Analogs Possessing Anti-Tumor Activity, in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1978, 152 (2), 421–430. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85078-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85078-5).
- (404) De Leenheer, A. P.; Lambert, W. E.; Claeys, I. All-Trans-Retinoic Acid: Measurement of Reference Values in Human Serum by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Lipid Research* 1982, 23 (9), 1362–1367.
- (405) Eckhoff, C.; Nau, H. Identification and Quantitation of All-Trans- and 13-Cis-Retinoic Acid and 13-Cis-4-Oxoretinoic Acid in Human Plasma. *J Lipid Res* 1990, 31 (8), 1445–1454.
- (406) Arnold, S. L. M.; Amory, J. K.; Walsh, T. J.; Isoherranen, N. A Sensitive and Specific Method for Measurement of Multiple Retinoids in Human Serum with UHPLC-MS/MS. *Journal of Lipid Research* 2012, 53 (3), 587–598. <https://doi.org/10.1194/jlr.D019745>.
- (407) Gatti, R.; Gioia, M. G.; Cavrini, V. Analysis and Stability Study of Retinoids in Pharmaceuticals by LC with Fluorescence Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, 23 (1), 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00285-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00285-5).
- (408) Van Breemen, R. B.; Huang, C. High-performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry of Retinoids. *FASEB j.* 1996, 10 (9), 1098–1101. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.9.8801173>.
- (409) Van Breemen, R. B.; Nikolic, D.; Xu, X.; Xiong, Y.; Van Lieshout, M.; West, C. E.; Schilling, A. B. Development of a Method for Quantitation of Retinol and Retinyl Palmitate in Human Serum Using High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1998, 794 (1-2), 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01138-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01138-2).
- (410) Kane, M. A.; Chen, N.; Sparks, S.; Napoli, J. L. Quantification of Endogenous Retinoic Acid in Limited Biological Samples by LC/MS/MS. *Biochemical Journal* 2005, 388 (1), 363–369. <https://doi.org/10.1042/BJ20041867>.
- (411) Kane, M. A.; Folias, A. E.; Wang, C.; Napoli, J. L. Quantitative Profiling of Endogenous Retinoic Acid in Vivo and in Vitro by Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2008, 80 (5), 1702–1708. <https://doi.org/10.1021/ac702030f>.

- (412) Morgenstern, J.; Fleming, T.; Kliemank, E.; Brune, M.; Nawroth, P.; Fischer, A. Quantification of All-Trans Retinoic Acid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Association with Lipid Profile in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolites* 2021, 11 (1), 60. <https://doi.org/10.3390/metabolites11010060>.
- (413) Zhong, G.; Kirkwood, J.; Won, K.-J.; Tjota, N.; Jeong, H.; Isoherranen, N. Characterization of Vitamin A Metabolome in Human Livers With and Without Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2019, 370 (1), 92–103. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258517>.
- (414) Zelenková, M.; Zima, T.; Kalousová, M. Determination of Retinoic Acid in Human Serum and Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Monatsh Chem* 2019, 150 (10), 1731–1735. <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02489-1>.
- (415) Wang, J.; Yoo, H. S.; Obrochta, K. M.; Huang, P.; Napoli, J. L. Quantitation of Retinaldehyde in Small Biological Samples Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2015, 484, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.016>.
- (416) Kullolli, M.; Rock, D. A.; Ma, J. Immuno-Affinity Capture Followed by TMPP N-Terminus Tagging to Study Catabolism of Therapeutic Proteins. *J. Proteome Res.* 2017, 16 (2), 911–919. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00863>.
- (417) Deng, J.; Zhang, G.; Huang, F.-K.; Neubert, T. A. Identification of Protein N-Termini Using TMPP or Dimethyl Labeling and Mass Spectrometry. In *Proteomic Profiling*; Posch, A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1295, pp 249–258. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_19.
- (418) Ayoub, D.; Bertaccini, D.; Diemer, H.; Wagner-Rousset, E.; Colas, O.; Cianfrani, S.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A.; Schaeffer-Reiss, C. Characterization of the N-Terminal Heterogeneities of Monoclonal Antibodies Using In-Gel Charge Derivatization of α -Amines and LC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2015, 87 (7), 3784–3790. <https://doi.org/10.1021/ac504427k>.
- (419) Bagal, D.; Gibson, B. W. Identification of Proteolysis Products in Protein Therapeutics through TMPP N-Terminal Tagging and Electron Transfer Dissociation Product Triggered Collisional Induced Dissociation Fragmentation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2021, 32 (8), 1936–1944. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00391>.
- (420) Koniev, O.; Leriche, G.; Nothisen, M.; Remy, J.-S.; Strub, J.-M.; Schaeffer-Reiss, C.; Van Dorsselaer, A.; Baati, R.; Wagner, A. Selective Irreversible Chemical Tagging of Cysteine with 3-Arylpropionitriles. *Bioconjugate Chem.* 2014, 25 (2), 202–206. <https://doi.org/10.1021/bc400469d>.

