

Université de Strasbourg

Thèse

présentée par

David WARTHER

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie Bioorganique

Synthèse de sondes fluorescentes photo-activables pour le marquage et l'étude de la dynamique de protéines cellulaires.

Soutenue publiquement le jeudi 22 septembre 2011,

devant les membres de la commission d'examen :

Prof. Maurice GOELDNER	Directeur de Thèse
Dr. Alain WAGNER	Rapporteur interne
Dr. Anthony ROMIEU	Rapporteur externe, Rouen, France
Prof. Ludovic JULLIEN	Rapporteur externe, Paris, France

Université de Strasbourg

Thèse

présentée par

David WARTHER

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie Bioorganique

Synthèse de sondes fluorescentes photo-activables pour le marquage et l'étude de la dynamique de protéines cellulaires.

Soutenue publiquement le jeudi 22 septembre 2011,

devant les membres de la commission d'examen :

Prof. Maurice GOELDNER	Directeur de Thèse
Dr. Alain WAGNER	Rapporteur interne
Dr. Anthony ROMIEU	Rapporteur externe, Rouen, France
Prof. Ludovic JULLIEN	Rapporteur externe, Paris, France

Sommaire.

Remerciements.....V

Abréviations et Symboles.....VII

Chapitre I : Introduction.

Les sondes photo-activables, présentation générale.....1

I. Visualiser la dynamique de protéines cellulaires.....3

I.1. Photo-blanchiment.....3

I.1.1. Techniques de photo-blanchiment.....4

I.1.1.1. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).....4

I.1.1.2. Inverse FRAP (iFRAP).....4

I.1.1.3. Fluorescence Localization After Photobleaching (FLAP).....4

I.1.1.4. Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP).....4

I.1.2. Applications.....5

I.2. Photo-activation.....7

I.3. Microscopie haute résolution et photo-activation.....7

II. Fluorophores photo-activables.....9

II.1. Absorption de la lumière.....9

II.1.1. Absorbance mono-photonique.....10

II.1.2. Absorbance à 2 photons.....11

II.2. La fluorescence.....15

II.2.1. Chronologie d'une émission de fluorescence.....17

II.2.1.1. Absorption.....17

II.2.1.2. Conversion interne.....18

II.2.1.3. Émission.....19

II.2.2. Facteurs affectant la fluorescence.....19

II.2.2.1. Phosphorescence.....19

II.2.2.2. Les désexcitations non radiatives.....20

II.2.3. Les fluorophores.....22

II.2.3.1. Caractéristiques.....22

II.2.3.2. Les protéines fluorescentes.....26

II.2.3.3. Fluorophores organiques.....29

II.2.4. La fluorescence à 2 photons.....38

II.4. La fluorescence photoactivable.....39

II.4.1. Photoactivation.....39

II.4.2. Les protéines fluorescentes photo-activables.....41

II.4.3. Groupements photolabiles.....	41
II.4.3.1. Série 2-nitrobenzyle.....	42
II.4.3.2. Série (nitrophényl)éthyle.....	46
II.4.4. Photo-fragmentation bi-photon.....	48
II.4.4.1 Série o-NB.....	48
II.4.4.2. Dérivés de la 4-yl-méthyle coumarine.....	49
II.4.4.3. Série o-nitrophénylalkyle.....	49
II.4.4.4. Autres groupements photo-labiles.....	50
II.4.5. Les fluorophores cagés.....	52
II.4.5.1. Photo-activation directe.....	52
II.4.5.2. Rapporteurs fluorescents.....	54
II.4.5.3. Photo-activation de fluorophores en bi-photon.....	54
II.4.5.4. Photoactivation indirecte.....	55
III. Du fluorophore à la sonde : le marquage de protéines.....	58
III.1. Marquage non-covalent.....	59
III.1.1. Affinité naturelle.....	59
III.1.2. Reconnaissance de Tag peptidiques.....	60
III.1.2.1. Tag histidine.....	61
III.1.2.2. Tag Aspartate.....	62
III.2. Marquage covalent.....	63
III.2.1. Modifications directe des acides aminés.....	63
III.2.2. Motifs de reconnaissance peptidiques.....	64
III.2.2.1. Tag tétracystéine.....	64
III.2.2.2. Tag tétrasérines.....	65
III.2.2.3. Sondes bi-fonctionnelles.....	65
III.2.2.4. Sondes N-cyanobenzothiazoles.....	66
III.2.3. Reconnaissance de protéines de fusion.....	66
III.2.3.1. SNAP-Tag.....	66
III.2.3.2. CLIP-Tag.....	67
III.2.3.3. Halo-Tag.....	67
III.2.3.4. Tag β -lactmase.....	67
III.2.3.5. TMP-Tag covalent.....	68
III.2.4. Marquage catalysé par des enzymes.....	68
III.2.4.1. Biotine ligase d' <i>E. Coli</i> (BirA).....	69
III.2.4.2. Transglutaminase.....	69
III.2.4.3. Lipoïc Acid Ligase (LplA).....	69
III.2.4.4. Formylglycine Generating Enzyme (FGE).....	70
III.2.4.5. Sortase A bactérienne (SrtA).....	70
III.2.4.6. Phosphopanthéinyl transférases (PPtases).....	70
III.2.5. Insertion d'acide aminé non naturel.....	71
III.2.6. Réactions bioorthogonales.....	72
III.2.6.1. Condensation aldéhydes/cétones-amines.....	72
III.2.6.2. Réaction de Staudinger.....	73
III.2.6.3. Cycloaddition de Huisgen.....	74

Chapitre II : Résultats et discussion.

Développement d'un fluorophore photo-activable en bi-photon et émettant hors du champ d'auto-fluorescence des cellules.....77

I. Groupement photolabile.....81

II. Les fluorophores.....84

II.1. Les 7-hydroxycoumarines.....84

II.1.1. Les 7-hydroxycoumarines fluorogéniques.....84

II.1.2. Inversion du cycle triazole.....92

II.2. Les benzochromène-2-ones.....98

II.2.1. 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one (21a).....99

II.2.2. Modification du squelette par bromation.....100

II.3. L'acridinone.....102

II.3.1. Synthèse.....103

II.3.2. Propriétés spectrales.....106

II.3.3. Détermination du pKa.....107

II.3.4. Photo-blanchiment.....107

II.3.5. Réactivité des thiols.....108

III. Fluorophore photo-activable.....110

III.1. Synthèse.....110

III.2. Propriétés physico-chimiques.....111

III.2.1. Longueurs d'onde.....111

III.2.2. Stabilité.....112

III.2.3. Solubilité.....113

III.3 Photolyse.....113

III.3.1. Photolyse à 1 photon.....114

III.3.2. Photo-fragmentation à 2 photons.....116

III.3.3. Photo-fragmentation *in vivo*.....118

IV. Conclusion.....123

Chapitre III : Résultats et discussion.

Du fluorophore à la sonde : vers la fonctionnalisation du DDAO.....125

I. Stratégie.....128

II. Tentatives de couplage de Suzuki sur le DDAO.....129

III. Oxydation à partir d'un aldéhyde.....132

III.1. Ortho-formylation du DDAO.....132

III.2. Oxydation d'un alcène.....133

III.2.1. Synthèse d'un dérivé allylique du DDAO.....133

III.2.2. Ozonolyse.....138

III.2.3. Coupure oxydative par KMnO_4 / NaIO_4139

III.2.4. Métathèse.....139

IV. Couplages palladium sur un brome aromatique.....139

IV.1. Stratégie.....	139
IV.2. Synthèse de dérivés bromés du DDAO.....	140
IV.2.1. Bromation radicalaire du DDAO.....	140
IV.2.2. Dérivés bromés du 3'-hydroxy-acétophénone.....	140
IV.3. Couplage de Heck.....	143
IV.4. Optimisation de la bromation en position 4.....	143
IV.4.1. Stratégie.....	144
IV.4.2. Bromations du phénol 23.....	145
IV.4.3. Bromations sur le 3'-hydroxy-acétophénone.....	146
IV.4.4. Bromation de l'ester 3-hydroxybenzoate de méthyle.....	147
V. Dérivés aminés du DDAO.....	148
V.1. Stratégies de synthèse.....	149
V.2. Synthèse par nitration du DDAO.....	150
V.3. Synthèse à partir d'esters d'acides benzoïques.....	152
V.3.1. Méthylation des produits commerciaux.....	152
V.3.2. Protection de l'amine du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.....	153
VI. Modifications du pont diméthyle.....	156
VI.1. Insertion d'un acide carboxylique aliphatique.....	157
VI.1.1. Couplage avec un organo-magnésien.....	157
VI.1.2. Couplage avec un organo-zincique.....	159
VI.2. Insertion d'un alcool aliphatique.....	161
VII. Conclusion.....	163
Chapitre IV	
Perspectives.....	165
Chapitre V	
Conclusion.....	173
Chapitre VI	
Partie expérimentale.....	177
Bibliographie.....	220
Annexes : Publications et molécules synthétisées.....	233

Je remercie le Prof. Ludovic Jullien, le Dr. Anthony Romieu et le Dr. Alain Wagner d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer l'ensemble du travail qui a occupé mes quatre années de thèse.

Je remercie également très chaleureusement le Prof. Maurice Goeldner de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de chimie biologique à la faculté de pharmacie d'Illkirch. Je le remercie également pour sa disponibilité et son implication permanente dans la réussite de ses étudiants.

C'est aussi grâce à lui, que j'ai pu, au cours de de mes quatre ans de thèse, acquérir, je l'espère, non seulement quelque compétence en chimie, mais également une ouverture d'esprit scientifique multi-disciplinaire.

Je tenais également à remercier, au sein de l'équipe de chimie biologique, le Dr. Alexandre Specht pour son expérience et ses conseils toujours avisés.

Un grand merci à David Puliti, avec qui j'ai pu faire un bout de route tant chimiquement qu'humainement.

Merci également à tous ceux avec qui j'ai pu faire un petit bout de route au laboratoire Portia, Cyril, Loïc, Adeline, Damien, Olivier, Tien, Marielle, Sophie, Sébastien, Cédrik, Florian, Elias, Ziad.

Un petit clin d'œil particulier aux question faussement naïves du Dr. Thomas Grutter qui pimentent les réunions de labo.

Je remercie le Dr. Jérémie Léonard pour sa gentillesse et son accueil à l'IPCMS lors des mesures de cinétique.

Merci également aux Drs. Frédéric Bolze et Pascal Didier pour leur bonne humeur lors des interminables séances d'irradiation à 2 photons.

Merci encore à Pascal Kessler et aux joyeux lurons de la plateforme d'imagerie de l'IGBMC pour les bons moments passés dans la pénombre du confocal et en bord de mer.

Mais comme la vie d'un thésard ne se limite pas à sa sorbonne, je tenais à remercier tout particulièrement Mariette, Étienne et Nathalie pour leur bonne humeur ainsi que mes amis moniteurs Julien, Matthieu, Bérengère et Vincent, Charlyne, Jérémy.

Merci également tous ceux avec qui j'ai pu faire quelques voies au SIUPAS ou en falaise.

Enfin, je tenais à remercier ma famille pour son soutien.

Mes parent, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

Laurent qui m'a supporté pendant ces quatre années.

Céline, Derek et leur petit bonhomme.

Et merci à toi Lucile de m'avoir soutenu durant ma thèse et tout particulièrement pendant ces quelques derniers mois.

Abréviations et Symboles

ϕ_u	rendement quantique de photolyse
ϕ_{fl}	rendement quantique de fluorescence
λ_{em}	longueur d'onde maximale d'émission
λ_{ex}	longueur d'onde maximale d'excitation
ρ	rendement de réaction
d	doublet (RMN)
dd	doublet dédoublé (RMN)
m	multiplet (RMN)
q	quadruplet (RMN)
s	singulet (RMN)
t	triplet (RMN)
t. a.	température ambiante
AcCN	acétonitrile
AcOAc	anhydride acétique
AcOEt	acétate d'éthyle
DCM	dichlorométhane
DDAO	6,8(1,3)-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethylacridin-2-one
DIAD	diisopropyle azodicarboxylate
DMF	diméthyle formamide
DMSO	diméthyle sulfoxyde
Et ₂ O	diéthyle éther
EtOH	éthanol
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GFP	Green Fluorescent Protéin
GM	Göppert-Mayer ($10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1} \cdot \text{molécule}^{-1}$)
HBSS	Hank's buffered salt solution
Hept.	heptane
IR	Infra-rouge
MeMgBr	bromure de méthyle magnésium
MeOD	méthanol deutéré
MeOH	méthanol
MeSiI	iodure de triméthyle silane
NaOAc	acétate de sodium
NBS	N-bromosuccinimide
NCS	N-chlorosuccinimide
NDA	nitrilodiacetic acid
NTA	Nitrilotriacetic acid
PBS	phosphate buffer saline

NBS	N-bromosuccinimide
NCS	N-chlorosuccinimide
NDA	nitrilodiacetic acid
NTA	nitrilotriacetic acid
PBS	phosphate buffer saline
PENB	3-(2-Propyl-1-ol)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrobiphenyl
PENB-DDAO	7(2)-{3-(2-propyle)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrobiphényle}-6,8-dichloro-9,9-diméthylacridine-2-one
PMNB	3-(2-Propyl-1-ol)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl
PPh ₃	triphényle phosphine
TBAB	bromure de tétra <i>n</i> -butyle-ammonium
TBAF	fluorure de tétra <i>n</i> -butyle-ammonium
tBuOH	<i>ter</i> -butanol
THF	tétrahydrofurane
THP	tétrahydropyrane
TMSil	iodure de triméthyle silane
UV.	Ultra-violet
vis.	visible

Chapitre I

Introduction

**Les sondes photo-activables,
présentation générale.**

I. Visualiser la dynamique de protéines cellulaires.

Le marquage fluorescent de protéines cibles a permis, à l'origine d'établir des cartes de localisation au niveau cellulaire. Le développement de la microscopie time-lapse, conjointement à l'évolution des marqueurs, autorise des acquisitions de longue durée permettant de visualiser des changements de répartition des protéines sur le long terme. Mais cette technique, utilisée seule, n'apporte pas de précision sur la dynamique des protéines en temps réel.

Pour visualiser la dynamique de protéines à court terme, il faut moduler la fluorescence initiale et suivre l'évolution du contraste ainsi obtenu au cours du temps. Pour cela, on peut induire une baisse de la fluorescence initiale par photo-blanchiment, ou l'augmenter par photo-activation. Le contraste ainsi créé va rendre les mouvements des protéines fluorescentes visibles.

Ces deux techniques donnent ainsi l'opportunité d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur la concentration, la diffusion, la cinétique de liaison ou le temps de vie des protéines.^[1]

I.1. Photo-blanchiment.

Le photo-blanchiment est une extinction de la fluorescence initiale suite à une irradiation intense ou prolongée. Il s'agit d'un phénomène commun à la plupart des fluorophores et est un effet que l'on cherche généralement à minimiser ou à éviter. Dans le cadre d'expérimentations de photo-blanchiment, cet effet est à l'inverse recherché et optimisé.

Cette technique connaît diverses applications. Elles sont toutes fondées sur une variation d'intensité de fluorescence au cours du temps dans une zone d'intérêt visualisée, suite à la destruction de fluorophores dans une zone irradiée.

I.1.1. Techniques de photo-blanchiment.

I.1.1.1. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).

Cette technique a été développée pour l'étude des propriétés de diffusion de molécules sur cellules vivantes.^[1]

Elle consiste à photo-blanchir une zone d'intérêt, puis de suivre en microscopie time-lapse la récupération de fluorescence dans cette même zone au cours du temps.

I.1.1.2. Inverse FRAP (iFRAP).

Cette technique consiste à blanchir les fluorophores situés hors d'une zone cible d'intérêt, puis de suivre l'évolution de la fluorescence dans cette zone cible. Par rapport au FRAP, cela permet de mettre en évidence des mouvements en provenance de la zone d'intérêt, mais également de diminuer le bruit de fond, par une diminution très forte de la fluorescence initiale (zone de photo-blanchiment étendue).

I.1.1.3. Fluorescence Localization After Photobleaching (FLAP).

Dans cette technique, la protéine cible est marquée par deux fluorophores de couleurs différentes. Un des fluorophores est blanchi dans une zone d'intérêt, puis grâce au double marquage, le pool de protéines issues de la zone cible peut être suivi et différencié des autres protéines. En effet, les protéines issues de la zone blanchie, à l'inverse des autres protéines, ne portent plus qu'un seul marqueur actif et n'émettent qu'une seule couleur.

I.1.1.4. Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP).

Cette technique consiste à suivre l'évolution de la fluorescence d'une cellule complète pendant un blanchiment continu des fluorophores d'une zone restreinte de cette cellule. Cela permet de mettre en évidence des connexions entre différentes zones cellulaires, les zones connectées à la zone

blanchie montrant une baisse de leur fluorescence alors que les zones isolées ne sont pas affectées.

I.1.2. Applications.

L'application de ces techniques a permis de mettre en évidence des phénomènes dynamiques des protéines cellulaires :

- au niveau du cytoplasme : des expériences de FRAP ont permis de quantifier les paramètres cinétiques de protéines, ainsi que d'apporter des informations sur la mobilité et l'immobilité de protéines cibles (état dynamique des protéines).

- dans le noyau : ces techniques ont permis de mettre en évidence des échanges entre différents compartiments du noyau, ainsi que de mesurer la cinétique de liaison des facteurs de transcription aux promoteurs, de mettre en évidence la mobilité des ARNm ainsi que la localisation des chromosomes.

- intra- et inter-organelles : les techniques de photo-blanchiment ont mis en évidence des différences de mobilité des composés des mitochondries. La mobilité des protéines a été montrée dans le réticulum endoplasmique par les variations observées au niveau de sa lumière selon le degré de stress cellulaire. Ces techniques ont également permis la compréhension de phénomènes de rétention de protéines dans différents compartiments de liaison membranaire et les mécanismes associés. Des études sur différentes protéines ont également montré une variabilité de leur mobilité dans la membrane.

Ces techniques permettent de mettre en évidence des phénomènes dynamiques au niveau cellulaire ainsi que de les quantifier, mais n'en autorisent pas l'observation directe.

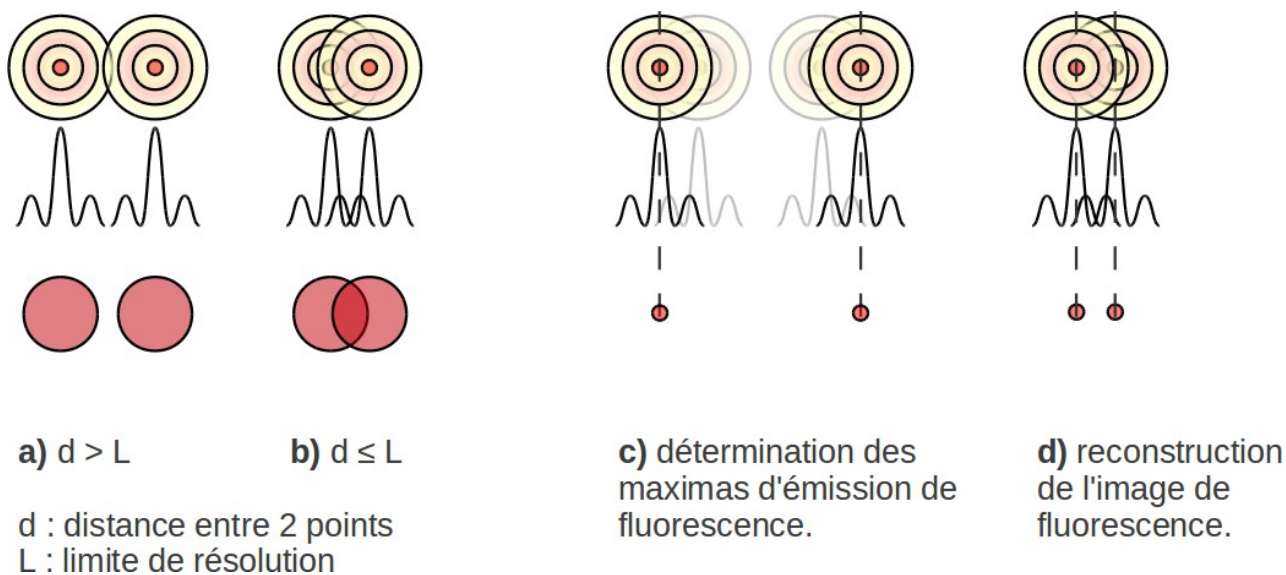


Figure I.1 : Principe des microscopies PALM et StORM.

a) et b) En microscopie classique, lorsque deux objets sont séparés par une distance inférieure à la limite de résolution, les taches de diffraction se recouvrent partiellement. Leurs images se confondent donc en une tache de fluorescence unique et ne peuvent être distinguées individuellement.

c) En suivi de fluorescence en molécule unique, on observe un objet de manière isolée. Il est donc possible d'attribuer sa position au maximum d'émission de la tache de diffraction.

d) L'image complète est reconstruite à partir des positions de chaque objet. Deux objets proches peuvent ainsi être distingués.

I.2. Photo-activation.

La technique de photo-activation permet de générer des conditions propices à de telles observations. C'est la conversion photo-induite d'une molécule inerte en une molécule active. Dans le cas d'un fluorophore, il s'agit de la photo-conversion de chromophore (molécule absorbant la lumière mais n'émettant pas de fluorescence) en fluorophore (qui a la propriété d'émettre de la fluorescence). C'est un outil idéal pour l'étude du comportement dynamique de protéines sur cellules vivantes. Elle permet également de visualiser la localisation des protéines dans les compartiments cellulaires ainsi que les échanges entre ces différents compartiments. Cette technique peut également être appliquée à l'échelle d'un organe ou d'un organisme entier. Des lignées cellulaires ou des mouvements cellulaires sur des organismes en développement ont ainsi pu être étudiés après photo-activation de la fluorescence sur une cellule isolée ou une sous-population de cellules.^[2]

Le développement récent de techniques de microscopie basées sur l'activation de fluorophores et leur visualisation en molécule unique, comme les microscopies PALM (Photo-Activated Light Microscopy)^[3] et StORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy),^[4] a accentué l'intérêt du développement de nouvelles sondes fluorescentes photoactivables.

I.3. Microscopie haute résolution et photo-activation.

Ces techniques de microscopie permettent de diminuer la limite de résolution rencontrée en microscopie de fluorescence classique. Cette limite représente la distance minimale entre deux points pour qu'ils apparaissent distincts l'un de l'autre. Elle peut être calculée par la formule $0,61\lambda/NA$, où λ représente la longueur d'onde de la lumière utilisée et NA l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.^[5] La limite de résolution, avec les objectifs classiquement utilisés, est donc d'environ $\lambda/2$, soit de 200 à 400 nm environ en lumière visible. Grâce à la photo-activation de fluorophores isolés et au suivi d'une seule molécule, il est possible de corriger mathématiquement le signal fluorescent, perçu comme une tache de diffraction, en point lumineux unique centré sur le milieu de la tache, sans l'incertitude liée au recouvrement de plusieurs taches voisines (Figure I.1). La limite de résolution est ainsi abaissée à quelques dizaines de nanomètres.^[4]

Par exemple, les mouvements dynamiques de l'actine au niveau des pics dendritiques de

neurones de l'hippocampe a été mise en évidence grâce à la photo-activation de l'EosFP, protéine fluorescente photoactivable, exprimée en tandem avec l'actine, en microscopie PALM avec une résolution inférieure à 30 nm.^[6]

La recherche et le développement de sondes autorisant le contrôle de la fluorescence sur des systèmes vivants représente donc un challenge majeur en chimie biologique. Ces sondes doivent présenter une fluorescence élevée, une activation efficace et une reconnaissance spécifique de la protéine cible afin de créer un contraste de fluorescence significatif, contrôlé tant spatialement que temporellement. Ces différents points seront détaillés dans ce premier chapitre.

II. Fluorophores photo-activables.

Les fluorophores photo-activables représentent la partie visuelle d'une sonde fluorescente photo-activable. C'est sur eux que repose la qualité du contraste de fluorescence attendu pour suivre les évènements dynamiques en systèmes vivants.

II.1. Absorption de la lumière.

La photo-activation de sondes fluorescentes repose sur deux concepts ayant une même base physique. La fluorescence et la photo-activation sont deux manifestations dépendantes de l'absorption d'une certaine quantité d'énergie sous forme de photons par un chromophore, molécule absorbant certaines radiations lumineuses. L'absorption de cette énergie la mène à un état excité à partir duquel, selon la nature de la molécule irradiée, peut se produire, parmi d'autres phénomènes, l'émission d'un photon (fluorescence) ou une réaction chimique (photo-activation).

Le saut énergétique vers l'état excité peut être effectué soit en absorbant un photon d'une énergie $h\nu$ pour une absorption mono-photonique, soit par l'absorption simultanée de n photons d'énergie $(h\nu)/n$ dans le cas d'une absorption multi-photonique. Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la photo-activation mono-photonique (1 photon) et bi-photonique (2 photons) de fluorophores.

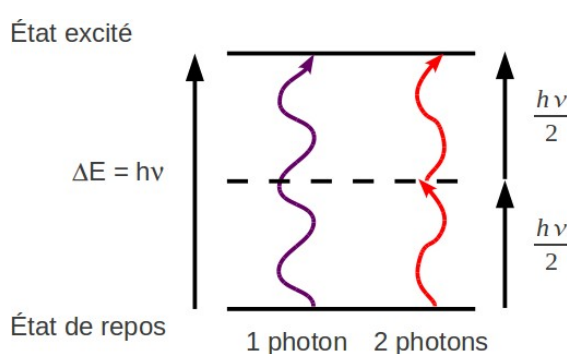


Figure I.2 : Excitation d'un composé par absorption à 1 ou 2 photons.

II.1.1. Absorbance mono-photonique.

Un chromophore a la capacité d'absorber un photon incident, afin d'atteindre un état excité. Chaque chromophore possède une section efficace d'absorption σ pouvant être vue comme la surface disponible, pour une molécule, pour absorber 1 photon.^[7] Plus cette surface se rapproche de la surface réelle de la molécule, plus l'absorption est efficace.

Pour quantifier l'efficacité de l'absorption de lumière par un composé, on peut écrire :

$$\frac{dI}{dx} = -I \sigma n$$

Équation 1.1

qui correspond à la variation d'intensité de lumière (dI) en fonction de l'épaisseur de l'échantillon (dx), avec I = intensité de la lumière incidente et n = nombre de molécules par cm³.

Par réarrangement on obtient : $\frac{dI}{I} = -\sigma n dx$

Équation 1.2

puis par intégration : $\ln(I) = -\sigma n x \Leftrightarrow I = e^{-\sigma n x}$

Équation 1.3

avec x représentant l'épaisseur de l'échantillon et I exprimée en rapport de I₀, l'intensité de la lumière incidente.

Pour quantifier l'absorption de lumière, on a :

$$\Delta I = I - I_0 = e^{-\sigma n x} \Leftrightarrow \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \sigma n x$$

Équation 1.4

C'est l'équation de Beer-Lambert, permettant de quantifier l'absorption de lumière par un composé. Une autre variante de cette équation, est utilisée plus couramment et permet de quantifier la densité optique (DO) de l'échantillon (également appelée absorbance, A) :

$$DO = A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon c x$$

Équation 1.5

avec ε = coefficient d'extinction molaire, correspondant à l'absorption d'une solution d'une mole par litre du composé dans un échantillon d'épaisseur 1 cm, exprimé en M⁻¹.cm⁻¹ ; et

c = concentration du composé en mol/L.

Comme on peut le voir, l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

Pour caractériser un composé, on exprime son absorbance en fonction de sa longueur d'onde d'absorption maximale, ou longueur d'onde maximale d'excitation, notée λ_{ex} , ainsi que le coefficient d'extinction molaire correspondant. On peut également comparer différents composés par leur coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée.

Dans une solution composée d'un mélange de molécules, l'absorbance observée est la somme des absorbances de chaque composé.

II.1.2. Absorbance à 2 photons.

Un composé peut, comme nous l'avons vu, atteindre un état excité par l'absorption d'un photon d'une énergie $h\nu$. Il peut également atteindre le même état excité par l'absorption simultanée de 2 photons d'énergie $(h\nu)/2$, et donc de $\lambda' = 2 \lambda$.

La théorie du concept d'absorption bi-photon a été évoqué pour la première fois en 1929 par Maria Göppert-Mayer,^[8] puis établi en 1931 dans sa dissertation de fin de PhD.^[9] Il a fallu attendre l'invention du laser pour que ce concept soit démontré expérimentalement en 1961 par Kaiser *et al.*^[10] Les expérimentations en bi-photon se sont fortement développées à partir des années 1990 par la disponibilité commerciale des lasers pulsés sub-picosecondes, en particulier le laser Ti:saphire,^[11] et par le développement de la fluorescence à 2 photons, décrite en 1990 par Denk *et al.*^[12]

Par analogie à la loi de Beer-Lambert pour l'absorption mono-photonique, l'atténuation de l'intensité de la lumière à travers un échantillon est donnée par l'équation :^[11]

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -Na_2 I^2$$

Équation 1.6

avec I : intensité de la lumière ; z : profondeur de pénétration dans l'échantillon ; N : nombre de molécules par unité de volume ; a_2 : coefficient moléculaire d'absorption à 2 photons.

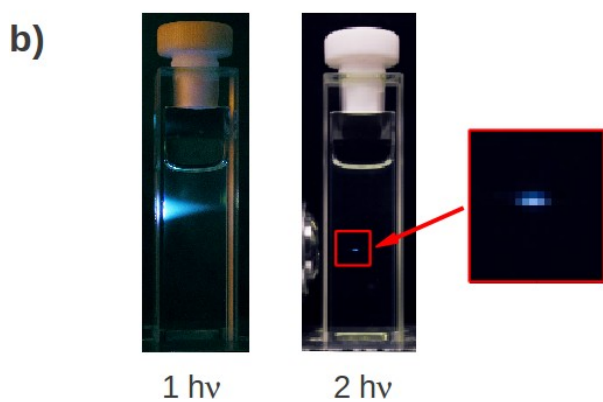
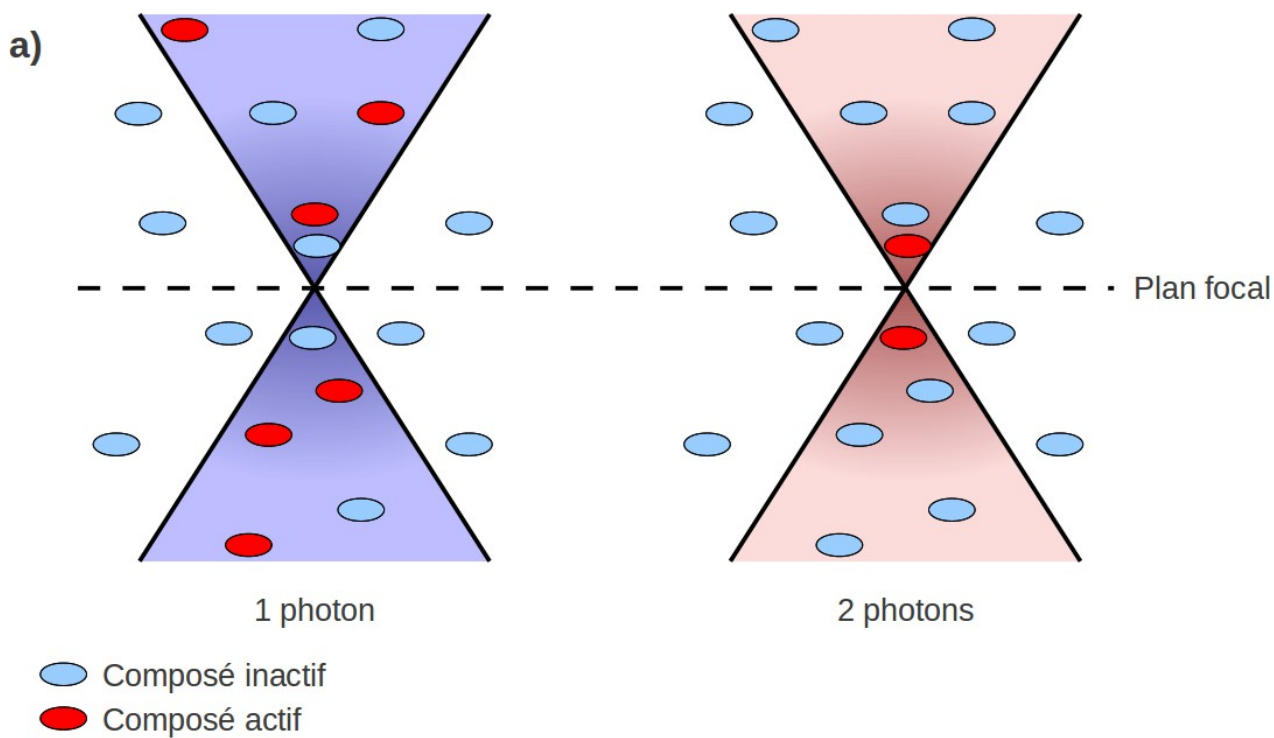


Figure I.3 : Absorption à 1 et 2 photons.

3a. L'absorption à 1 photon se fait tout le long du trajet optique, alors qu'elle est limitée au point focal à 2 photons.

3b. Illustration par l'émission de fluorescence d'une solution de fluorophore suite à une excitation à 1 ou 2 photons.

L'intensité peut également être exprimée comme un flux de photons, $F = I/(h\nu)$, $h\nu$ étant l'énergie du photon. En modifiant l'équation précédente, on obtient l'équation :

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -N \delta_a F I$$

Équation 1.7

F est exprimé en photons.cm⁻².s⁻¹. δ_a est appelé section efficace d'absorption bi-photon, exprimé en Göppert-Mayer (GM, 1 GM = 10⁻⁵⁰ cm⁴.s.photon⁻¹.molécule⁻¹). C'est une mesure quantitative de la probabilité de l'absorption par une molécule de 2 photons simultanément.

Le taux moyen d'absorption en bi-photon peut être exprimé par l'équation :^[13]

$$taux \equiv \frac{1}{2} \delta_a \langle I^2 \rangle$$

Équation 1.8

où $\langle I^2 \rangle$ représente la moyenne des intensités au carré du faisceau laser, exprimée en photon.cm⁻².s⁻¹. La probabilité d'absorber simultanément deux photons présente donc une dépendance quadratique à l'intensité du faisceau lumineux, alors que la dépendance est linéaire pour une absorption mono-photonique. Afin d'obtenir une absorption la plus élevée possible, le flux de photons doit être concentré, tant temporellement, par l'utilisation de lasers pulsés, que spatialement, en focalisant le faisceau lumineux.^[13]

Comme, d'une part, un seul des photons de longueur d'onde élevée, utilisés pour le bi-photon, ne possède pas l'énergie suffisante pour amener un composé à son état excité, et d'autre part, l'absorption simultanée de 2 photons ne peut se faire qu'en un point où l'intensité du faisceau est très élevée, on n'observera une absorption en bi-photon qu'à l'entour du point focal. Il s'agit en réalité d'un volume focal, qui est d'autant plus petit que la lumière est focalisée par un objectif de grande ouverture numérique.^[13]

Le phénomène d'absorption bi-photon peut être utilisé pour de nombreuses expérimentations qui impliquent de passer par l'état excité d'un composé, notamment la fluorescence ou le décaage à 2 photons.

En pratique, la section efficace d'absorption à 2 photons δ_a est difficilement mesurable. On détermine plus généralement la section efficace d'action à 2 photons du composé en mesurant l'effet produit sur le composé par une irradiation à 2 photons.^[14] Cette section efficace d'action est le

produit de δ_a par le rendement quantique de l'action observée.

Ainsi, en fluorescence à 2 photons, on peut déterminer une section efficace de fluorescence à 2 photons, notée $\delta_{fl} = \delta_a \phi_{fl}$. De manière analogue, lors d'expérimentations de photo-fragmentation à 2 photons, on peut déterminer une section efficace de photo-libération, ou d'"uncaging" d'après le terme anglo-saxon, à 2 photons $\delta_u = \delta_a \phi_u$.

Une irradiation à 2 photons présente divers avantages par rapport à une irradiation mono-photonique.

Un tel procédé permet de diminuer très fortement le bruit de fond par action uniquement autour du point focal. Cette propriété est illustrée Figure **I.3**, où sont comparées les fluorescences émises par le même fluorophore suite à une irradiation mono-photonique (excitation sur tout le trajet optique) et bi-photonique (excitation au point focal).

Les longueurs d'onde utilisées ont également leur importance. En effet, les longueurs d'onde au-delà de 700 nm ne sont que peu absorbées par les tissus.^[15] Comme les tissus sont "transparents" à ces longueurs d'onde, il n'y a que peu d'effets délétères dus aux radiations. De plus, l'ADN absorbant dans l'UV, il n'est pas non plus affecté par une lumière rouge. Les conditions d'imagerie sont donc plus favorables aux cellules et organismes.

Enfin, grâce à la transparence des tissus, il est possible d'imager à une profondeur importante. Une pénétration tissulaire de plusieurs millimètres a été décrite par Brown *et al.*^[16]

A partir de son état excité, un composé peut subir différentes actions dissipant l'énergie absorbée. Les deux actions qui sont déterminantes dans le développement de sondes fluorescentes photo-activables sont l'émission de photons de fluorescence et la photo-fragmentation du composé inerte de départ conduisant à la libération du fluorophore.

II.2. La fluorescence.

La fluorescence est un cas particulier de luminescence. Il s'agit de la propriété qu'ont certains composés d'émettre de la lumière par désexcitation radiative à partir d'un état électroniquement excité. Cet état peut être atteint par apport d'énergie de sources variées et le retour à l'état fondamental, non excité, se fait par émission d'un photon.

La nature de la source d'énergie portant le composé à son état excité détermine la classe de luminescence correspondante :

- chémoluminescence, dans le cas où l'énergie est apportée par une réaction chimique.
- bioluminescence, émission de lumière suite à des réactions biologiques.
- thermoluminescence, énergie thermique.
- photoluminescence, où un composé atteint un état excité après l'absorption d'un ou plusieurs photons incidents. La photoluminescence est subdivisée en deux catégories, la fluorescence et la phosphorescence, selon l'état excité atteint par la molécule avant émission de photon.
- ...

Le phénomène de fluorescence a été décrit pour la première fois par Herschel en 1845 suite à l'observation d'une solution aqueuse de quinine, incolore, mais présentant un voile bleuté à sa surface quand elle était exposée à la lumière du soleil.^[17] Stokes a montré en 1852 que ce phénomène était dû à l'absorption de rayonnements UV par la solution de quinine.^[18] Il a également montré que l'émission de lumière se faisait à des longueurs d'onde supérieures à celles de la lumière absorbée.^[18] Ce phénomène porte le nom de déplacement de Stokes, et correspond à la différence de longueur d'onde entre les maxima d'absorption et d'émission.

Les propriétés anti-malariques de la quinine, premier fluorophore connu, ont eu une incidence heureuse sur le développement de la chimie organique, notamment par les essais de synthèses de Perkin à partir de précurseurs anilines. Ces essais ont abouti à la production de la mauvine, premier colorant textile de synthèse, qui est souvent considéré, pour l'anecdote, comme le point de départ du développement de l'industrie chimique moderne.^{[19][20]}

Les propriétés pharmaceutiques de la quinine ont également eu une incidence sur le développement, durant la seconde guerre mondiale, des premiers fluorimètres,^[7] destinés à analyser la composition des traitements anti-malariques. Ces appareils ont ouvert la voie à de nouvelles techniques d'analyse basées sur l'émission de fluorescence.^[21]

Depuis les années 50, l'attrait pour la fluorescence n'a cessé d'augmenter, avec le développement

conjoint de nouvelles sondes et de nouvelles techniques pour la mise en œuvre de ces sondes, comme le laser dans les années 60.

Au cours des vingt dernières années, l'utilisation de la fluorescence en biologie a connu une expansion considérable. Elle rencontre actuellement des applications dans les biotechnologies, en cytométrie en flux, dans le diagnostic médical, dans le séquençage d'ADN, en imagerie cellulaire. La haute sensibilité de cette technique a également permis de remplacer dans de nombreuses applications les éléments radioactifs comme marqueurs, dont l'application est plus délicate.^[20]

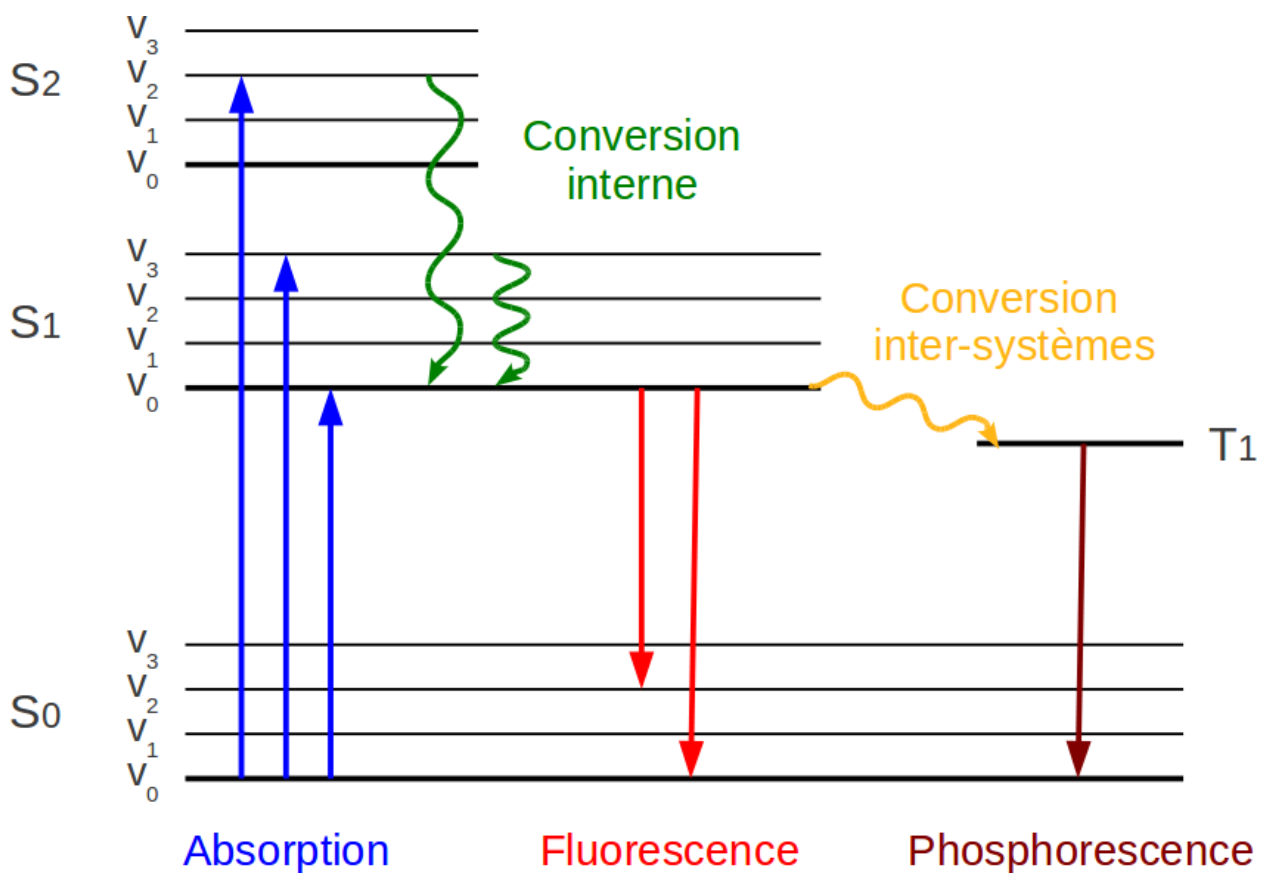


Figure I.4 : Diagramme de Jablonski.

Représentation des états d'énergie d'une molécule et transitions électroniques.

Le phénomène d'émission de fluorescence est l'émission d'un photon à partir d'un état électronique excité suite à l'absorption d'un photon incident. Le temps de vie de fluorescence est de l'ordre de la nanoseconde, c'est à dire que la molécule reste à l'état excité pendant environ 1 ns. Rapporté à l'échelle de la lumière, cela correspond à un trajet de près de 30 cm. De telles échelles nécessitent l'utilisation d'appareils très pointus, mais autorisent, en contre-partie, l'étude de phénomènes extrêmement rapides.^[7]

II.2.1. Chronologie d'une émission de fluorescence.

Le phénomène d'émission de fluorescence peut être représenté sur un diagramme de Jablonski (Figure I.4). Un diagramme de Jablonski typique représente les états d'excitation électronique d'une molécule, les états singulets fondamental S_0 et excités S_1 et S_2 , correspondants aux niveaux d'énergie principaux. Chaque niveau d'énergie est subdivisé en plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle, notés $v_0, v_1, v_2...$

II.2.1.1. Absorption.