- (421) King, M.; Baati, R.; Wagner, A. New Tetramethylthiepinium (TMTI) for Copper-Free Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (74), 9308. <https://doi.org/10.1039/c2cc35034c>.
- (422) Baatarkhuu, Z.; Chaignon, P.; Borel, F.; Ferrer, J.-L.; Wagner, A.; Seemann, M. Synthesis and Kinetic Evaluation of an Azido Analogue of Methylerythritol Phosphate: A Novel Inhibitor of *E. Coli* YgbP/IspD. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 17892. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35586-y>.
- (423) Kanu, A. B. Recent Developments in Sample Preparation Techniques Combined with High-Performance Liquid Chromatography: A Critical Review. *Journal of Chromatography A* **2021**, *1654*, 462444. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462444>.
- (424) Płotka-Wasyłka, J.; Szczepańska, N.; De La Guardia, M.; Namieśnik, J. Modern Trends in Solid Phase Extraction: New Sorbent Media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *77*, 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>.
- (425) Alshammari, T. M.; Al-Hassan, A. A.; Hadda, T. B.; Aljofan, M. Comparison of Different Serum Sample Extraction Methods and Their Suitability for Mass Spectrometry Analysis. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2015**, *23* (6), 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.023>.
- (426) Soltani, S.; Jouyban, A. Biological Sample Preparation: Attempts on Productivity Increasing in Bioanalysis. *Bioanalysis* **2014**, *6* (12), 1691–1710. <https://doi.org/10.4155/bio.14.118>.
- (427) Czuba, L. C.; Zhong, G.; Yabut, K. C.; Isoherranen, N. Analysis of Vitamin A and Retinoids in Biological Matrices. In *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2020; Vol. 637, pp 309–340. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.02.010>.
- (428) Kane, M. A.; Folias, A. E.; Napoli, J. L. HPLC/UV Quantitation of Retinal, Retinol, and Retinyl Esters in Serum and Tissues. *Analytical Biochemistry* **2008**, *378* (1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.038>.
- (429) Smith, E.; Collins, I. Photoaffinity Labeling in Target- and Binding-Site Identification. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7* (2), 159–183. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.152>.
- (430) Walko, M.; Hewitt, E.; Radford, S. E.; Wilson, A. J. Design and Synthesis of Cysteine-Specific Labels for Photo-Crosslinking Studies. *RSC Adv.* **2019**, *9* (14), 7610–7614. <https://doi.org/10.1039/C8RA10436K>.
- (431) Kleiner, P.; Heydenreuter, W.; Stahl, M.; Korotkov, V. S.; Sieber, S. A. A Whole Proteome Inventory of Background Photocrosslinker Binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (5), 1396–1401. <https://doi.org/10.1002/anie.201605993>.
- (432) He, D.; Xie, X.; Yang, F.; Zhang, H.; Su, H.; Ge, Y.; Song, H.; Chen, P. R. Quantitative and Comparative Profiling of Protease Substrates through a Genetically Encoded Multifunctional Photocrosslinker. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (46), 14521–14525. <https://doi.org/10.1002/anie.201708151>.

Synthèse de sondes moléculaires rétinoïdes en vue de déterminer la forme active de la vitamine A *in vivo*

Résumé

La vitamine A est une petite molécule ayant un nombre très important de fonctions dans l'organisme et, de fait, une implication dans une large variété de pathologies. Aujourd'hui, la connaissance de son métabolisme est incomplète, en particulier à l'échelle cellulaire, ce qui se répercute sur la compréhension de pathologies complexes telles que la maladie de Parkinson. Ainsi, le but de cette thèse est de développer de nouveaux outils moléculaires permettant de localiser les rétinoïdes aux échelles cellulaire et subcellulaire mais également de détecter et d'identifier de nouveaux métabolites. Ces études fourniront les bases qui contribueront à élargir la compréhension du métabolisme et du stockage des rétinoïdes. La première partie de cette thèse décrit la mise au point d'une nouvelle méthode d'insertion tardive d'azoture sur la vitamine A afin d'en faire une sonde moléculaire détectable. La seconde partie présente la conception et la synthèse de sondes fluorescentes pour leur application en imagerie cellulaire dans un but de visualisation des rétinoïdes aux échelles cellulaire et subcellulaire. Enfin, la dernière partie retrace le développement de sondes de spectrométrie de masse facilitant la détection et la quantification de nouveaux métabolites de la vitamine A.

Mots-clés : azidation ; imagerie cellulaire ; late-stage ; rétinoïdes ; sondes fluorescentes ; sondes masse ; vitamine A.

Abstract

Vitamin A is a small molecule with many functions in the body and is therefore involved in a wide range of pathologies. Today, our knowledge of its metabolism is incomplete, particularly at the cellular level, which has implications for our understanding of complex pathologies such as Parkinson's disease. The aim of this thesis is therefore to develop new molecular tools to localize retinoids at the cellular and subcellular levels and to detect and identify new metabolites. These studies will provide the basis for a broader understanding of retinoids' metabolism and storage. The first part of this thesis describes the development of a new method of late stage azidation of vitamin A to make it a detectable molecular probe. The second part presents the design and synthesis of fluorescent probes for their application in cellular imaging to visualize retinoids at cellular and subcellular levels. Finally, the last part describes the development of mass spectrometry probes to facilitate the detection and quantification of new vitamin A metabolites.

Key words: azidation; cell imaging; fluorescent probes; late stage; retinoids; mass probes; vitamin A.