Après absorption d'un photon d'énergie $h\nu = hc/\lambda$ (h : constante de Planck ; ν : fréquence du photon ; λ : longueur d'onde de la radiation), un électron d'une orbitale de niveau d'énergie S_0 effectue une transition vers un état d'énergie supérieur $S_x v_y$. La différence entre le niveau d'énergie atteint et l'état basal $S_0 v_0$ correspond exactement à l'énergie du photon absorbé. Les différents états d'énergie étant déterminés pour une molécule donnée, seules certaines transitions sont autorisées, expliquant ainsi la forme du spectre d'absorption. Les transitions vers S_1 et S_2 se font sur des temps de l'ordre de grandeur de 10^{-15} s.

Lors de cette transition, l'électron ayant atteint le niveau d'énergie $S_x v_y$ conserve l'appariement de spin avec l'électron demeurant sur l'orbitale de niveau S_0 . L'opposition des spins étant conservée, le retour ultérieur sur l'orbitale de départ est autorisé.

II.2.1.2. Conversion interne.

Après avoir atteint son état excité S_{xv_y} , l'électron effectue une conversion interne. Il va subir une désexcitation vers S_{1v_0} sur un temps de l'ordre de 10^{-12} s. Contrairement aux états S_0 et S_1 qui présentent une différence d'énergie élevée, les états S_1 et S_2 sont énergétiquement assez proches. Cette proximité pourrait entraîner un recouvrement plus ou moins important de niveaux vibrationnels de S_1 et S_2 d'énergie équivalente, favorisant une conversion interne rapide.

L'électron demeure au niveau S_{1v_0} pendant un temps de l'ordre de la nanoseconde, ce qui représente un temps relativement long, rapporté aux temps de transitions de l'absorption ou de la conversion interne.

Les temps très courts pendant lesquels l'électron passe d'un niveau d'énergie à l'autre n'autorisent aucun mouvement simultané du fluorophore et de son environnement, les transitions sont purement électroniques. En revanche, durant le temps de vie de fluorescence, temps pendant lequel le fluorophore demeure à l'état excité, il peut se produire un réarrangement des molécules du solvant entourant le fluorophore pour aligner leurs moments dipolaires. L'énergie dissipée par ce réarrangement entraîne une baisse de l'énergie du niveau S_{1v_0} . Cet effet est d'autant plus marqué que le solvant est polaire. Cela explique les variations, parfois importantes, des spectres d'émission de certains fluorophores en fonction du solvant dans lequel ils sont dissous. Ce phénomène est appelé effet de solvant et est, en partie, responsable du déplacement de Stokes.^[7]

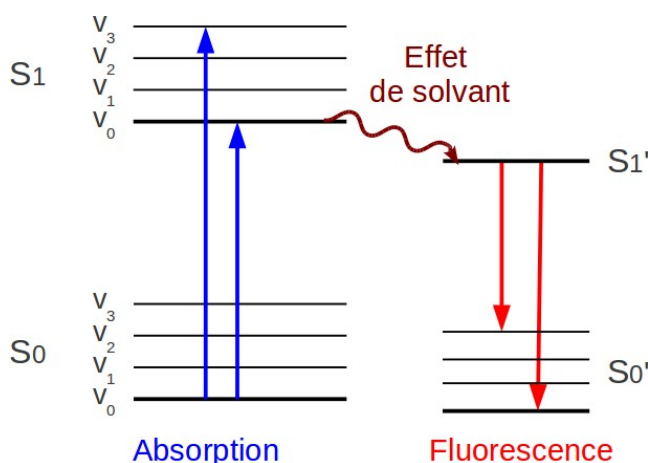


Figure I.5 : Effet de solvant.

La perte d'énergie due à la réorientation des moments dipolaires du fluorophore et des molécules de solvant induit une relaxation des états d'énergie.

II.2.1.3. Émission.

A partir du niveau S_{1v_0} , le fluorophore émet un photon d'énergie correspondant à la transition S_{1v_0} vers S_{0v_y} . Le temps de vie de fluorescence étant généralement de 10^{-8} - 10^{-9} s, le phénomène de conversion interne est terminé. Ainsi la probabilité d'observer l'émission d'un photon à partir d'un niveau d'énergie supérieur à S_{1v_0} est extrêmement faible. Le spectre d'émission observé ne dépend donc pas, à quelques exceptions près, de la longueur d'onde d'excitation. Ce phénomène est connu comme la règle de Kasha.^[22]

La désexcitation radiative ayant lieu à partir de l'état vibrationnel le plus bas de S_1 , on comprend également que les photons émis sont de plus faible énergie que les photons absorbés, entraînant un décalage vers le rouge du spectre d'émission. Toutefois, l'excitation électronique n'affecte que peu la géométrie du noyau ou de la molécule.^[7] Ainsi, les différences d'énergie entre les niveaux vibrationnels des états S_0 et S_1 sont semblables, expliquant la symétrie des spectres d'excitation et d'émission.

II.2.2. Facteurs affectant la fluorescence.

L'émission de fluorescence peut être diminuée par différents facteurs compétiteurs. Ces phénomènes entraînent une extinction, ou "quenching", plus ou moins complète, de la fluorescence et interviennent à partir de S_{1v_0} .

II.2.2.1. Phosphorescence.

La molécule peut subir une conversion inter-système. Elle passe de l'état singulet S_1 à un état triplet T_1 , par inversion du spin de l'électron sur S_{1v_0} . L'inversion de spin entraînant une relaxation du système, l'état T_1 présente une énergie plus basse que l'état S_1 (Figure I.4). Un photon peut être émis à partir de l'état T_1 . Son énergie sera plus basse que celle d'un photon émis depuis S_1 , c'est le phénomène de phosphorescence. La transition T_1 - S_0 étant "interdite" par le non appariement des spins de l'électron sur l'orbitale excitée et celui de l'orbital de repos, le temps de vie à l'état triplet est extrêmement long comparé à celui de l'état singulet. Les temps de vie de phosphorescence vont de

10^{-3} s à plusieurs heures (principe utilisé dans les jouets phosphorescents ou les veilleuses de nuit pour les enfants).

II.2.2.2. Les désexcitations non radiatives.

Les désexcitations non radiatives d'un fluorophore à l'état excité peuvent intervenir par divers procédés, comme des rotations ou des vibrations au niveau des liaisons inter-atomiques ou des collisions intermoléculaires.^[23]

II.2.2.2.a. Le Transfert d'Électron Photo-induit.

Une perte de fluorescence peut également être due à un transfert d'électron photo-induit (PET, *photoinduced electron transfer*).^[24] Il s'agit d'un transfert d'électron, à partir de l'état excité du fluorophore, soit d'un groupement donneur vers le fluorophore, soit du fluorophore vers un groupement accepteur.

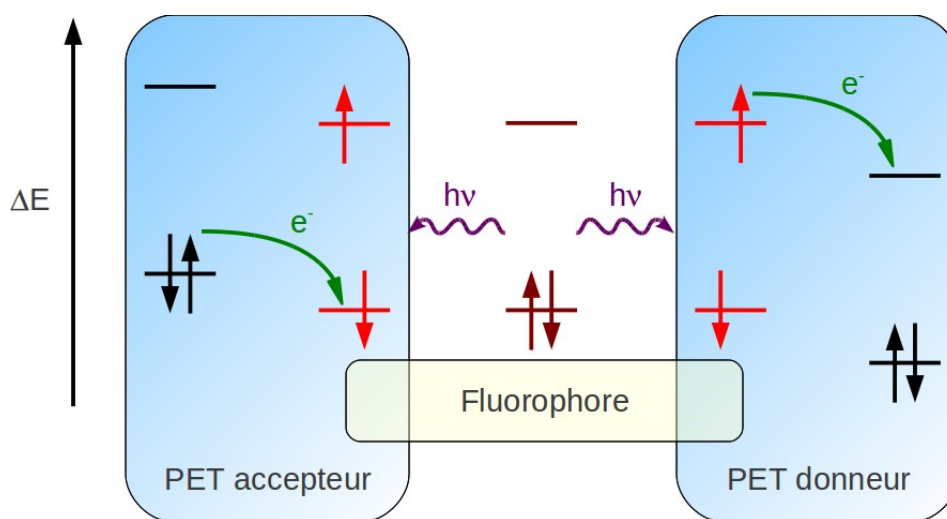


Figure I.6 : Concept du transfert d'électron photoinduit (PET).

A partir de l'état excité du fluorophore, il peut y avoir soit transfert d'un électron du niveau basal d'un donneur vers le niveau basal libre du fluorophore (PET accepteur) ; soit transfert de l'électron de l'état excité du fluorophore vers une orbitale libre d'un accepteur (PET donneur).

Lors d'un transfert d'un groupement donneur vers le fluorophore, un électron du donneur passe sur l'orbitale S_0 du fluorophore. Comme ce niveau porte à ce moment deux électrons, le retour de l'électron de S_1 est impossible et l'émission de fluorescence ne peut avoir lieu.

L'électron de S_1 peut également être transféré vers une orbitale libre du groupement accepteur. La couche S_1 du fluorophore étant désormais libre, le retour de S_1 vers S_0 par émission de photon est impossible.

Le PET dépend des différents niveaux d'énergie du fluorophore et du groupement de transfert. En modifiant ces niveaux, le phénomène est annulé et la fluorescence restaurée. C'est le cas lors de la liaison d'un cation pour les sondes cationiques (H^+ , cations métalliques)^[25] ou une addition de Michael d'un thiol sur un système maléimide.^{[26][27]}

II.2.2.2.b. Le Quenching par FRET.

Un autre mécanisme de désexcitation non radiative d'un fluorophore est un transfert d'énergie non radiatif entre le fluorophore excité, servant de donneur, et un accepteur dont le spectre d'absorption recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du donneur. C'est le phénomène de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Ce phénomène est distance dépendant, et peut donc être utilisé pour des mesures de distances inter- ou intra-moléculaire.^[28]

Cette technique est utilisée pour du FRET fluorescent, permettant de déterminer la proximité de deux entités marquées, l'une avec le donneur et l'autre avec l'accepteur. La mesure des intensités de fluorescence respectives permet de déterminer le degré de proximité des deux entités.

Il est également possible d'utiliser ce transfert d'énergie pour éteindre la fluorescence lorsque le transfert est effectué vers un accepteur non fluorescent. C'est du quenching par FRET. Par déplacement du quencher, la fluorescence peut être restaurée. Cette stratégie a été utilisée par Komatsu *et al.* pour des mesures en temps réel de la dynamique de protéines cellulaires.^[29]

II.2.2.2.c. Réactions photo-induites.

Enfin, certains composés ont la propriété d'effectuer une réaction chimique à partir de l'état excité. C'est le cas par exemple dans le photo-blanchiment d'un fluorophore. C'est la dégradation du composé fluorescent par réaction avec des composés réactifs du milieu. Le photo-blanchiment est toutefois parfois mis volontairement en œuvre en imagerie, dans le but de visualiser ou de quantifier certains phénomènes dynamiques.

Les réactions photo-induites contrôlées sont également utilisées dans différents domaines : photo-chimie de synthèse (procédés radicalaires...), marquage biologique (marquage de photo-affinité), neuro-sciences (photo-activation de neurotransmetteurs).

II.2.3. Les fluorophores.

Les fluorophores sont des molécules possédant la propriété d'émettre un photon de longueur d'onde λ consécutivement à l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ' . Les fluorophores les plus utilisés comme marqueurs de protéines sont les protéines fluorescentes, dérivées de la GFP et les fluorophores organiques de petite taille. Ces composés sont caractérisés par différents paramètres.

II.2.3.1. Caractéristiques.

II.2.3.1.a. Absorption.

La première caractéristique d'un fluorophore est sa capacité à absorber un photon incident, afin d'atteindre son état excité. L'efficacité de l'absorption de lumière est déterminée par le coefficient d'extinction molaire ϵ du composé. Ce coefficient est déterminé à une longueur d'onde donnée et permet de comparer l'efficacité d'absorption de plusieurs fluorophores. Il est généralement donné à la longueur maximale d'absorption du fluorophore.

Dans le cas d'une excitation bi-photonique, on détermine soit la section efficace d'absorption à 2 photons δ_a , soit directement la section efficace de fluorescence à 2 photons δ_f , toujours données en fonction de la longueur d'onde correspondante.

Une absorbance élevée permet d'utiliser des intensités à l'irradiation plus faibles pour une réponse identique, limitant ainsi l'effet de la lumière sur le système étudié.

II.2.3.1.b. Émission.

La deuxième caractéristique d'un fluorophore est d'émettre un photon de manière efficace. L'émission d'un composé est caractérisée par la longueur d'onde maximale d'émission, notée λ_{em} et le rendement quantique de fluorescence ϕ_f , calculé de la manière suivante :

$$\phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

Le rendement est un nombre sans unité, allant de 0 (non fluorescent) à 1 (émission d'un photon par photon absorbé). En pratique, le rendement quantique de fluorescence est calculé par rapport à un composé de référence, placé à la même DO, par comparaison des aires de réponse du composé et de la référence.

Le rendement quantique de fluorescence, bien qu'étant une donnée primordiale pour déterminer la qualité d'un fluorophore, ne reflète pas systématiquement le comportement du fluorophore. En effet, le spectre d'émission est considéré dans son ensemble pour la détermination du rendement, que la répartition des longueurs d'onde soit étalée ou étroite. Ainsi, un fluorophore de répartition large pourra avoir une réponse à son λ_{em} moindre qu'un autre fluorophore, dont la répartition des longueurs d'onde sera plus centrée sur son maximum d'émission. Comme en pratique, on ne visualisera la fluorescence que sur une partie d'un spectre d'émission, il convient de s'assurer que la réponse est suffisante pour la manipulation envisagée.

II.2.3.1.c. Brillance.

La brillance B est une valeur qui associe l'absorbance d'un composé à son rendement quantique de fluorescence.

$$B = \varepsilon \times \phi_f$$

C'est un paramètre simple qui permet d'effectuer des comparaisons fiables entre plusieurs molécules fluorescentes. C'est également un paramètre qui donne un aperçu de l'intérêt biologique d'un composé pour du marquage fluorescent. Il est généralement reconnu qu'une brillance de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ permet une utilisation confortable du fluorophore, du point de vue de l'intensité du signal. La brillance est toutefois à mettre en rapport avec le bruit de fond naturel du système observé.

II.2.3.1.d. Longueurs d'onde d'absorption et d'émission.

Une attention particulière doit être portée sur l'allure des spectres d'absorption et d'émission, en plus de la détermination de la brillance. Ce point est surtout important si l'on envisage des expérimentations sur un système vivant, sur cellules ou animal entier.

Une cellule, et a fortiori un organe ou un organisme entier, possède nativement de nombreux composés endogènes, dont un certain nombre sont des fluorophores.^[20]

Trois acides aminés, le tryptophane, la tyrosine et, dans une moindre mesure, la phénylalanine sont fluorescents. Ils absorbent et émettent dans l'UV (280 nm et 348 nm pour le tryptophane, avec une brillance de 800 environ).^[20]

D'autres fluorophores sont présents dans le cytoplasme dont les co-facteurs nicotinamides réduits, comme le NADH, qui présente des maxima d'excitation et d'émission à 340 et 435 nm.^[30]

Les flavines représentent un autre groupe de fluorophores. La flavine mono-nucléotide absorbe à 450 nm, émet à 530 nm avec une brillance relativement élevée de $3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^{[20][31]}

D'autres entités fluorescentes peuvent être présentes comme les porphyrines ou des dérivés de la

pyridoxine. L'ensemble de ces espèces forme ce qui est appelé "autofluorescence" des cellules. Bien que l'intensité de l'autofluorescence soit assez faible dans l'absolu, elle peut interférer avec le signal intrinsèque d'un marqueur fluorescent lorsque le marquage n'est pas intense (marquage d'une protéine, suivi de dynamique par photo-activation...).

Pour s'affranchir, ou du moins limiter les effets du bruit de fond naturel, il convient de s'éloigner le plus possible des longueurs d'ondes rencontrées naturellement dans une cellule, allant typiquement de l'UV au vert-jaune. Il est globalement admis qu'une longueur d'onde d'émission minimale de 600 nm permet de s'affranchir des effets de l'autofluorescence cellulaire.

L'utilisation de lumière orange-rouge présente en outre deux avantages supplémentaires.

Il a été rapporté que l'absorption endogène des tissus mammifères présentait un minimum entre 650 et 850 nm. Comme corollaire, la pénétration tissulaire des radiations visibles présente un maximum entre 650 et 850 nm.^[15] Ainsi, l'utilisation de sondes absorbant et émettant dans le rouge autorise un travail sur des échantillons plus épais, les tissus étant plus transparents à ces longueurs d'onde.

Enfin, il est connu que l'ADN absorbe autour de 260 nm avec un ϵ de $(7-15) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^[32] Ainsi, en illuminant un échantillon à des longueurs d'onde très éloignées de l'UV, on évite tout problème de photo-toxicité vis à vis de l'ADN.

II.2.3.1.e. Déplacement de Stokes.

Le déplacement de Stokes est la différence entre λ_{ex} et λ_{em} . Un déplacement de Stokes élevé pour un fluorophore est un avantage pour plusieurs raisons.

Cela permet un meilleur confort d'utilisation du fluorophore. En effet, la mesure de la fluorescence émise a moins de risque d'être polluée par les rayonnements d'excitation. De plus, dans le cas où il est possible de modifier la bande passante d'acquisition (largeur du spectre collecté), un fort décalage entre excitation et émission permet une ouverture de la bande passante également sur les longueurs d'onde inférieures au λ_{em} , et ainsi obtenir un signal plus intense.

Certains fluorophores présentant un déplacement de Stokes faible, comme les rhodamines ou les fluorescéines ($\Delta\lambda \approx 20-30 \text{ nm}$), ont un comportement parfois problématique dans des expérimentations de marquage fluorescent. Ces sondes ont en effet tendance à subir un phénomène d'auto-quenching lors d'un marquage multiple.^[7] Cela peut s'expliquer par le fort recouvrement des spectres d'absorption et d'émission et par la proximité des différentes molécules lors d'un marquage multiple sur une même protéine. Deux sondes sont séparées par une distance inférieure à 40 Å, ce qui est inférieur à la distance de Förster pour un transfert de FRET fluorescéine-fluorescéine. De

plus, il a été rapporté que les transferts d'énergie en FRET entre sondes xanthènes est très efficace.^[33] Ainsi, à cause de leur faible déplacement de Stokes, les sondes fluorescéine et rhodamines, peuvent subir un transfert d'énergie induisant un self-quenching de leur fluorescence.^[7]

II.2.3.1.f. Temps de vie de fluorescence.

La relaxation d'une molécule de son état excité vers son état de repos par émission de photon est un phénomène aléatoire. Le temps de vie de fluorescence représente le temps moyen passé par une population de fluorophores à l'état S_1V_0 avant émission de photon et couvre des valeurs allant de 0,1 à 100 ns. C'est un paramètre important pour les mesures résolues en temps,^[34] et les applications impliquant la polarisation de fluorescence.^[35]

II.2.3.1.g. Stabilité.

La stabilité d'un fluorophore est une caractéristique importante. Il doit résister au photoblanchiment lorsqu'une irradiation prolongée est requise. Il doit également être inerte vis à vis de son environnement pour ne pas altérer le signal fluorescent attendu et ne pas modifier son environnement, notamment lors d'imagerie biologique, afin de conserver la viabilité de l'échantillon.

II.2.3.1.h. Solubilité.

La plupart des expérimentations biologiques se déroulent en milieu physiologique aqueux. Il est important que le fluorophore ait une solubilité aqueuse suffisante pour atteindre une concentration adéquate avec l'expérimentation envisagée. Or, la plupart des fluorophores organiques sont construits autour d'un cœur polycyclique aromatique (coumarines, fluorescéines, rhodamines ...) ou d'hétérocycles aromatiques reliés par une chaîne carbonée insaturée (Bodipy, cyanines...). Ces cœurs sont fortement lipophiles et présentent de fait une solubilité aqueuse limitée. Des fonctions chimiques ionisées à pH physiologique ont été ajoutées à ces fluorophores afin de les rendre plus hydrophiles comme carboxylates pour la fluorescéine ou sulfonates pour les cyanines Cy3,5,7 et les rhodamines. Le pendant de ces modifications est une diffusion plus faible à travers les membranes qui pourrait limiter leur utilisation pour des expérimentations intra-cellulaires.

II.2.3.1.i. Accessibilité chimique.

Un point qui peut sembler secondaire en vue d'une utilisation de fluorophores en biologie est leur accessibilité chimique, c'est à dire la possibilité de pouvoir effectuer des modifications chimiques sur ces molécules. Ce point est néanmoins très important lorsque l'on envisage de

produire une sonde fluorescente, qui porte une fonction réactive vis à vis de sa cible. La plupart des sondes commerciales possèdent ainsi une fonction ester activée, permettant la formation d'une liaison amide avec une fonction amine présente sur la molécule cible.

La possibilité de modifications chimiques peut également être recherchée pour modifier les propriétés physico-chimiques des fluorophores (longueurs d'onde, solubilité, pKa...).

II.2.3.2. Les protéines fluorescentes.

Découverte en 1962 par *Shimomura et al.*,^[36] la GFP (Green Fluorescent Protein, protéine fluorescente verte), extraite à partir d'*Æquorea victoria*, une méduse du pacifique capable de bioluminescence, a marqué un tournant en biologie cellulaire. Le chromophore responsable de la fluorescence naturelle de cette protéine est identifié en 1979,^[37] mais il faudra attendre les années 90, avec le clonage du gène de la GFP en 1992,^[38] et surtout la démonstration en 1994 de son expression en fusion avec une protéine d'intérêt,^[39] pour que son utilisation commence à se développer très fortement en biologie. De nombreux variants de la GFP ont été par la suite isolés d'organismes marins ou obtenus par mutagenèse dirigée.

La révolution engendrée par la découverte de ces protéines fluorescentes a été récompensée par l'attribution du prix Nobel de Chimie 2008 à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien pour leurs travaux sur la découverte et le développement de ces protéines.

II.2.3.2.a. Structure et fluorophore.

La structure du fluorophore des protéines fluorescentes est liée à la structure de la protéine elle-même. Les protéines de cette famille comportent aux environs de 220-240 acides aminés (25 kDa), formant un tonneau de onze feuillets β autour d'une hélice transversale centrale^[40] portant le fluorophore. Celui-ci se forme durant l'étape de maturation de la protéine, par une modification post-traductionnelle de trois acides aminés de cette hélice centrale (Figure I.7), les résidus 65, 66 et 67, numérotés selon la structure primaire de la GFP, servant de référence. Le fluorophore ainsi formé se situe par conséquent au centre du tonneau qui agit comme une coquille le protégeant de toute interaction directe du milieu extérieur.^[41]

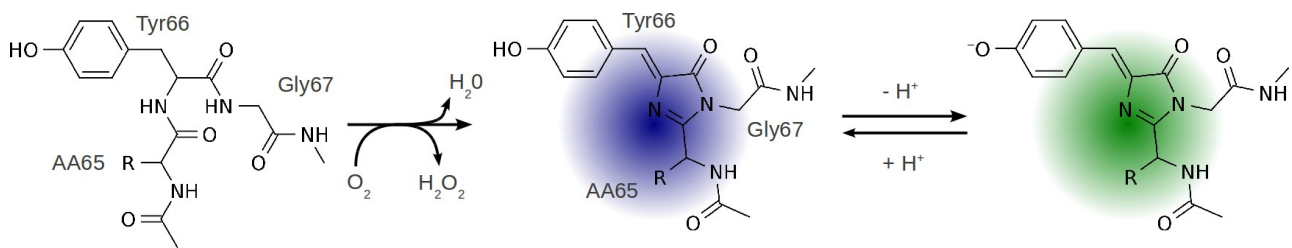


Figure I.7 : Maturation du fluorophore de la GFP. (adapté d'après Chudakov, 2010)^[41]

Les onze feuillets β des protéines fluorescentes, stabilisés entre eux par de nombreuses interactions non covalentes, forment une structure extrêmement résistante tant vis à vis d'une dénaturation, chimique ou thermique, que d'une protéolyse,^[42] assurant de fait une grande stabilité aux protéines fluorescentes. Outre la stabilité du fluorophore, les feuillets β permettent de catalyser la formation du cœur fluorescent et jouent un rôle dans la variété des couleurs des protéines fluorescentes.

L'intérêt des biologistes pour les protéines fluorescentes découle de leur large couverture spectrale, de leur maturation, indépendante du système d'expression et de leur expression par intégration du gène de la protéine dans le génome de l'hôte, soit en fusion avec le gène d'une protéine d'intérêt, soit isolée. Cette propriété autorise le développement de lignées (cellules, animaux) fluorescentes stables. Ces caractéristiques font des protéines fluorescentes les marqueurs fluorescents les plus largement utilisés, le nombre de publications sur la GFP dépassant les 2000 publications par an de 2005 à 2010.^[41]

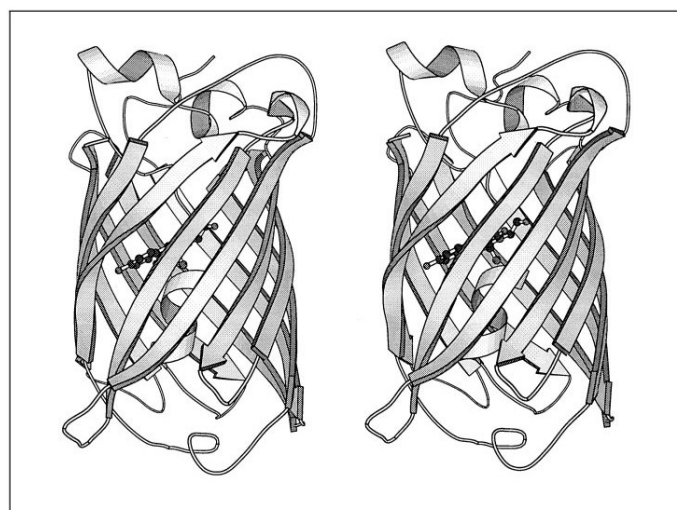


Figure I.8 : Structure de la GFP, formée d'une hélice centrale portant le fluorophore, entourée d'un tonneau de onze feuillets- β . L'image est construite comme un stéréogramme, c'est à dire qu'elle fait apparaître la protéine en 3D en vision parallèle. Tsien, 1998.^[40]

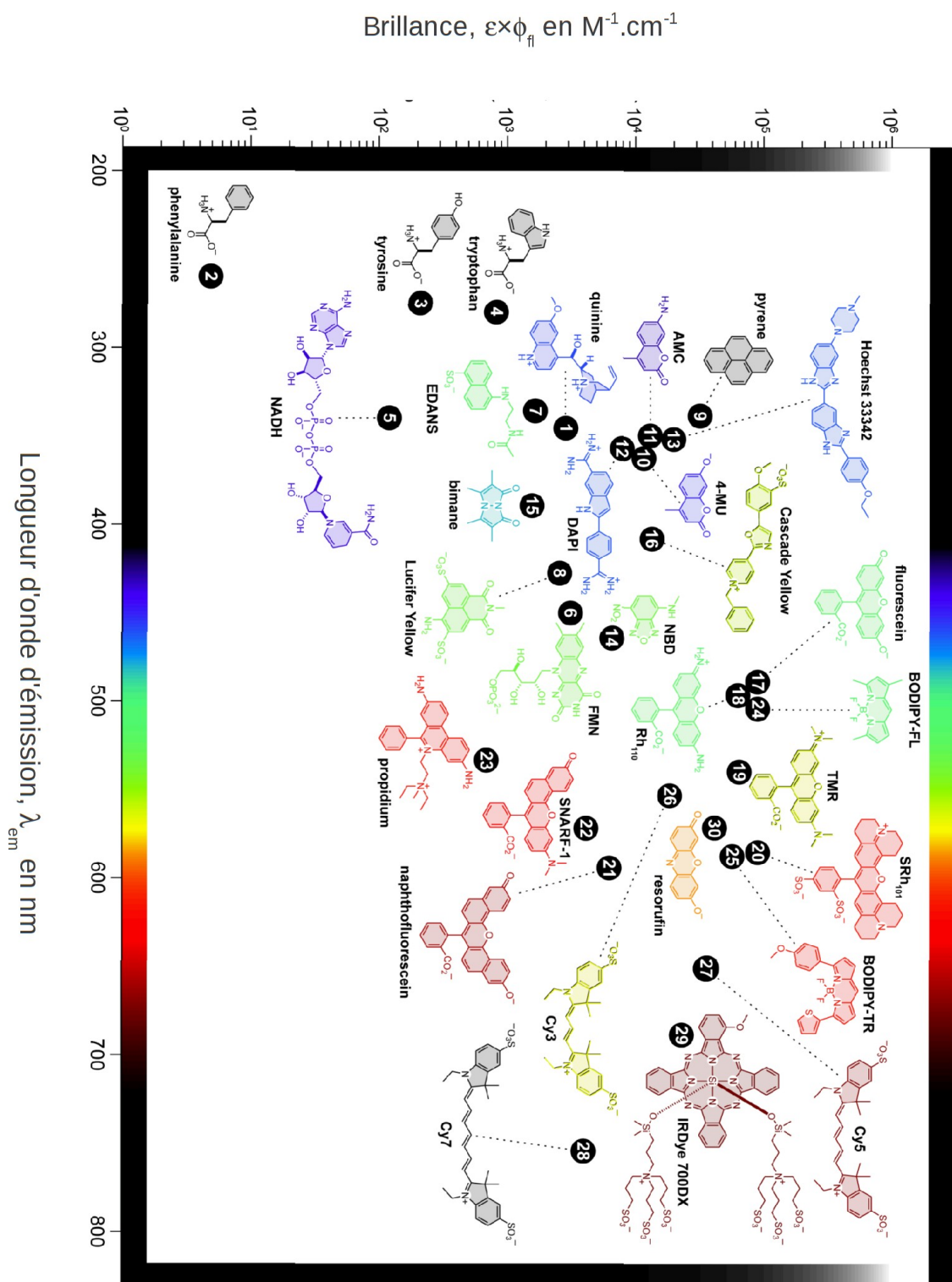


Figure I.9 : Principaux fluorophores organiques, répartis selon leur brillance en fonction de leur longueur d'onde d'émission (échelle des ordonnées logarithmique). Extrait de Lavis et al., 2008.^[20]

II.2.3.3. Fluorophores organiques.

Les descriptions de petites molécules fluorescentes sont extrêmement nombreuses dans la littérature. Il est de fait impossible d'effectuer une présentation exhaustive de tous les marqueurs utilisés.

Je présenterai ici succinctement les grandes familles de fluorophores organiques couramment utilisés comme sondes en imagerie et en biologie. Quelques fluorophores importants sont présentés Figure I.9, selon leur brillance et leur longueur d'onde maximale d'émission λ_{em} .

La caractéristique commune à ces fluorophores est la présence de plusieurs cycles aromatiques dans leur structure.

II.2.3.3.a. Les fluorophores polycycliques aromatiques carbonés.

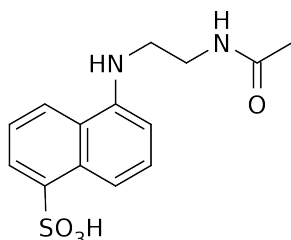


Figure I.10 : EDANS.

Une catégorie classique de marqueurs de biomolécules regroupe les dérivés du naphthalène. Cette famille comprend l'acide 5-(diméthylamino)naphtalène-1-sulfonique (dansyl),^[43] ainsi que ses dérivés.^{[44][45]} Ces composés présentent une λ_{ex} d'environ 335 nm, λ_{em} de 520 nm, un ϵ de 6100 M⁻¹.cm⁻¹ et un ϕ_{fl} de 0,27 en solution dans l'eau.^[46] Le dérivé EDANS est utilisé en particulier en FRET.^{[47][48]} Le cœur naphthalène a également servi de base au développement de séries 4-amino-3,6-disulfonylnaphtalimides, absorbant vers 430 nm.^[49] Cette série contient le motif "Lucifer Yellow", utilisé comme cœur fluorescent pour de nombreuses sondes.^[33]

Des molécules dérivées du pyrène sont également utilisées comme sondes. Ces fluorophores ont des λ_{ex} et λ_{em} de l'ordre de 340 et 375 nm et une brillance d'environ 32000 M⁻¹.cm⁻¹.^{[50][33]} La sensibilité de ces fluorophores à leur environnement a été mise à profit pour l'élaboration de sondes indiquant le repliement de l'ADN.^[51] Le pyrène présente également un long temps de vie de fluorescence (> 100 ns) permettant la formation d'un dimère entre un pyrène excité et un pyrène à

l'état basal. L'eximère présente un décalage bathochromique (vers les grandes longueurs d'onde) de son spectre d'émission (490 nm). Cette particularité a permis l'observation de phénomènes biologiques importants, comme le repliement de protéines.^[52] Des dérivés sulfonylés ont également été synthétisés, produisant des fluorophores dont la solubilité aqueuse est améliorée.^{[53][33]}

Des dérivés de l'anthracène ont également été synthétisés et utilisés pour la détection d'anions comme les pyrophosphates.^[54] Des structures issues du pérylène ont montré de hauts rendements quantiques en solvants organiques,^[55] mais leur utilisation semble limitée en solution aqueuse.^[56] Enfin le motif coronène a été utilisé pour développer des sondes possédant un très long temps de vie de fluorescence (200 ns), intéressantes pour des mesures résolues en temps.^[57]

II.2.3.3.b. Les coumarines.

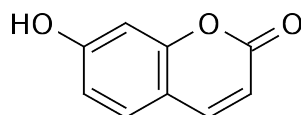


Figure I.11 : 7-hydroxycoumarine

Les coumarines forment une large classe de molécules regroupant des substances naturelles, des composés pharmacologiquement actifs et des fluorophores. La substitution de leur position 7 par un hétéro-atome (généralement reportés : oxygène ou azote) confère à ces molécules des propriétés d'absorption dans le proche-UV, comme la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (ou 4 méthyl-umbelliférone, la 7-hydroxycoumarine étant communément appelée umbelliférone), présentant des λ_{ex} et λ_{em} de respectivement 360 et 450 nm ainsi qu'une brillance de $11000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ environ.^[58] Le large déplacement de Stokes (90 nm) est dû en partie à un changement important de son moment dipolaire à l'état excité, entraînant une perte d'énergie par réorganisation du solvant.^[59] Les sondes moléculaires construites autour d'un cœur coumarine représentent d'intéressants marqueurs biomoléculaires. Les positions 3 et 4 du squelette peuvent être relativement facilement substituées afin de fonctionnaliser le fluorophore par différents groupements réactifs.^[33] Les propriétés spectrales des dérivés 7-aminocoumarines peuvent être modulées par différentes substitutions de l'atome d'azote.^[60] Enfin, les propriétés chimiques des coumarines (solubilité, pKa...) peuvent être modifiées par des substitutions sur d'autres positions. La bis-fluorination de l'umbelliférone aux positions 6 et 8 permet d'abaisser son pKa de 8 à 5.^[61]

II.2.3.3.c. Les quinolines.

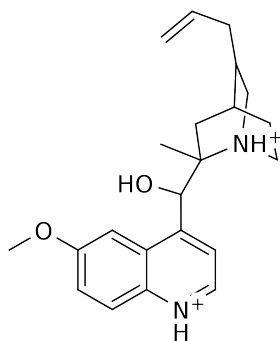


Figure I.12 : Quinine

Le composé chef de file de cette classe est la quinine, fluorophore historique et toujours utilisé comme standard de fluorescence.^{[62][63]} La partie 6-méthoxyquinoline peut être alkylée. De nombreux composés quinolinium, possédant la propriété d'être quenchés par les ions Cl⁻, ont été utilisés comme rapporteurs de la présence de ces ions.^[64] Les propriétés de chélation des dérivés de l'hydroxyquinoline ont été mises à profit pour l'élaboration de substrats fluorescents de kinases,^[65] ou d'indicateurs fluorescents de la présence d'ions.^[66]

II.2.3.3.d Les indoles et les imidazoles.

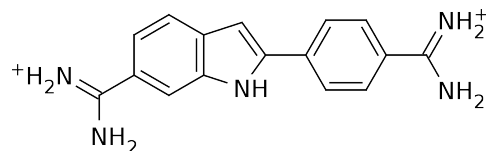


Figure I.13 : DAPI

Le fluorophore indole a été élaboré à partir du tryptophane pour obtenir un outil efficace comme l'indicateur calcique Indo-1.^[67] Une autre sonde indole classique est le 4',6-diamino-2-phénylindole (DAPI) qui se lie au petit sillon de l'ADN,^[68] induisant une forte hausse de la fluorescence. Le DAPI est donc un marqueur largement utilisé de l'ADN en biologie.^[69]

Les sondes dibenzimidazoles, développées par Hoechst AG sont des marqueurs se liant à l'ADN, au niveau du petit sillon. Ils ont été utilisés en microscopie de fluorescence et en cytométrie en flux.^[70] La sonde Hoechst 33342 pénètre suffisamment à travers les membranes pour être utilisée sur cellules vivantes.^[69]

II.2.3.3.e. Les sondes NBD.

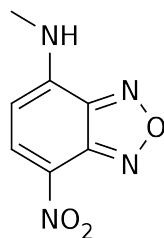


Figure I.14 : NBD

Les sondes dérivées du 4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) sont d'autres exemples de petits fluorophores organiques. Certains dérivés comme le Cl-NBD,^[71] et le 7-chlorobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate(SBD-Cl),^[72] ont la propriété de réagir sur les amines ou les thiols. Les dérivés amino du NBD-Cl présentent des propriétés de fluorescence intéressantes, notamment ses $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$, élevées par rapport à la faible taille du marqueur. Il présente toutefois une brillance modeste de $6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans le méthanol.^[33]

II.2.3.3.f. Autres fluorophores excités dans l'UV.

D'autres composés, absorbant dans l'UV, présentent un intérêt car ils possèdent un déplacement de Stokes remarquable.

Les dérivés de la structure diaryloxazole, comme le Cascade Yellow,^{[73][33]} sont utilisés comme marqueurs fluorescents.^[73] Le Cascade Yellow présente un déplacement de Stokes de 149 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 409 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 558 \text{ nm}$) ainsi qu'une brillance intéressante de $13000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II.2.3.3.g. Les fluorescéines.

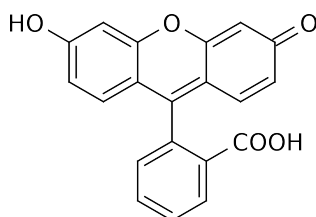


Figure I.15 : Fluorescéine

Ces fluorophores bien connus sont construits sur un cœur xanthène. La synthèse de la fluorescéine a été décrite par Baeyer en 1871.^[74] En dépit son ancienneté, lui conférant un caractère

historique, la fluorescéine demeure l'un des fluorophores les plus largement utilisés encore à l'heure actuelle. Il s'agit, pour être plus précis du groupe des fluorescéines. De nombreux dérivés de la fluorescéine ont en effet été synthétisés, améliorant les caractéristiques physico-chimiques de la fluorescéine historique.

La fluorescéine existe sous de multiples états ioniques. La forme bis anionique (carboxylate et phénate présents simultanément, en solution aqueuse basique, le pKa du phénol étant de 6,4) est la forme présentant la fluorescence la plus élevée : $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$ et affichant une excellente brillance de $88000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^{[7][33]}

De manière analogue à la série coumarine, différentes substitutions des positions aromatiques sont accessibles, autorisant la fonctionnalisation du fluorophore avec des fonctions réactives ou pour modifier ses propriétés physico-chimiques. Une bis fluorination aux positions 2' et 7' entraîne un abaissement du pKa à 4,6 et une augmentation de sa photostabilité tout en conservant les spectres d'absorption et d'émission comparables (Oregon Green).^[75]

La sensibilité de la fluorescéine aux variations de pH a permis le développement d'indicateurs de pH.^[76] Des dérivés chélateurs de la fluorescéine ont également été mis au point pour détecter la présence d'ions fluorures et de divers ions métalliques.^[20]

L'ajout de groupements électro-donneurs sur le cycle benzène de la fluorescéine a permis de mettre au point le Tokyo Green, une fluorescéine dont les propriétés redox sont améliorées par des substitutions 2-méthyl-4-(2-oxy-acétate) sur le site benzène.^[77] Le Tokyo Green a été utilisé comme rapporteur d'activité enzymatique^[77] ainsi que pour de l'imagerie in vivo.^[78]

II.2.3.3.h. Les rhodamines.

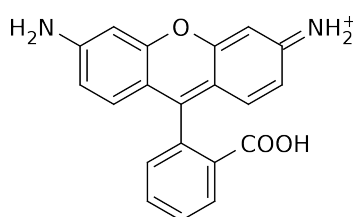


Figure I.16 : Rhodamine 110

Les rhodamines sont des sondes très largement utilisées. Cette classe de fluorophores présente certaines caractéristiques clés, comme une faible sensibilité au pH et des propriétés de fluorescence modulables par différentes alkylations des anilines.

Le composé le plus simple de la série, la rhodamine 110, présente des caractéristiques de fluorescence analogues à la fluorescéine ($\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$; brillance de $68000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en solution aqueuse).^[79]

La substitution des anilines par 4 méthyles pour former la tetraméthylrhodamine entraîne une augmentation des longueurs d'onde (540 nm et 565 nm) mais également une baisse du rendement quantique de fluorescence.^[80] Une fixation de la liaison C-N des anilines, par un système julolidine par exemple permet de s'affranchir de ce désagrément. La sulforhodamine 101 est une sonde présentant une telle structure. Elle est commercialisée sous le nom de Texas Red.^[33]

Les rhodamines sont utilisées en FRET en association avec la fluorescéine, comme rapporteurs d'activité enzymatique,^[20] comme chélateurs d'ions métalliques,^[20] ou pour détecter des espèces réactives de l'oxygène au niveau cellulaire.^[81]

Des hybrides rhodamine/fluorescéine, les rhodols ont également été développés. Ils sont construits sur un cœur xanthène portant une aniline et un phénol et présentent des propriétés de fluorescence intéressantes.^[82]

II.2.3.3.i. Les sondes naphtoxanthènes.

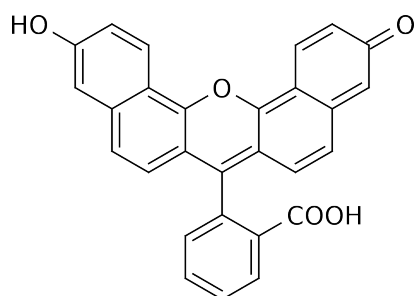


Figure I.17 : Naphthofluorescéine

Ces sondes dérivent des séries fluorescéine et rhodamine par l'introduction de cycles benzène fusionnés au cœur xanthène. Ces modifications entraînent un saut bathochromique des spectres d'excitation et d'émission, comme la naphthofluorescéine, montrant des longueurs d'onde supérieures à celles de la fluorescéine (595 nm et 660 nm en conditions basiques). En contrepartie, son pKa augmente à 8, soit un log au dessus du pH physiologique et sa brillance diminue de façon dramatique ($6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).^[83]

Des sondes asymétriques comme des semi-naphthofluorescéines ou des semi-naphthorhodols ont été développées. Elles sont utilisées essentiellement comme sondes pH dépendantes,^[84] ou comme marqueurs de la présence d'ions.^[85]

II.2.3.3.j. Les phénanthridines.

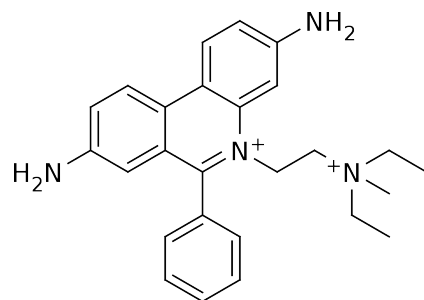


Figure I.18 : Propidium

Ce sont des agents intercalants de l'ADN, montrant un fort accroissement de la fluorescence après liaison aux acides nucléiques, comme les sondes éthidium ou propidium.

En présence d'ADN, le propidium présente une $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, une $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$ et une brillance de $702 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ce qui correspond à une augmentation de 20 à 30 fois de la fluorescence initiale.^[20]

II.2.3.3.k. Les Bodipy.

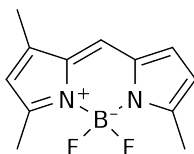


Figure I.19 : Bodipy-Fl

Le cœur difluoro-dipyrrométhène borane a été utilisé pour construire de nombreux marqueurs fluorescents.^[86] Ces sondes présentent un faible déplacement de Stokes, sont peu hydrophiles, mais leur fluorescence n'est pas influencée par l'environnement de la sonde.^{[33][87]}

Le composé le plus simple de cette classe, le Bodipy-FL, présente des caractéristiques spectrales semblables à la fluorescéine ($\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 511 \text{ nm}$; brillance : $85000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les caractéristiques spectrales sont modifiables par des substitutions adéquates de la partie dipyrrométhène du motif de base. Le Bodipy-TR possède par exemple des caractéristiques proches de celles du Texas-Red.^{[80][33]}

Ces fluorophores sont utilisés pour de nombreuses applications,^[20] notamment par incorporation à des sondes lipophiles, grâce à leur caractère apolaire.^[87] Leur faible déplacement de Stokes,

induisant un self-quenching en cas de polymarquage de protéine, a été mis à profit pour reporter l'activité de protéases.^[88]

II.2.3.3.1. Les cyanines.

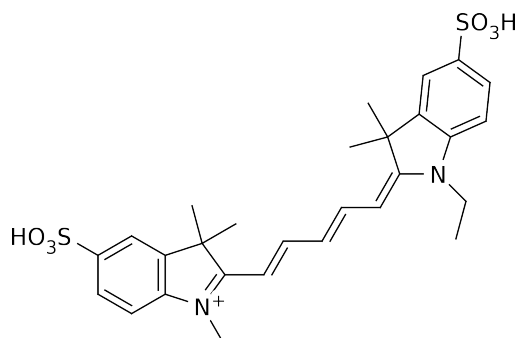


Figure I.20 : Cyanine Cy5

Cette famille est composée de molécules présentant un système de base comportant deux atomes d'azote espacés par une chaîne polyméthine. Les cyanines Cy3, Cy5 et Cy7, largement utilisées, sont basées sur une structure sulfoindocyanine.^[89] Les noyaux indoles sont séparés par la chaîne polyméthine, dont la longueur détermine le chiffre du nom du fluorophore. Ce sont des sondes qui présentent des propriétés intéressantes, des longueurs d'onde élevées et une brillance élevée (pour chaque caractère, les valeurs sont données respectivement pour Cy3 et Cy5 : $\lambda_{\text{ex}} = 554$ et 652 nm ; $\lambda_{\text{em}} = 568$ et 672 nm, brillance : 18200 et 36000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cy7 présente des longueurs d'onde encore plus décalées vers le rouge ($\lambda_{\text{ex}} = 755$ nm ; $\lambda_{\text{em}} = 788$ nm), mais souffre d'un rendement quantique de fluorescence très faible ($\phi = 0,02$).

Les sondes Cy sont des marqueurs très utilisés et servent de référence dans de nombreux procédés analytiques.^[90] Elles sont également utilisées dans des expérimentations en imagerie. Elles souffrent toutefois d'un manque de linéarité dans l'émission de fluorescence lors de polymarquages protéiques.^[91]

II.2.3.3.m. Les oxazines.

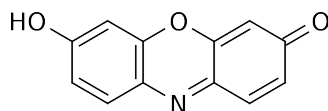


Figure I.21 : Résorufine

Ces composés sont également des fluorophores importants, notamment la résorufine, dont l'anion absorbe à 572 nm, émet à 585 nm et possède une brillance de $41000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Elle présente également une sensibilité au pH modérée ($\text{pK}_a = 5,8$).^[92]

Les fluorophores de cette famille sont utilisés essentiellement comme rapporteurs d'activité enzymatique.^[20] Les propriétés redox de la résorufine ont également été exploitées pour mettre en évidence une activité réductrice intracellulaire, comme assesseur de la viabilité cellulaire,^[93] ou comme marqueur lors de tests Elisa, en présence d' H_2O_2 et d'une peroxydase.^[94]

II.2.3.3.n. L'acridine et ses dérivés.

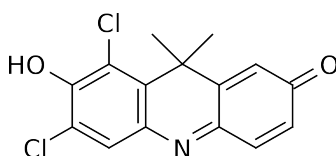


Figure I.22 : Fluorophore DDAO

Ces fluorophores sont construits sur un cœur acridine. Ces composés sont utilisés comme marqueurs des acides nucléiques. Les dérivés les plus utilisés sont issus du 3-N,3-N,6-N,6-N-tétraméthylacridine-3,6-diamine ou acridine orange, qui présente une fluorescence verte lorsqu'il est lié à l'ADN et orange quand il se lie à l'ARN. Ils sont utilisés comme marqueurs de viabilité cellulaire,^[95] ou pour discriminer des organites intra-cellulaires, comme les mitochondries.^[96]

Les dérivés phénoliques de cette série ont été peu décrits dans la littérature. Seule l'utilisation 7-hydroxy-9,9-diméthylacridin-2-one (DAO) a été reportée dans la littérature comme marqueur d'activité enzymatique,^{[97][98]} en dépit de longueurs d'onde intéressantes ($\lambda_{\text{ex}} = 638 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 651 \text{ nm}$). Toutefois, ce fluorophore présente une faible brillance ($\epsilon = 2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 633 nm à pH7,4) et semble avoir une sensibilité particulière vis à vis des thiols libres.^[98] La libération d'un dérivé photo-activable du précurseur 6,8-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthylacridin-2-one (DDAO)^[97] du DAO a été un des axes de recherche de mes travaux de thèse.

II.2.4. La fluorescence à 2 photons.

Les propriétés d'absorption à 2 photons des fluorophores peuvent être mises à profit en imagerie. La résolution 3D de l'excitation permet de n'observer la fluorescence qu'au point focal, ou au plan focal lors d'un balayage d'une zone d'intérêt.

Les longueurs d'onde d'absorption théoriques à 2 photons sont d'environ deux fois les longueurs d'onde d'absorption à 1 photon. Toutefois, les règles pour l'absorption étant différentes à 1 et 2 photons, certains spectres 2 photons montrent des variations importantes par rapport aux spectres attendus, comme pour la rhodamine B.^[99] Les spectres d'absorption à 2 photons sont généralement plus étalés que les spectres 1 photon et les sections efficaces à 2 photons des fluorophores ne sont pas proportionnelles aux sections efficaces à 1 photon (et par extension aux coefficients d'extinction molaire).^[99]

L'imagerie de fluorescence par excitation à 2 photons permet d'obtenir une résolution supérieure à l'imagerie à 1 photon classique. Cela peut paraître contradictoire avec la limite théorique de résolution liée à la longueur d'onde ($\approx \lambda/2$),^[5] qui attribue une résolution deux fois moindre pour la microscopie de fluorescence à 2 photons. Or, la résolution réelle prend en compte plusieurs facteurs, notamment le bruit de fond. Lors d'une irradiation à 1 photon, l'excitation a lieu sur tout le trajet optique. La fluorescence émise est filtrée par un *pinhole* mécanique, en microscopie confocale, n'autorisant en théorie que le passage de la fluorescence émise du plan focal. Mais le *pinhole* possède une ouverture qui n'est pas infiniment petite et laisse passer des photons issus des plans proches du plan focal. Il y a donc nécessairement un léger bruit de fond. La microscopie à 2 photon, ne provoquant l'excitation, et donc l'émission de fluorescence qu'au point focal, réduit par l'utilisation d'objectifs de forte ouverture numérique, permet de ne recueillir que les photons de fluorescence émis au point focal, tout en s'affranchissant du *pinhole*.^[99] L'absence de *pinhole* permet également une acquisition 3D plus rapide que pour la microscopie confocale.

Le volume restreint d'excitation limite également les risques de toxicité et de photo-blanchiment à l'échelle de l'échantillon, bien que ces phénomènes soient parfois observés au point focal.

L'absence de fluorescence hors focale et l'utilisation de longueurs d'onde dans l'IR ont donné à la microscopie de fluorescence à 2 photons une place de choix en imagerie biologique, notamment en imagerie profonde sur cellules vivantes et sur animal entier.^[99]

La fluorescence à 2 photons est également une technique de choix en marquage multicolores. L'étalement des spectres d'excitation à 2 photons permet en effet d'exciter plusieurs fluorophores, de couleurs différentes, avec une même longueur d'onde.^[99]

II.4. La fluorescence photoactivable.

II.4.1. Photoactivation.

Les informations biologiques sont souvent obtenues suite à la genèse d'un signal, qu'il est possible d'analyser. La création d'un signal doit être effectuée de façon orthogonale au système biologique étudié, c'est à dire n'interagissant pas avec les phénomènes biologiques endogènes. Il y aura donc moins d'interactions avec le système étudié et le signal sera plus fiable. A quelques exceptions près, par exemple des cellules végétales effectuant la photosynthèse ou des cellules rétiniennes contenant des photophores, le fonctionnement des systèmes biologiques n'est pas influencé par la lumière. Les radiations lumineuses apparaissent donc comme un outil intéressant pour générer le signal attendu. C'est le concept de photo-activation, l'activation de molécules actives contrôlée par la lumière.

Il s'agit de masquer temporairement l'activité propre d'un composé par un couplage covalent à un groupement photolabile, communément appelé "cage" par francisation de l'expression "caging group" employée de façon traditionnelle dans la littérature.^[100] La liaison formée est ensuite clivée sous l'action de la lumière. Ainsi, tant que le groupement est lié au composé, celui-ci est inactif. L'activité est régénérée après irradiation du complexe par une lumière d'énergie appropriée, induisant la coupure de la liaison et le départ de la cage.

Ce concept a été appliqué à de nombreuses molécules d'intérêt biologique comme des nucléotides, des neurotransmetteurs ou des effecteurs secondaires.^[101]

Dans le cas de la fluorescence photoactivable, les propriétés d'émission de photons du fluorophore sont temporairement annihilées. Après exposition à une longueur d'onde adéquate, ses propriétés d'émission lui sont restituées et la fluorescence peut être visualisée à ses longueurs d'onde propres (Figure I.23).

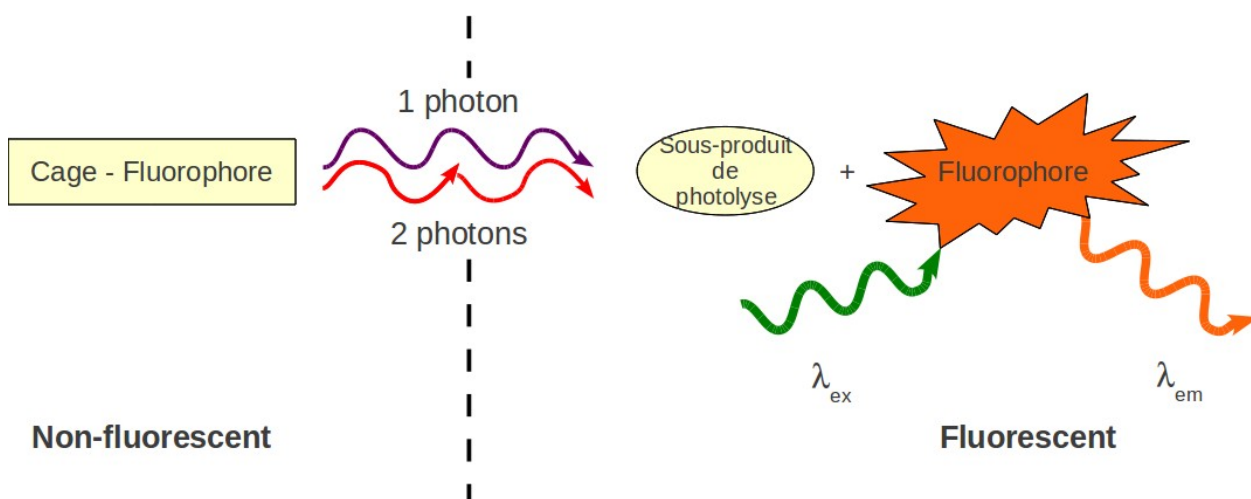


Figure I.23 : Concept de la fluorescence photo-activable.

Un fluorophore éteint par liaison à un groupement photo-labile est irradié. Après l'absorption d'un ou deux photons, le groupement photo-labile atteint son état excité, à partir duquel est initiée une réaction chimique entraînant la coupure de la liaison avec le fluorophore. Après libération du fluorophore, la fluorescence peut être visualisée par irradiation à ses longueurs d'onde propres.

La fluorescence peut être masquée soit de manière directe, soit de manière indirecte.^[102] Dans le premier cas, le plus couramment décrit, une fonction active du fluorophore, le phénate pour les coumarines et les fluorescéines ou une aniline pour les rhodamines, est alkylée, diminuant ou éteignant l'émission de fluorescence. Ainsi, la coupure de la liaison libère directement le fluorophore. Dans le second cas, le fluorophore est couplé à un quencher par l'intermédiaire d'un groupement photolabile. Après irradiation, le quencher est libéré et la fluorescence réactivée Figure I.23.

Avec pour finalité un développement d'outils pour la biologie cellulaire ou animale, les processus de décaage doivent être compatibles avec des systèmes vivants, et doivent donc pouvoir se dérouler dans un milieu aqueux tamponné et les longueurs d'onde d'excitation doivent être supérieures à 350 nm pour limiter les dommages sur les composants cellulaires et plus particulièrement au niveau nucléaire.

La photo-activation de fluorophore permet la génération d'un signal qui peut ensuite être suivi, de manière indépendante, soit en fluorescence à 1 photon soit en fluorescence à 2 photons.

II.4.2. Les protéines fluorescentes photo-activables.

Les développements récents ont permis la mise au point de protéines fluorescentes photo-activables. Ces protéines sont issues d'animaux marins pour les protéines de 1ère génération ou de d'ingénierie rationnelle ou semi-rationnelle pour les générations plus récentes.^[41]

La conversion photo-induite peut soit activer la fluorescence d'une protéine originellement non-fluorescente, soit modifier les spectres d'absorption et d'émission de protéines présentant nativement une fluorescence. Pour les deux types d'activation, les variations des propriétés photo-physiques des protéines peut être réversible ou irréversible, selon le mutant concerné.

Les travaux récents ont permis le développement de protéines présentant une forte variation de la fluorescence lors de la photo-activation. Elles couvrent désormais une large palette du spectre visible.^[41]

Les protéines fluorescentes photo-activables ont permis des avancées importantes en imagerie cellulaires, tant dans la localisation de protéines cibles^[103] que dans la visualisation directe de leur dynamique^[6] et sont largement utilisées en microscopie haute résolution comme la microscopie PALM.^{[104][6]}

Leurs principaux avantages et inconvénients sont les mêmes que pour les protéines fluorescentes classiques. Elles présentent également une photo-conversion souvent limitée, induisant une brillance faible après activation.

II.4.3. Groupements photolabiles.

Les premiers groupements photolabiles ont été développés à la fin des années 1970 (1976, groupement 1-acyl-7-nitroindoline,^[105] 1978, groupement orthonitrobenzyle, o-NB^[106]). Ces groupements ont connu une évolution très importante depuis et il existe aujourd'hui un très grand nombre de cages, utilisées avec plus ou moins de succès.^[100]

Ces groupements doivent présenter certaines caractéristiques afin de permettre une utilisation confortable.^[101]

- La synthèse du groupement photolabile et le couplage avec la molécule à cager doivent pouvoir être effectués de manière efficace. Une fois synthétisé, le composé cagé doit être stable vis à vis du solvant et du système dans lequel il va être utilisé. Une sensibilité à l'hydrolyse ou à une molécule réactive peut entraîner le relargage de la molécule active, induisant un signal erroné par

une augmentation du bruit de fond. Une toxicité de la molécule cagée sur le système étudié est également néfaste pour les expérimentations envisagées.

- La molécule cagée doit avoir une solubilité suffisante dans le milieu d'étude. C'est souvent un facteur limitant dans la photoactivation de fluorophores en milieu biologique aqueux.

- La libération de la molécule doit être efficace. Derrière le terme d'efficacité se cachent plusieurs notions, conduisant à la libération d'un maximum de molécules actives pour un minimum de lumière d'excitation. Le rendement quantique de la réaction de photolibération, noté ϕ_u pour "uncaging quantum yield", doit être le plus élevé possible, afin d'utiliser des concentrations aussi basses que possible de composé cagé. Le coefficient d'extinction molaire du groupement photolabile doit également être la plus élevée possible. Cela permet de diminuer l'intensité lumineuse de photo-activation, limitant les dommages éventuels causés au niveau tissulaire. De manière analogue à la brillance pour la fluorescence, il est possible de déterminer une efficacité quantique de photo-fragmentation d'un composé cagé $\varepsilon \times \phi_u$. Les effets délétères de la lumière sur les systèmes biologiques sont également diminués en employant des groupements réagissant à des $\lambda_{ex} > 300$ nm. Enfin, la réaction de photolibération doit avoir une cinétique compatible avec les phénomènes étudiés.

- La photolibération du composé actif doit créer un fort contraste par rapport au composé cagé (activité, fluorescence...).

- Les sous-produits de photolyse doivent présenter une toxicité la plus faible possible vis à vis des systèmes biologiques étudiés et ne doivent pas (ou peu) interférer avec la réaction de photolyse.

II.4.3.1. Série 2-nitrobenzyle.

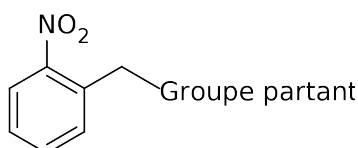


Figure I.24 : Groupement *o*-nitrobenzyle

Le groupement 2-nitrobenzyle, ou ortho-nitrobenzyle (o-NB) est la première cage à avoir été largement utilisée. Les premières molécules cagées ont été l'AMPC,^[107] et l'ATP.^[106] Ce groupement peut aussi être couplé à diverses fonctions comme des phosphates,^[107] des acides carboxyliques,^[108]

des amines,^[109] des amides,^[110] des alcools,^[111] des phénols,^[112] et des thiols.^[113]

Le mécanisme de la réaction de photolibération de ce groupement est présenté Figure I.25. Après irradiation, il se forme un intermédiaire *aci*-nitro par échange d'un proton benzylique avec le groupe nitro. Il y a ensuite formation d'une benzisoxazoline par réaction de l'*aci*-nitro sur le carbone benzylique. L'ouverture du cycle isoxazoline entraîne la libération du groupe partant et la formation d'un résidu de photolyse nitroso aromatique.^[101]

Bien que possédant un rendement quantique acceptable ($\phi_u \approx 0,20$),^[111] l'utilisation du groupement o-NB sur des systèmes biologiques est limitée par une cinétique de photolyse lente, un maximum d'absorption à 261 nm,^[111] pouvant entraîner une dégradation de l'ADN des cellules, d'un ϵ faible à 365 nm.^[114] La solubilité aqueuse du groupement o-NB est limitée. Toutefois, la solubilité du produit de couplage peut s'avérer bonne, la molécule couplée au groupement protecteur ayant une influence prépondérante sur ce paramètre. Le sous-produit de dégradation de la cage présente enfin une toxicité potentielle dans un environnement biologique, réagissant avec des espèces nucléophiles (thiols, amines).^[101]

Ce groupement a été modifié par l'ajout de plusieurs fonctions, influant sur ses propriétés physico-chimiques.

Les substitutions d'un hydrogène benzylique par divers groupements ou fonctions vont modifier la cinétique et le rendement quantique de la réaction de photo-fragmentation du composé cagé.

La substitution par un méthyle influe essentiellement sur la cinétique de photolibération, qui diminue d'un facteur 1000. Le rendement quantique de la réaction est légèrement amélioré.^[111] L'absorbance du composé cagé ne varie que peu, et sa λ_{ex} n'est pas affectée.

La présence d'une fonction acide carboxylique améliore la solubilité aqueuse du composé, la fonction étant sous forme carboxylate à pH7. Le rendement quantique est comparable à la substitution méthyle et la cinétique de photolyse inférieure à 1 ms.^[110]

La substitution par un trifluorométhyle va accroître de façon remarquable le rendement quantique de la réaction de photo-libération ($\phi_u \approx 0,6-0,7$).^[115]

Des substitution du cycle par des groupements électro-donneurs en positions 4 et 5 ont permis de déplacer les longueurs d'onde d'absorption des cages dans une région du spectre plus compatible avec des études biologiques (350 nm).

La présence de deux oxy- (méthoxy ou benzodioxole) apporte un décalage bathochromique important ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 345 nm pour le dérivé diméthoxy et $\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 360 nm pour le dérivé benzodioxole).^[116] Toutefois, ce décalage s'accompagne d'une diminution importante

du rendement quantique ($\phi_u \approx 0,002 - 0,26^{[116]}$; $0,013^{[114]}$).

En associant une substitution CF_3 en α du cycle et diméthoxy aux positions 4 et 5 du cycle, un groupement photolabile présentant une efficacité de photo-activation élevée à des longueurs d'onde intéressantes ($\epsilon = 3650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 340 nm ; $\phi_u \approx 0,4-0,5$) a été décrit au laboratoire.^[115]

Des dérivés polycycliques ont également été synthétisés. Un dérivé bis(nitrobenzyle),^[114] et un dérivé bis(diméthoxy-nitro)benzyle^[116] ont été décrits. Ces composés n'apportent pas d'amélioration notables par rapport à leurs homologues mono-cycliques, présentant parfois des λ_{ex} inférieures et un ϕ_u globalement identique.

Un composé nitrodibenzofurane (NDBF) a également été décrit.^[117] Il présente un $\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 350 nm et un ϕ_u de $0,7$.

Enfin, pour neutraliser le sous produit nitroso de photo-fragmentation, deux dérivés pentadiényles ont été décrits.^[118] Après photo-fragmentation, la chaîne pentadiényle va réagir avec le nitroso pour former un tricycle non réactif.

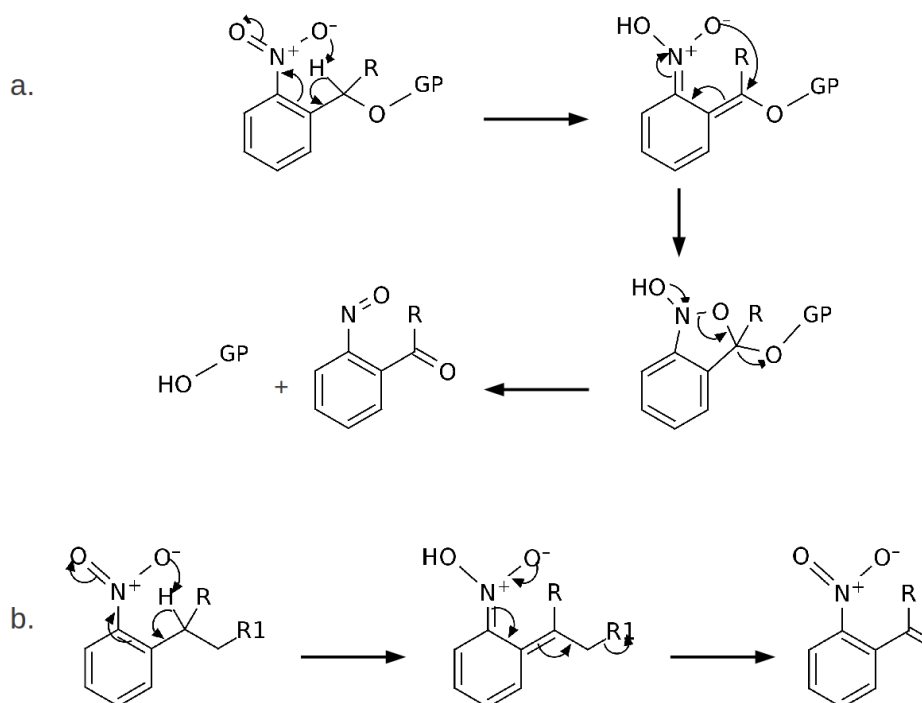


Figure I.25 : Mécanisme de photolyse des groupements *o*-nitrobenzyle (a.) et *o*-(nitrophényle)alkyle (b.).

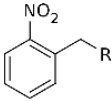
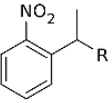
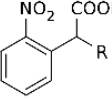
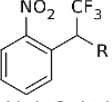
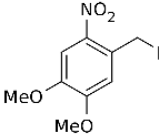
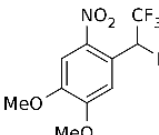
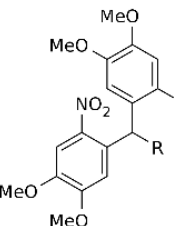
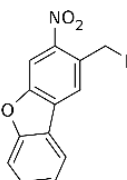
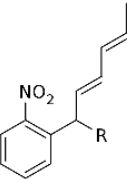
Groupement	λ_{ex} (nm)	ϵ_{350nm} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ	Divers
 o-nitrobenzyle	261 nm	faible	Bon 0,20	o-NB Cinétique lente Peu soluble
 o-nitrophényléthyle	\approx 260 nm	faible	Bon \approx 0,30	o-NPE Cinétique rapide ($<$ ms)
 α -carboxy-2-nitrobenzyle	\approx 260 nm	faible	Bon \approx 0,30	o-CNB Bonne solubilité Cinétique rapide
 α -trifluorométhyle-2-nitrobenzyle	\approx 260 nm	faible	Très bon \approx 0,60-0,70	o-NPT
 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle	\approx 350 nm	Bon 5000 $M^{-1}.cm^{-1}$ (à 365 nm)	Mauvais à faible	ϕ très variable selon l'entité libérée
 1-(4,5-diméthoxy-2-nitrophénylé)- 2,2,2-trifluoroéthyle	340 nm	Bon 3650 $M^{-1}.cm^{-1}$ (à 340 nm)	Bon \approx 0,40	DMNPT
 bis(4,5-diméthoxy-2- nitrophényl)méthyle	\approx 275 nm	Faible	Faible $<$ 0,15	
 dérivé dibenzofurane	330 nm	Très bon 15300 $M^{-1}.cm^{-1}$ (350 nm) 18400 $M^{-1}.cm^{-1}$ (330 nm)	Très bon 0,70	
 α -pentadiényle-2-nitrobenzyle	264 nm	Faible	Bon \approx 0,20-0,40	Neutralisation du sous- produit nitroso par une réaction de Diels-Alder intramoléculaire.

Table I.1 : Série o-NB et influence des différentes substitutions sur les caractéristiques des groupements.

II.4.3.2. Série (nitrophényl)éthyle.

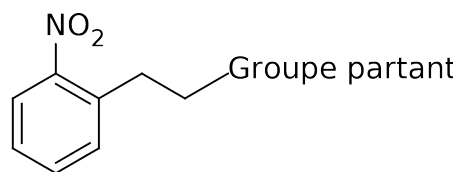


Figure I.26 : Groupement *o*-(nitrophényl)éthyle

Les groupements photolabiles de cette série portent un carbone supplémentaire sur la chaîne liant le groupe partant. Après absorption d'un photon, ce groupe passe également par un intermédiaire *aci*-nitro. Mais la β -élimination est privilégiée pour cette série par rapport à l'attaque de l'*aci*-nitro en position benzylique Figure I.25. Ainsi, le sous-produit de photo-fragmentation est un nitro-alcène terminal, dont la réactivité est moindre que le sous-produit nitroso de la série *o*-NB. Ils présentent donc une toxicité potentielle plus faible que les composés de la série *o*-NB.

Les propriétés de photofragmentation des composés de cette série ont été décrites pour la première fois dans un brevet par Pfleiderer et Giegrich en 1996.^[119] De nombreux dérivés ont été décrits par Hasan *et al.*^[114] et Walbert *et al.*,^[120] focalisant sur l'évolution de leurs propriétés physico-chimique en fonction des substitutions opérées sur le squelette 2-(2-nitrophenyl)ethan-1-ol, composé le plus simple de la série.

Ce composé présente des caractéristiques assez médiocres ($\epsilon = 257 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 365 nm pour un $\phi_u = 0,042$)^[114] ainsi qu'une cinétique de photo-fragmentation longue. Les halogénations en position 3, 4 et 6 améliorent très légèrement ϕ_u (0,070 à 0,1) sans influencer sur ϵ .^{[114][120]} Le composé 2,6-dinitro présente une légère augmentation de ϵ ($370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 365 nm), avec un ϕ_u analogue aux composés halogénés.^[114] De façon comparable aux composés de la série *o*-NB, une méthylation en position 5 du cycle augmente ϵ à 365 nm ($1690 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mais entraîne un déclin du ϕ_u (0,0081).^[114]

Le rendement quantique de photo-fragmentation a été amélioré par des substitutions en α du cycle. Un dérivé 2-bis(nitrophényl)éthanol a été synthétisé. Il présente un ϵ plus élevé que les composés non substitués ($457 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et un ϕ_u de 0,2.^[114] L'amélioration la plus importante du rendement quantique a été obtenue par méthylation de la position α . Bien que n'ayant aucun impact sur l'absorbance du composé, elle permet d'obtenir un ϕ_u de 0,35 à 0,48, selon l'entité libérée.^{[114][120]} Ces composés présentent également une cinétique de photo-fragmentation rapide.

En combinant les substitutions aromatiques et aliphatiques, les composés 2-(4,5-diméthoxy-2-

nitrophényl)propan-1-ol (DMNPP) et 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)butan-2-ol (DMNPB) ont été synthétisés au laboratoire. Ils présentent un ϵ intéressant d'environ $4000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 346 nm et un ϕ_u de 0,26 à 0,36.^[121]

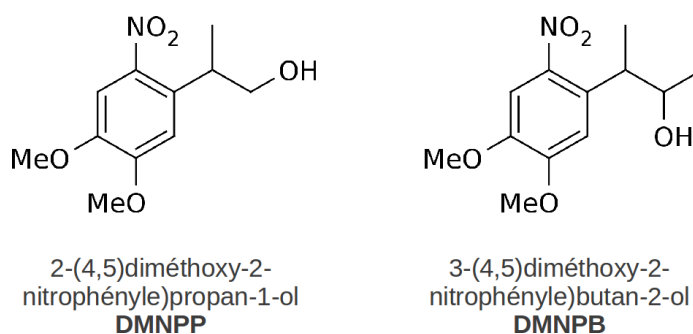


Figure I.27 : Groupements DMNPP et DMNPB.

La série o-NB a été la plus largement décrite pour la synthèse de fluorophores photoactivables. Le groupement photolabile DMNPB a également été décrit comme étant efficace pour la mise au point de fluorophores photoactivables.

De nombreux autres groupements photo-labiles ont été décrits à travers la littérature,^[100] notamment les dérivés de la 4-méthylcoumarine (6-bromo-7-hydroxycoumarine-4-yl-méthyle, Bhc,^[14] et 7-(N,N-diméthyle)aminocoumarine-4-yl-méthyle, DMACM^[122]), les 8-bromo-7-hydroxyquinolines (BHQ),^[123] les groupements p-hydroxyphénacyles,^[124] ou les dérivés nitroindolinyles (NI).^[125]

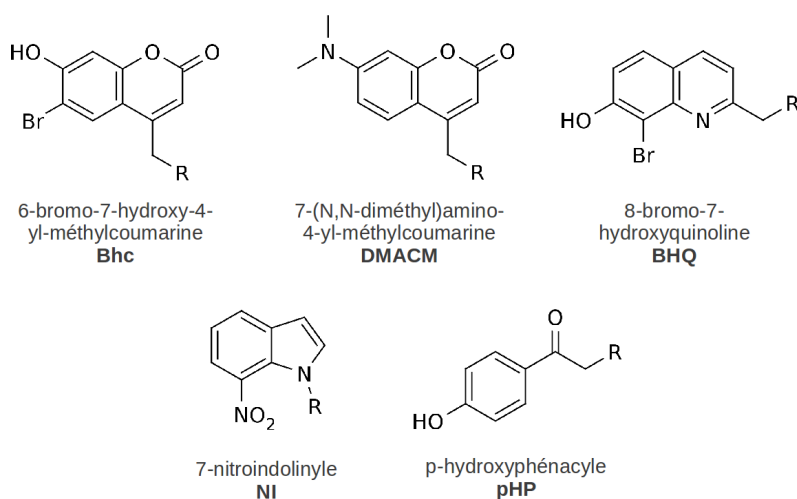


Figure I.28 : Autres groupements photolabiles communément utilisés. (R représente le groupe libéré lors de la photolyse).

II.4.4. Photo-fragmentation bi-photon.

Les groupements photo-labiles ont fait l'objet de développement vis à vis de l'irradiation bi-photon afin d'améliorer la précision spatiale de photo-libération des composés cagés, notamment pour la libération de neurotransmetteurs ou du calcium en électrophysiologie ou en neurochimie.^[126] La première expérience de décaage en bi-photon a été décrite en 1994 par Denk *et al.* sur le récepteur nicotinique de l'acétylcholine.^[127] Il est considéré qu'une section efficace de décaage à 2 photons inférieure à 0,1 GM est trop faible pour une utilisation commode du groupement concerné en biologie.

Les premiers groupements testés ont été les groupements les plus utilisés en photolyse mono-photonique, les séries o-NB et Bhc. Les groupements dérivés o-NB ont montré de faibles sections efficaces de décaage en bi-photon (< 0,3 GM). La sensibilité en bi-photon du groupement Bhc a été déterminée à 740 et 800 nm et présente des sections efficaces de 1 à 2 GM à 740 nm et environ 0,4 GM à 800 nm.^[14]

De nombreuses modifications chimiques ont été effectuées sur ces groupements afin d'en optimiser les caractéristiques en bi-photon. D'autres groupes ont également été caractérisés.^[128]

II.4.4.1 Série o-NB.

Afin d'améliorer les propriétés de photolyse à 2 photons, des substitutions ont été effectuées sur le cycle aromatique. Ces substitutions, qui ont démontré leur efficacité en mono-photon, visaient une augmentation de la section efficace d'absorption.

Un dérivé 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzène a été décrit par Furuta *et al.*,^[14] libérant de l'acide acétique. Les sections efficaces de photolibération demeurent très faibles (0,03 GM à 740 nm et 0,01 GM à 800 nm), malgré l'amélioration théorique de l'absorbance. Ces faibles résultats peuvent s'expliquer par la dégradation du ϕ_u induit par ces substitutions, décrite précédemment en photolyse mono-photonique.^[116] La présence d'éléments électro-attracteurs (-F, -Cl, -Br, -CN) en position benzylique n'influent guère sur δ_u .^[129] La présence d'un groupement amino en position 5 du cycle n'apporte aucune amélioration ($\delta_u = 0,035$ GM à 750 nm).^[129]

De manière surprenante, une augmentation de la délocalisation électronique par couplage, en position 5 du cycle, du 2-nitrobenzyle à des groupements 4-éthynylanisole, 4-méthoxystyrène ou 5-

(4-méthoxyphényl)oxazole-2-yl n'améliore que très peu la section efficace de photolyse à 2 photons ($\delta_u < 0,05$ à 750 nm).^[129]

L'utilisation du groupement NPE, possédant un groupement méthyle en position benzylique a permis d'apporter une amélioration notable de δ_u . Selon l'entité libérée, les sections efficaces de décadeage varient entre 0,37 et 0,68 GM à 740 nm.^[130]

Le composé NDBF, portant également une substitution allylique en a du cycle, a été utilisé pour libérer du Ca^{2+} avec une section efficace de 0,6 GM à 720 nm.^[117]

II.4.4.2. Dérivés de la 4-yl-méthyle coumarine.

Cette série comporte deux composés qui ont été utilisés de manière efficace en bi-photon, le groupement 7-(bis-carboxyméthyle)aminocoumarine-4-yl-méthyle (BCMACM) et les dérivés de la 7-hydroxycoumarine-4-yl-méthyle. Ces groupements présentent des sections efficaces de décadeage importantes, bien que semblant dépendantes du substrat libéré.

Le BCMACM a été décrit par Hagen *et al.* et présente des sections efficaces de décadeage variant de 0,38 à 2,47 GM à 740 nm.^{[131][132]}

La 7-hydroxycoumarine-4-yl-méthyle ainsi que ses dérivés halogénés en position 6 ont été décrits par Furuta *et al.*^{[14][133]} Le composé le plus intéressant est le 6-bromo-7-hydroxycoumarine-4-yl-méthyle, présentant des sections efficaces de 0,89 à 2,28 GM à 740 nm et de 0,30 à 0,42 à 800 nm. Les autres dérivés de ce groupe demeurent intéressants, bien que présentant des sections efficaces plus faibles car leur δ_u a été déterminée directement, utilisant la fluorescence de la fluorescéine comme étalon. Bien qu'il demeure une incertitude de facteur 2 sur la détermination de la section efficace de décadeage à 2 photons de ces composés,^[14] ces groupements servent de référence communément utilisées pour la détermination des δ_u d'autres composés.

II.4.4.3. Série o-nitrophénylalkyle.

Le groupement DMNPB a été utilisé comme groupement photolabile sensible à 2 photons pour relarguer du glutamate,^[121] et une coumarine,^[112] avec des sections efficaces de photo-fragmentation d'environ 0,2 GM à 740 nm.

Un dérivé du DMNPB, construit sur un cœur biphényle, le 3-(2-propyl)-4'-methoxy-4-nitro-

biphenyl (PMNB) a été développé au laboratoire. Ce groupement, présentant également un système donneur-accepteur (méthoxy-nitro) permet une délocalisation électronique accrue par rapport au DMNPB. Il a été utilisé avec succès pour photolibérer du glutamate avec une δ_u d'environ 3,1 GM à 740 nm et 0,45 GM à 800 nm.^{[134][135]}

En 2008, une nouvelle plateforme basée sur un cœur fluorène, de structure accepteur-accepteur a été mise au point au laboratoire, le BNSF. Il a permis une photolibération de glutamate avec une section efficace très remarquable de 5 GM à 800 nm.^[135]

II.4.4.4. Autres groupements photo-labiles.

D'autres groupements classiquement employés pour photo-activer des composés cagés par une irradiation mono-photonique ont été évalués et utilisés en irradiation bi-photonique.

Des neurotransmetteurs, du glutamate et du GABA, ont été libérés à partir de précurseurs cagés par des dérivés nitroindolinyles avec des sections efficaces de 0,06 à 0,24 GM à 720-730 nm.^{[136][137]}
[138]

Le groupement BHQ a permis de libérer des acides carboxyliques et des diols cagés avec une section efficace modérée de 0,4 à 0,9 GM à 740 nm.^[139]

La transformation d'un azoture en amidinium entraîne le décaageage du calcium par le groupement Azid-1 à un δ_u de 1,4 GM à 700 nm.^[16]

Enfin, des complexes de coordination ont été récemment décrits comme cages pour du glutamate,^[140] ou du GABA,^[141] mais sans détermination de leur δ_u .

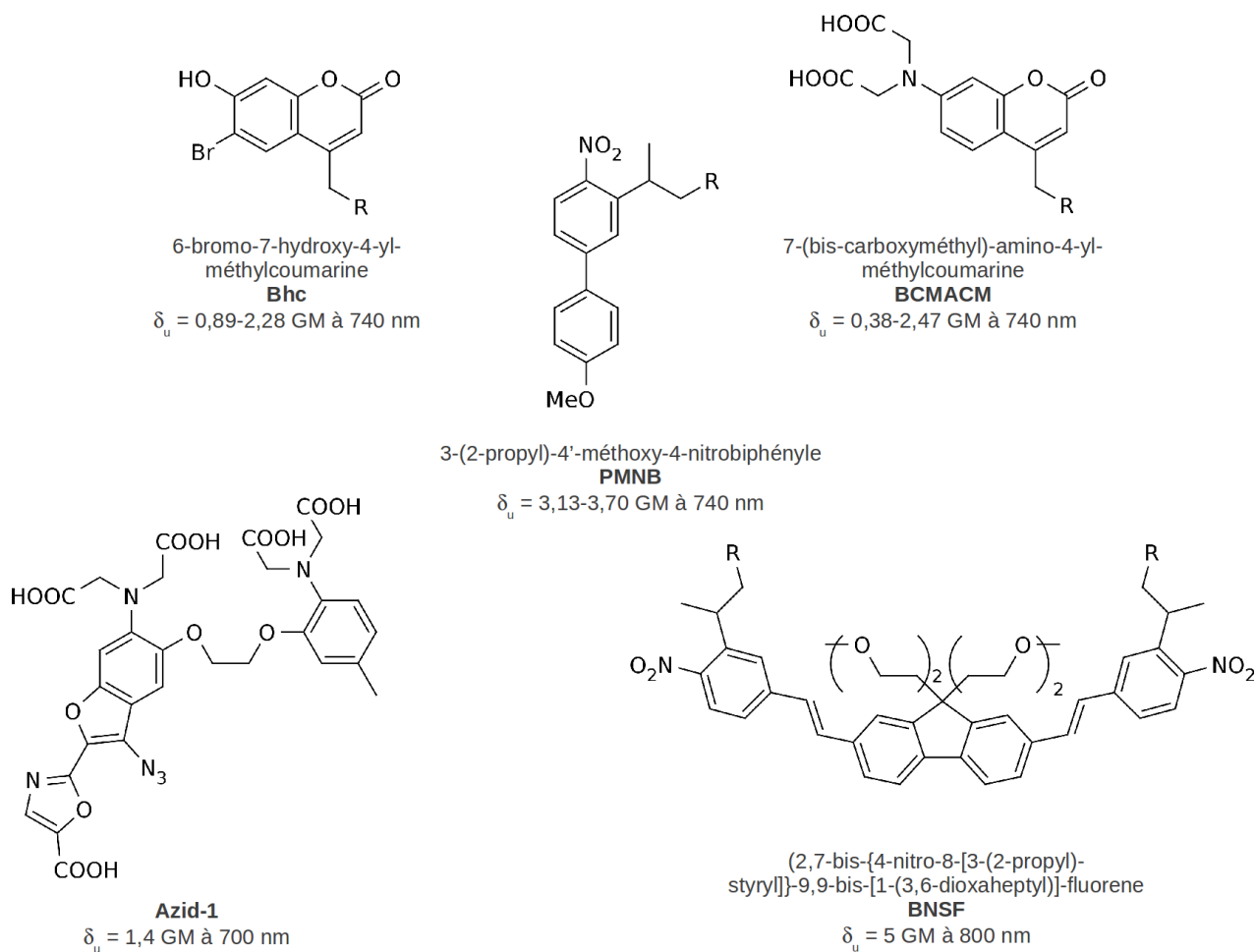


Figure I.29 : Groupements photolabiles présentant une section efficace de photo-fragmentation à 2 photons δ_u supérieure à 1 GM.

II.4.5. Les fluorophores cagés.

A travers la description des applications de décaage, un contrôle spatio-temporel de l'activation de la fluorescence représente un outil puissant pour les biologistes cellulaires, en particulier lorsque le signal ainsi généré permet de suivre un composant cellulaire sur des systèmes vivants.

II.4.5.1. Photo-activation directe.

L'augmentation de l'intensité de fluorescence après un processus de décaage se fait en général par une variation du système électronique du fluorophore, par la modification d'une fonction chimique directement responsable de la fluorescence, comme la fonction phénol sur les coumarines, fluorescéines et résorufines ou la fonction amine pour les rhodamines et les cyanines.^[102]

L'alkylation de ces fonctions par un groupement photo-labile entraîne une baisse ou une extinction de la fluorescence. Le photo-clivage du groupement protecteur libère ainsi la fonction masquée et le fluorophore retourne vers sa forme active et retrouve ses propriétés d'émission de fluorescence.

De nombreux fluorophores ont été alkylés par des dérivés o-NB. Ainsi, des dérivés de la résorufine ont été masqués par un groupement o-NPE,^[142] le groupement DMNPE a été utilisé pour masquer la rhodamine 110,^[143] et la Q-rhodamine.^[142] Des fluorescéines ont été modifiées par des groupements o-NB,^[144] et o-NPE.^[142] Les hydroxycoumarines ont également été alkylées avec des groupements o-NB, o-NPE et DMNPE.^[130]

Une hydroxycoumarine portant une fonction NTA (nitrotriacetic acid) et masquée par un groupement DMNPB a été décrite au laboratoire.^[112]

Enfin, l'irradiation d'une cyanine portant une fonction azoture a montré une activation de la fluorescence par la réduction photo-induite de la fonction azoture en amine.^[145] Cette stratégie présente les intérêts de ne pas libérer de sous produit de photolyse toxique et de présenter un faible encombrement stérique comparé aux groupements photolabiles, mais l'irradiation doit être prolongée et se fait à des longueurs d'ondes basses. Elle présente donc un risque de phototoxicité.

Des rhodamines ont également été éteintes, de manière élégante, par perturbation réversible du système électronique du cœur xanthène de ces fluorophores.

Une rhodamine photochromique a été décrite, pouvant être photoactivée de manière réversible, l'extinction se faisant par voie thermique.^[146]

Une rhodamine cagée a été obtenue par l'incorporation d'un groupement diazocétone dans un système spiro-9H-xanthène.

Ces deux dérivés sont non fluorescents aux longueurs d'ondes d'excitation normales et peuvent être activés par un rayonnement approprié. Ils présentent un intérêt par rapport aux groupements photolabiles classiques par un plus faible encombrement stérique, une lipophilie moindre et l'absence de sous-produit de photo-fragmentation toxiques.

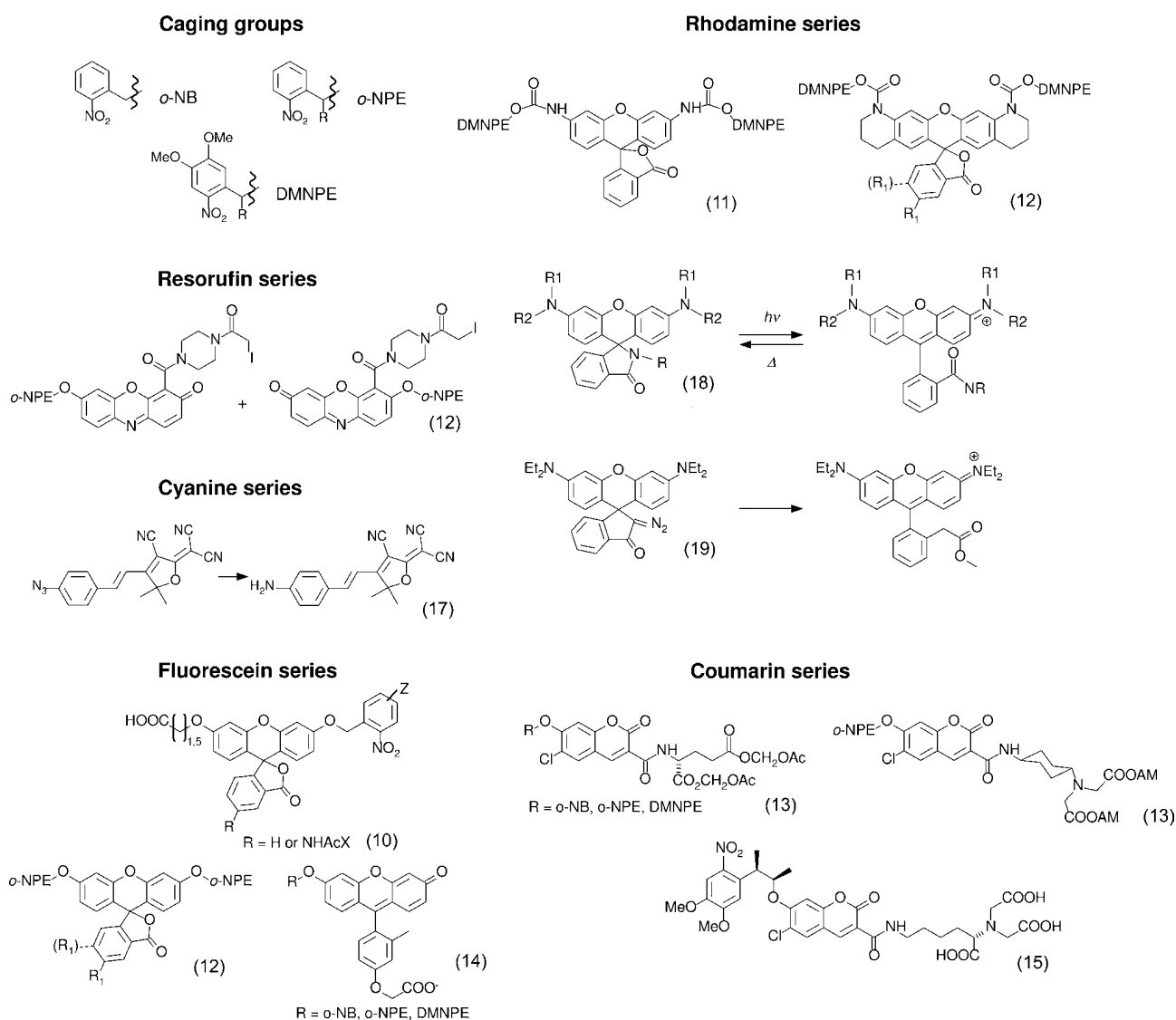


Figure I.30 : Fluorophores photo-activables décrits dans la littérature.

Les numéros correspondent aux références de la publication "**Small photoactivatable molecules for controlled fluorescence activation in living cells**" en annexe du manuscrit.

II.4.5.2. Rapporteurs fluorescents.

Ces groupements sont associés aux fluorophores photo-activables car génèrent de la fluorescence après irradiation. En effet, la photolibération d'une molécule cagée entraîne un réarrangement du groupement photolabile, induisant la genèse d'un fluorophore. La fluorescence est alors utilisée comme rapporteur de la libération d'un composé d'intérêt, permettant de quantifier l'efficacité de la réaction *in situ*.

Différents groupements présentent cette propriété. Des dérivés 2,3-diazabicyclo[2,2,2]oct-2-ène ont été générés à partir de précurseurs thiadiazodinedione,^[147] des thioxanthonnes générés à partir d'amines aromatiques masquées,^[148] la libération d'alcools à partir d'esters hydroxycinnamiques entraîne la formation de coumarines,^{[149][150]} et des dérivés xanthonnes ont été utilisés pour cager des acides carboxyliques.^[151]

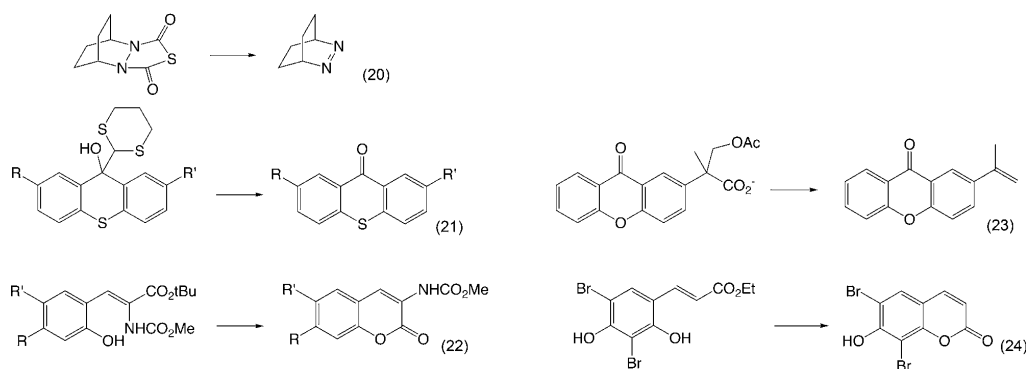


Figure I.31 : Rapporteurs fluorescents décrits à ce jour.

Les numéros correspondent aux références de la publication "**Small photoactivatable molecules for controlled fluorescence activation in living cells**" en annexe du manuscrit.

II.4.5.3. Photo-activation de fluorophores en bi-photon.

Ce champ est récent et très faiblement décrit par rapport à la fluorescence à 2 photons ou le décaage de neurotransmetteurs en bi-photon.

Quelques exemples ont été décrits dans la littérature. La photolibération à 2 photons d'hydroxycoumarines a été observée avec des groupements o-NB, o-NPE et DMNPE.^[130] Le dérivé DMNPB-hydroxycoumarine-NTA obtenu au laboratoire a également été caractérisé en bi-photon.

[112]

Parmi les groupements rapporteurs de photolyse, la génération de coumarine à partir d'ester hydroxycinnamique a également été obtenue avec succès en bi-photon.

Mes travaux de thèse ont focalisé sur l'efficacité de photoactivation à 2 photons d'un fluorophore, en couplant un groupement dérivé du PMNB, dont le groupement méthoxy a été remplacé par une chaîne oligo-éthylène glycol, afin d'en améliorer la solubilité aqueuse, le PENB, à un fluorophore rouge dérivé de l'acridinone (DDAO,^[97]). La photolyse de ce composé a montré une très bonne δ_u de 3,7 GM à 740 nm.^[152]

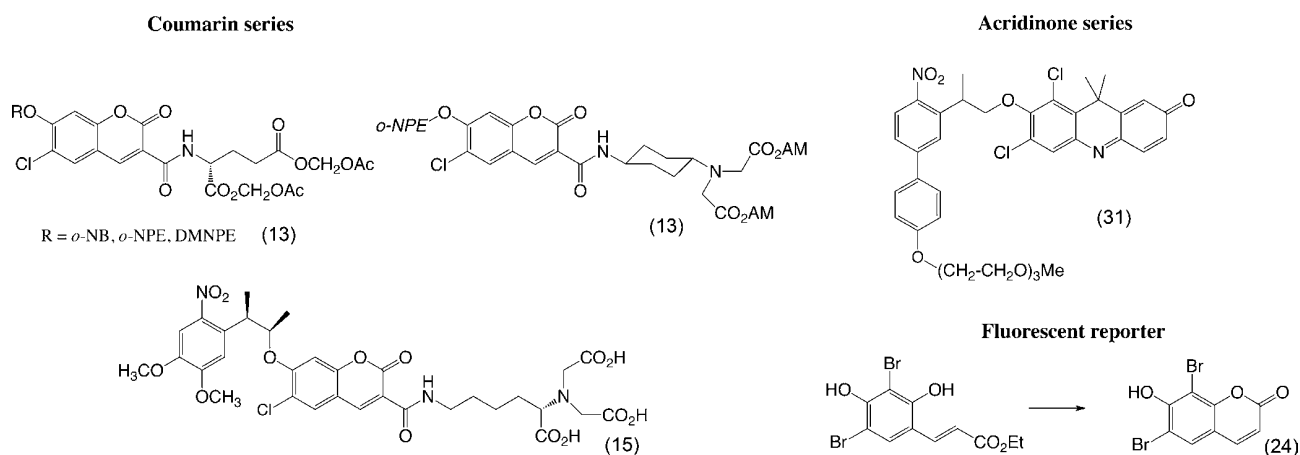


Figure I.32 : Fluorophores photo-activables à 2 photons décrits à l'heure actuelle.

Les numéros correspondent aux références de la publication "**Small photoactivatable molecules for controlled fluorescence activation in living cells**" en annexe du manuscrit.

II.4.5.4. Photoactivation indirecte.

L'extinction du fluorophore peut être induite par la liaison d'un système quencher au fluorophore par l'intermédiaire d'un groupement photolabile. La photolyse de ce groupement annihile le système quencher et la fluorescence est restaurée. Le système quencher peut être un phénomène de PET ou un quenching par FRET.

II.4.5.4.a. Annihilation de PET.

Le Tokyo Green est un dérivé de la fluorescéine dont les propriétés redox ont été optimisées afin qu'un transfert d'électron ait lieu entre le cycle benzène et le cœur xanthène du fluorophore dont un phénol a été alkylé, éteignant ainsi l'émission de fluorescence. Des dérivés cagés du Tokyo Green

avec des groupements o-NB, o-NPE et DMNPE ont été synthétisés, présentant une très faible fluorescence. La photolyse du fluorophore cagé modifie les niveaux énergétiques de la partie xanthène, annihilant le phénomène de PET.^[153]

L'intérêt de cette stratégie réside dans l'extinction de la fluorescence par l'utilisation d'un seul groupe photolabile, contre deux pour les fluorescéines précédemment décrites. En effet, une fluorescence résiduelle non négligeable est observée pour les fluorescéines mono-cagées et la photolyse de deux groupements nécessite des intensités et des durées de photolyse pouvant être délétères sur des systèmes vivants.

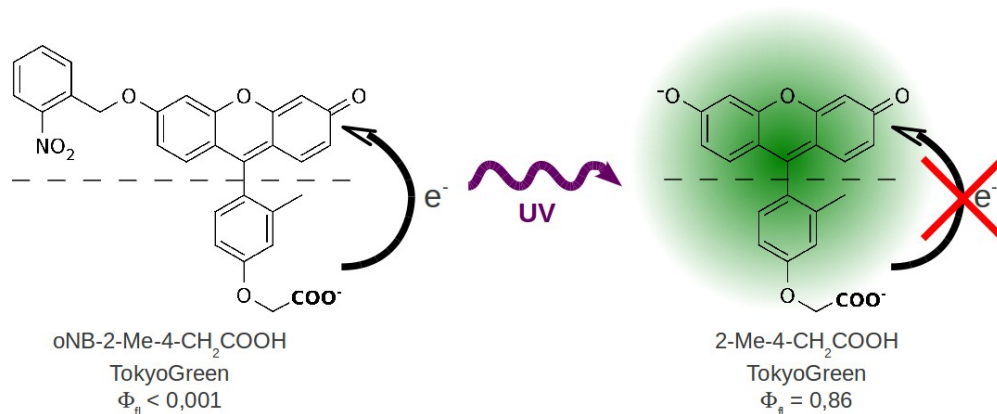


Figure I.33 : Anihilation du PET photoinduite appliquée au TokyoGreen.

II.4.5.4.b. Suppression de quenching en FRET.

L'extinction de fluorescence par FRET est un transfert d'énergie du fluorophore excité vers un chromophore non fluorescent dont le spectre d'absorption recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du fluorophore. Ce transfert ne peut être effectué efficacement que sur une échelle de distance adéquate.

Lorsque le fluorophore et le quencher sont reliés par l'intermédiaire d'un groupement photolabile, la séparation des partenaires de FRET peut se faire au moyen de la lumière.

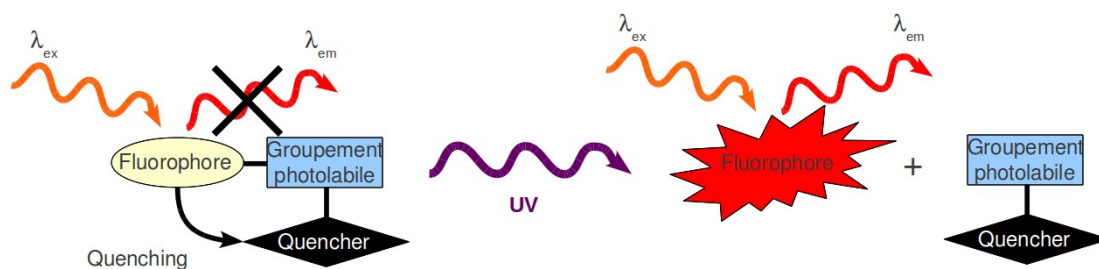


Figure I.34 : Principe de l'anihilation de FRET photoinduite.

Une telle stratégie a été appliquée récemment pour le marquage des mitochondries. Un peptide porteur d'une séquence de localisation des mitochondries MLS (mitochondrial localization sequence) a été marqué par un fluorophore lié à un quencher par un groupement photolabile. La photolyse de ce groupe a décroché le quencher et l'augmentation de fluorescence a pu être suivie par cytométrie en flux.^[154]

Nous avons vu qu'il est possible, par de nombreuses stratégies, de contrôler spatio-temporellement l'activation d'un signal fluorescent, *in vitro* et *in vivo*. Ce contrôle est opéré par modification de la structure chimique et électronique du fluorophore grâce à une impulsion lumineuse.

Toutefois, pour pouvoir prétendre à une utilité en imagerie de la dynamique de protéines, ces fluorophores photo-activables doivent être capables de reconnaître leur protéine cible et de s'y lier.

III. Du fluorophore à la sonde : le marquage de protéines.

Il s'agit d'introduire un marqueur fluorescent sur une protéine d'intérêt. Diverses techniques ont été décrites, réparties en deux grandes classes. Le marquage est soit non-covalent, réversible, basé sur l'affinité entre un groupement de marquage, exprimé sur la protéine et un groupement de reconnaissance porté par le marqueur, soit covalent, irréversible, basé sur la formation d'une liaison entre la protéine cible et le marqueur.

Le marquage idéal présente diverses caractéristiques^[155] :

- introduction du marqueur en une étape
- marquage rapide et quantitatif
- marquage inexistant sur les protéines non ciblées, non taguées
- marqueur de petite taille pour ne pas influencer sur la fonction de la protéine cible
- pas d'effet secondaire des réactifs de marquage
- fonctionner à différentes échelles, de l'éprouvette à l'animal entier, du *in vitro* au *in toto*.

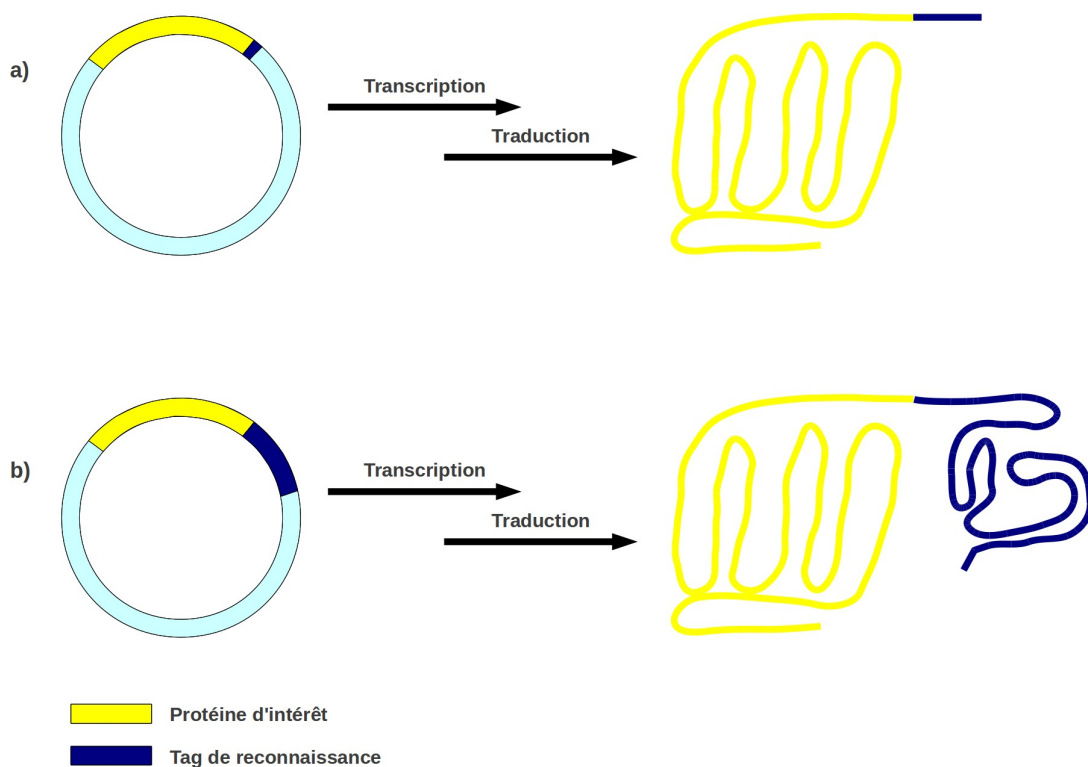


Figure I.35 : Insertion des motifs de reconnaissance dans une protéine d'intérêt, a) Tag peptidique ; b) Tag protéique ou protéine fluorescente exprimée en fusion avec la protéine cible.

La séquence génétique du marqueur (bleu foncé) est insérée à la suite du gène de la protéine d'intérêt (jaune) dans le même cadre de lecture. Ainsi, l'expression du marqueur, lié à la protéine, se fait directement lors des étapes de transcription et de traduction.

La taille du marqueur peut avoir une influence sur le comportement de la protéine cible. La plupart du temps, cela n'affecte pas la protéine cible mais dans certains cas, de petits marqueurs conservent le comportement de la protéine marquée de façon plus rigoureuse^[155]. Il a été reporté que la vérification de l'impact du marqueur sur le comportement de la protéine n'est pas systématiquement rigoureusement vérifié^[155] et les altérations du comportement ne sont pas toutes publiées. Des altérations ont été reportées sur des protéines de surface de virion^[156], sur la β -tubuline^[157] ou sur la β -actine (transport dans le noyau cellulaire)^[158]. Il est toutefois difficile d'estimer l'impact général de la taille des marqueurs sur le comportement dynamique des protéines cibles.

III.1. Marquage non-covalent.

Le marquage non-covalent repose sur la reconnaissance d'un tag par une sonde de manière réversible. L'affinité de la sonde pour le tag conditionne l'efficacité de ce marquage.

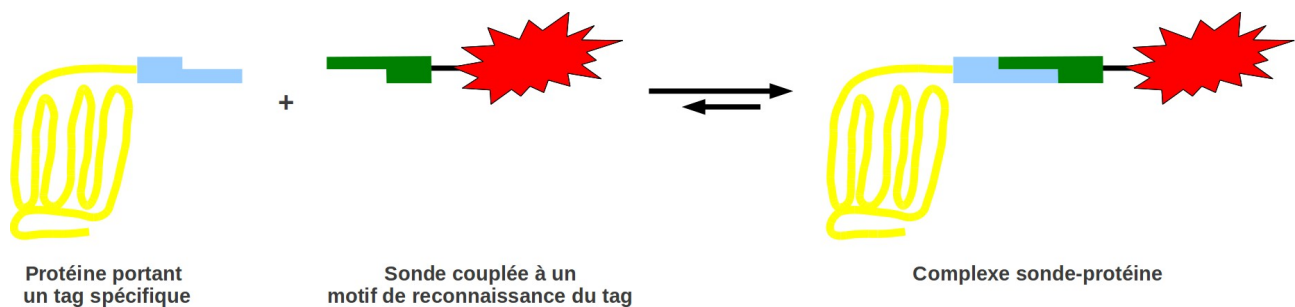


Figure I.36 : Marquage non covalent.

III.1.1. Affinité naturelle.

Ce sont des molécules naturellement présentes au niveau cellulaire qui ont été utilisées pour marquer des protéines d'intérêt. Il s'agit le plus souvent de couples enzyme/substrat ou récepteur/ligand.

Les systèmes biotine/avidine des cellules mammifères et son équivalent biotine/streptavidine chez les bactéries ont été les précurseurs des marqueurs basés sur l'affinité de deux entités entre elles. Décrite en 1978 par Wilson *et al.*,^[159] leur première utilisation s'appuie sur la très forte affinité

de la biotine pour l'avidine ($K_D \approx 10^{-15}$ M) et pour la streptavidine ($K_D \approx 10^{-13} - 10^{-14}$ M).

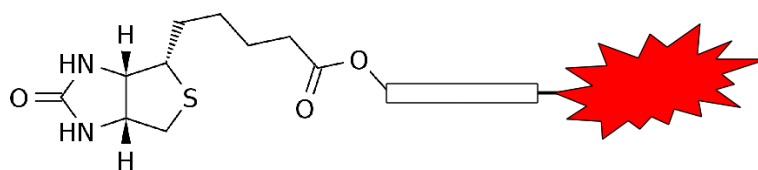


Figure I.37 : Sonde fluorescente biotine

Cette technique a l'avantage de présenter une affinité élevée pour un couple accepteur/ligand donné ainsi qu'une sélectivité naturelle. Différentes sondes ont été utilisées^[160] : des diméthylpyridines (comme marqueur de l'*Archobacter globiformis* amine oxydase), des ptérides (NO synthase), β -œstradiol (récepteurs à l'œstrogène, indole (Indole Binding Protein), biotine (avidine).

Le Triméthoprime (TMP, antibiotique) est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase bactérienne (DHFR), à laquelle il se lie avec un K_D de l'ordre du nanomolaire. Cette forte affinité a été mise à profit pour marquer des protéines exprimées en fusion avec la DHFR.^[161]

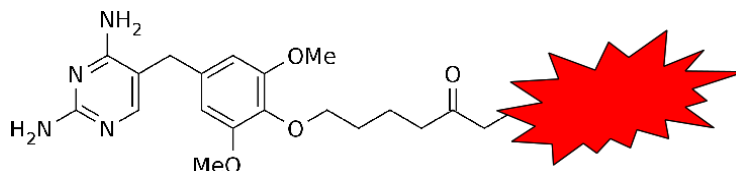


Figure I.38 : Sonde triméthoprime fluorescente

III.1.2. Reconnaissance de Tag peptidiques.

Ce marquage est basé sur des interactions de coordination entre un motif de reconnaissance contenant un ion métallique et un tag peptidique inséré sur une zone de la protéine qui n'affecte pas sa fonction.^[160]

III.1.2.1. Tag histidine.

Ce marquage est dérivé d'une technique de purification de protéines sur colonne d'affinité. Une sonde portant un complexe nitrilotriacetic acid (NTA)-Ni(II) reconnaît spécifiquement un peptide hexa-histidine (His₆) porté par une protéine ($K_D \approx 1,5 \times 10^{-5}$ M). Une telle sonde, modifiée pour porter un fluorophore, permet ainsi un marquage fluorescent de la protéine d'intérêt avec différents fluorophores : rhodamine,^[162] cyanines,^[163] fluorescéine.^[164]

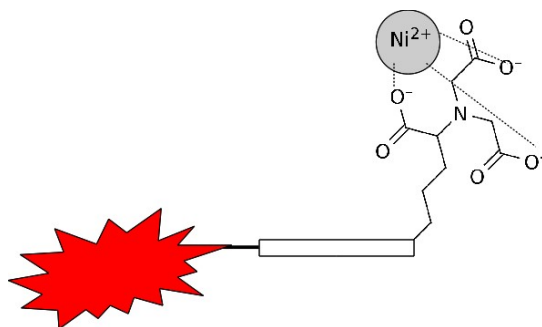


Figure I.39 : Sonde Ni(II)-NTA fluorescente.

Une des limites de cette technique est sa constante de dissociation moyenne. Afin d'améliorer l'affinité de la sonde vis à vis du tag peptidique, des travaux ont été effectués afin d'augmenter la multivalence. Une des stratégies a été de porter le nombre d'histidines de 6 à 10, mais l'amélioration apportée est assez limitée.^[165] Une autre technique a été de doubler et tripler les complexes NTA-Ni(II).^[164] Les sondes bis NTA-Ni(II) et tris NTA-Ni(II) ont respectivement un K_D de $2,7 \times 10^{-7}$ M et 2×10^{-8} M vis à vis d'un tag His₆.

La seconde limite de cette technique est la pénétration cellulaire des motifs NTA-Ni(II). A pH 7, le NTA est chargé trois fois négativement, le Ni(II) porte deux charges positives, ce qui laisse une charge négative non neutralisée résiduelle. Cette charge bloque l'entrée de la sonde dans la cellule.^[112] Des travaux menés au laboratoire par le Dr. C. Orange ont permis de contourner cette limite. L'estérification d'une fonction acide permet de former la NDA (nitrilodiacetic acid), un précurseur du NTA portant deux charges négatives. Ces charges sont neutralisées par les cations divalents, permettant ainsi la pénétration cytoplasmique de la sonde.^[112]

Enfin, le Ni(II) peut limiter l'utilisation de cette technique. Il est toxique pour les cellules,^[166] et sa nature paramagnétique peut dans certains cas avoir un effet quencher de la fluorescence.^[167] Cet inconvénient a été contourné par le développement du HisZiFit,^[168] chélatant le Zn(II) et

reconnaissant un tag His₆, avec un K_D de 40 nM environ, comparable à celui d'une sonde bis NTA-Ni(II), et bien inférieur à celui d'une sonde NTA-Ni(II).

III.1.2.2. Tag Aspartate.

Ce tag, présentant un motif tétra-aspartate (Asp₄ ou D₄), est reconnu par un complexe Zn(II)-DpaTyr (dipicolylamine-tyrosine).^{[169][170]} Cette sonde a été conjuguée à de la fluorescéine et des cyanines pour visualiser le récepteur muscarinique de l'acétylcholine sur des cellules CHO.^[169]

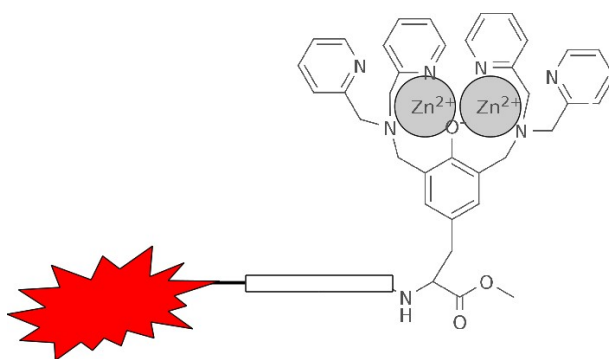


Figure I.40 : Sonde bis Zn(II)-DpaTyr fluorescente

Ce tag a été utilisé également avec des sondes fluorescentes sensibles au pH. En effet, la présence de quatre aspartates crée un environnement acide à proximité du fluorophore, entraînant une variation de ses propriétés de fluorescence.^[170]

Un motif D₄-Gly-D₄ a été inséré dans la séquence d'une protéine et reconnu par deux sondes pyrène-Zn(II). Après chélation, les résidus pyrènes forment un excimer, reconnaissable par ses propriétés de fluorescence différentes du monomère.^[171]

Des sondes bis-Zn(II) ont également été synthétisées et utilisées pour la détection de protéines phosphorylées,^{[172][173]} ou en présence de Tb(III) reconnaissant une protéine marquée par une séquence D4-Trp-D4. Après chélation, on observe un transfert d'énergie entre le Trp et le Tb(III) à l'état excité.^[174]

III.2. Marquage covalent.

Le marquage covalent d'une protéine est basé sur la réactivité complémentaire d'un tag exprimé en fusion avec la protéine d'intérêt et une sonde fluorescente. La reconnaissance du tag par la sonde entraîne la formation d'une liaison covalente, rendant ces marquages irréversibles.

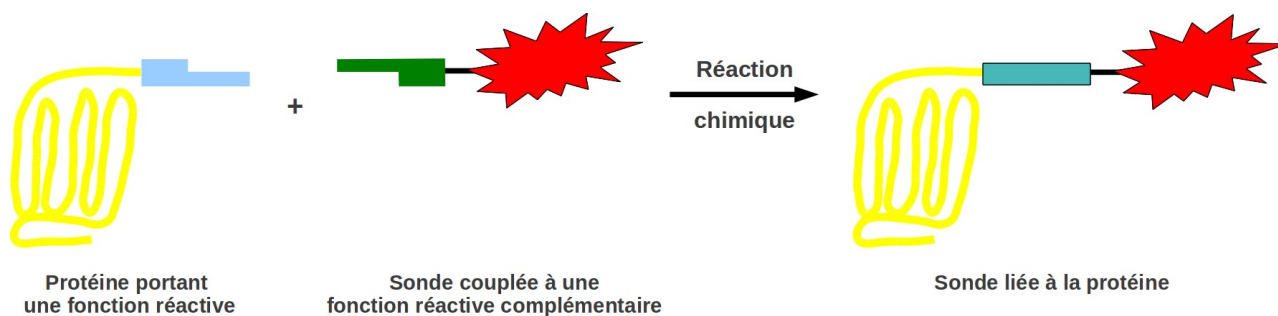


Figure I.41 : Marquage covalent d'une protéine d'intérêt.

III.2.1. Modification directe des acides aminés.

Ces méthodes utilisent la réactivité naturelle de certains acides aminés afin d'insérer le marqueur fluorescent sur la protéine native.^[175]

Les propriétés nucléophiles des chaînes latérales des lysines et cystéines ont été utilisées, soit directement, soit après réduction de l'amine ou du thiol, puis marquage secondaire.

Les acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane ont également servi de point d'ancrage pour des marqueurs, par réaction chimique comme le couplage oxydatif sur les phénols ou de la chimie pi-allyle catalysée par du palladium.

La réactivité pH dépendante de l'amine terminale des protéines a été explorée pour du marquage en raison de sa différence de pKa par rapport aux lysines, lui conférant une réactivité unique.

Ces réactions sont relativement généralistes. Il est souvent préférable de marquer les protéines d'intérêt de manière plus spécifique et sélective. Pour cela, on peut utiliser des propriétés de reconnaissance entre un motif qui sera exprimé sur la protéine (tag peptidique ou protéique, selon sa taille) et une sonde portant une fonction réactive particulière. L'utilisation de tels "couples" permet d'obtenir des marquages bio-orthogonaux, c'est à dire n'interférant pas avec les réactions biologiques.

III.2.2. Motifs de reconnaissance peptidiques.

Ces tags sont des marqueurs de petite taille (quelques acides aminés) ayant une grande affinité pour certains motifs moléculaires couplés à la sonde de marquage.

III.2.2.1. Tag tétracystéines.^[176]

Ce marqueur exploite la bonne affinité d'un hexapeptide dont la séquence comporte quatre cystéines selon le motif : CCXXCC, où X représente un acide aminé quelconque, avec une molécule contenant deux atomes d'arsenic. La séquence la plus communément utilisée est CCPGCC. La fluorescéine et la résorufine ont été modifiées par l'équipe de Tsien pour former respectivement les sondes FAsH et ReAsH. Ces sondes présentent certains intérêts. Leur fluorescence est quenchée lorsque la sonde est libre et est activée après liaison au motif tétracystéines. Ces sondes traversent également la membrane cellulaire, autorisant un marquage intra-cellulaire. Toutefois, leur spécificité n'est pas parfaite. Ce sont des molécules relativement hydrophobes pouvant se lier aux protéines sur des sites non-spécifiques.^[175] Pour contourner cet effet, elles sont utilisées avec une mixture de molécules hydrophobes, entrant en compétition pour les interactions sur les sites de liaison non spécifiques, diminuant ainsi les marquages artefactuels. De plus, afin d'éviter la réaction des arsenics sur des cystéines hors site, de l'éthandithiol est utilisé en excès pendant le marquage et le rinçage, pouvant induire une toxicité pour des études *in vivo*.

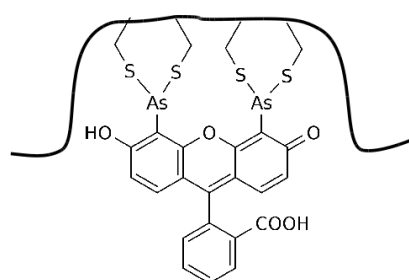


Figure I.42 : Sonde FAsH liée à un tag tétra-cystéines

Un contrôle photochimique de l'activation de fluorescence lors d'un marquage FAsH d'une protéine a été rapporté par l'incorporation, dans la séquence SSXXSS d'une cystéine cagée par un groupement o-NB.^[113]

III.2.2.2. Tag tétrasérines.

Afin de contourner le problème lié à l'excès de thiols, un tag tétrasérine reconnaissant spécifiquement des sondes dérivées d'acides boroniques a été décrit par Halo *et al* en 2009. Une rhodamine a été modifiée pour porter 2 groupements acide boronique (RhoBo).^[177]

Ces sondes sont également cellule-perméables, fluorogéniques, se lient à l'hexapeptide SSPGSS avec un K_D de l'ordre du nanomolaire et s'affranchissent de la toxicité de l'arsenic et de l'éthanedithiol. Toutefois, comme certaines protéines portent naturellement un motif SSXXSS, la sélectivité doit encore être améliorée afin d'éviter un marquage hors cible.

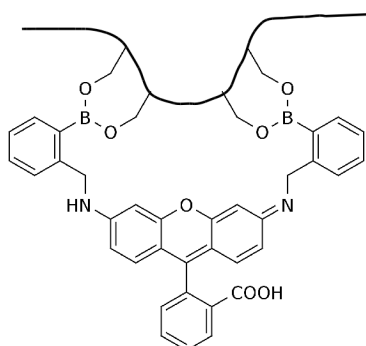


Figure I.43 : Sonde RhoBo liée à un tag tétra-sérines

III.2.2.3. Sondes bi-fonctionnelles.

Ce sont des sondes qui portent deux groupements distincts, un groupement de reconnaissance de la protéine cible, assurant une liaison non-covalente à la protéine, ainsi qu'un groupement réactif vis à vis de la chaîne latérale d'un acide aminé de la protéine, proche du tag de reconnaissance.

L'appariement non-covalent de la sonde à la séquence peptidique reconnue rapproche la fonction réactive de l'acide aminé réactif, et maintient cette proximité pendant un temps suffisamment long pour qu'une réaction chimique ait lieu. Après réaction, l'élément de reconnaissance est relargué.

Cette approche a été appliquée aux motifs His-Tag^[178] et flagTag.^[179]

Ces sondes permettent un marquage sélectif, mais la cinétique de réaction en limite l'intérêt *in vivo*.^[155]

III.2.2.4. Sondes N-cyanobenzothiazoles.^[180]

Ces sondes réagissent sélectivement sur les cystéines présentant une fonction amine en β de la chaîne latérale. Elles réagiront donc sélectivement sur les cystéines terminales d'une protéine. Elles ont été utilisées pour du marquage de surface et en lysats cellulaires. Le marquage est spécifique, mais lent.

III.2.3. Reconnaissance de protéines de fusion.

Ces marquages sont basés sur des dérivés d'enzymes exprimés en fusion avec la protéine cible et reconnaissant sélectivement un substrat spécifique. Ce sont des marqueurs de haut poids moléculaire (> 10 kDa).

III.2.3.1. SNAP-Tag.^[181]

Ce marqueur a été mis au point par l'équipe de K. Johnsson et commercialisé par Covalys[®] puis par New England Biolabs[®]. Il est dérivé d'une enzyme de réparation de l'ADN humaine, la hAGT (human AlkylGuanine alkyl Transferase). Cette enzyme a été mutée afin de reconnaître spécifiquement un dérivé O-benzyle de la guanine. Au site actif, une cystéine porte une attaque nucléophile sur le carbone benzylique de la O-benzyle guanine qui se retrouve lié de façon covalente à l'enzyme. En fin de réaction, la guanine est relarguée.

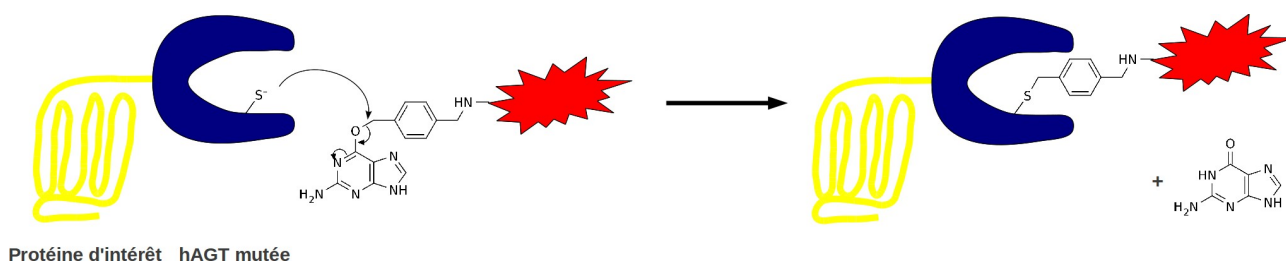


Figure I.44 : Principe de réaction du Snap-tag.

Le marquage fluorescent de protéines a été décrit en faisant réagir une O-benzyle guanine portant un fluorophore sur l'enzyme exprimée en fusion avec la protéine d'intérêt dans divers

compartiments cellulaires (cytosol, noyau, réticulum endoplasmique...).[155]

III.2.3.2. CLIP-Tag.^[182]

Développé par la même équipe, sur une stratégie identique, le CLIP-Tag est une AGT modifiée reconnaissant spécifiquement une cytosine O-benzylée. De manière analogue au SNAP-Tag, le benzyle est transféré sur la cystéine du site actif après reconnaissance du substrat par l'enzyme et autorise ainsi le marquage d'une protéine cible par une O-benzyle cytosine portant un fluorophore.

III.2.3.3. Halo-Tag.^[183]

Développé et commercialisé par Promega[®], ce marqueur est dérivé d'une enzyme qui catalyse la déhalogénéation des alcanes, la DhaA (haloalkane deshalogénase). Cette enzyme a été modifiée pour réagir de manière covalente sur des dérivés haloalcanes, notamment un dérivé du chlorohexane, le 1-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]-6-chlorohexane, disponible commercialement. En couplant un fluorophore au dérivé haloalcane, la réaction de l'Halo-Tag exprimé en fusion avec la protéine d'intérêt entraîne un marquage fluorescent de celle-ci.

Il est intéressant de noter que ces différents tags sont orthogonaux entre eux et peuvent ainsi être utilisés pour faire des marquages multicolores, pour analyser des colocalisations de protéines, par exemple.

III.2.3.4. Tag β -lactamase.^[184]

Une β -lactamase, exprimée en fusion avec une protéine cible réagit de manière covalente avec un dérivé d'une β -lactame portant une sonde fluorescente et un quencher de fluorescence. Ce marquage présente une cinétique de liaison moins intéressante que celle des autres tags et son utilisation est limitée à un usage extra-cellulaire.

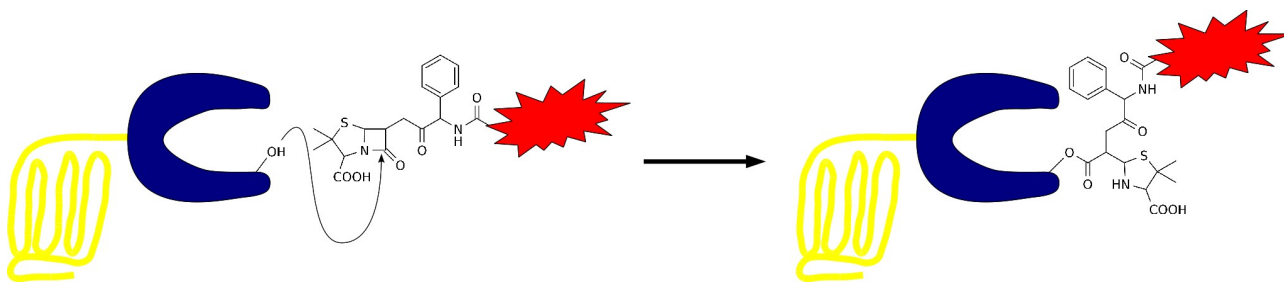


Figure I.45 : Réactivité du tag β -lactamase.

III.2.3.5. TMP-Tag covalent.^{[161][185]}

Cette sonde est basée sur la dihydrofolate réductase d'*E.Coli* (eDHFR), qui a subi une mutation L28C. La cystéine ainsi insérée réagit avec un dérivé propénamide du triméthoprime, substrat de l'eDHFR, à travers une addition de Michael. Ce marqueur a été employé avec succès sur des protéines intracellulaires.

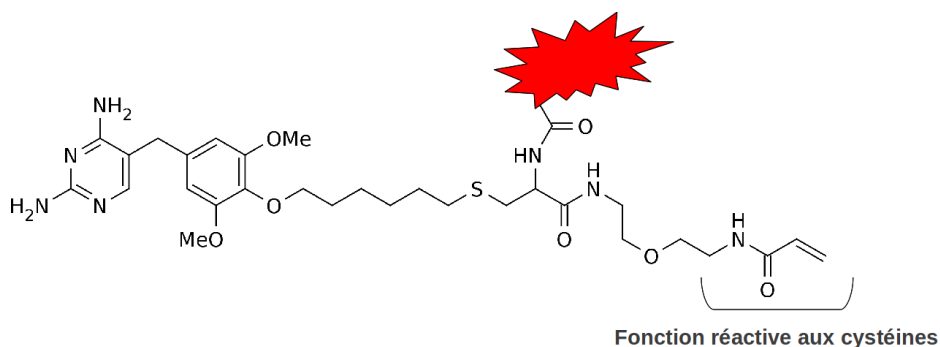


Figure I.46 : Triméthoprime réactif aux cystéines.

III.2.4. Marquage catalysé par des enzymes.

Ces stratégies s'appuient sur des enzymes naturelles qui modifient une protéine avec des petites molécules ou des cofacteurs de manière covalente. Certaines enzymes reconnaissent également de petites séquences peptidiques qui peuvent être insérées de manière covalente dans une protéine hétérologue.^{[186][187]} Ces enzymes reconnaissent parfois des substrats modifiés, permettant d'insérer des marqueurs sur une protéine d'intérêt. Comme l'enzyme sert ici uniquement de médiateur pour la ligation, cela permet de bénéficier de l'efficacité de la réaction enzymatique en s'affranchissant d'un marqueur de haut poids moléculaire.

III.2.4.1. Biotine ligase d'*E. Coli* (BirA).^[188]

La BirA insère une biotine sur la chaîne latérale d'une lysine présente dans un peptide accepteur de quinze acides aminés. Ce système est orthogonal aux biotine ligases mammifères. Il a été utilisé pour marquer des protéines mammifères avec un complexe Q-Dot-Streptavidine.^[189]

Cette enzyme peut également reconnaître des isostères de la biotine, comme la cétobiotine.^[188] Des biotine ligases d'autres espèces peuvent reconnaître des biotines portant une fonction azoture ou alcyne. Le marquage fluorescent de la protéine d'intérêt se fait donc dans un deuxième temps, par modification de la fonction réactive de la biotine.

Cette technique a été utilisée pour marquer des protéines intra-cellulaires.^[190] Le marquage parallèle d'autres protéines biotinyllées et l'insertion de la sonde en deux temps modèrent l'intérêt de cette technique.

III.2.4.2. Transglutaminase.^[191]

Cette technique permet de modifier une protéine marquée par des glutamates en présence de sondes portant une fonction amine. Elle a été utilisée pour du marquage sur des cellules vivantes.

III.2.4.3. Lipoïc Acid Ligase (LplA).^[192]

Cette enzyme transfère efficacement des marqueurs contenant des bromes réactifs, des azotures et des photocrosslinkers pour marquer des protéines.^{[192][193][194]} Récemment, une ligase a été modifiée pour accepter des sondes coumariniques comme substrat.^[158]

L'expression de cette enzyme en cellules mammifères permet un marquage intracellulaire, sur les protéines cytosoliques ou nucléaires.

Toutefois, le choix du marqueur n'est pas libre, car il doit pouvoir rentrer dans la cavité de l'enzyme. Ainsi, pour l'insertion d'un nouveau marqueur, de nouveaux mutants de l'enzyme doivent être élaborés.

III.2.4.4. Formylglycine Generating Enzyme (FGE).^{[195][196]}

Cette enzyme reconnaît un motif de six acides aminés comprenant une cystéine, qui est oxydée en formylglycine par l'enzyme. Le marquage proprement dit est secondaire, par réaction d'une sonde amino-oxy ou hydrazine sur l'aldéhyde précédemment formé.

III.4.4.5. Sortase A bactérienne (SrtA).

Cette enzyme permet de lier une protéine ou un peptide contenant le motif de reconnaissance LPXTG (COOH terminal) à une seconde protéine ou peptide présentant une séquence polyglycine en N-terminal.^[197] Cette technique a permis d'effectuer des marquages en C-terminal^{[198][199]} et en N-terminal.^{[200][201]} Ces marquages présentent une haute spécificité sur les cellules vivantes, mais semblent limités au marquage de surface.^[155]

III.4.4.6. Phosphopanthéinyl transférases (PPtases).^{[202][203]}

Les PPtases de *E. coli* (AcpS) et de *B. subtilis* (Sfp) reconnaissent le Co-enzyme A (CoA) comme substrat et catalysent naturellement l'addition d'un groupement phosphopantéthine activé par le CoA sur une sérine portée par une Acyl ou Peptidyl Carrier Protein. Les transférases bactériennes sont orthogonales aux protéines mammifères et ne marqueront donc pas de protéine native des cellules eucaryotes.

AcpS et Sfp sont également orthogonales entre elles. Elles peuvent donc être utilisées pour un double marquage.^[204]

Pour contourner la limitation due à la taille des marqueurs (les Carrier Proteins comportent entre 80 et 120 résidus), deux petits peptides de douze acides aminés, A1 et S6, ont été développés, reconnus sélectivement respectivement par AspS et Sfp. Ils conservent leur propriété d'orthogonalité.^[205]

La limite de cette technique est la présence physiologique de CoA intra-cellulaire, diminuant l'efficacité de marquage et restreignant l'utilisation de ces marqueurs à des protéines extra-cellulaires.

III.2.5. Insertion d'acide aminé non naturel.

Cette technique utilise la machinerie de traduction cellulaire de l'information génétique pour obtenir des protéines modifiées par la présence d'un acide aminé non-naturel. Ces acides aminés, issus de synthèse chimiques, présentent des propriétés particulières, comme émettant de la fluorescence ou portant une fonction chimique particulière lui conférant une réactivité propre.

Cette technique est fondée sur la reconnaissance d'un codon anti-sens (ou stop, non-sens, non codant, "ambre"...) par un ARN de transfert modifié portant l'acide aminé non-naturel à insérer. Le codon ambre utilisé est le codon TAG (UAG après transcription en ARN) car minoritaire parmi les trois codons stop présents dans le code génétique. L'ARNt acylé est micro-injecté dans la cellule et l'insertion de l'acide aminé dans la protéine est effectué par le biais de la machinerie de traduction, au niveau du ribosome. L'ARNt utilisé est un ARNt bactérien, non reconnu par les aminoacyl-tRNA synthétases de l'hôte, afin qu'il ne soit pas recyclé par acylation avec un des vingt acides aminés naturels.^[206]

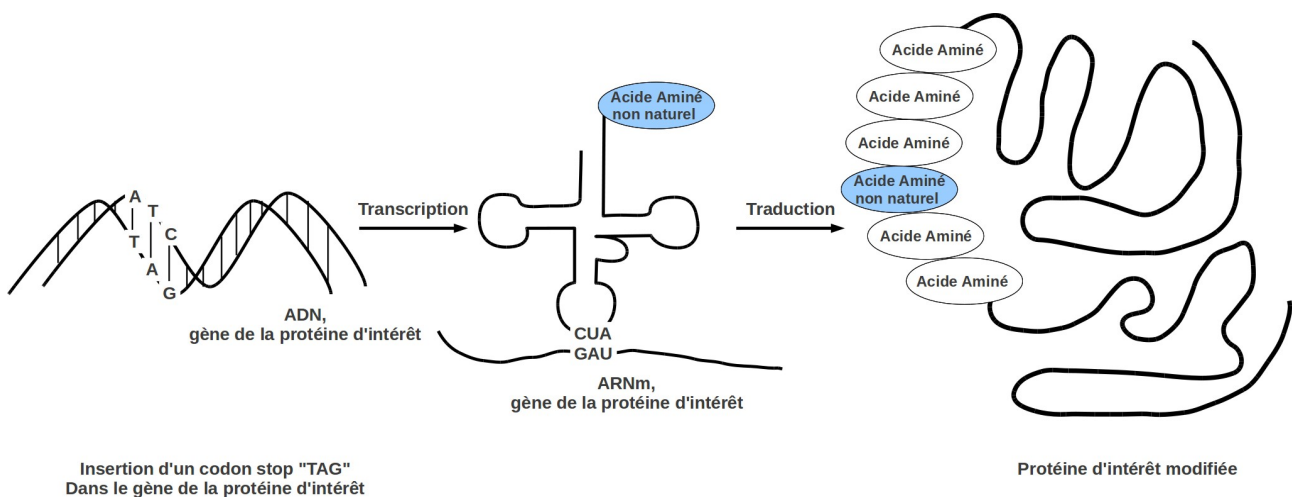


Figure I.47 : Stratégie d'incorporation d'un acide aminé non naturel dans une protéine par insertion d'un codon "stop".

Le codon "stop" TAG est inséré dans le gène de la protéine d'intérêt. Le transcrit ARNm UAG est reconnu par un ARNt portant l'acide aminé non-naturel à insérer. Cet acide aminé est donc incorporé lors de l'étape de traduction au sein de la protéine grâce à la machinerie de la cellule.

La principale limite de cette technique est la disponibilité réduite en ARNt acylé et sa mise en œuvre assez peu confortable par micro-injection. Des travaux récents ont permis de s'en affranchir par mise au point de paires permanentes d'aminocyl-tRNA synthétases/acides aminés non naturels. Ainsi, l'ARNt acylé est directement synthétisé par la cellule hôte et seul l'acide aminé non-naturel doit être présent dans le milieu. Cette évolution a été appliquée avec succès aux bactéries, levures et

cellules eukaryotes.^[207]

Une autre évolution a été apportée. L'emploi du codon stop pouvant induire des synthèses erronées sur d'autres protéines, des efforts sont portés sur l'emploi de codons codants, mais non utilisés par le système biologique étudié. Cette stratégie permet également d'insérer plusieurs acides aminés non naturels différents sur la même protéine.^[207]

Cette technique a été utilisée avec succès dans l'exploration de la structure et de la fonction de protéines ainsi que dans la préparation de protéines présentant des activités nouvelles ou améliorées.
[207]

III.2.6. Réactions bioorthogonales.

Ce sont des réactions qui n'interfèrent pas avec les processus biologiques, impliquant des fonctions réactives non présentes naturellement. Il s'agit généralement de bio-marquages secondaires, consécutifs à l'insertion de la fonction réactive soit par l'insertion d'un acide aminé non naturel, soit par couplage de la protéine avec un intermédiaire portant la fonction réactive par une des stratégies décrites précédemment.

Pour être biologiquement intéressantes, les réactions doivent être spécifiques, sélectives et rapides. Dans la plupart des cas, elles présentent une cinétique de second ordre.^[175] Leur vitesse dépend donc de la concentration des réactifs. *In vitro*, les concentrations étant élevées et connues, la cinétique des réactions n'est pas un obstacle, mais *in vivo*, en conditions diluées, ces réactions peuvent être très ralenties. Les vitesses de ces réactions sont comprises entre 10^{-4} et $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

III.2.6.1. Condensation aldéhydes/cétones-amines.

La couplage est effectué par la formation d'une liaison oxyme ou hydrazone entre une sonde amino-oxy ou hydrazine et un aldéhyde ou une cétone portée par la protéine d'intérêt. L'utilisation de telles réactions est limitée par la présence d'aldéhydes et de cétones dans le cytoplasme. Ces fonctions sont par contre absentes de la membrane cellulaire. L'équipe de Schultz a décrit, par cette technique, le marquage fluorescent de la protéine membranaire LamB suite à l'insertion d'une acétyl-phénylalanine par le biais d'un codon non-sens.^[208]

III.2.6.2. Réaction de Staudinger.

La réaction de Staudinger est la condensation d'un azoture sur une triarylposphine portant une fonction ester sur un des phényles. Il se forme un intermédiaire aza-ylide puis formation intramoléculaire de la fonction amide.^[209]

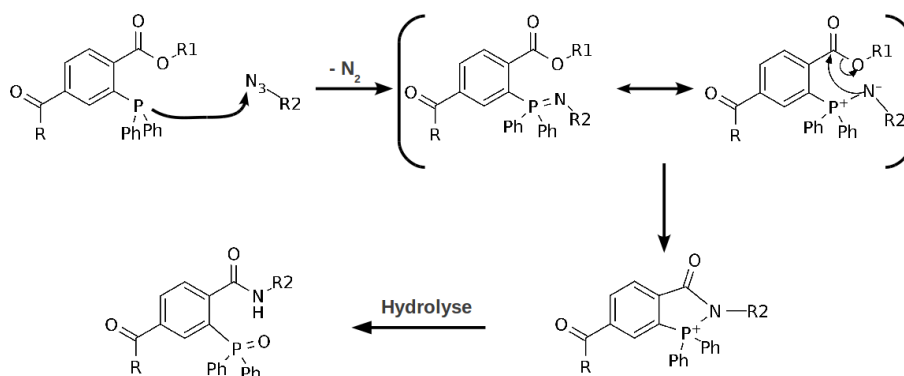


Figure I.48 : Mécanisme de la réaction de Staudinger.

L'intérêt d'une telle stratégie repose sur la non-réactivité de la fonction azoture sur les fonctions biologiques et son absence des systèmes vivants.

Une variante de cette réaction a été décrite par Soellner *et al.*^[210] Il s'agit d'une réaction "traceless", dont le produit de couplage est dépourvu de l'oxyde de triphénylphosphine résiduel. Pour ce faire, un des phényle de la phosphine a été remplacé par un méthyl thioester. L'intermédiaire aza-ylide réagit sur le carbonyle puis, après hydrolyse, du (diphénylphosphanyl)méthanethiol est relargué.

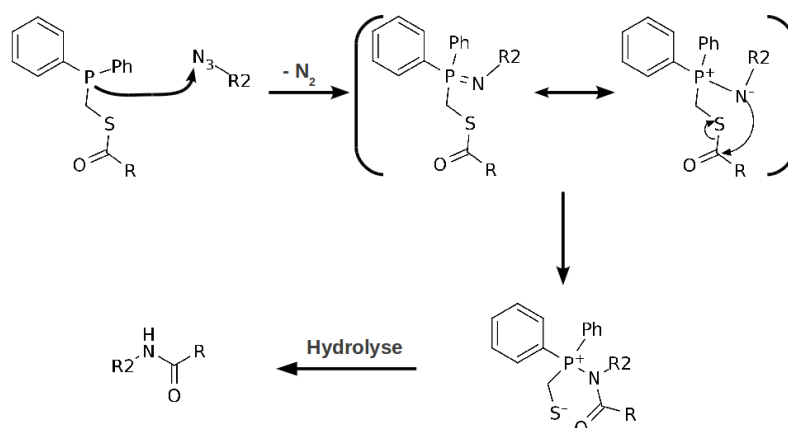


Figure I.49 : Réaction de Staudinger "traceless".

Ces réactions sont bioorthogonales et permettent ainsi le marquage de biomolécules dans des environnements variés. La principale limite de cette technique est sa faible cinétique ($10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui nécessite de travailler avec des concentrations élevées en triarylphosphine.^[175]

III.2.6.3. Cycloaddition de Huisgen.

Cette réaction est une cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne.^[211] Elle est catalysée par du Cu(I), parfois activé par des ligands spécifiques et est effectuée en conditions de solvants non toxiques (eau, alcools), définies sous le nom de "Click Chemistry" par Kolb *et al.* en 2001.^[212] Le mécanisme de la réaction a été proposé en 2005 par Himo *et al.*^[213] et est présenté Figure I.50.

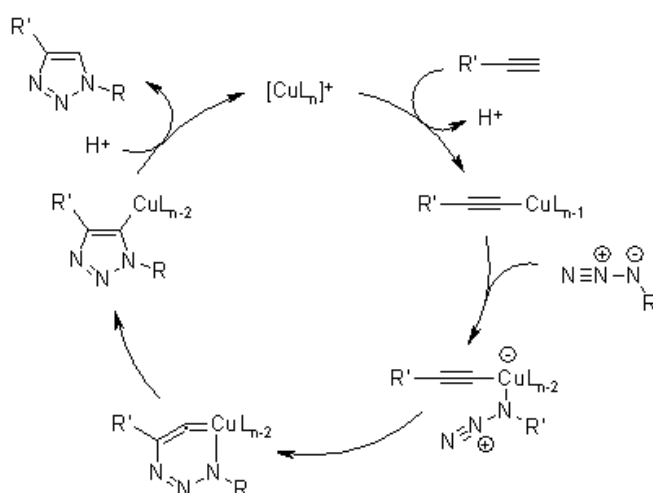


Figure I.50 : Mécanisme proposé de la réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le CuI. D'après Himo *et al.*, 2005.^[213]

Elle a été utilisée avec succès pour du marquage de protéines sur cellules fixées.^[214] Son utilisation sur cellules vivantes est limitée par la toxicité du Cu(I). *E. coli* résiste 16 heures à une incubation dans un milieu contenant une concentration de $100 \mu\text{M}$ de CuBr, survit au marquage "click" mais sa division est bloquée.^{[215][216]} Les cellules mammifères survivent une heure à des concentrations inférieures à $500 \mu\text{M}$, mais meurent à des concentrations voisines de 1 mM .^[175] A cette concentration, les embryons de Zebrafish meurent en 15 minutes environ.^[175]

Des optimisations ont été effectuées afin de s'affranchir de catalyseur. Il a été montré que les cyclooctynes, les plus petits alcynes cycliques stables, réagissent fortement avec les azotures ($10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, cyclooctyne non fonctionnalisé). Cette cinétique reste toutefois trop faible en regard des

concentrations des réactifs utilisés en biologie.

Une seconde génération de cyclooctynes a été développée. Ce sont des dérivés difluorocyclooctynes,^[217] un dérivé azacyclooctyne^[218] et des dérivés dibenzocyclooctyn-ol.^[219] Ces dérivés présentent une réactivité comparable à celle de la réaction catalysée par le cuivre, de l'ordre de $10^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^[217] Cette technique a été utilisée avec succès pour marquer des biomolécules dans des systèmes divers : cellules vivantes,^[217] *C. elegans*^[175] et des embryons de Zebrafish^[220].

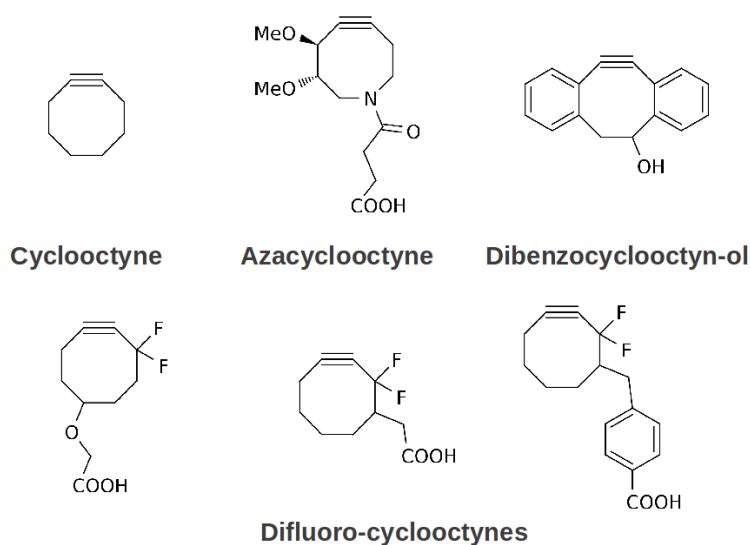


Figure I.51 : Dérivés cyclooctynes utilisés dans des réactions de cycloadditions. D'après Sletten, 2009.^[175]

De nombreuses techniques ont ainsi été employées pour marquer des protéines de manière sélective.

Toutefois, les stratégies les plus commodes à mettre en œuvre pour le développement de sondes fluorescentes photo-activables sont celles autorisant un marquage en une étape. Les sondes photo-activables nécessitent en effet de prendre certaines précautions lors de leur utilisation, notamment en ce qui concerne leur exposition à la lumière. Moins les manipulations seront importantes, plus ces précautions pourront être respectées.

Les techniques de marquage en une étape unique sont résumées table **I.2**.

Tag	Sonde complémentaire	Marquage	Type de tag	Fonctionnement	Références
Avidine/Streptavidine	Biotine	Non-covalent	Protéine de fusion	Interactions non covalentes de très forte affinité entre la biotine et l'avidine/streptavidine	159
Dihydrofolate réductase (DHFR)	Triméthoprime (TMP)	Non-covalent	Protéine de fusion	Interactions non covalentes de très forte affinité entre le TMP et la DHFR	161
Tag His ₆ / His ₁₀	Ni(II)-NTA	Non-covalent	Tag peptidique	Sphère de coordination du Ni(II) interagissant avec la fonction NTA et 2 imidazoles	112 ; 162-168
Tag tétra-aspartates	Zn(II)-DpaTyr	Non-covalent	Tag peptidique	Coordination entre le Zn(II) et la DpaTyr et 4 Asp	169 ; 170
Tag tétra-cystéines	FlAsH / ReAsH	Covalent	Tag peptidique	Liaison covalente entre un composé portant 2 atomes d'arsenic et un tag contenant 4 Cys	176
Tag tétra-sérines	RhoBo	Covalent	Tag peptidique	Réaction covalente entre un composé portant 2 esters boroniques et un tag portant 4 sérines	177
Sondes bifonctionnelles	Ni(II)-NTA / Ni(II)-DpaTyr TMP	Covalent	Tag peptidique Protéine de fusion	Liaison covalente formée par réaction d'un acide aminé sur une fonction réactive portée par une sonde d'affinité	178 ; 179 ; 185
Snap-tag	O-benzyle guanine	Covalent	Protéine de fusion	Réaction d'une cystéine du site actif d'une hAGT modifiée sur une O-benzyle guanine	181
Clip-tag	O-benzyle cytosine	Covalent	Protéine de fusion	Réaction d'une cystéine du site actif d'une hAGT modifiée sur une O-benzyle cytosine	182
Halo-tag	1-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]-6-chlorohexane	Covalent	Protéine de fusion	Réaction d'une haloalkane deshalogenase mutée sur un alcane halogéné	183
Tag β-lactamase	β-lactame	Covalent	Protéine de fusion	Réaction d'une β-lactamase sur un dérivé β-lactame portant un fluorophore	184
Tag polyglutamate	Fonction amine	Covalent	Tag peptidique	Trans-amination catalysée par la transglutaminase entre un glutamate et une sonde portant une fonction amine	191
Acyl/Peptidyl Carrier Protein	Phosphopantéthine-CoA	Covalent	Protéine de fusion	Addition catalysée par une PPTase d'un groupement phosphopantéthine activé sur une sérine d'une Carrier Protein	204
A1/S6	Phosphopantéthine-CoA	Covalent	Tag peptidique	Addition catalysée par une PPTase d'un groupement phosphopantéthine activé sur un peptide A1 ou S6	205
Réactions bio-orthogonales	Fonction réactive complémentaire	Covalent	Acide aminé non-naturel	Réaction de Staudinger ou cycloaddition [3+2] de Huisgen	209 ; 210 212

Table I.2 : Couples tag/sonde permettant le marquage de protéines en une étape.

Chapitre II

Résultats et discussion

Développement d'un fluorophore photoactivable en bi-photon et émettant hors du champ d'auto-fluorescence des cellules.

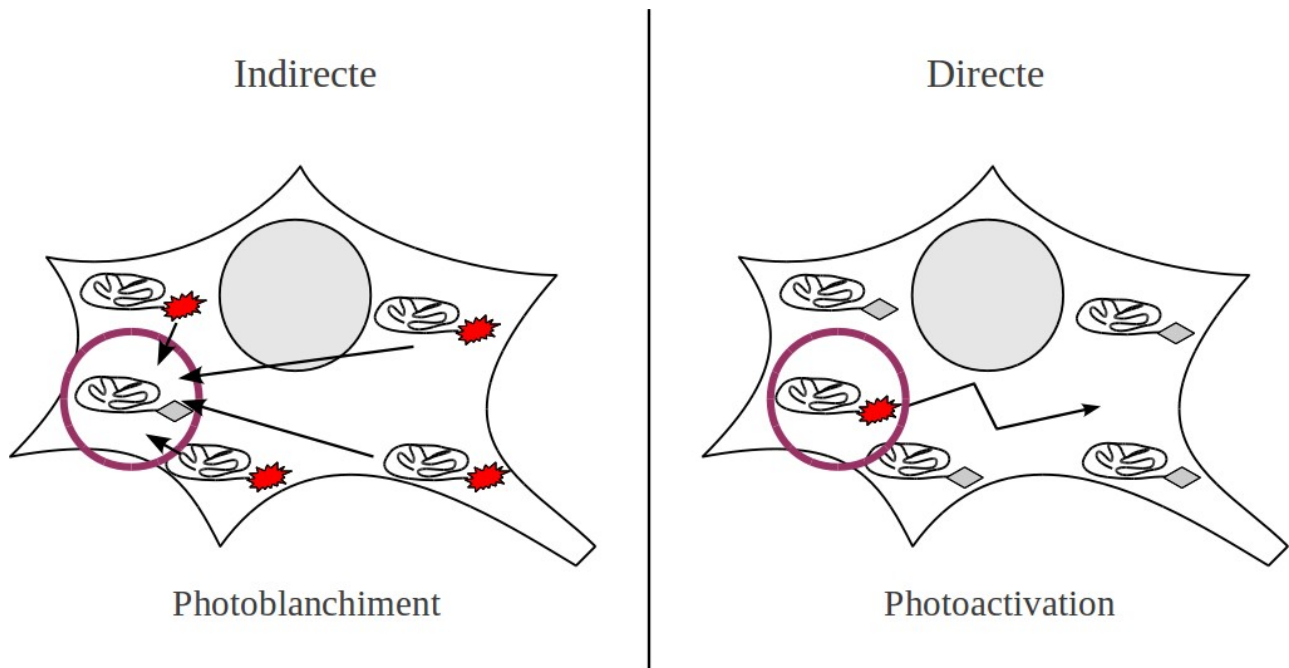


Figure II.1 : Observation de phénomènes dynamiques de protéines cellulaires fluorescentes par photoblanchiment et photo-activation.

Les techniques de photoblanchiment permettent de mettre en évidence des phénomènes dynamiques au niveau cellulaire et de les quantifier, mais ne permettent pas de suivre directement le comportement dynamique d'une protéine.

Grâce à la libération de la fluorescence dans une zone restreinte d'une cellule par photoactivation, cette technique permet une visualisation directe des phénomènes dynamiques de protéines cellulaires.

La visualisation et la compréhension de la dynamique des protéines cellulaires est un défi et un enjeu majeur en biologie. Ces investigations sont, en effet, une voie d'accès aux informations sur les processus cellulaires et sont souvent complémentaires à d'autres voies d'investigation classiques. Cette complémentarité permet d'obtenir des informations de sources variées et le recoupement des données permet d'appréhender le déroulement de processus biologiques de façon plus précise et rigoureuse.

Comme nous l'avons vu au début du Chapitre I, l'observation de la dynamique de protéines fluorescentes peut se faire de manière indirecte par photo-blanchiment, ou de manière directe par photo-activation. La visualisation par photo-activation de sondes fluorescentes apporte des informations directes sur le comportement des protéines au sein d'une cellule. Le développement de telles sondes est donc un enjeu majeur en biologie et chimie biologique. Il est important que ces sondes soient d'usage confortable (photolyse efficace et rapide, brillance élevée après photolibération (décageage), longueurs d'onde de photolyse et de fluorescence compatible avec le milieu cellulaire, stabilité en milieu aqueux et marquage aisé des protéines).

Dans l'optique de ne libérer la fluorescence que dans une zone d'intérêt restreinte, pour diminuer le bruit de fond en imagerie, nous avons orienté nos recherches sur le développement de sondes fluorescentes photo-activables possédant une efficacité de photolyse à 2 photons élevée.

Mes travaux de thèse découlent de résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire par le Dr. C. Orange^[221] et le Dr. D. Puliti.^[61] Un dérivé d'une 7-hydroxycoumarine photo-activable a été synthétisé et caractérisé.^[112]

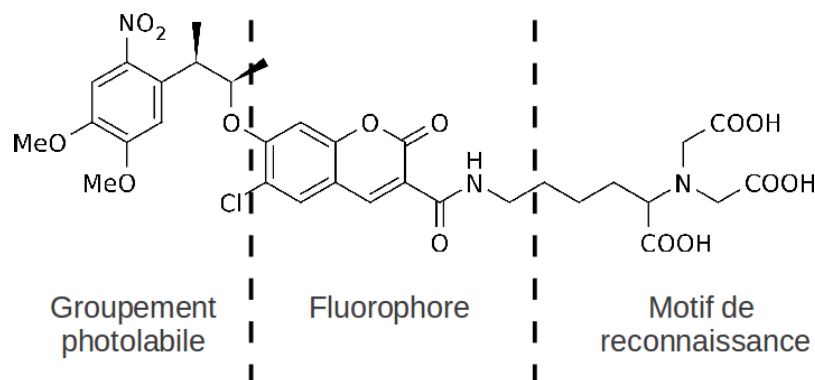


Figure II.2 : Sonde photo-activable NTA, synthétisée au laboratoire.^[112]

Cette sonde photo-activable est construite sur un schéma classique qui sera maintenu. Il se compose d'un cœur fluorescent, la coumarine, lié à un groupement photolabile DMNPB et à un motif NTA pour la reconnaissance de la protéine d'intérêt marquée par un Tag-polyhistidine.

Ce composé libère une coumarine après photo-activation à 350 nm avec un rendement quantique de 0,26, et temps de demie-vie de photo-libération de 4 μ s. Ce composé est également sensible à une irradiation à 2 photons. Lors de l'excitation à 740 nm, la coumarine est libérée avec une section efficace d'action de 0,21 GM. Cette efficacité est relativement modérée et le fluorophore libéré émet dans la zone d'auto-fluorescence des cellules ($\lambda_{em} \approx 460$ nm). Si la libération de la coumarine peut être visualisée par augmentation de la fluorescence bleue après photo-activation lorsque la sonde est libre dans le cytosol, il sera beaucoup plus délicat de distinguer une protéine, ou un groupe de protéines marquées (quelques fluorophores activés) au sein du bruit de fond naturel de fluorescence de la cellule.

L'axe de recherche est donc double. Il convient d'une part d'améliorer l'efficacité de photo-libération du fluorophore à 2 photons et d'autre part de travailler sur le fluorophore afin de sortir de la zone d'auto-fluorescence des cellules, ou du moins s'écarter du maximum d'émission des composants cellulaires.

I. Groupement photolabile.

D'autres travaux au sein du laboratoire, menés par le Dr. S. Gug^[222] sur le développement de groupements photolabiles pour la libération de glutamate cagé en bi-photon, ont permis de mettre au point des composés présentant des sections efficaces d'action à 2 photons remarquables : le PMNB-Glu^{[134][135]} ($\delta_u = 3,13 \text{ GM à } 740 \text{ nm}$) et le BNSF-Glu^[135] ($\delta_u = 5 \text{ GM à } 800 \text{ nm}$).

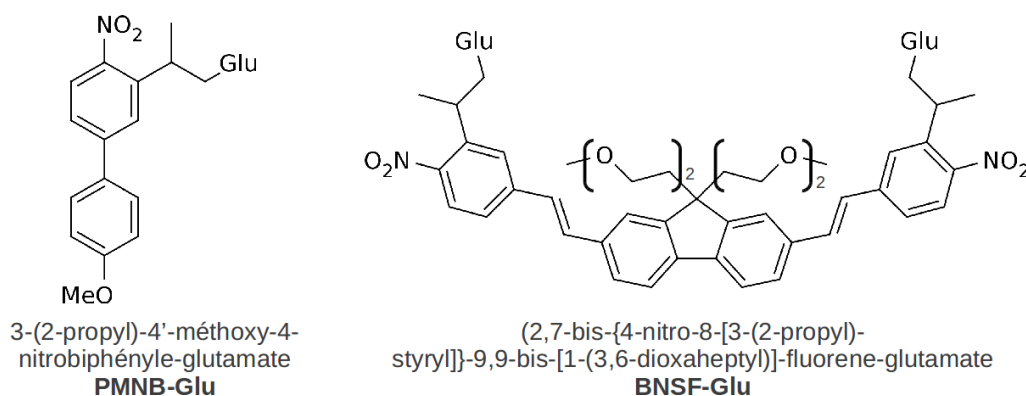


Figure II.3 : Structure des groupements PMNB-Glu et BNSF-Glu.

Le BNSF est attrayant sur deux points. Premièrement, une irradiation à 800 nm est intéressante, comparativement à une irradiation à 740 nm, au niveau de la stabilité du laser bi-photon utilisé en imagerie, moins importante sous les 780 nm.

Et deuxièmement, sa section efficace plus élevée est un atout en soi, permettant d'avoir une réponse plus importante à l'irradiation.

Mais ce groupement présente également deux inconvénients, dont un rédhibitoire. Il permet en effet de cager deux groupes partants, ce qui dans notre problématique reviendrait à cager deux fluorophores. Lorsqu'il s'agit simplement de libérer le fluorophore dans une cellule, cela ne pose aucun problème. Mais dans l'optique de développer une sonde réactive vis à vis d'une protéine cible, le groupement cagerait deux sondes réactives pouvant chacune lier une protéine. Le groupement BNSF pourrait ainsi agir comme un cross-linker, en couplant deux protéines. Un tel phénomène pourrait fausser les observations.

Le second inconvénient, en dépit de la présence de chaînes éthylène-oxy, est une faible solubilité aqueuse, remarquée lors de l'utilisation de ce groupement pour la photo-libération de glutamate. Or, les fluorophores sur lesquels nous travaillons sont des composés tricycliques aromatiques ou pseudo-aromatiques dont la solubilité aqueuse de leur forme protonée acide est très

limitée. L'association de deux unités fluorescentes au groupement BNSF risquerait de former un composé pratiquement insoluble dans l'eau et donc difficilement exploitable pour des études biologiques.

Nous avons donc décidé d'exploiter les propriétés du PMNB pour le développement de fluorophores photo-activables. Ce groupement présente toutefois une solubilité aqueuse limitée, bien que supérieure à celle du BNSF. Pour l'améliorer, un dérivé du PMNB, le PENB a été synthétisé, en remplaçant le groupement méthoxy par une chaîne oligoéthylène glycol. Les propriétés photo-physiques de ce dérivé sont similaires à celle du composé méthoxylé (communication personnelle du Dr. F. Bolze).

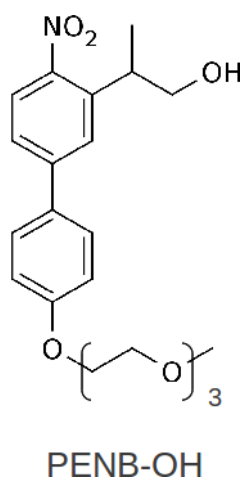


Figure II.4 : Structure du PENB-OH.

Enfin, ses longueurs d'ondes maximales plus faibles peuvent être tournées en avantage. A 740 nm, la transparence des tissus est bonne, ce qui n'affectera pas trop fortement la pénétration tissulaire des rayons par rapport à une irradiation à 800 nm. On peut par contre tirer un avantage important d'un décalage du spectre d'absorption vers les petites longueurs d'onde. En effet, un décalage du spectre 2 photons pourrait entraîner un décalage du spectre d'absorption à 1 photon.

Ainsi, en cherchant à élever les longueurs d'onde d'absorption et d'émission du fluorophore, tout en maintenant des longueurs d'onde d'absorption basses pour la cage, nous pouvons obtenir un décalage important des spectres, limitant ainsi leur recouvrement. Cela trouve son intérêt lors de la photo-activation de la fluorescence. En limitant l'absorption du composé cagé lors de l'excitation du fluorophore libre, nous limitons la libération artificielle de nouveaux fluorophores qui entraîneraient une hausse non désirée de la fluorescence (Figure II.5). De plus, comme la libération

envisagée se fera en bi-photon, une absorption dans l'UV du groupement protecteur ne limitera pas son utilisation.

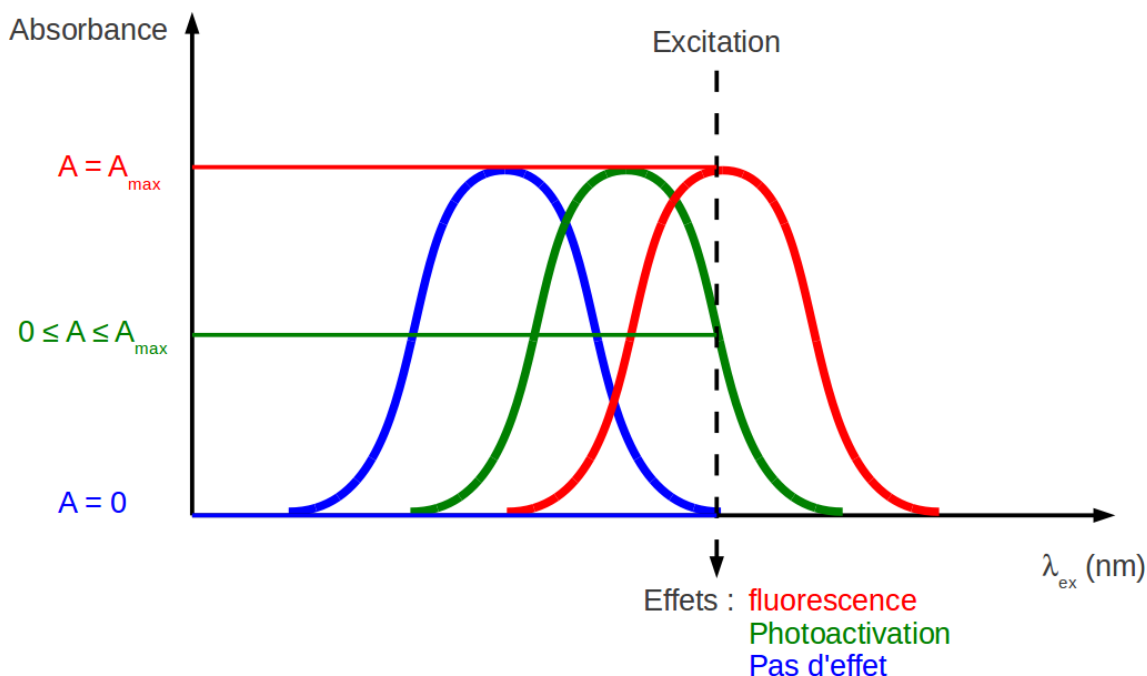


Figure II.5 : Superposition arbitraire de spectres d'absorption d'un fluorophore libre (rouge) et cagé avec deux cages différentes (verte et bleue).

Lorsque le fluorophore est excité à sa longueur d'onde maximale, les fluorophores cagés présents dans le même solution vont avoir des comportements différents.

La cage verte va également être excitée et donc conduire à la libération de fluorophore libre. La cage bleue n'absorbe pas de lumière, elle n'est pas excitée et ne peut donc pas libérer de fluorophore supplémentaire.

On remarque alors qu'un fort décalage entre les spectres d'absorption du fluorophore libre et du fluorophore cagé est nécessaire pour éviter toute libération non souhaitée de fluorophore lors de la visualisation de fluorescence.

Nous avons donc décidé d'utiliser un dérivé du groupement PMNB pour masquer les fluorophores. Ce groupement, le PENB se différencie du PMNB par la présence d'une chaîne oligo-éthylèneglycole à la place du groupement méthoxy afin d'améliorer sa solubilité aqueuse.

La synthèse de ce composé a été décrite par le Dr. S. Gug.^{[222][152]}

II. Les fluorophores.

La deuxième facette du développement des sondes fluorescentes photo-activables est de mettre au point un fluorophore dont la fluorescence peut être éteinte par un groupement photolabile, dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont compatibles tant avec l'observation de fluorescence sur cellules vivantes qu'avec le groupement protecteur envisagé et qui peut également être couplé à un motif de reconnaissance vis à vis d'une protéine.

II.1. Les 7-hydroxycoumarines.

Dans la continuité des travaux préalablement effectués au laboratoire, des modifications ont été apportées au squelette 7-hydroxycoumarines. Le bon rendement quantique de fluorescence observé est lié à la présence du groupement phénate. Ce groupement constituait une cible évidente pour cager la fluorescence. Ce fluorophore est relativement simple à synthétiser à l'échelle de plusieurs grammes selon deux stratégies de cyclisation principales, l'une impliquant une réaction de Knoevenagel (Figure II.7), l'autre reposant sur une condensation de Pechmann (Figure II.8). Ses positions 3, 4 et 6 sont également accessibles chimiquement et peuvent être substituées par divers groupements.

II.1.1 7-hydroxycoumarines fluorogéniques.

Une première stratégie envisagée a été suggérée par les travaux de Sivakumar *et al.* en 2004,^[223] présentant un dérivé 3-azidocoumarine non fluorescent. La fluorescence est activée par une réaction de cyclo-addition de Huisgen avec un dérivé alcyne aromatique.

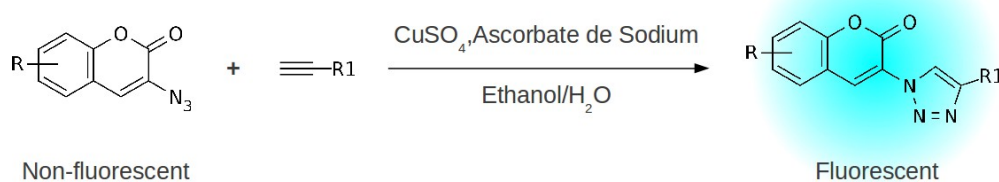


Figure II.6 : Activation de la fluorescence d'une coumarine fluorogénique par une réaction de cyclo-addition [3+2] de Huisgen. D'après Sivakumar *et al.*, 2004.^[223]

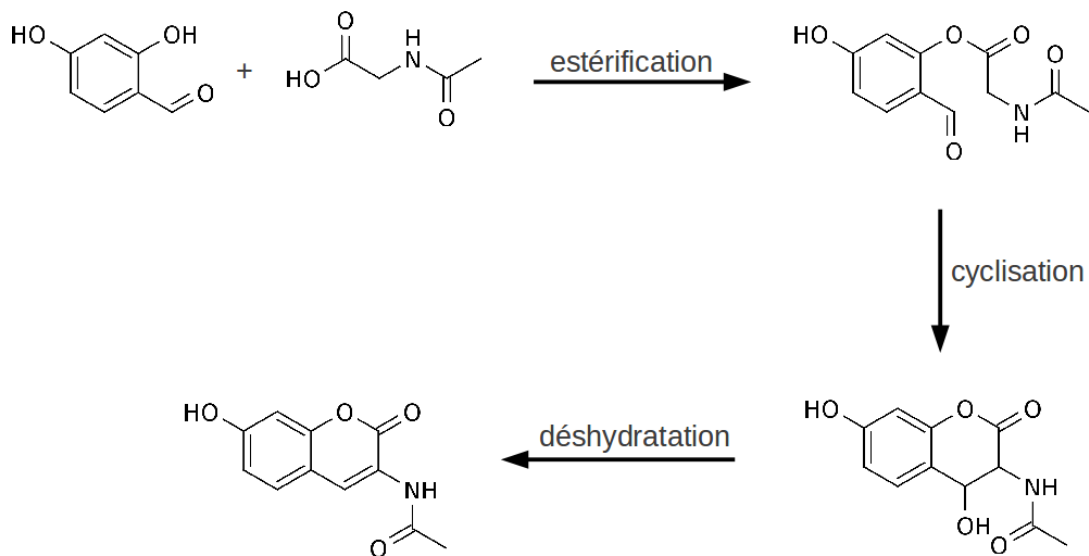


Figure II.7 : Synthèse de la 3-N-acétyl-7-hydroxycoumarine par réaction de Knoevenagel.

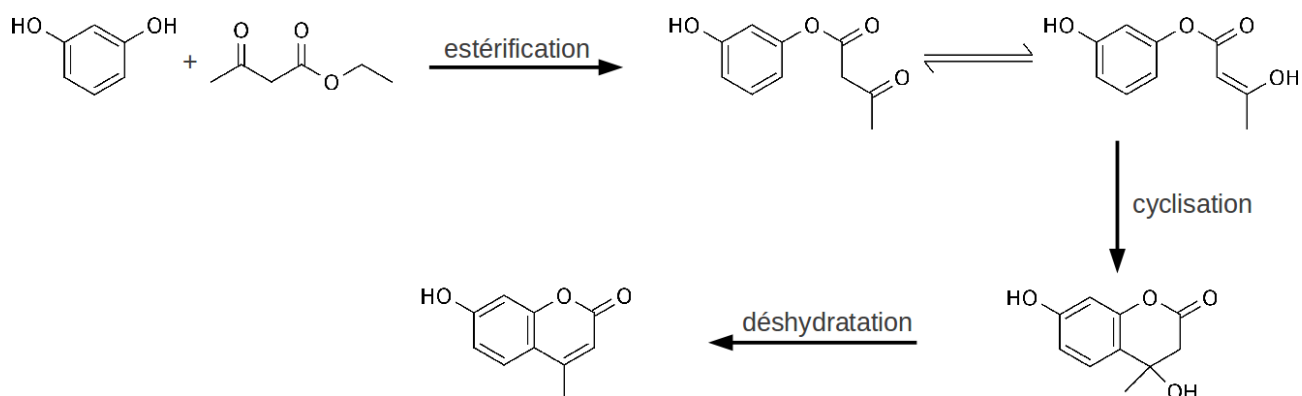


Figure II.8 : Formation de la 7-hydroxy-4-yl-méthylecoumarine par condensation de Pechmann.

Cette stratégie était séduisante sous deux aspects. L'activation de la fluorescence par formation d'un cycle triazole entraîne une élévation des longueurs d'onde d'émission de 80 à 90 nm par rapport à la 7-hydroxycoumarine simple (490-499 nm en présence du triazole contre 400-410 nm pour la coumarine seule). Le second aspect séduisant est que cette stratégie permettrait de faire d'une pierre deux coups. La formation du cycle triazole permet d'activer la fluorescence, mais peut également conditionner la liaison à une protéine d'intérêt comme cela a été décrit par Deiters *et al.*^[214] après incorporation d'une propargyle tyrosine dans une protéine.

II.1.1.a. Stratégie.

Nous avons décidé de coupler une azidochlorocoumarine à la O-propargyle tyrosine, pour former l'acide 2-amino-3-(4-{[1-(6-chloro-7-hydroxy-2-oxochromène-3-yl)-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}phényl)-propanoïque, afin de nous rapprocher des conditions utilisées par Deiters.^[214] La présence d'un atome de chlore en position 6 permet d'abaisser la pKa du phénol de la coumarine de 2 unités environ, passant de 8 pour la 7-hydroxycoumarine à 6,2 pour la 6-chloro-7-hydroxycoumarine.^[61] L'état de protonation du phénol joue un rôle capital dans le fluorescence de la coumarine, la forme protonée étant moins brillante que le forme déprotonée. Le pH physiologique étant d'environ 7, l'abaissement du pKa de 2 unités permet de passer d'un équilibre protoné/déprotoné de 9/1 (pKa 8) à 1/9 (pKa 6), ce qui entraîne une hausse de la brillance en milieu biologique tamponné non négligeable. La synthèse de la 3-azido-6-chloro-7-hydroxycoumarine a été envisagée à partir du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde et de la N-acétylglycine et le dérivé de la tyrosine par réaction du bromure de propargyle sur la tyrosine selon le schéma rétro-synthétique suivant :

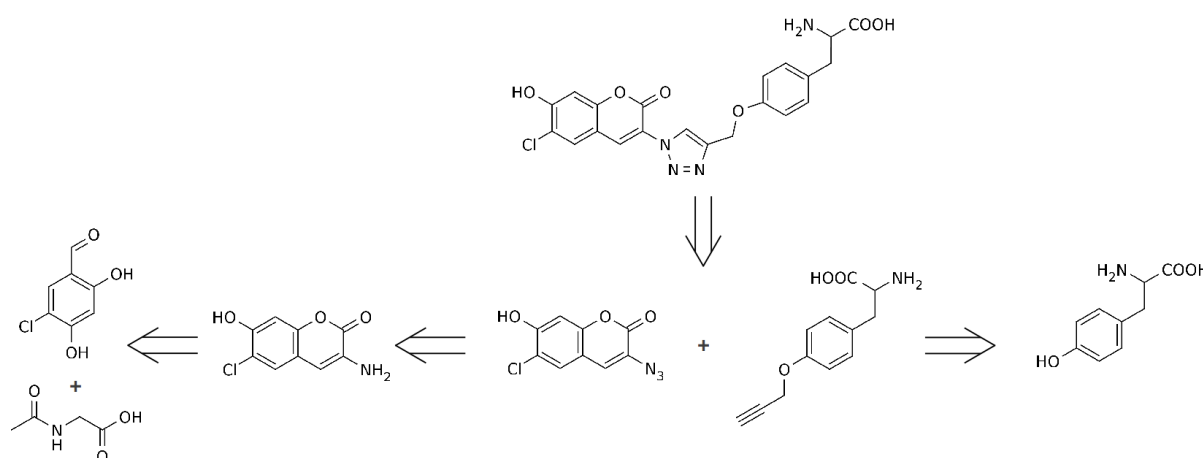


Figure II.9 : Rétro-synthèse prévue de l'acide 2-amino-3-(4-{[1-(6-chloro-7-hydroxy-2-oxochromène-3-yl)-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}phényl)propanoïque.

II.1.1.b. Synthèse.

La première étape de la synthèse a été d'obtenir le dérivé 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldéhyde à partir du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde commercial et de la N-chloropipéridine **1**. Le composé **2** a été obtenu en deux étapes.

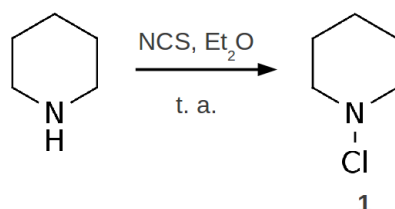


Figure II.10 : Synthèse de la N-chloropipéridine **1**.

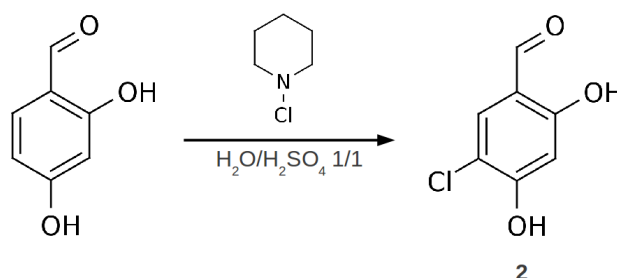


Figure II.11 : Synthèse du 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldéhyde **2**.

Le composé **2** ainsi obtenu a été engagé dans une réaction de Knoevenagel afin de former la 3-acétamido-7-acétoxy-6-chloro-coumarine **3**.

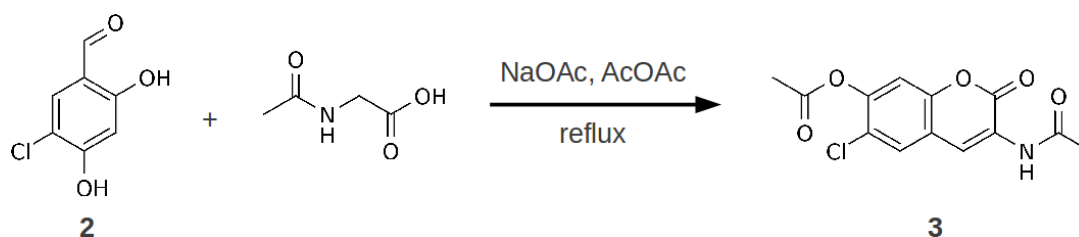


Figure II.12 : Synthèse de la 3-acétamido-7-acétoxy-6-chloro-coumarine **3**.

Le dérivé 3 azido-coumarine est enfin obtenu par une réaction de type Sandmeyer à partir du composé **3**, après hydrolyse préalable des fonctions acétate et amide. Le produit intermédiaire d'hydrolyse n'a pas été isolé et la diazotation a été effectuée sur le brut de réaction. Un aliquot est

recupéré pour analyse RMN, afin de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse.

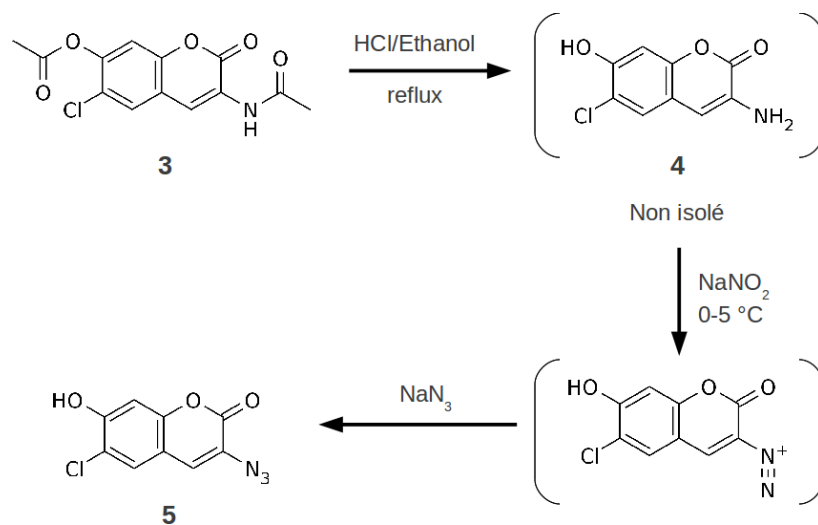


Figure II.13 : Synthèse de la 3-azido-6-chloro-7-hydroxycoumarine 5.

Le composé 5 précipite dans le milieu réactionnel, il est donc récupéré par filtration. Ce composé est très peu soluble dans la plupart des solvants usuels, à l'exception de la DMF et du DMSO. Ces solvants ne sont pas adaptés aux techniques de purifications classiques et sont, de plus, délicats à éliminer. Le produit azoture a donc simplement été soigneusement rincé et utilisé tel quel dans les manipulations suivantes.

En parallèle à la synthèse de l'azido-coumarine, nous avons préparé le dérivé O-propargylé de la tyrosine, d'après la synthèse décrite par Deiters.^[214] Il a été obtenu en trois étapes à partir de la NHBoc tyrosine commerciale, d'abord formation de l'éther par la réaction du phénol de la tyrosine sur le bromure de propargyle en milieu basique par synthèse de Williamson, puis déprotection de l'amine en milieu acide et enfin saponification de l'ester propargylique formé lors de la première étape.

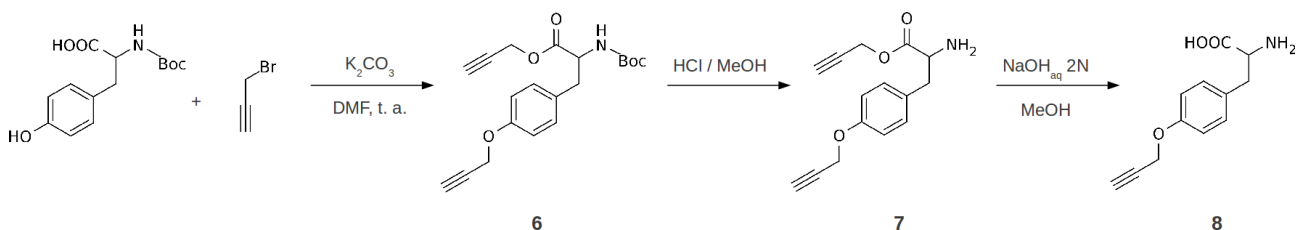


Figure II.14 : Synthèse de la O-propargyle tyrosine 8.

Le couplage des composés **5** et **8** en conditions "click" classiques, catalysé par le Cu(I), généré *in situ* par réduction du CuSO₄ par l'ascorbate de sodium, n'a pas démarré. Les produits de départ ne régissent pas entre eux. Dans les conditions décrites par Deiters, la O-propargyle tyrosine ayant réagi est insérée dans la protéine d'intérêt. Ses fonctions carboxylate et amine sont donc impliquées dans des liaisons amides et ainsi "masquées". Nous avons par conséquent décidé de relancer le couplage à partir des dérivés NHBoc de la O-propargyle tyrosine et de l'ester méthylique correspondant.

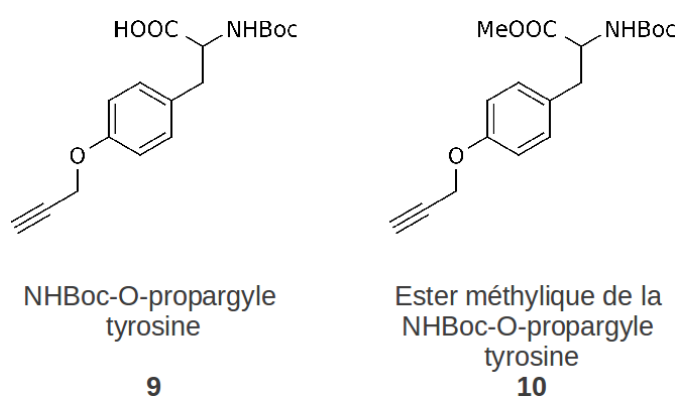


Figure II.15 : Dérivés protégés de la O-propargyle tyrosine.

Le composé **9** a été obtenu par saponification de l'intermédiaire **6**, sans hydrolyse préalable du groupement Boc. Le dérivé **10** a été synthétisé par réaction de Williamson entre le bromure de propargyle et l'ester méthylique de la NHBoc-tyrosine. Cette réaction a été effectuée dans des conditions identiques à la formation du composé **6**.

La cyclo-addition [3+2] de Huisgen a ensuite été effectuée entre la coumarine **5** et les dérivés **9** et **10** de la tyrosine. Les conditions de couplage ont été légèrement modifiées par rapport à la tentative précédente, les concentrations en cuivre et ascorbate de sodium ont été conservées mais du bisulfate de bathophénantroline, décrit pour augmenter la durée de vie le cuivre (I),^[224] a été ajouté au milieu. Le produit de couplage portant le cycle triazole a pu être obtenu à partir du composé **10**, avec un rendement de 50 %.

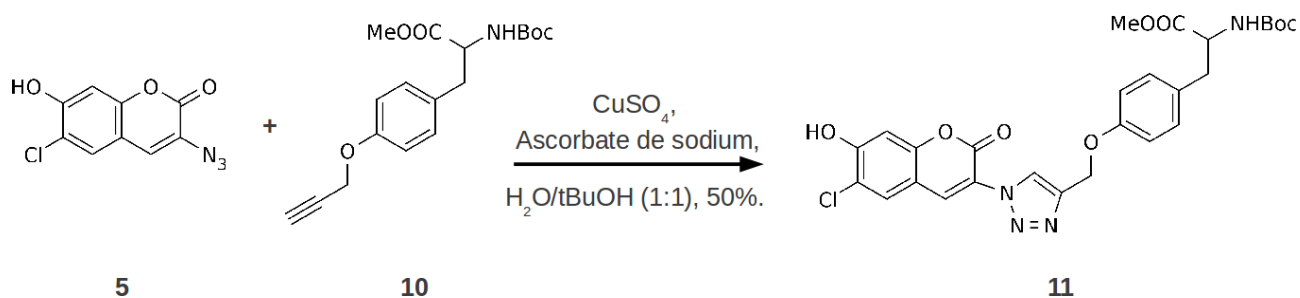


Figure II.16 : Couplage "click" entre les composés **5** et **10**.

II.1.1.c. Propriétés spectrales.

Les propriétés spectrales du composé **11** ont été établies. Il présente un maximum d'absorption à 397 nm, un ϵ correspondant de $16000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et une longueur maximale d'émission de 476 nm. Comme attendu, ce composé présente une hausse visible de la fluorescence après formation du cycle triazole. Toutefois, même si ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont plus longues que pour une coumarine classique, comme la 3-acide carboxylique-6-chloro-7-hydroxycoumarine (Figure II.2) présentant des $\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 446 \text{ nm}$, les $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 476 \text{ nm}$ observées sont loin des longueurs d'ondes espérées à la lecture de la publication de Sivakumar, qui sont environ 30 nm supérieures à celles observées. Cette différence peut être expliquée par leurs conditions de mesure, en plaque 96 puits et dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1/1. La coumarine possédant un moment dipolaire élevé, il se peut que la proportion élevée de DMSO, solvant très polaire (moment dipolaire du DMSO : 4,3 ; moment dipolaire de l'eau : 1,85), ait une influence sur la relaxation des états excités dus à un effet de solvant plus important.

II.1.1.d. Conclusion.

Le cycle triazole, bien que non conjugué avec la coumarine a permis d'en augmenter les λ_{ex} et λ_{em} . En augmentant la délocalisation, en liant le cycle par sa partie alcyne à la coumarine, il semble possible d'améliorer encore ses propriétés, comme illustré Figure II.17.

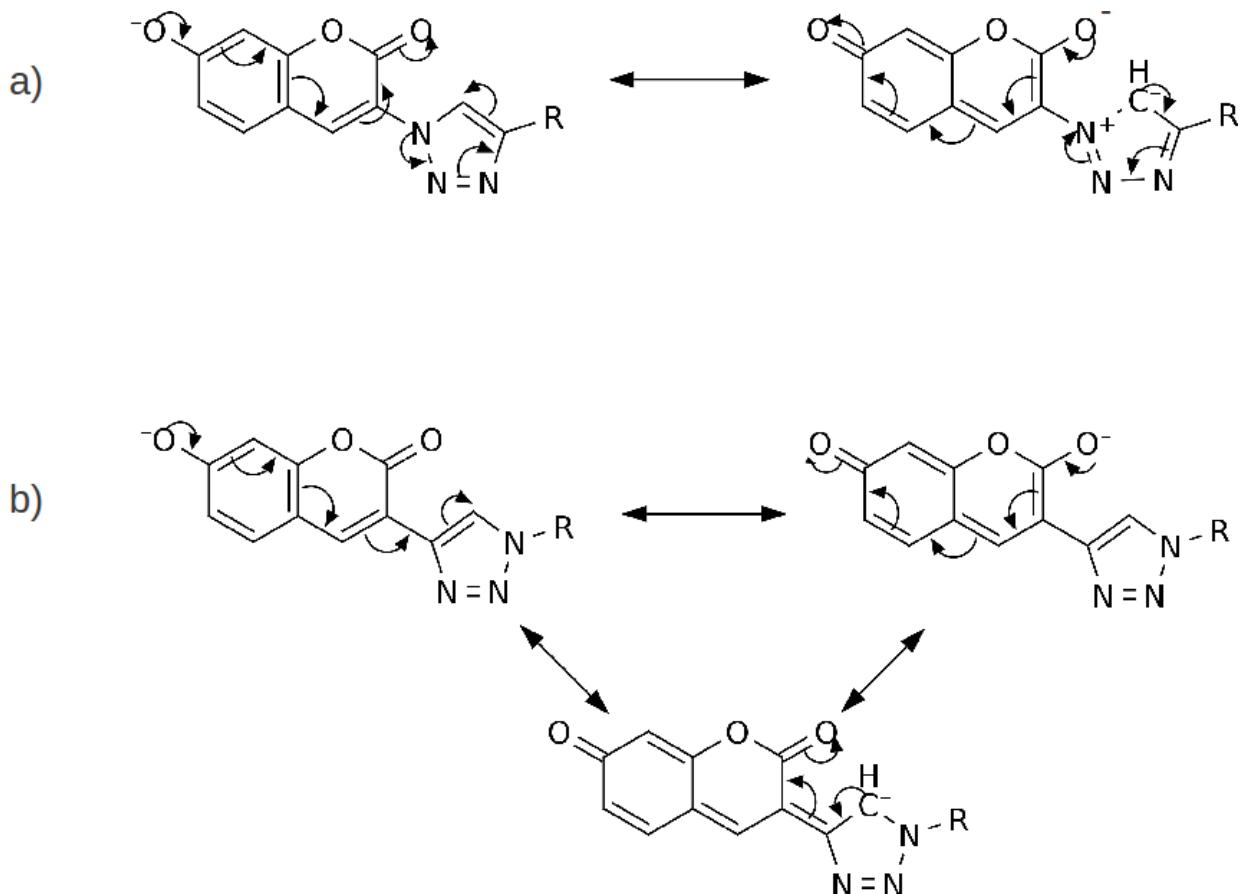


Figure II.17 : Augmentation de la délocalisation par inversion du cycle triazole.

a) La coumarine et le cycle triazole sont indépendants, il n'y a pas de délocalisation électronique entre les deux parties.

b) En inversant le cycle triazole, les deux parties ne sont plus indépendantes, une résonance étant possible entre la coumarine et le cycle. On peut donc envisager une amélioration des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du fluorophore.

II.1.2. Inversion du cycle triazole.

Afin d'obtenir le cycle triazole "inversé", il faut partir de la coumarine portant une fonction alcyne en position 3, la 3-éthynyl-(6-chloro)-7-hydroxycoumarine.

II.1.2.a. Synthèse par réaction de Corey-Fuchs.

La première stratégie envisagée s'appuie sur une synthèse dont une partie a déjà été réalisée au laboratoire. Elle consiste à introduire le groupement alcyne par réaction de Corey-Fuchs, dérivée de la réaction de Wittig, sur un aldéhyde obtenu par réduction d'un ester en position 3 de la coumarine. Cet ester est obtenu par méthylation de l'acide-3-carboxylique-coumarine correspondant, dont la synthèse est déjà connue au laboratoire.

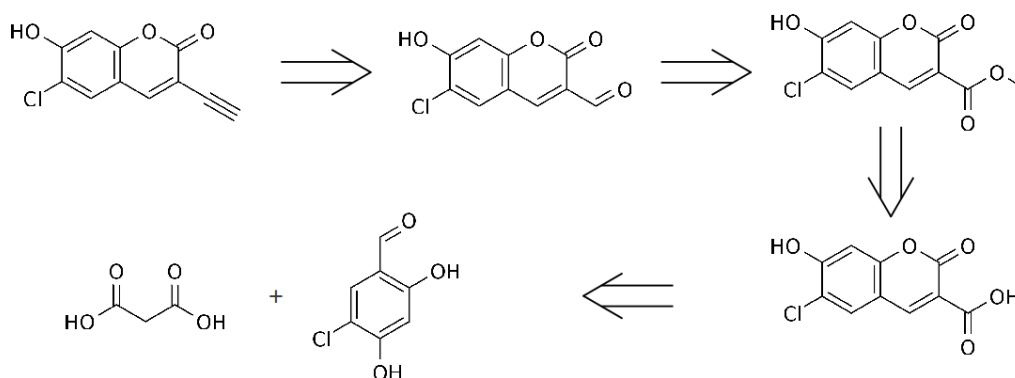


Figure II.18 : Schéma rétro-synthétique par réaction de Corey-Fuchs.

Cette stratégie est toutefois risquée pour la coumarine lors de l'étape de réduction de l'ester, car la fonction lactone peut également être réduite. Les coumarines montrent néanmoins une certaine stabilité vis à vis des conditions basiques douces à moyennes. Cette voie de synthèse nous a donc semblé envisageable.

La synthèse de l'ester méthylique de l'acide 3-carboxylique-6-chloro-7-hydroxycoumarine n'a pas posé de souci et le composé a pu être obtenu en quantités confortables.

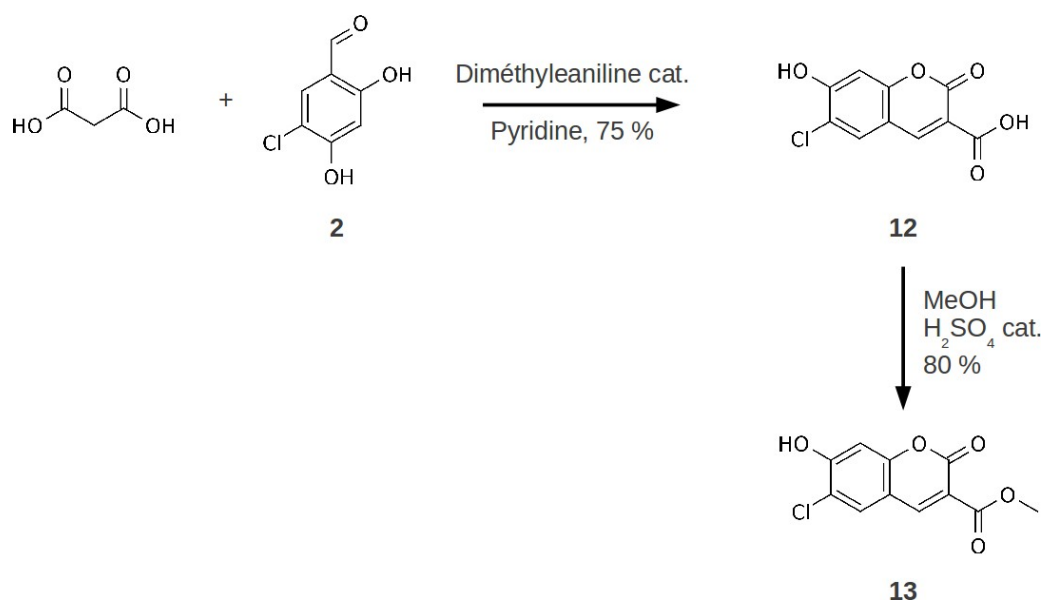


Figure II.19 : Synthèse de l'ester méthylique de l'acide 3-carboxylique-6-chloro-7-hydroxycoumarine.

La réduction de l'ester a été envisagée en utilisant le DIBALH comme générateur d'hydrure, utilisé à 1 équivalent pour réduire l'ester sans aller jusqu'à l'alcool correspondant. L'addition de l'hydrure sur le composé **13** a été faite à -78°C , pour limiter sa réactivité et maintenir la lactone intacte. La réaction n'a pas démarré à cette température, le mélange a été réchauffé progressivement, pour augmenter la réactivité des réactifs. En se réchauffant, la coumarine s'est dégradée, probablement par action de l'hydrure.

II.1.2.b. Synthèse par réaction de Sonogashira.

Une voie alternative de synthèse envisagée pour obtenir cette coumarine, menée en parallèle, est une réaction de Sonogashira entre le triméthylesilyl-acétylène et une 3-halogéno-coumarine, comme exposé Figure **II.20**. Comme des dérivés chlorés ont été utilisés à travers des réactions de Sonogashira, la chloration en position 6 sera supprimée, afin de ne pas interférer avec le couplage en position 3 attendu.

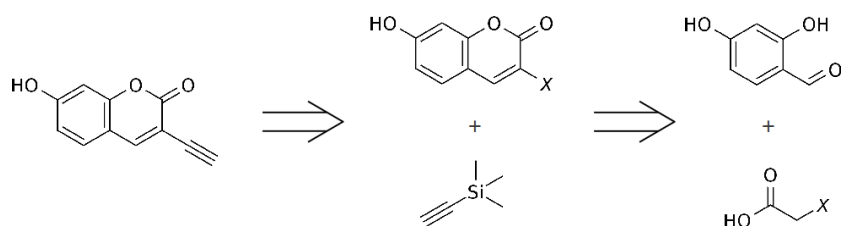


Figure II.20 : Schéma rétro-synthétique à partir d'acide 2-halogéno-acétique.

$X = I, Br \text{ ou } Cl.$

Les hydrogènes en position 2 de ces composés ne semblent toutefois pas être suffisamment acides pour initier la réaction de Knoevenagel en conditions classiques (anhydride acétique/ acétate de sodium). La réaction effectuée en utilisant la pyridine comme solvant et la diméthyle aniline comme catalyseur n'a pas donné de meilleurs résultats, les réactifs de départ étant récupérés intacts.

Une halogénéation aromatique peut également être obtenue à partir d'une aniline par réaction de Sandmeyer. Le composé intermédiaire **4** de la synthèse de l'azidocoumarine (Figure II.13) est un candidat valable pour une telle réaction, l'insertion de l'azoture passant également par un intermédiaire diazonium. Nous avons toutefois utilisé l'équivalent non chloré du composé **4** pour les raisons évoquées précédemment.

Les composés non chlorés **14** et **15** ont été synthétisés dans les mêmes conditions réactionnelles que leurs équivalents chlorés, avec des rendements similaires.

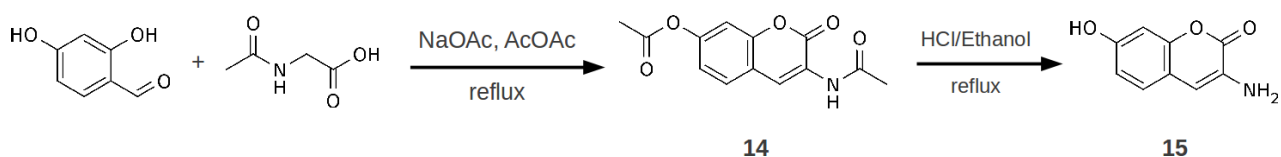


Figure II.21 : Synthèse de la 3-amino-7-hydroxycoumarine **15**.

Le composé **15** a ensuite été utilisé dans la réaction de Sandmeyer. Le dérivé bromé 3-bromo-7-hydroxycoumarine **16** a été obtenu avec un faible rendement, inférieur à 10 %.

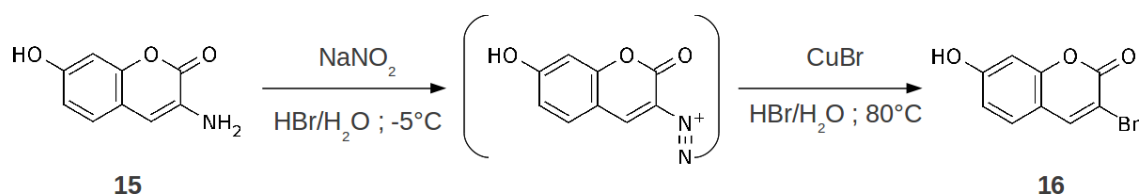


Figure II.22 : Synthèse de la 3-bromo-7-hydroxycoumarine **16** par réaction de Sandmeyer.

Une dernière voie de synthèse utilisée a permis d'obtenir le composé bromé **16** à l'échelle de plusieurs grammes. Il s'agit d'une bromation électrophile aromatique dans un liquide ionique, le bromure de tétra *n*-butyle ammonium fondu (TBAB), l'entité Br^+ étant fournie par la NBS. Cette synthèse a été décrite par Ganguly *et al.* en 2005.^[225] Bien que l'on n'ait pas atteint des rendements supérieurs à 30 % après purification, cette synthèse autorise de travailler sur des quantités de plusieurs grammes de réactifs, en particulier la 7-hydroxycoumarine, commerciale et peu onéreuse.

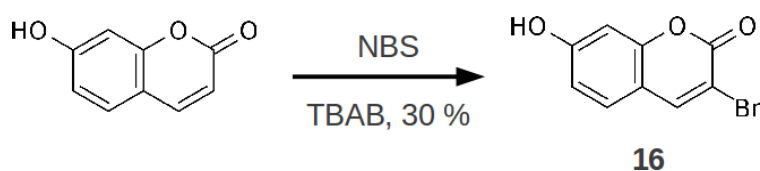


Figure II.23 : Bromation directe de la 7-hydroxycoumarine.

Une fois le composé **16** obtenu, nous avons effectué un couplage de Sonogashira en conditions "classiques" avec le triméthylesilyle acétylène. Les conditions "classiques" sont les conditions les plus couramment décrites pour cette réaction. Les catalyseurs utilisés sont le CuI pour l'activation de l'alcyne et le tétrakis triphénylphosphine palladium, formé in situ à partir de di(triphénylphosphine) dichloro palladium et de triphénylphosphine afin de limiter les risques d'oxydation spontanée du catalyseur. La réaction a été effectuée dans le 1,4-dioxane préalablement dégazé en présence de diisopropyle-éthyle amine. La réaction n'a pas abouti au produit attendu, le produit obtenu n'a pas été identifié.

L'efficacité des couplages catalysés par le palladium est souvent tributaire des conditions réactionnelles, présentant parfois un effet de "tout ou rien". Nous avons donc dans un premier temps utilisé d'autres conditions de solvant, remplaçant le dioxane par la diisopropyle-éthyle amine. Constatant l'absence d'évolution de la réaction dans ces conditions, nous avons décidé de changer complètement les conditions réactionnelles, en procédant dans un mélange d'acétonitrile et de

triéthyle amine en solvant et en utilisant directement du tétrakis(triphénylphosphine) palladium comme catalyseur. Le CuI a naturellement été maintenu. Ces conditions n'ont pas donné plus de satisfaction que les précédentes.

Cette réaction a toutefois été décrite sur des 3-bromocoumarines, avec des rendements intéressants.^[226] Mais ces dérivés ne portaient pas de fonction phénol en position 6. Il a donc été décidé de masquer le phénol de la 7-hydroxycoumarine. La méthode la plus simple est d'effectuer une estérification avec l'anhydride acétique. L'estérification du phénol est, en effet, une réaction secondaire de la cyclisation de l'aminocoumarine **15** (Figure II.21), qui se déroule également dans l'anhydride acétique. L'estérification a été catalysée par de la pyridine et l'acétate de 3-bromo-7-hydroxy-yl-coumarine **17** a été obtenu avec de bons rendements.

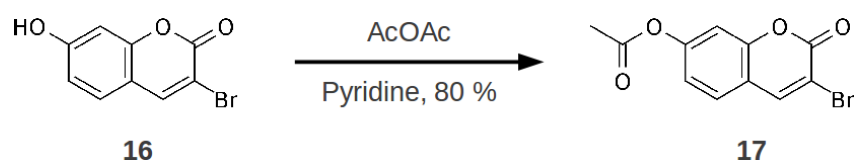


Figure II.24 : Synthèse de l'acétate de 3-bromo-7-hydrox-yl-coumarine **17**.

Le composé **17** obtenu, il a été investi dans une réaction de Sonogashira en conditions "classiques", décrites précédemment, à l'exception du tétrakis palladium qui est incorporé directement. La réaction, menée en solvants désoxygénés et sous argon, a conduit au produit attendu avec un rendement d'environ 30 %.

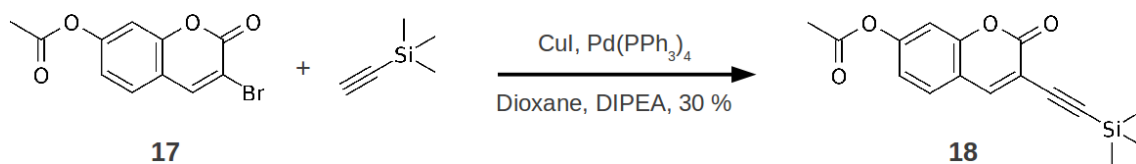


Figure II.25 : Synthèse du composé **18** par réaction de Sonogashira.

Le produit **18** a ensuite été traité par du fluorure de tétra *n*-butyle-ammonium (TBAF) afin de décrocher le groupement protecteur triméthyle silane et de générer l'alcyne terminal. Le brut de "déprotection" a été purifié sur colonne de silice. Le produit attendu était l'acétate de 3-éthynyle-7-hydroxy-yl-coumarine, mais le produit récupéré a été directement la 3-éthynyle-7-

hydroxycoumarine **19**, nous épargnant ainsi une étape de déprotection supplémentaire. Cette hydrolyse inattendue mais bienvenue est peut être due à la longueur de la colonne utilisée et au temps d'élution long en découlant. Le produit **19** est récupéré avec un faible rendement de 15 % environ, peut-être également dû au temps de purification, ayant induit une possible dégradation du composé.

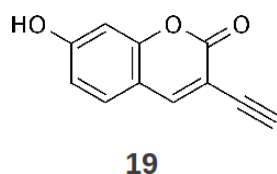


Figure II.26 : 3-éthynyle-7-hydroxycoumarine **19**.

Avant de nous investir plus en avant dans le développement d'un acide aminé portant une fonction azoture pour le couplage au fluorophore **19** ainsi obtenu, nous avons voulu nous assurer de la pertinence de la stratégie dans l'inversion du cycle triazole. Pour cela, nous avons synthétisé un composé azoture modèle, l'azoture de benzyle **20** à partir de bromure de benzyle puis nous avons effectué un couplage "click" dans les conditions décrites pour le composé **11**.

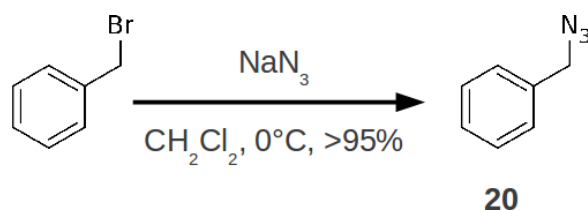


Figure II.27 : Synthèse de l'azoture de benzyle **20**.

La réaction n'a pas démarré. Il semblerait, d'après les discussions que j'ai pu avoir avec d'autres chimistes travaillant sur des réactions similaires, corroborées par le faible nombre de résultats publiés, que les couplages [3+2] de Huisgen avec un alcyne "rigide", c'est à dire sans degré de liberté, comme pour le composé **19**, où l'alcyne est directement lié au cycle, sont difficiles, voire très difficiles à obtenir. Il faudrait que le groupe éthynyle soit séparé du cycle par un carbone supplémentaire, mais dans ce cas, la conjugaison du cycle triazole et du fluorophore devient impossible.

Nous avons donc préféré nous concentrer sur une autre stratégie qui avait été initiée en parallèle

aux travaux sur le développement des coumarines click "inversées".

II.2. Les benzochromène-2-ones.

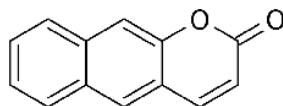


Figure II.28 : Benzo[g]chromène-2-one

L'idée du développement de sondes chromène-2-ones a été inspirée par les fluorophores de la série naphtoxanthènes.^[20] En effet, par ajout d'un cycle benzène sur le cœur xanthène initial du fluorophore, les longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence ont été décalées vers le rouge de manière importante (595 nm et 660 nm pour la naphthofluorescéine, contre 490 nm et 514 nm pour la fluorescéine).

En ajoutant, de manière analogue, un cycle benzène aux coumarines, il semblait envisageable d'induire un déplacement bathochrome des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission par une délocalisation électronique supplémentaire.

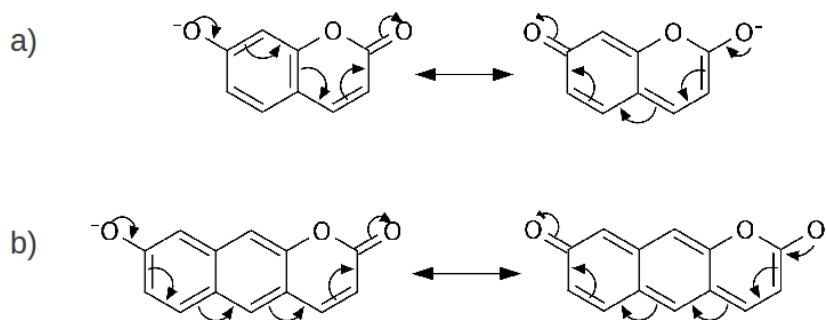


Figure II.29 : Élongation de la délocalisation électronique du fluorophore par ajout d'un cycle benzène.

a) Délocalisation électronique de la 7-hydroxycoumarine.

b) Délocalisation électronique de la 8-hydroxybenzo[g]chromène-2-one.

Enfin, la synthèse de la 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one **21** ayant été décrite par Tao *et al.* en 1997,^[227] il était aisé de la reproduire et de tester les propriétés du fluorophore.

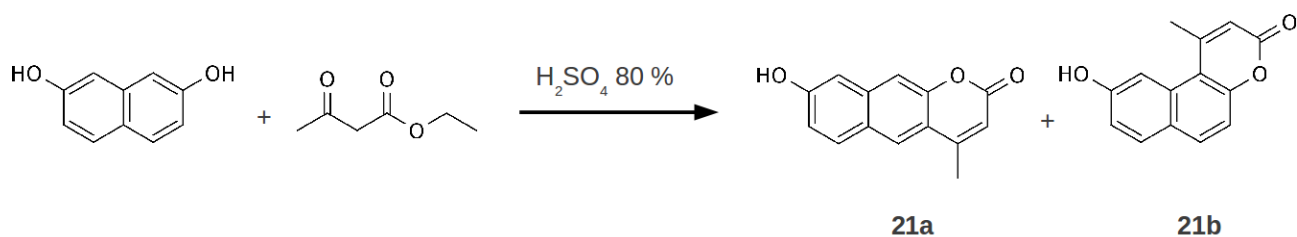


Figure II.30 : Synthèse des isomères 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one **21a** et la 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[f]-2-one **21b**.

II.2.1. 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one (21a).

La 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one **21a** a été obtenue en une étape par une réaction de Pechmann entre le 2,7-dihydroxynaphtalène et l'acétoacétate d'éthyle. Cette réaction aboutit à deux produits, la 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one **21a** et la 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[f]chromène-2-one **21b**, isomères de cyclisation.

Les deux isomères sont séparés par recristallisation dans l'acide acétique et par précipitation fractionnée. Le composé **21a** précipite dans les 5 heures suivant la recristallisation, le composé **21b** précipitant après une nuit à 4°C.

II.2.1.a. Propriétés.

Seul le produit **21a** est analysé par la suite car il est donné comme ayant une λ_{em} supérieure au composé **21b** (477 nm au lieu de 456 nm dans l'éthanol) ainsi qu'un ϵ légèrement supérieur (11455 M⁻¹.cm⁻¹ contre 7670 M⁻¹.cm⁻¹ à 357 nm dans l'éthanol).

Après purification, les propriétés spectrales du composé **21a** ont été évaluées dans du tampon PBS, pH7,4. Nous attendions des longueurs d'onde d'excitation basses, aux alentours de 350 nm, comparables à celles obtenues dans l'éthanol, car peu modulées par l'effet de solvant. Le composé **21a** présente par contre un coefficient d'extinction molaire relativement faible ($\epsilon = 6000$ M⁻¹.cm⁻¹ à $\lambda_{ex} = 350$ nm dans le tampon phosphate pH7,4). En revanche, ce composé présente un très grand déplacement de Stokes en milieu aqueux, dû probablement à un fort effet de solvant, la variation des longueurs d'onde d'émission étant très marquée entre l'éthanol (477 nm) et l'eau (509 nm). Un tel déplacement de Stokes (159 nm) est intéressant pour des applications biologiques, car les composants cellulaires excités à 350 nm n'émettront que peu de fluorescence vers 510 nm. On aura donc théoriquement qu'un faible bruit de fond et la fluorescence émise par le fluorophore pourrait

être visualisée en dépit d'une faible brillance (liée à un faible coefficient d'extinction molaire).

Toutefois, une excitation à 350 nm est trop faible pour pouvoir être menée à long terme *in vivo*. Cela nous a encouragé à modifier le squelette du fluorophore **21a** pour décaler le maximum d'absorbance vers le rouge tout en maintenant le déplacement de Stokes, en nous inspirant des travaux de thèse du Dr. D. Puliti,^[61] effectués au laboratoire. Il a montré que le couplage d'un thiophène portant une fonction acide à une coumarine en position 3 permettait un décalage substantiel des longueurs d'onde d'excitation et d'émission vers le rouge.

II.2.2. Modification du squelette par bromation.

Le couplage avec le thiophène étant effectué par une réaction de Suzuki, la synthèse d'un dérivé bromé est une étape cruciale.

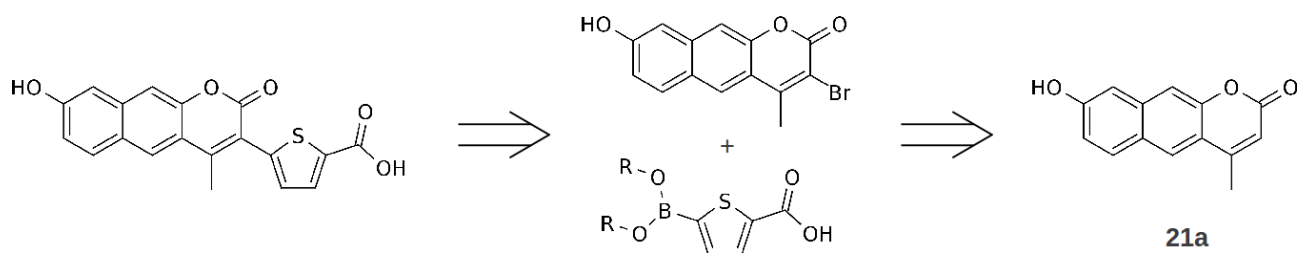


Figure II.31 : Rétro-synthèse envisagée du dérivé 3-thiophène du benzo[g]chromène-2-one.

La position de bromation sur laquelle nous nous sommes focalisés est la position 3. Cela permet d'obtenir la délocalisation électronique la plus importante après couplage au thiophène.

La stratégie de bromation a été calquée sur celle ayant montré la meilleure efficacité sur les coumarines. Nous avons donc fait réagir la NBS sur le composé **21a** dans le TBAB fondu. La réaction n'a pas conduit à la formation d'un produit exploitable.

Une deuxième voie de synthèse a donc été envisagée, par bromation de l'acétoacétate de départ. La position 2 étant relativement réactive, nous avons tenté de faire réagir directement le dibrome sur l'acétoacétate d'éthyle. L'ajout de brome sur l'acétoacétate a été fait à 0°C puis le mélange réactionnel a été ramené à température ambiante, mais la réaction n'a pas démarré.

L'acétoacétate d'éthyle a donc été activé par un équivalent de NaH dans le THF puis du dibrome, dilué dans du dichlorométhane a été ajouté. Nous avons obtenu le 2-bromo-acétoacétate

d'éthyle **22** de façon quantitative.

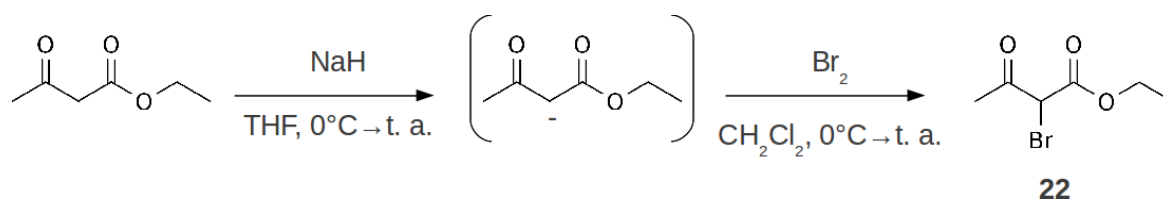


Figure II.32 : Synthèse du 2-bromo-acétoacétate d'éthyle **22**.

Une fois le produit **22** obtenu, nous avons poursuivi la synthèse du composé bromé par cyclisation à travers une réaction de Pechmann, dans les conditions utilisées précédemment, dans du H₂SO₄ à 80%. Le 2-bromo-acétoacétate d'éthyle ou le produit de cyclisation semblent être fragiles. Nous avons en effet récupéré une poudre noire en fin de réaction, ne donnant aucun signal en RMN du proton, ressemblant à du "charbon" issu de la dégradation probable des réactifs de départ.

L'utilisation d'un acide de Brønsted crée des conditions dures. La réaction de Pechmann peut toutefois être catalysée par des acides de Lewis, tels que l'AlCl₃ ou le BiCl₃, permettant de mener la cyclisation dans des conditions relativement douces. La cyclisation a donc été menée d'abord avec le trichlorure d'aluminium dans le dichlorométhane, à température ambiante. La réaction n'a pas démarré. En utilisant un autre solvant hydrophobe le 1,2-dichloroéthane avec le BiCl₃, plus réactif que l'AlCl₃, la cyclisation n'a pas donné de meilleur résultat. Un séchage poussé du 1,2-dichloroéthane par distillation puis séchage sur tamis moléculaire a permis d'obtenir un produit fluorescent, émettant à 529 nm par spectrofluorimétrie du brut de réaction, mais en quantité trop faible pour être analysé.

Les difficultés estimées des synthèses restant à effectuer pour obtenir le fluorophore attendu, ainsi que les propriétés spectrales très moyennes du 8-hydroxy-4-méthyle-benzo[g]chromène-2-one **21a** nous ont incité à limiter nos efforts portés sur cette série. Cette décision a été confortée par la diminution de l' ϵ rencontrée sur les coumarines par le Dr. D. Puliti lors du couplage avec le thiophène. Ceci risquait de conférer une absorbance faible à médiocre au fluorophore envisagé.

Nous avons, de plus, de nouvelles opportunités qui s'ouvraient grâce à un nouveau fluorophore, dont certaines propriétés nous ont semblé très prometteuses.

II.3. L'acridinone.

Les sondes fluorogéniques, utilisées comme marqueurs d'activité enzymatique, comme des β -galactosidases ou des pénicillines G acylases, sont des pistes de recherche intéressantes pour le développement de fluorophores photo-activables. En effet, l'extinction de fluorescence par alkylation d'une fonction clé est commune à ces deux concepts. La différence réside dans la réactivation de la fluorescence, induite par le déplacement d'un substrat enzymatique, dans le cas des sondes d'activité enzymatique, ou par le clivage d'un groupement photolabile dans le cas de sondes photo-activables. Les fluorophores utilisés peuvent donc être communs pour ces deux techniques.

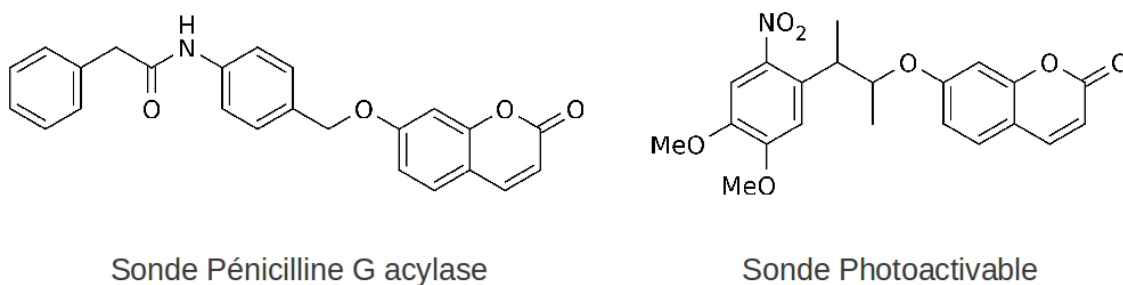


Figure II.33 : Sondes coumarines pénicilline G acylase et photo-activables.

Le même fluorophore est utilisé pour ces deux applications, sur une stratégie d'extinction de fluorescence semblable.

Deux fluorophores dérivés de l'acridinone ont attiré notre attention, le 7-hydroxy-9,9-diméthyleacridin-2-one (DAO) et le 6,8(1,3)-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthylacridin-2-one (DDAO). Ces fluorophores ont été peu décrit dans la littérature mais ont fait l'objet d'investigations comme sonde d'activité β -galactosidase,^[97] ou pénicilline G acylase.^[98]

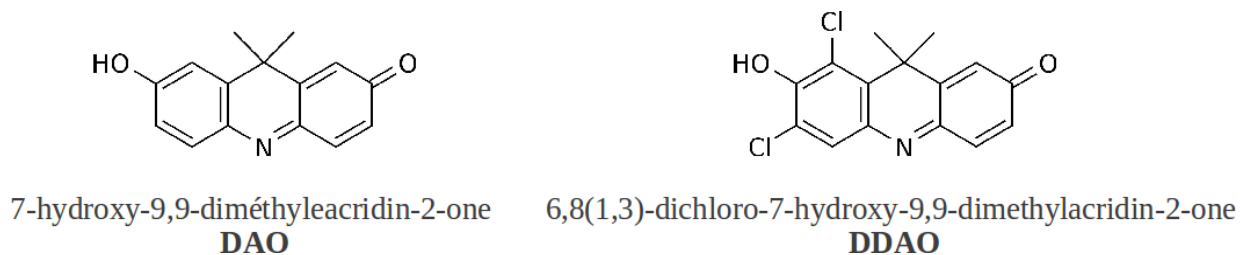


Figure II.34 : Structure des fluorophores DAO et DDAO.

Ces fluorophores présentent une fluorescence rouge ($\lambda_{\text{ex}} > 630 \text{ nm}$, 634-638 nm pour le DAO et 636 à 646 nm pour le DDAO qui semble montrer une variabilité plus importante selon les conditions de solvant, probablement due à son asymétrie ; $\lambda_{\text{em}} = 651 \text{ nm}$ pour le deux fluorophores dans le PBS). Leur principale limite semble découler de leur faible brillance ($\epsilon \approx 24500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\phi_{\text{fl}} \approx 0,08$; d'où une brillance d'environ $2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 633 nm pour le DAO). La fluorescence semblant sensible à l'action des thiols naturellement présents dans les cellules, nous avons décidé d'explorer les propriétés du DDAO dans un premier temps. Deux points importants seront à contrôler au cours de ces investigations : la stabilité du DDAO vis à vis des thiols et la stabilité du DDAO alkylé, qui a montré une grande sensibilité à l'hydrolyse lors de l'utilisation des sondes rapportant l'activité de pénicilline G acylases.^[98]

II.3.1. Synthèse.

La synthèse du fluorophore suivie a été adaptée de celle décrite par Corey *et al.* en 1991.^[97]

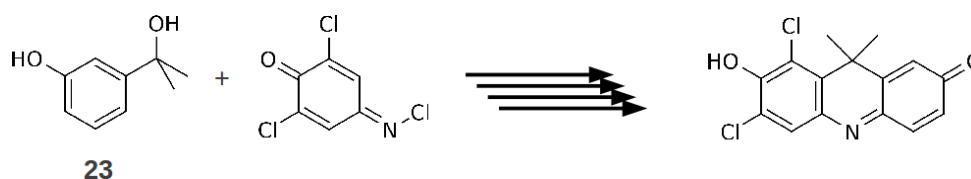


Figure II.35 : Synthèse proposée par Corey *et al.* en 1991.^[97]

La première difficulté rencontrée a été la préparation d'un réactif de départ, le 3-(2-hydroxypropan-2-yl)phénol **23**. La préparation de ce composé est effectuée par action du bromure de méthyle magnésium sur le 3'-hydroxyacétophénone commercial à travers une réaction de Grignard. L'addition du réactif organo-métallique, à froid, sur la cétone préalablement dissoute dans le diéthyle éther sont les conditions de réaction habituelles lors de l'utilisation de magnésien.

Le problème rencontré est la présence d'un phénol sur l'acétophénone, dont l'acidité consomme instantanément un équivalent de magnésien pour former le phénate. Une fois formé, le phénate précipite et forme une pâte épaisse empêchant toute agitation magnétique. Comme nous ne disposons pas d'un agitateur mécanique fonctionnel, et que nous souhaitons également éviter deux étapes supplémentaires de protection et déprotection du phénol, il a fallu adapter les conditions réactionnelles.

La première adaptation a été d'utiliser le THF en remplacement du diéyle éther. Ce solvant présente une polarité supérieure, ce qui permettrait de solubiliser plus facilement le phénate formé en début de réaction. Afin de favoriser au maximum la solubilisation du phénate, nous avons utilisé une dilution plus importante que pour les conditions habituelles. L'ajout de l'acétophénone sur le magnésien dans ces conditions à 0°C s'est également soldée par la formation d'un précipité. Après plusieurs d'agitation, nous avons récupéré l'intégralité de l'acétophénone de départ.

La formation d'un précipité bloquant la réaction, la clé du succès semble se situer dans la mise au point de techniques permettant de limiter cette précipitation. Une stratégie envisagée est d'inverser l'ordre d'ajout des réactifs. L'acétophénone dissoute dans du THF sera ajoutée au goutte à goutte à une solution de bromure de méthyle magnésium diluée dans un grand volume de THF. Ainsi, une très faible quantité de phénate sera formée en début de réaction et sera en présence d'un très large excès de magnésien. La réaction de Grignard devrait ainsi être favorisée. Toutefois, l'ajout dans ces nouvelles conditions, à 0°C, ne conduit pas à la formation du produit attendu, seul l'acétophénone de départ est récupéré. Ce composé semble avoir une réactivité limitée. En effectuant l'ajout à température ambiante, la vitesse de réaction devrait être accélérée et l'addition du magnésien pourrait avoir lieu avant précipitation du phénate.

L'ajout au goutte à goutte lent, à température ambiante, du 3'-hydroxyacétophénone sur une solution diluée de bromure de méthylemagnésium conduit à la formation du produit attendu **23** avec un rendement important de 85 %.

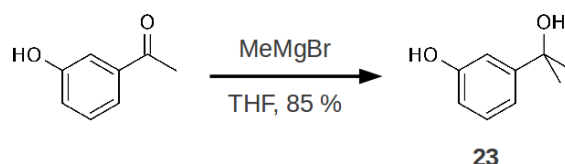


Figure II.36 : Synthèse du composé **23**.

La suite de la formation du fluorophore se fait selon les conditions décrites par Corey (Figure II.37), par réaction du composé **23** sur la 2,6-dichloroquinone-4-chloroimine, ou réactif de Gibbs, à l'exception des étapes de réduction par le Na₂S₂O₄ et d'oxydation par le NaIO₄, qui sont effectuées par agitation magnétique dans un erlenmeyer et non dans l'ampoule à décanter comme cela a été décrit. Le fluorophore a été formé avec un rendement global de 40 % environ.

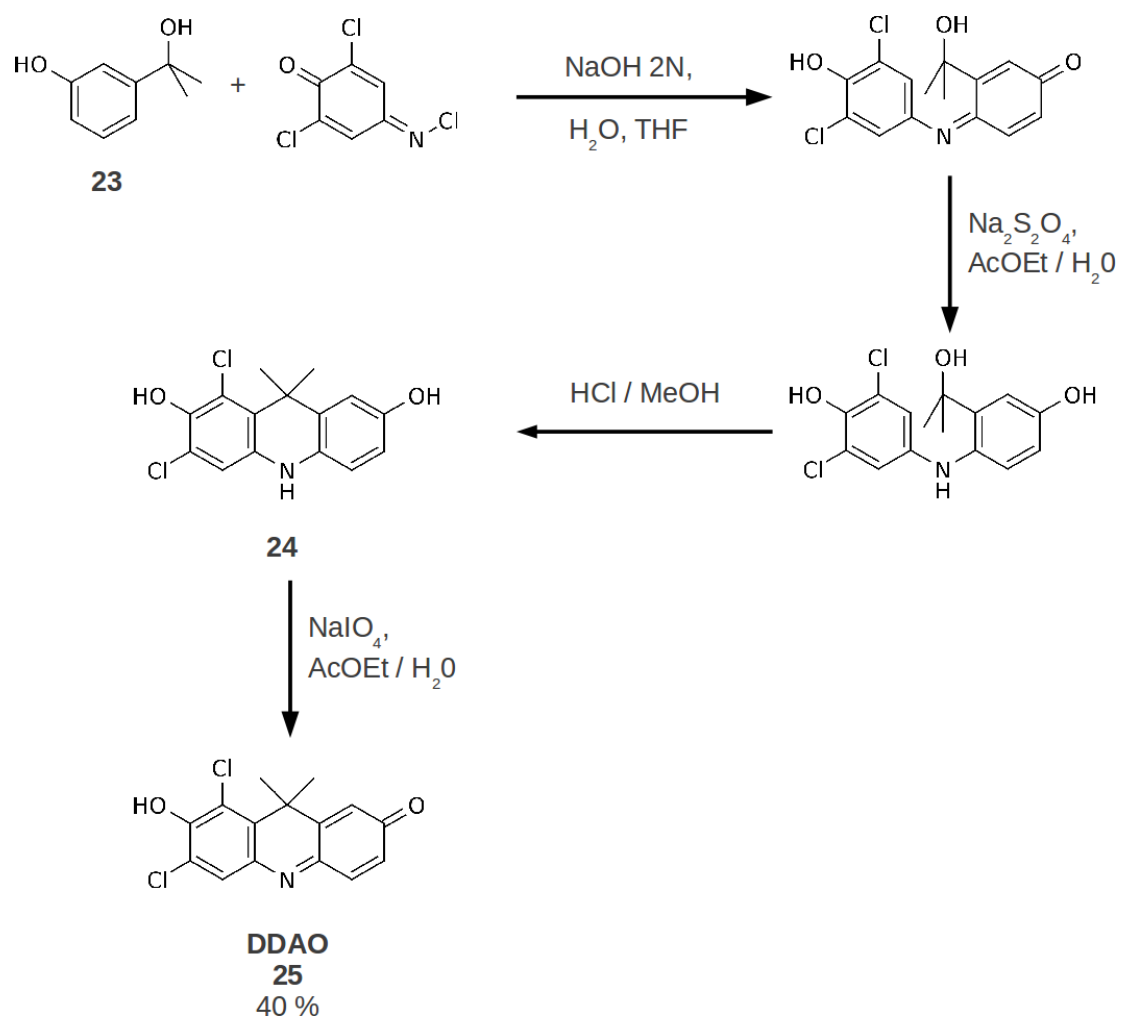


Figure II.37 : Synthèse du DDAO 25.

II.3.2. Propriétés spectrales.

Les propriétés d'absorbance et de fluorescence ont ensuite été analysées. Les caractérisations ont été effectuées dans le PBS, pH7,4. Le DDAO 25 présente un maximum d'absorption à 645 nm, pour un ϵ de $34000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Son rendement quantique de fluorescence est de 0,1, déterminé par rapport à la Rhodamine B,^[228] avec un maximum d'émission à 658 nm. Ces résultats sont en adéquation avec ceux préalablement reportés dans la littérature. Une donnée intéressante qui nous a conforté dans le choix de ce composé pour le développement d'un fluorophore photo-activable est la grande différence de longueurs d'ondes d'absorption du DDAO sous sa forme phénate à pH neutre ($\lambda_{\text{ex}} = 645 \text{ nm}$) et sous sa forme protonée à pH acide ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$). Le spectre d'absorption du composé sous sa forme protonée donne une idée partielle du spectre du composé alkylé, sans tenir compte d'un éventuel recouvrement des spectres du fluorophore et du groupement photo-labile. Ce fort déplacement permet de différencier sans ambiguïté le fluorophore libre du fluorophore cagé.

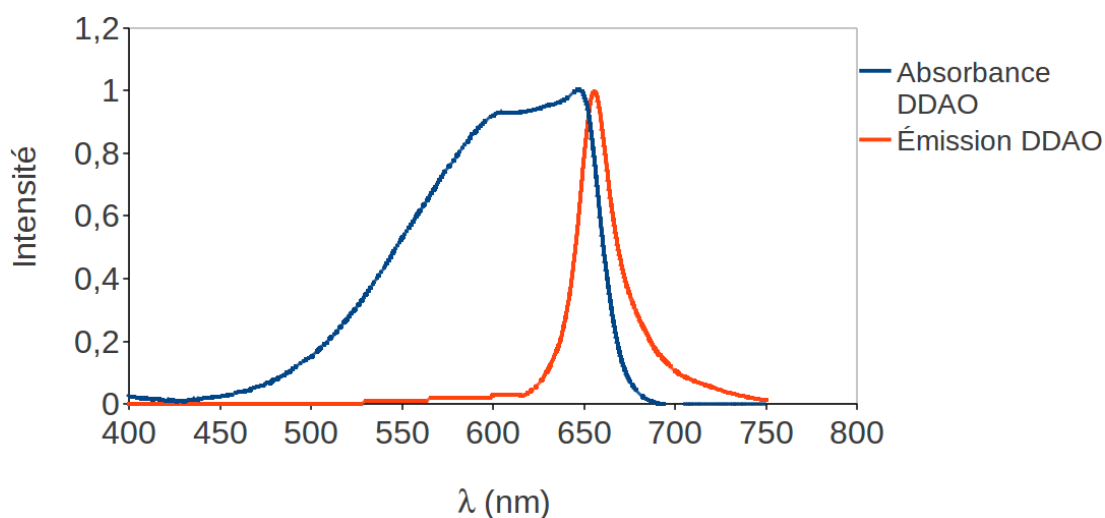


Figure II.38 : Spectre d'absorption et d'émission du DDAO 25 libre dans le PBS, pH7,4.

Les spectres d'absorption et d'émission ont été normalisés, leur maximum a été rapporté à 1, ils ne représentent donc pas les intensités réelles.

Une autre caractéristique intéressante qui est remarquable est la présence d'un plateau entre 600 et 650 nm. Cette propriété permet d'exciter le fluorophore sur une large plage de longueur d'ondes, en ayant une réponse en fluorescence quasiment constante sur cette plage d'excitation. Le spectre d'excitation du DDAO a confirmé la constance de l'émission de fluorescence à 658 nm suite à une irradiation entre 600 et 650 nm.

II.3.3. Détermination du pKa.

Le pKa du DDAO a été déterminé par comparaison des absorbances normalisées du fluorophore à 490 et 645 nm en fonction d'une gamme croissante de pH (3 à 6,7). Les deux courbes normalisées se croisent à la moitié de leur intensité maximale. Cela correspond au fluorophore réparti également entre sa forme protonée et déprotonée. Le pH reporté à l'intersection des courbes d'absorbance nous a donné le pKa du DDAO, qui est de 5. Cela signifie qu'à pH physiologique de 7,4-7,6, plus de 99 % des molécules de DDAO sont sous leur forme déprotonée fluorescente.

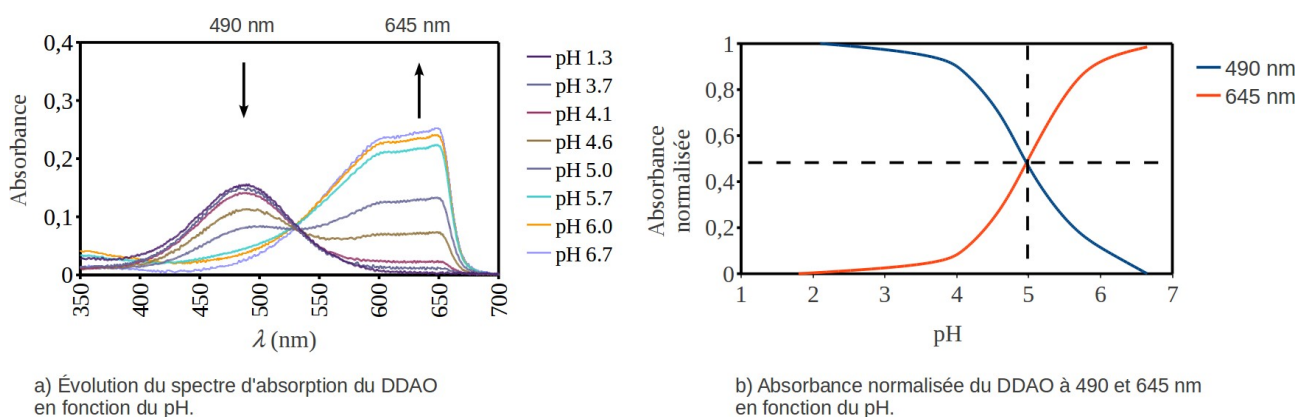


Figure II.39 : Détermination du pKa du DDAO par variation de l'absorbance de ses formes protonée ($\lambda_{ex} = 490$ nm) et déprotonée ($\lambda_{ex} = 645$ nm).

II.3.4. Photo-blanchiment.

Un point qui nous a paru important de vérifier avant toute éventuelle utilisation du fluorophore est sa résistance au photo-blanchiment, notamment avant les essais de sensibilité vis à vis des thiols. En effet, si la fluorescence se dégrade lors de l'excitation du fluorophore, il sera difficile d'évaluer la sensibilité du fluorophore à divers facteurs extérieurs par simple analyse de la variation de la fluorescence. De plus, cela limiterait fortement l'intérêt du fluorophore en imagerie time-lapse.

Le blanchiment a été évalué par rapport à la fluorescéine et à la rhodamine, par excitation continue pendant deux heures sur le spectrofluorimètre. L'irradiation a été effectuée à des longueurs d'onde communes d'une part à la fluorescéine et au DDAO et d'autre part à la rhodamine et au DDAO. L'émission de fluorescence a été mesurée à intervalles réguliers. La fluorescéine a montré

une dégradation d'environ 20 % sur les deux heures d'irradiation, la rhodamine et le DDAO n'ont pas montré de variation notable de leur fluorescence (2-4 % sur 2 heures). La variation de la fluorescence du DDAO par rapport à la fluorescéine n'est pas exploitable, de par son ϵ presque nul à cette longueur d'onde. Cette mesure a essentiellement permis de montrer qu'une irradiation continue au spectrofluorimètre peut induire un blanchiment de fluorophore. Cette méthode de mesure ne permet pas de quantifier le blanchiment mais donne une idée globale de la stabilité du fluorophore, par comparaison à des fluorophores de référence. Le DDAO semble donc relativement stable au blanchiment, dans nos conditions expérimentales.

II.3.5. Réactivité des thiols.

Nous avons ensuite déterminé la sensibilité du fluorophore aux thiols, par deux méthodes complémentaires.

II.3.5.a. *In vitro*.

La première vérification effectuée a été un contrôle direct, par réaction de DTT sur le DDAO en solution dans du tampon phosphate. Les tests ont été effectués en présence de 5 et de 100 équivalents de DTT. En présence de 5 équivalents de DTT, l'intensité de l'absorbance diminue très rapidement. Elle atteint son minimum en 10 minutes (50 % de l'absorbance initiale) puis retrouve progressivement sa fluorescence initiale. En présence de 100 équivalents, l'absorbance diminue également très rapidement pour atteindre environ 10% de l'intensité initiale au bout de 10 minutes. La fluorescence augmente ensuite très lentement après 10 minutes.

II.3.5.b. *In vivo*.

Le second test effectué a été de contrôler si la baisse d'absorbance constatée *in vitro* avait une influence sur la fluorescence émise *in vivo*. Le test a été effectué sur une culture de cellules HeLa. Afin de permettre au fluorophore, ionisé à plus de 99 % à pH7,4, de pénétrer dans les cellules, nous avons synthétisé les acétates d'acridinone, en laissant réagir le DDAO sur de l'anhydride acétique en présence de pyridine.

La présence d'un acétate permet de maintenir le fluorophore sous sa forme non ionisée lors de l'incubation et ainsi de lui permettre de passer la barrière membranaire. Dans la cellule, une hydrolyse enzymatique se fera instantanément et le fluorophore ionisé sera maintenu dans le

cytoplasme. Cela permet également d'estimer la pénétration cellulaire du fluorophore, en gardant à l'esprit qu'une fois couplé à un groupement photo-labile, cette propriété pourra être complètement modifiée.

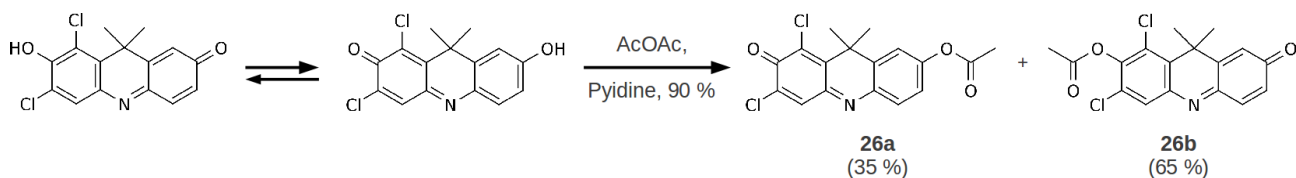


Figure II.40 : Synthèse des acétates d'acridinone **26a** et **26b**. Les chiffres entre parenthèses indiquent les proportions relatives des deux isomères caractérisés par RMN.

Ces composés montrent une sensibilité, attendue, à l'hydrolyse en milieu tamponné. Ils sont donc conservés en solution dans du DMSO anhydre, utilisé comme solution mère. Les dilutions dans le tampon se feront juste avant d'incuber les cellules, afin de limiter l'hydrolyse spontanée des acétates de DDAO.

Les observations en imagerie ont été effectuées en collaboration avec P. Kessler et le Dr. Y. Lutz à la plateforme d'imagerie de l'IGBMC.

Les cellules ont été incubées 15 minutes dans une solution d'acétate de DDAO à 30 μ M dans du PBS. Elles ont ensuite été lavées avec du milieu de culture sans rouge de phénol puis la fluorescence des cellules a été visualisée en microscopie de fluorescence en champ plein. La fluorescence intracellulaire est plus intense que celle du milieu extracellulaire, traduisant une concentration du fluorophore dans le cytosol. On constate toutefois un léger bruit de fond de fluorescence, dû à l'hydrolyse spontanée de l'acétate de DDAO dans le tampon ou à une sortie du fluorophore libre des cellules. La fluorescence observée est stable sur le temps d'observation, montrant une certaine stabilité du fluorophore.

Nous avons également contrôlé l'auto-fluorescence des cellules lors d'une excitation à 633 nm (Figure II.41a). Les cellules HeLa n'ont pas émis de fluorescence visible à ces longueurs d'onde, confirmant l'intérêt de fluorophores rouges en microscopie sur cellules vivantes.

La stabilité du fluorophore à l'irradiation et en milieu cellulaire, associée à ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission élevées permettant de s'affranchir de l'auto-fluorescence des cellules nous

ont encouragés à poursuivre nos travaux sur la photo-activation de ce fluorophore.

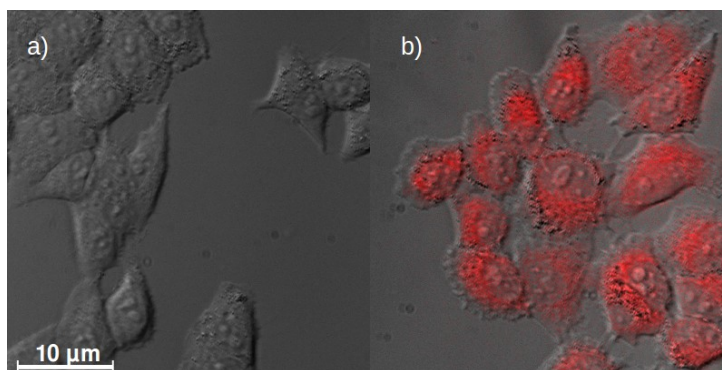


Figure II.41 : Fluorescence de cellules HeLa en microscopie en champ plein, incubation avec du PBS seul (a) ou avec une solution d'acétate de DDAO (b).

Superposition des images en lumière transmise et d'émission de fluorescence.

III. Fluorophore photo-activable.

L'extinction de la fluorescence du DDAO a été induite par l'alkylation d'une fonction phénol du cœur acridinone du fluorophore par le groupement PENB, qui nous a aimablement été mis à disposition par l'équipe de Biophotonique du Prof. J-F. Nicoud, UMR 7213 du CNRS.

III.1. Synthèse.

Le couplage entre le fluorophore et le PENB a été effectué par une réaction de Mitsunobu, puis purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir les deux isomères du PENB-DDAO.

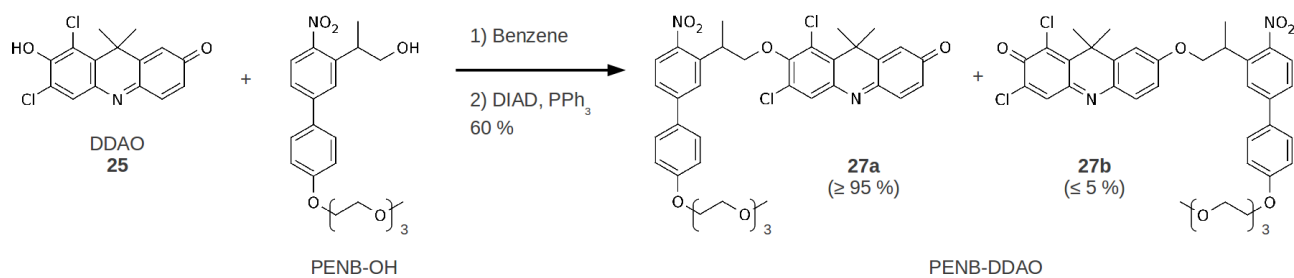


Figure II.42 : Synthèse du PENB-DDAO 27.

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux proportions relatives des deux produits.

Les deux isomères obtenus n'ont pas été séparés car la photolyse entraîne la libération du même fluorophore. Une solution de PENB-DDAO à $3,9 \cdot 10^{-3}$ M dans le DMSO a été préparée et a servi de solution-mère pour toutes les expérimentations suivantes.

Les propriétés physico-chimiques du PENB-DDAO ont été déterminées en vue de tests sur cellules, puis des expérimentations sur cellules HeLa ont été menées afin de valider la pertinence de ce composé en imagerie sur des systèmes vivants.

III.2. Propriétés physico-chimiques.

III.2.1. Longueurs d'onde.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence du PENB-DDAO ont été déterminées à une concentration de $1,6 \cdot 10^{-5}$ M dans un mélange équi-volumique d'acétonitrile et de tampon PBS. L'utilisation d'un tel mélange de solvants a été nécessaire pour obtenir une solubilité suffisante du composé. Le PENB-DDAO a en effet tendance à précipiter en milieu aqueux. Ce phénomène perturbe les acquisitions qui s'en trouvent faussées.

Comme les conditions de solvants sont différentes de celles utilisées pour la détermination des propriétés du DDAO seul, celles-ci ont été mesurées à nouveau dans ces nouvelles conditions.

Les spectres d'absorption du PENB-DDAO ainsi que les spectres d'absorption et d'émission du DDAO sont reportés Figure II.43. Le spectre d'émission du PENB-DDAO n'est pas reporté car aucune fluorescence de ce composé n'est mesurée à $1,6 \cdot 10^{-5}$ M. Il faut atteindre des concentrations de l'ordre de 10^{-3} M pour apercevoir un signal.

On constate un très large décalage entre les maxima d'absorption des fluorophores libre et cagé

($\epsilon \approx 11000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$). Un décalage attendu est confirmé par ces mesures, mais la lecture des différents spectres nous apporte une seconde information très intéressante : le recouvrement des deux spectres d'absorption est quasiment inexistant. Cela nous permet d'irradier le composé cagé, entre 315 et 405 nm, pour libérer le fluorophore en ne générant que peu de fluorescence. Mais l'aspect le plus réjouissant de cette absence de recouvrement réside dans l'absence d'absorption du PENB-DDAO à 633 nm, longueur d'onde du laser utilisé en imagerie pour le DDAO. Ainsi, on pourra visualiser les fluorophores libérés sans induire de photo-libération supplémentaire. La fluorescence observée sera donc uniquement celle créée lors de l'irradiation de photo-activation.

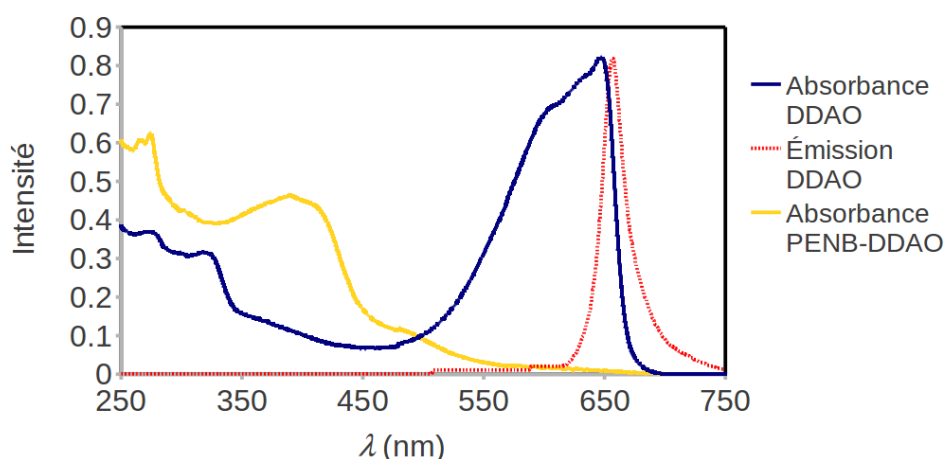


Figure II.43 : Spectre d'absorption du PENB-DDAO et spectres d'absorption et d'émission du DDAO libre.

$1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ dans un mélange équi-volumique MeCN / PBS pH7,4.

Le spectre d'émission ne représente pas les intensités réelles, son maximum a été normalisé au maximum du spectre d'absorption pour des raisons de lisibilité du graphique.

III.2.2. Stabilité.

La stabilité du PENB-DDAO à l'hydrolyse a été contrôlée. En effet, les éthers benzyliques du DDAO synthétisés comme pro-fluorophores pour les pénicillines G acylases ont montré une forte sensibilité à l'hydrolyse en milieu tamponné, interdisant de fait leur utilisation comme rapporteurs d'activité enzymatique. Le PENB-DDAO a été dissous dans un mélange équi-volumique d'acétonitrile et de PBS, puis l'absorbance de la solution a été mesurée toutes les heures pendant 12 heures, puis après 48 heures. L'hydrolyse du fluorophore cagé a été suivie par l'augmentation de l'absorbance entre 600 et 650 nm, traduisant la libération du DDAO libre. Entre deux mesures, la

solution est conservée à l'abri de la lumière.

Aucune hydrolyse n'a été constatée sur les premières 12 heures. Celle-ci ne devient légèrement visible qu'après 48 heures, mais ne compromet pas l'utilisation de ce composé en milieu biologique.

III.2.3. Solubilité.

Les observations sur des systèmes biologiques vivants ayant lieu en milieu aqueux, la solubilité d'un composé est un paramètre déterminant pour la pertinence de son utilisation sur de tels systèmes.

La solubilité du PENB-DDAO a donc été déterminée dans deux tampons aqueux neutres couramment utilisés, le PBS, qui est un milieu tampon phosphate isotonique, et l'HBSS, qui est un milieu PBS amélioré avec des substances nutritives comme des sucres.

Une solution-mère de PENB-DDAO est diluée dans les deux milieux tamponnés, PBS et HBSS. Un précipité apparaît. Après centrifugation, le surnageant est injecté en HPLC et la concentration en PENB-DDAO est comparée à une solution de référence de concentration connue.

Le fluorophore cagé présente une solubilité de $3,75 \times 10^{-6}$ M dans le PBS et de $9,53 \times 10^{-6}$ M dans l'HBSS. La solubilité est faible mais peut être améliorée par dilution au 1/2 de la solution mère dans le DMSO, puis dilution dans le tampon, comme cela sera fait pour les tests cellulaires.

Ce test nous a également permis de déterminer que le tampon utilisé pour la microscopie sur cellules vivantes sera l'HBSS, car il permet de travailler à des concentrations plus élevées.

III.3 Photolyse.

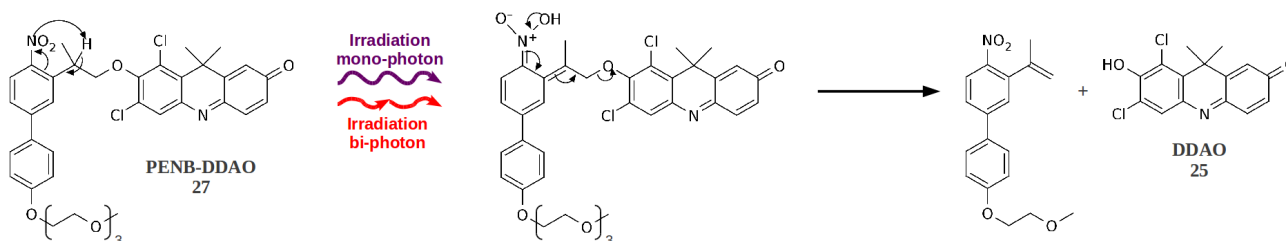


Figure II.44 : Réaction de photolyse du PENB-DDAO 27.

III.3.1. Photolyse à 1 photon.

Le suivi de l'irradiation d'une solution de PENB-DDAO dans un mélange équimoléculaire acétonitrile / PBS à 315 ou 365 nm montre une diminution de l'absorbance initiale à 390 nm et l'apparition du plateau entre 600 et 650 nm, traduisant la libération du DDAO. La présence de points isobestiques (Figure II.45) traduit une photo-fragmentation uniforme. Une irradiation plus longue entraîne d'autres modifications du spectre, dues probablement à une réactivité ou une dégradation des sous-produits de photolyse de la cage.

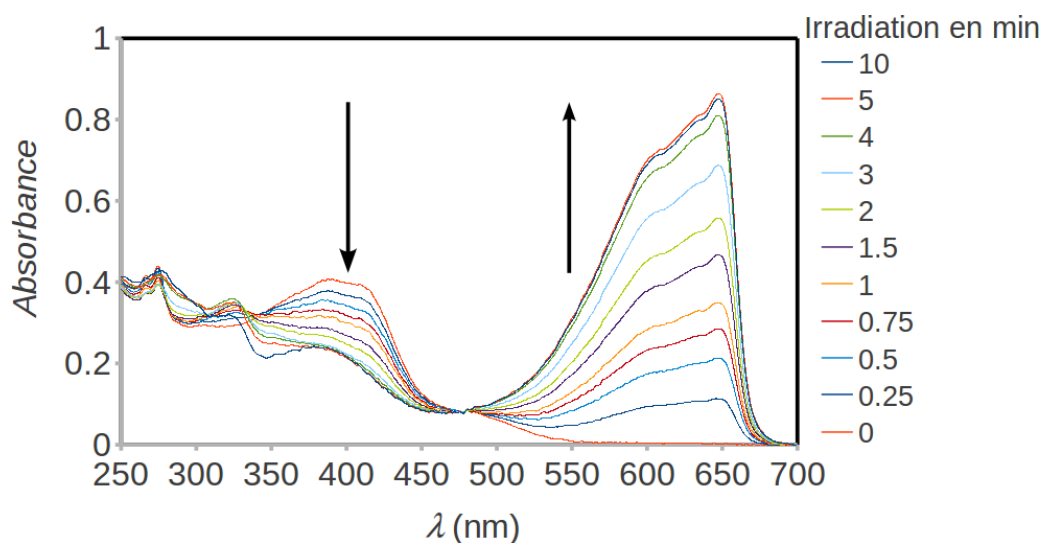


Figure II.45 : Évolution du spectre d'absorption d'une solution de PENB-DDAO dans un mélange MeCN / PBS au cours de la photolyse. La photolyse est effectuée par une irradiation à 315 nm.

III.3.1.a. Rendement quantique de photolyse.

L'analyse HPLC de la solution après photolyse a permis de déterminer que le DDAO a été libéré à plus de 95 %.

Le rendement quantique de photolyse ϕ_u a été déterminé en utilisant le PMNB-Glu ($\phi_u = 0,1$) comme référence.^[134] Lors de l'analyse HPLC des solutions irradiées, nous avons des mesures qui n'étaient pas reproductibles. Il s'est avéré que les conditions d'élution utilisées en routine au laboratoire (gradient linéaire H₂O/TFA 0,1 % à acétonitrile) dégradent le PENB-DDAO non-photolysé. Le rendement quantique de photolyse étant déterminé à partir de l'évolution de ce pic,

une dégradation spontanée du PENB-DDAO engendre une variation aléatoire de l'aire de son pic d'élution et par conséquent des mesures non reproductibles.

L'élution par une solution tamponnée d'acétate d'ammonium en remplacement de la solution d'H₂O/TFA a permis de maintenir la stabilité du PENB-DDAO tout au long de l'analyse.

La comparaison des aires des pics d'élution du PENB-DDAO par rapport au PMNB-Glu a permis de déterminer un rendement quantique de photo-fragmentation ϕ_u de 0,1.

III.3.1.b. Cinétique.

La détermination de la cinétique de photo-fragmentation a été effectuée au Département d'Optique ultrarapide et de Nanophotonique de l'IPCMS, UMR 7504 du CNRS. Collaboration avec le Dr. J. Léonard.

La grande différence de longueurs d'onde entre le fluorophore cagé et le fluorophore libre nous a permis de déterminer la cinétique de photolyse par suivi de l'évolution de la fluorescence. Cette expérience constitue le premier exemple d'utilisation de la photo-libération de fluorescence pour déterminer les cinétiques de photo-fragmentation.

Une solution de PENB-DDAO est irradiée en continu par une diode à 590 nm, longueur d'onde n'excitant pas le composé cagé. Les photons de fluorescence sont captés par un détecteur, muni d'un filtre arrêtant les longueurs d'onde inférieures à 640 nm, couplé à un oscilloscope. Une irradiation à 355 nm est ensuite effectuée par un pulse unique et la variation de la fluorescence émise est visualisée au cours du temps.

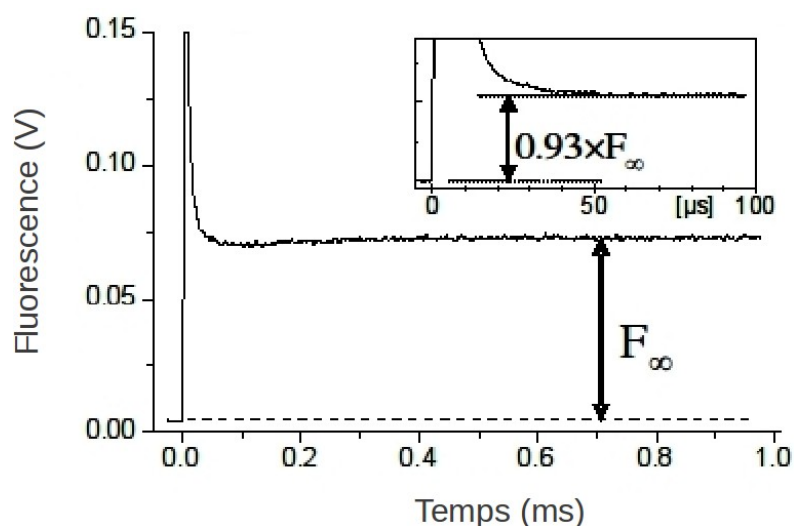


Figure II.46 : Cinétique de photolyse d'une solution de PENB-DDAO X suite à un pulse unique à 355 nm dans un mélange 1:1 d'acétonitrile et de PBS à pH7,4. L'insert est un agrandissement de la courbe sur un temps de 100 μ s, indiquant que 93 % de la fluorescence libérée est atteinte alors que le détecteur est saturé par le pulse d'irradiation.

Après un pulse unique, on enregistre une augmentation de fluorescence, atteignant un palier en moins de 0,5 ms. Ce palier correspond à 12 % de la libération de fluorophore que l'on obtient suite à une irradiation prolongée. La détermination de la constante de temps associée à la réaction de photolyse n'a pas pu être déterminée avec précision car le détecteur est aveuglé par l'intensité du pulse d'irradiation sur un temps d'environ 40 μ s. lorsque le détecteur retrouve sa sensibilité, la fluorescence a déjà atteint 93 % de la fluorescence libérée lors du pulse. La courbe exploitable pour la détermination de la constante de temps est par conséquent très réduite et la mesure imprécise. Nous avons toutefois pu établir une limite maximale de 15 μ s. Cette valeur est en adéquation avec les valeurs déterminées lors de la photo-fragmentation d'une coumarine cagée par le groupement DMNPB.^[112] Cette valeur est également suffisamment basse pour être compatible avec des études de dynamique de protéines.

III.3.2. Photo-fragmentation à 2 photons.

Les études de photolyse en bi-photon ont été effectuées au laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie – UMR 7213 du CNRS. Collaboration avec le Dr. F. Bolze.

L'efficacité de la photo-fragmentation du PENB-DDAO à 2 photons a été déterminée en deux temps. Dans un premier temps, nous avons déterminé la section efficace de décaageage à 740 nm,

par analyse HPLC de la diminution du fluorophore cagé lors de l'irradiation, en utilisant le PMNB-Glu comme étalon ($\delta_u = 3,1 \text{ GM à } 740 \text{ nm}$).^[135] Ces mesures comparatives nous ont permis de déterminer une $\delta_u = 3,7 \text{ GM à } 740 \text{ nm}$ pour le PENB-DDAO. Toutefois, notre référence, le PMNB-Glu, a été caractérisée par rapport à la cage coumarine décrite par Furuta *et al.* Cette cage présente une incertitude de facteur 2 sur sa section efficace de photolyse à 2 photons, due à une incertitude sur le rendement quantique de fluorescence de la fluorescéine qu'ils ont utilisée comme référence.^[14] Par reports successifs, la section efficace de photolyse du PENB-DDAO présente également cette incertitude de facteur 2 pour sa valeur absolue.

Nous avons dans un deuxième temps déterminé les sections efficaces de photo-fragmentation à 2 photons du PENB-DDAO pour d'autres longueurs d'onde par mesure des variations de la fluorescence libérée après irradiation. La fluorescence libérée lors de l'irradiation à 740 nm nous sert de référence, avec une section efficace correspondante de 3,7 GM déterminée précédemment par HPLC. La détermination des sections efficaces par mesure de la fluorescence apporte deux avantages par rapport à la détermination HPLC.

Ces mesures permettent un gain de temps non négligeable. Il n'est en effet pas nécessaire d'irradier la référence pour chaque longueur d'onde. Une seule irradiation est donc effectuée pour chaque longueur d'onde, contre deux lors d'analyses HPLC. La mesure de la fluorescence émise après irradiation est également nettement plus rapide qu'un cycle d'analyse HPLC.

Cette technique apporte également une précision et une reproductibilité supérieure aux analyses HPLC. L'irradiation à 2 photons n'agit que sur un volume restreint de la solution. Par conséquent, seule une faible quantité de fluorescence est libérée par cette technique. Or, les mesures de spectrofluorimétrie ont un seuil de détection inférieur aux mesures d'absorbance UV-visible utilisées en HPLC. De plus faibles variations dans la concentration du fluorophore libéré pourront donc être détectées par spectrofluorimétrie.

Les mesures ont été effectuées de 740 à 840 nm. Le PENB-DDAO possède des sections efficaces de photolyse supérieures à 2 GM de 740 à 780 nm.

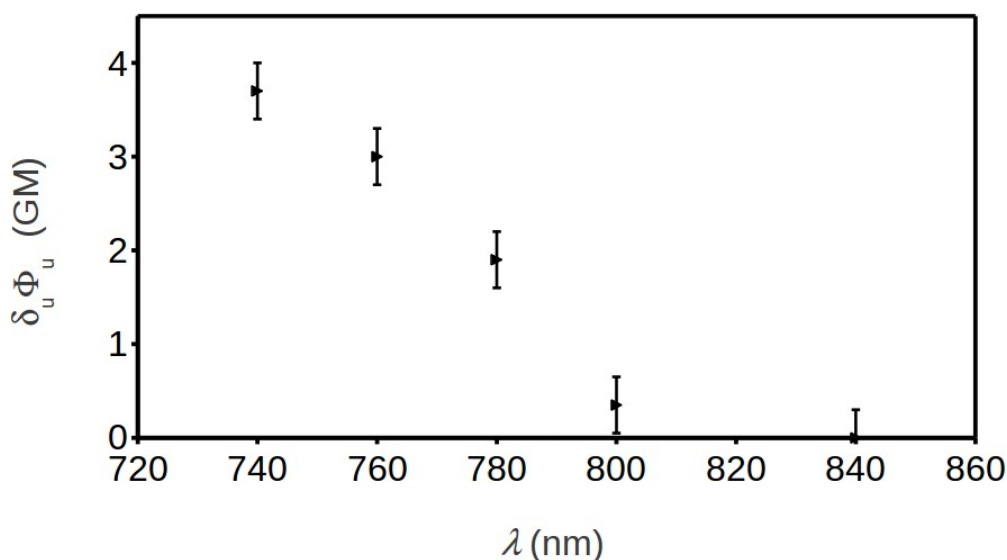


Figure II.47 : Sections efficaces de photolyse à 2 photons du PENB-DDAO entre 740 et 840 nm. La valeur à 740 nm a été déterminée par HPLC par rapport au PMNB-Glu,^[135] les autres valeurs par comparaison de la fluorescence libérée par rapport à la photolyse à 740 nm.

III.3.3. Photo-fragmentation in vivo.

III.3.3.a. Observation sur cellules vivantes.

Avant de poursuivre nos investigations dans le développement de sondes réactives vis à vis de protéines d'intérêt, nous devons nous assurer que l'utilisation du PENB-DDAO était compatible avec des études sur cellules vivantes. Pour cela, le composé doit pouvoir pénétrer dans les cellules et générer une fluorescence stable suite à une irradiation à 1 ou 2 photons.

Pour cela, nous avons incubé des cultures de cellules HeLa avec une solution de PENB-DDAO à $1,95 \times 10^{-5}$ M dans l'HBSS, préparée par dilution de la solution-mère dans le DMSO. Après incubation, les cultures sont observées au microscope confocal. La fluorescence est visualisée grâce à un laser à 633 nm et les irradiations de photo-fragmentation effectuées soit par un laser à 405 nm ou une lampe HBO pour les irradiations à 1 photon, soit par un laser pulsé à 770 nm pour les irradiations à 2 photons. Une acquisition pré-irradiation est effectuée afin de déterminer le niveau de fluorescence initiale.

Remarque : les premières expérimentations de décaage étaient effectuées après un lavage post-incubation et n'ont montré aucune libération de fluorescence. Une explication qui a été formulée est que le fluorophore cagé ne présente aucune différence d'ionisation, qu'il soit dans ou hors de la cellule. De plus, ne possédant pas de motif de reconnaissance vis à vis d'une cible cellulaire, il demeure libre dans le cytosol. Ainsi, en estimant qu'il pénètre librement dans le cytoplasme, rien ne devrait, en principe le retenir pour diffuser ensuite hors de la cellule. Cette hypothèse a été validée par l'apparition d'un fort signal fluorescent après une irradiation sans lavage post-incubation.

L'irradiation par la lampe HBO (Figure II.48) a couvert l'ensemble des cellules présentes sur la plaque. Une très forte augmentation de la fluorescence après irradiation est observée à l'intérieur des cellules. Une légère fluorescence dans le milieu extérieur est également visible, due au décaage des fluorophores extra-cellulaires.

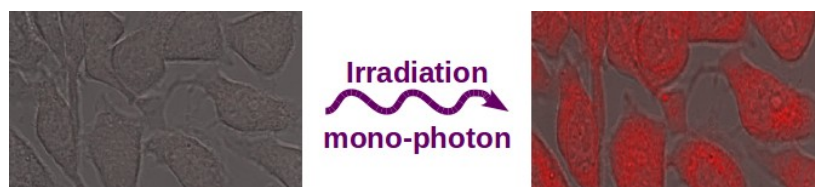


Figure II.48 : Superposition des images en lumière transmise et d'émission de fluorescence avant (gauche) et après (droite) irradiation d'une culture de cellules HeLa incubées avec une solution de PENB-DDAO.

Irradiation 340-380 nm, lampe HBO.

Les irradiations à 2 photons ont été effectuées sur une petite zone, couvrant une partie du cytoplasme et du noyau d'une cellule (Figure II.49). Après irradiation, l'apparition de fluorescence a été visualisée sur la partie cytoplasmique de la zone irradiée.

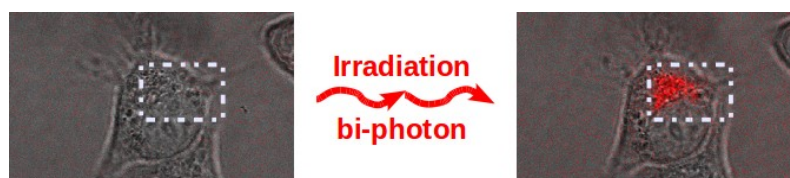


Figure II.49 : Superposition des images en lumière transmise et d'émission de fluorescence avant (gauche) et après (droite) irradiation d'une culture de cellules HeLa incubées avec une solution de PENB-DDAO.

Irradiation 770 nm. La zone d'irradiation est matérialisée par le rectangle en pointillé blanc.

Nous avons été surpris par une disparition très rapide de cette fluorescence. Cela peut avoir deux origines. Soit le fluorophore est dégradé, soit il diffuse très rapidement dans le cytoplasme.

La dégradation du fluorophore ne semble pas être la réponse la plus pertinente. La fluorescence est en effet stable lors du décageage à 1 photon ou lors des expérimentations avec l'acétate d'acridinone. Bien que dans ces deux cas, le nombre de fluorophores actifs soit largement plus important que lors d'une irradiation à 2 photons, une baisse de la fluorescence aurait dû toutefois être visualisée. Un photo-blanchiment n'est pas non plus une piste privilégiée, car l'intensité du laser à 633 nm utilisée est relativement faible.

La diffusion nous est apparue comme l'explication la plus plausible. La plus rassurante également. En effet, le volume irradié est très faible comparé au volume cellulaire complet. De plus, en microscopie confocale, seuls les abords du plan focal sont visibles. Une diffusion dans les trois dimensions entraînerait une dilution très rapide des fluorophores actifs et la fluorescence visible diminuerait de la même manière.

Nous avons dans un premier temps tenté de suivre une éventuelle diffusion par un balayage 3D de la zone d'émission de fluorescence après photolyse. Mais la fréquence de rafraichissement de l'image et le pas entre deux plans en Z (axe dans le sens de la profondeur de l'échantillon) étaient trop élevés pour visualiser de manière précise une diffusion directe. Nous avons observé une baisse de la fluorescence, mais sans pouvoir visualiser sa diffusion. Si un phénomène de diffusion existe, il est extrêmement rapide.

Pour nous en assurer, nous avons effectué des expérimentations de type FRAP.

Après incubation avec une solution de PENB-DDAO, les cellules sont irradiées avec une lampe HBO afin de libérer le maximum de fluorophores. Une zone du cytoplasme d'une cellule est délimitée et est photoblanchie. L'évolution de l'intensité moyenne de la fluorescence de cette zone, normalisée par rapport à l'intensité de la fluorescence avant blanchiment, est suivie au cours du temps. On constate que la fluorescence retrouve son niveau initial dès l'arrêt du blanchiment, c'est à dire en moins de 500 ms.

Afin de s'assurer que ces variations sont dues à des phénomènes de diffusion, les mêmes expérimentations ont été effectuées sur des cellules fixées, c'est à dire traitées par du paraformaldéhyde, lavées et incubées dans du méthanol. Ce traitement est connu pour polymériser le cytosquelette de la cellule et annihiler, ou du moins diminuer très fortement les phénomènes de

diffusion de molécules dans le cytoplasme. Après fixation, les expérimentations de photoblanchiment sont effectuées. On remarque cette fois une récupération de seulement 40 % de la fluorescence initiale.

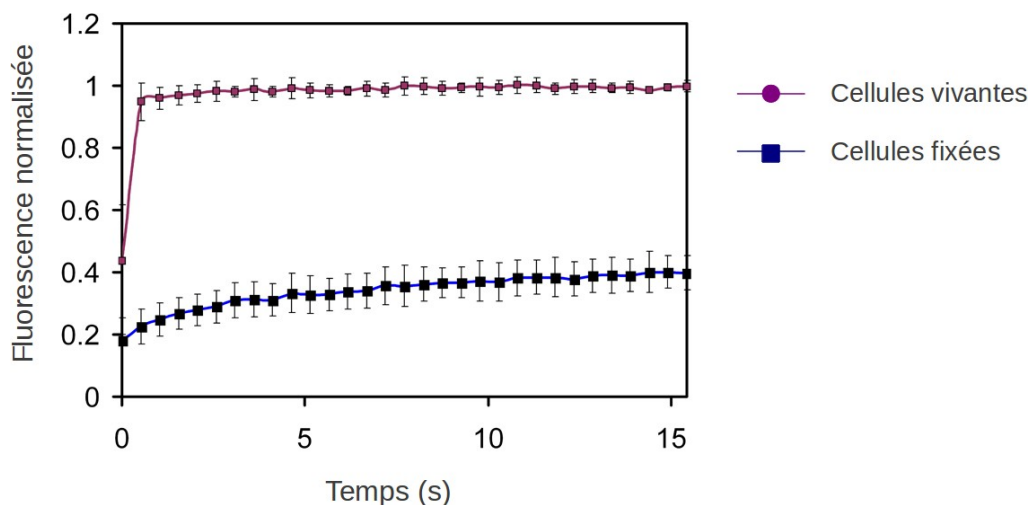


Figure II.50 : Visualisation des phénomènes de diffusion par photoblanchiment.

Ces résultats nous permettent de penser que la baisse de fluorescence est, du moins en partie, liée à des phénomènes de diffusion très rapides des fluorophores libres dans le cytoplasme.

III.3.3.b. Observation sur un embryon de Zébrafish.

J'ai également profité de ma participation à l'école thématique MiFoBio 2010 et de la mise à disposition de différents appareillages pour effectuer quelques observations rapides de la photo-activation du PENB-DDAO sur des Zébrafish, en compagnie de l'équipe du Dr. N. Peyriéras. Le temps disponible pour la préparation et la réalisation de ces manipulations étant très réduit, ces observations sont des résultats préliminaires à d'éventuelles expérimentations ultérieures et sont donc sujettes à confirmation.

Un embryon de Zébrafish, dont les membranes cellulaires sont marquées par la GFP, a été incubé 30 minutes avec une solution aqueuse de PENB-DDAO. Après incubation, une image de l'embryon a été effectuée par microscopie de fluorescence bi-photon à 980 nm, afin de sélectionner les cellules dans lesquelles sera effectuée la photo-activation. Ces cellules ont ensuite été irradiées à 740 nm puis la fluorescence a de nouveau été visualisée à 980 nm. Une fluorescence rouge est

visible au niveau des cellules irradiées à 740 nm.

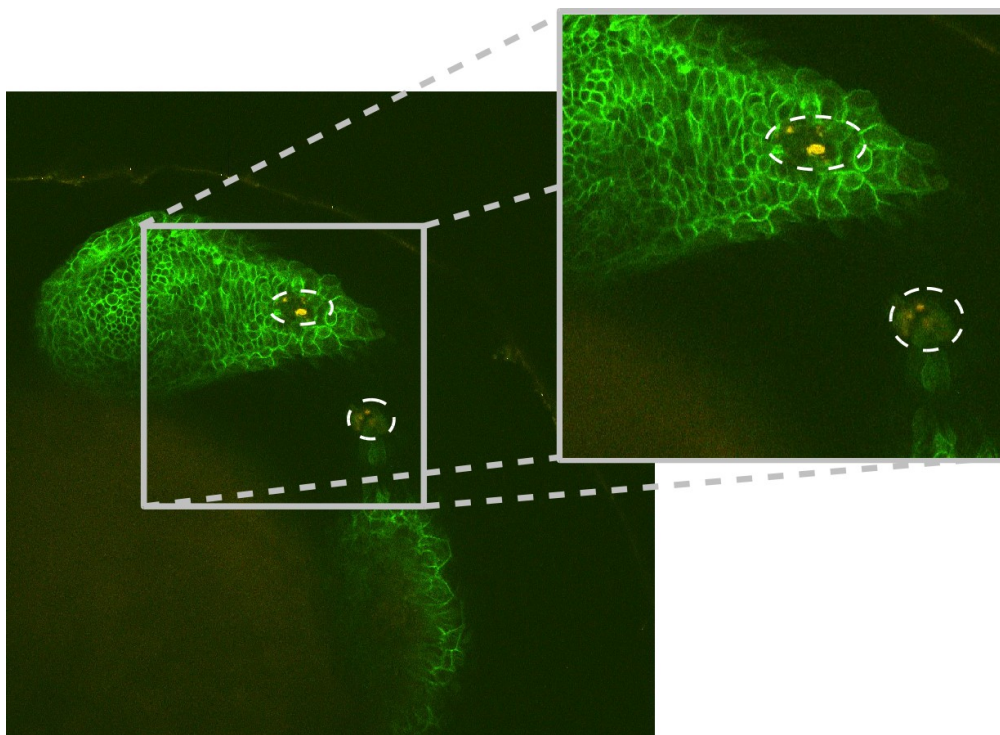


Figure II.51 : Embryon de Zébrafish observé en microscopie de fluorescence bi-photon après photo-activation du PENB-DDAO.
Les membranes cellulaires du Zébrafish sont marquées à la GFP.
Les zones irradiées sont matérialisées par les pointillés blancs.
Imagerie effectuée sur Trimscope II LaVision-Biotech®.

On remarque toutefois que l'intégrité des cellules semble atteinte dans cette zone, l'irradiation à 740 nm ayant été trop longue ou trop intense. Néanmoins, il semblerait que les cellules de Zébrafish, à l'inverse des cellules HeLa, n'émettent pas de fluorescence rouge lorsqu'elles se dégradent (communication personnelle Dr. N. Peyriéras). La fluorescence rouge serait donc due uniquement à la photo-activation du PENB-DDAO dans les cellules de l'embryon de Zébrafish.

IV. Conclusion.

Différents fluorophores ont été synthétisés au cours de cette première partie de travaux effectués au cours de ma thèse.

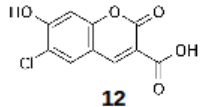
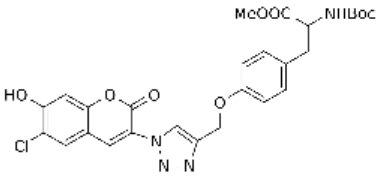
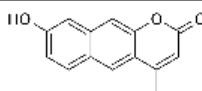
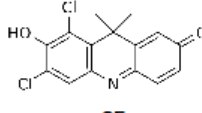
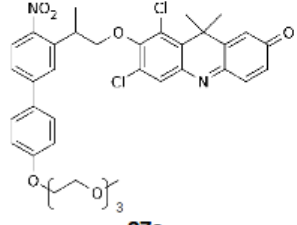
Fluorophore	λ_{ex}	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{em}	ϕ_{fl}	ϕ_{u}	$\delta_{\text{a}} \phi_{\text{u}}$
 12	387 nm	21000	446 nm	ND	/	/
 11	397 nm	16000	476 nm	ND	/	/
 21a	350 nm	6000	509 nm	ND	/	/
 25	645 nm	34000	658 nm	0,1	/	/
 27a	390 nm ^a	11000 ^a	/	/	0,1 ^a	3,7 GM ^a

Table II.1 : Principaux fluorophore synthétisés. Propriétés spectrales.

Les fluorophores ont été caractérisés à partir d'une solution-mère dans le DMSO diluée au 1/100^e dans le tampon phosphate PBS, pH7,4.

^a Les propriétés du composé **27a**, PENB-DDAO, ont été établies à partir d'une solution-mère dans le DMSO diluée au 1/100^e dans un mélange PBS/MeCN 1:1 v/v pour des raisons de solubilité.

Nous avons également synthétisé un fluorophore photo-activable, le composé PENB-DDAO **27** qui, à travers une réaction de photolyse, relargue de manière efficace un fluorophore rouge, le DDAO **25**. Ce fluorophore cagé est le premier décrit qui associe une efficacité de photo-fragmentation élevée à 2 photons (3,7 GM à 740 nm) et une fluorescence dans le rouge ($\lambda_{\text{em}} = 658$ nm). Cette photo-activation peut également être menée sur des cellules vivantes.

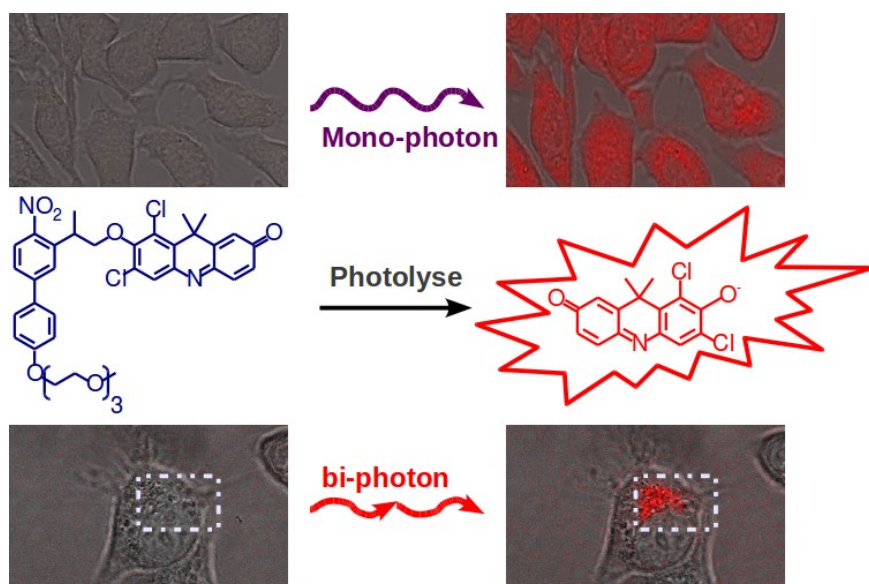


Figure II.52 : Photolyse du PENB-DDAO à 1 et 2 photons sur cellules HeLa vivantes.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article "Live-Cell One- and Two-Photon Uncaging of a Far-Red Emitting Fluorophore", publié dans le *Journal of the American Chemical Society* en 2010.^[152] Cet article est joint en annexe au manuscrit, ainsi que deux autres articles faisant référence à ce travail, "Two-Photon Uncaging: New Prospects in Neuroscience and Cellular Biology."^[128], "Small Photoactivatable Molecules for Controlled Fluorescence Activation in Living Cells."^[102]

La photolyse du PENB-DDAO semble également être efficace lors d'expérimentations sur animal entier.

Chapitre III

Résultats et discussion

**Du fluorophore à la sonde :
Vers la fonctionnalisation du DDAO.**

Comme cela a été présenté en début de chapitre précédent (Chapitre II, Figure II.2), une sonde fluorescente photo-activable est composée de trois parties complémentaires. Dans le cas présent, deux des éléments nécessaires ont été définis, le groupement photo-labile et le fluorophore ayant été couplés. Le composé ainsi obtenu, le PENB-DDAO, doit désormais pouvoir se lier à une protéine cible à travers un motif de reconnaissance afin d'officialier en tant que sonde de marquage.

Parmi les très nombreux couples "tag de reconnaissance / sonde associée" décrits à ce jour, deux ont particulièrement retenu notre attention. Les couples "HisTag / Ni(II)-nitrilo triacetic acid (NTA)" et "SnapTag / O-benzyle guanine" possèdent des propriétés intéressantes et complémentaires sur certains points. Tous deux permettent un marquage rapide et spécifique.

Le marquage de protéines intra-cellulaires, à la différence des protéines membranaires, présente une difficulté supplémentaire consistant à franchir la membrane plasmique. A la différence de la O-benzyle guanine, le complexe Ni(II)-NTA, possédant une charge négative non neutralisée, ne peut effectuer ce franchissement. Un dérivé du NTA, le nitrilo diacetic acid (NDA), a été élaboré au laboratoire par le Dr. C. Orange au cours de ses travaux de thèse, par estérification d'une fonction acide. Ainsi, les deux charges portées par les carboxylates du NDA sont neutralisées par les deux charges positives du Ni²⁺. Le complexe, neutre, peut cette fois franchir la barrière membranaire.^[112] Dans le cytoplasme, l'ester est hydrolysé pour régénérer le NTA fonctionnel.

Les sondes NDA et O-benzyle guanine, fonctionnalisées par une amine primaire, peuvent également être couplées à un fluorophore portant un groupement acide carboxylique par la formation d'une liaison amide. Cette stratégie de couplage commune présente un intérêt non négligeable : le même fluorophore pourra être utilisé avec les deux marqueurs.

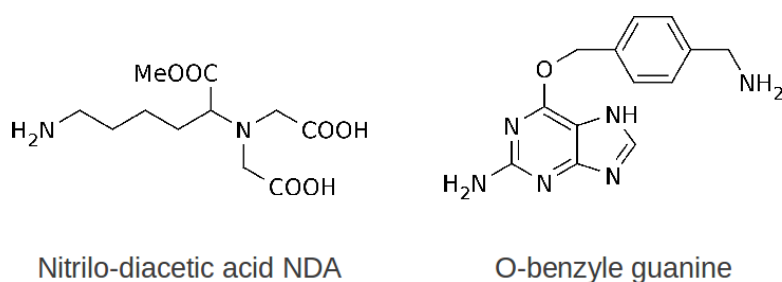


Figure III.1 : Structure des groupements NDA et O-benzyle guanine.

Ces deux sondes réagissent sur des marqueurs de masses moléculaires très différentes. La O-

benzyle guanine est le substrat du SNAP-Tag (19 kDa) alors que le complexe Ni(II)-NDA reconnaît un Tag-polyhistidines (1-1,5 kDa) par coordination avec les azotes des cycles imidazoles. Des études sur l'impact de la masse moléculaire du marqueur sur la dynamique des protéines d'intérêt peuvent donc être envisagées. L'emploi d'un même fluorophore permet dans cette optique de travailler dans des conditions d'observation identiques, et ainsi de s'affranchir d'un facteur pouvant induire des variations dans les mesures.

L'utilisation d'un fluorophore compatible avec différents motif de reconnaissance permet également, d'un point de vue plus pragmatique, de limiter les investissements, déjà conséquents, dans le développement du fluorophore fonctionnalisé.

Afin de le rendre compatible avec les couples de reconnaissance retenus, nous avons axé nos travaux dans le développement d'un dérivé du DDAO portant une fonction acide carboxylique. Les sondes NTA et O-benzyleguanine, portant une fonction amine réactive, pourront ainsi être couplées au moyen d'une liaison amide. Cette liaison, outre le fait de pouvoir être réalisée facilement entre un ester activé dérivé de l'acide carboxylique et l'amine de la sonde, présente une très bonne stabilité à l'hydrolyse à pH7, conditions communément rencontrées lors de travaux sur des systèmes biologiques vivants.

De nombreuses autres sondes possèdent également une fonction amine réactive. Cela pourra permettre d'élargir le champ d'application du fluorophore et de ne pas limiter son usage aux deux couples de reconnaissance sélectionnés.

I. Stratégie.

L'insertion d'une fonction acide carboxylique sur le DDAO peut être effectuée à deux endroits, soit au niveau du pont diméthyle, soit au niveau du tricycle acridine (Figure III.2).

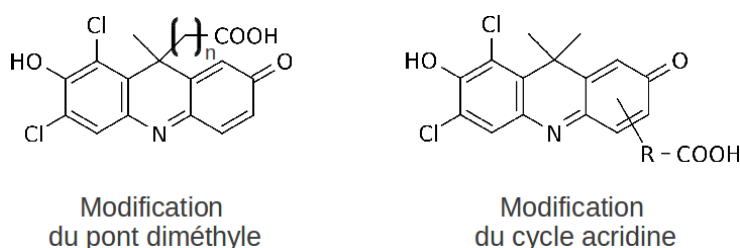


Figure III.2 : Stratégies envisagées pour l'insertion d'une fonction acide sur le DDAO.

La force de la fonction acide dans la fonctionnalisation du fluorophore réside dans les nombreuses voies de synthèse menant à sa formation (Figure III.3). Elle peut en effet être obtenue par différentes stratégies d'oxydation. De nombreux composés commerciaux portant une fonction acide sont également disponibles et peuvent être couplés au fluorophore.

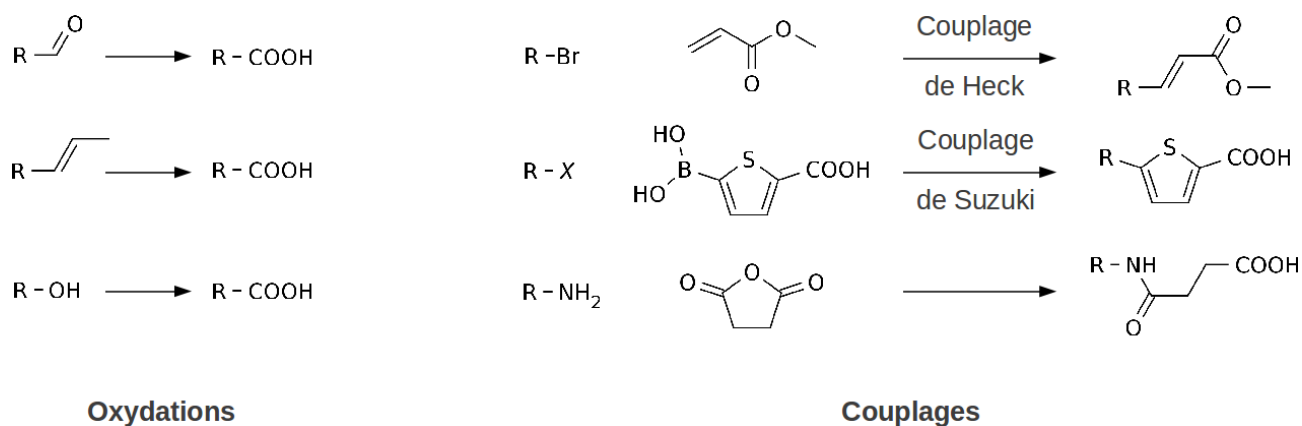


Figure III.3 : Exemples de stratégies de synthèse aboutissant à la formation d'une fonction acide.
R = fluorophore
X = Cl, Br ou I

II. Tentatives de couplage de Suzuki sur le DDAO.

La première voie de synthèse envisagée repose sur la présence de deux atomes de chlore aromatiques sur le fluorophore. Bien que moins réactifs que le brome ou l'iode, des couplages de Suzuki ont été décrits sur des atomes de chlore aromatiques. Cela nous permettrait de fonctionnaliser directement le fluorophore, sans autre étape de synthèse intermédiaire. Cela nous permettrait également, par un choix approprié de l'acide boronique, de faire d'une pierre deux coups et de gagner encore vers le rouge pour les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Dans cette optique, nous avons tenté de coupler un thiophène portant un acide boronique, comme décrit par le Dr. D. Puliti au cours de sa thèse de doctorat.^[61]

Nous avons dans un premier temps effectué la réaction de couplage entre le DDAO et l'acide (5-formylthiophène-2-yl)boronique dans des conditions communes, en utilisant le tétrakis(triphénylphosphine) palladium comme catalyseur en présence de carbonate de potassium dans du THF ou du dioxane dégazé. Le couplage ne se fait pas dans ces conditions, les réactifs de départ étant récupérés inchangés.

Le DDAO est en équilibre entre deux formes, les chlores étant soit sur la quinone, soit sur le phénol. Il ne nous a pas été possible de déterminer quelle forme résonante était majoritaire. Le couplage de Suzuki décrit sur les chlores était mené sur des chlores aromatiques. Il est possible que la résonance entre les deux formes du DDAO, déprotoné dans les conditions basiques du couplage de Suzuki, en limite la réactivité.

Pour s'affranchir de ce phénomène, la synthèse du DDAO (Chapitre II, Figure II.37) a été reprise et arrêtée avant la dernière étape d'oxydation, afin d'isoler le composé **24** bis-aromatique. Sous sa forme réduite, il n'y a pas de phénomène de résonance, les deux cycles étant indépendants. Ce composé a été relativement délicat à isoler car il tend à s'oxyder spontanément en DDAO au contact de l'air.

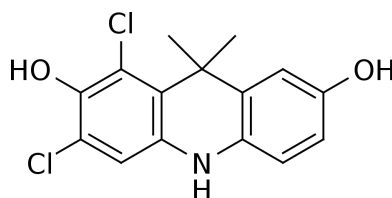


Figure III.4 : DDAO réduit **24**.

Nous avons ensuite procédé au couplage entre le composé **24** et l'acide thiophène boronique dans le dioxane en présence de K_2CO_3 et de $Pd(PPh_3)_4$. Les produits de départ n'ont pas réagi.

Une dernière tentative a été effectuée en utilisant un catalyseur différent le dichloro-1,4-bis(diphénylphosphino)butane-palladium(II) $[(dppb)PdCl_2]$, décrit comme catalysant efficacement le couplage entre un acide boronique et un chlore aromatique^[229] ou allylique.^[230]

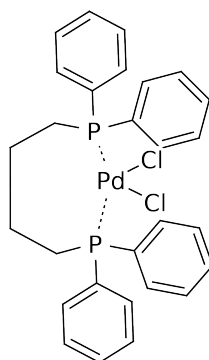


Figure III.5 : $(dppb)PdCl_2$.

La réaction a été effectuée dans les conditions décrites, à savoir dans un mélange équimoléculaire d'éthanol et de toluène en présence de carbonate de sodium. Le couplage entre le DDAO et l'acide thiophène boronique n'a pas non plus démarré.

Cette stratégie a été abandonnée.

On peut, en outre, se poser la question de l'utilité de la recherche de longueurs d'onde toujours plus élevées. En comparant la moyenne des brillances des fluorophores "chefs de file" les plus couramment utilisés,^[20] répartis par classe de 100 nm (Figure III.6), on remarque en effet que les brillances maximales sont atteintes pour les fluorophores dont la longueur d'onde au maximum d'émission est comprise entre 500 nm et 600 nm, puis décroissent de part et d'autre de ce maximum. Il est naturellement impossible d'en tirer formellement une quelconque conclusion. Il s'agit plus d'une tendance remarquée pour les quelques fluorophores comparés. Néanmoins, une tendance similaire semble également se dessiner pour les protéines fluorescentes.^[41] Il n'est donc pas forcément utile de chercher à déplacer les spectres d'absorption et d'émission du DDAO vers le rouge lointain.

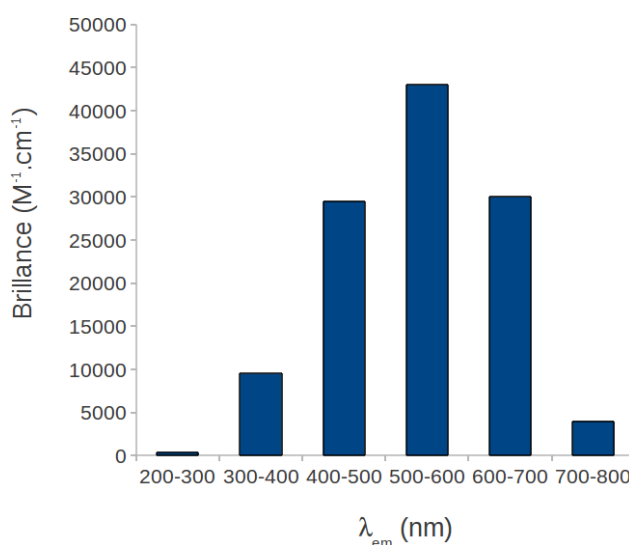


Figure III.6 : Brillance moyenne des fluorophores usuels décrits par Lavis et al.^[20] en fonction de leur longueur d'onde maximale d'émission

III. Oxydation à partir d'un aldéhyde.

Un aldéhyde est une fonction chimique très puissante car elle peut être transformée en de nombreuses autres fonctions organiques, de manière relativement accessible (Figure III.7). Un intermédiaire présentant une telle fonction est donc très intéressant dans la fonctionnalisation d'un fluorophore.

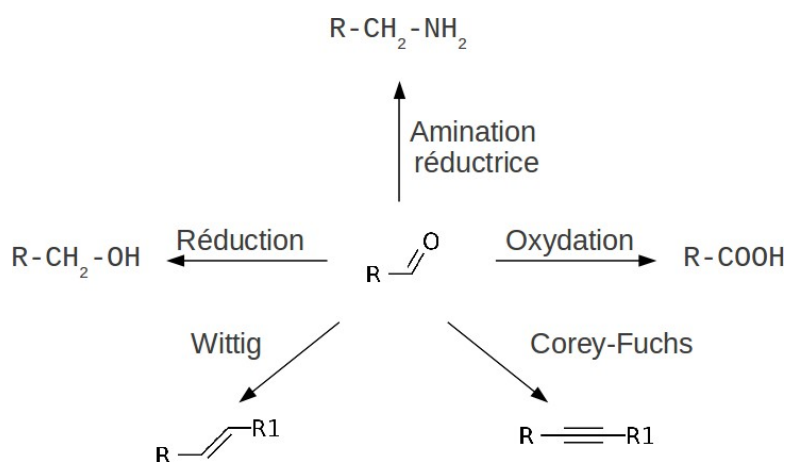


Figure III.7 : Exemples de transformations accessibles à partir d'un aldéhyde.

III.1. Ortho-formylation du DDAO.

Une première tentative pour obtenir un dérivé ortho-formylé du DDAO a été menée par une réaction de Reimer-Tiemann. Cette réaction permet une ortho-formylation de phénols, suite à la formation du dichlorocarbène, issu de la réaction d'une base (NaOH, KOH) sur le chloroforme. Pour cette réaction, nous avons utilisé de l'hydroxyde de sodium, activé par l'éther couronne 15-Crown-5 chélateur de l'ion sodium. Elle a été menée dans le méthanol à reflux.

Comme la réaction n'a pas démarré, nous avons changé de solvant, menant la réaction dans le THF. Le chauffage a été effectué au micro-onde à 100°C, pendant 20 minutes, mais la réaction n'a pas non plus démarré. Un temps de réaction plus long, jusqu'à deux heures, n'apporte rien de plus.

Une autre voie de synthèse aboutissant à l'ortho-formylation d'un phénol est la réaction du paraformaldéhyde sur le composé phénolique en présence de chlorure de magnésium. Cette synthèse exige que le chlorure de magnésium soit parfaitement sec. Nous l'avons donc séché, ainsi

que le paraformaldéhyde, sous vide en présence de pentaoxyde de diphosphore P₂O₅ pendant deux jours. La réaction a été menée dans le THF distillé à reflux sous argon. La réaction n'a pas démarré, le DDAO de départ est récupéré inchangé.

Cette stratégie n'a pas fait l'objet d'investigations plus poussées.

III.2. Oxydation d'un alcène.

Un alcène est également une fonction de choix pour développer un fluorophore fonctionnalisé. En présence d'ozone, puis de peroxyde d'hydrogène, ou en présence successive de permanganate et de periodate, l'oxydation des alcènes aboutit à la formation d'une fonction acide.

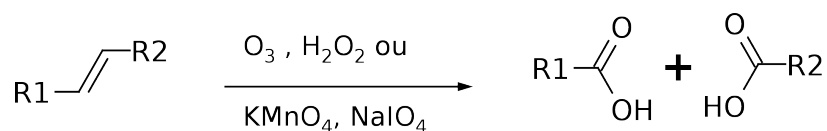


Figure III.8 : Oxydation d'un alcène.

III.2.1. Synthèse d'un dérivé allylique du DDAO.

III.2.1.a. À partir du O-allyl-DDAO.

Une première synthèse envisagée est la formation d'un dérivé allylique du DDAO suite à un réarrangement de Claisen à partir d'un O-allyle DDAO, comme présenté sur le schéma rétro-synthétique suivant :

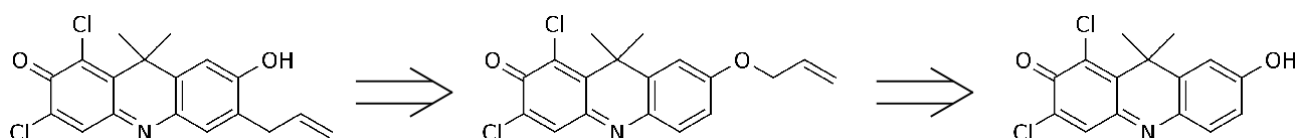


Figure III.9 : Rétrosynthèse envisagée pour l'insertion d'un bras allyle sur de DDAO.

Deux synthèses permettent la formation du O-allyle DDAO intermédiaire. La formation de l'éther peut être menée à travers une réaction de Williamson en présence du bromure d'allyle, ou par

une réaction de Mitsunobu en utilisant l'alcool allylique.

La réaction de Williamson a été effectuée dans la DMF à 130°C en présence de K_2CO_3 .

La réaction de Mitsunobu a été menée dans le THF, à température ambiante, en présence de diisopropyleazodicarboxylate (DIAD) et de triphényle phosphine, générant un intermédiaire phosphonium, activant l'alcool allylique.

Bien que ces deux synthèses aient mené au mélange des deux éthers isomères, il a été intéressant de remarquer que le produit majoritairement formé dépendait du type de synthèse mis en œuvre (Figure III.10).

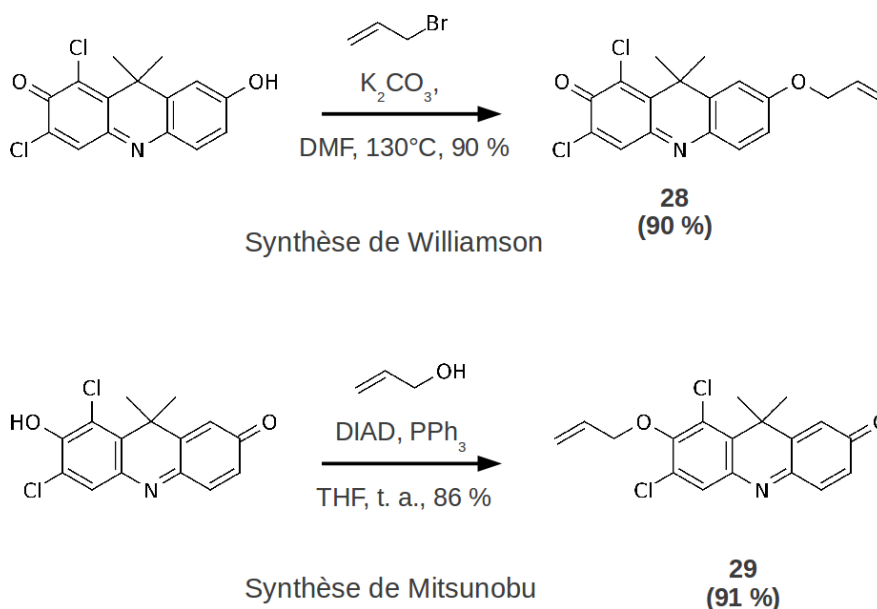


Figure III.10 : Isomère principal formé pour chaque type de réaction.

Le chiffre entre parenthèses est la proportion relative de l'isomère majoritaire. Le rendement global de la réaction, sans différenciation des isomères, est indiqué sous la flèche réactionnelle.

Les proportions relatives des deux isomères obtenus dans chaque réaction ont été déterminées par le rapport entre les aires de leurs pics respectifs en RMN du proton.

Pour déterminer leur structure, les deux isomères, possédant des temps de rétention légèrement différents, ont été séparés par HPLC. La structure de chaque isomère a été déterminée par RMN 2D

par analyse HMBC des couplages 3J entre le carbone 14 et les hydrogènes des carbones 12 et 21 pour l'isomère **28** ou les couplages entre le carbone 3 et les hydrogènes portés par les carbones 21 et 5 pour l'isomère **29** (numérotation d'après le schéma ci-dessous).

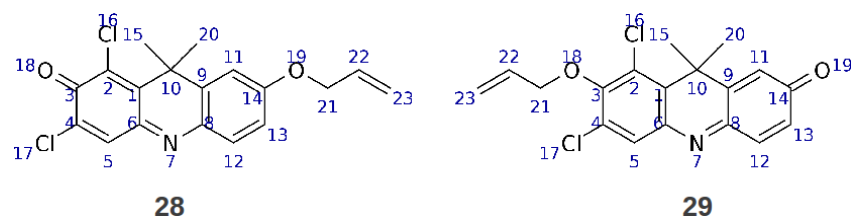


Figure III.11 : Numérotation des atomes des deux isomères **28** et **29**.

La détermination de l'empreinte RMN de chaque isomère nous a également permis de déterminer sans ambiguïté la structure du PENB-DDAO décrit précédemment.

Il est également intéressant de remarquer que ces deux composés présentent des propriétés spectrales différentes, l'isomère **28** étant fluorescent malgré l'allylation du phénol ($\lambda_{em} = 618$ nm) tandis que l'isomère **29** présente une fluorescence beaucoup plus faible, peu visible.

Nous avons ensuite exploré le réarrangement de Claisen afin d'obtenir le composé attendu.

La voie la plus simple pour effectuer cette réaction est en conditions thermiques, en chauffant fortement le composé. Après solubilisation du composé **28** dans la DMF, un chauffage à 150°C n'entraîne pas de début de réaction. En augmentant la température du bain d'huile, le réactif de départ se dégrade pour une température de chauffage de 170°C.

Nous avons donc essayé des conditions plus douces, par catalyse de la réaction soit par l'acide de Lewis SnCl_4 ,^[231] soit par du di(triphénylphosphine)dichloro palladium.^[232] Le réarrangement ne démarre pas, que ce soit à température ambiante ou avec un chauffage modéré.

III.2.1.b. A partir du dérivé O-allyl du 3'-hydroxyacétophénone.

Une solution a été apportée par l'allylation de l'hydroxy-acétophénone commercial (Figure III.12). Ce composé semble en effet plus robuste que le DDAO du fait de sa structure plus simple.

L'éther allylique a été formé par la synthèse décrite par Thalji *et al.*^[233] Il s'agit d'une variante de la réaction de Williamson effectuée dans l'acétone en présence de carbonate de potassium et d'iodure de potassium. L'éther allylique du 3'-hydroxy-acétophénone **30** est obtenu avec un rendement de 96 %.

Ce composé a ensuite été chauffé dans la DMF à reflux pour obtenir le 4'-(2'-)allyle-3'-hydroxy-acétophénone **31a** et **31b**. La réaction ne démarre pas. Comme la DMF a une température d'ébullition de 153°C, il se peut que l'énergie apportée par chauffage soit insuffisante pour effectuer le réarrangement de Claisen.

Le composé **30** étant une huile, il est possible d'envisager le réarrangement sans solvant. La température atteinte pourra ainsi être supérieure à celle atteinte dans le DMF et l'énergie apportée également supérieure. La température du bain chauffant a été augmentée progressivement à partir de 150°C. Le réarrangement a démarré entre 190 et 200°C. Un chauffage prolongé sur plus de 20 heures à ces températures entraîne toutefois, à terme, la dégradation des produits. Pour limiter cette dégradation, la réaction a été menée sous atmosphère d'argon, après dégazage de l'éther allylique de départ. Le temps de réaction a également été limité à 17 heures, conduisant à un rendement brut de 30 % environ. 60 % de la masse totale après réaction est représentée par le réactif de départ n'ayant pas réagi.

Deux composés **31a** et **31b** sont obtenus, résultant des deux réarrangements en *ortho* possibles. Les proportions respectives après purification sur colonne de silice sont de 35 et 65 % (Figure III.12).

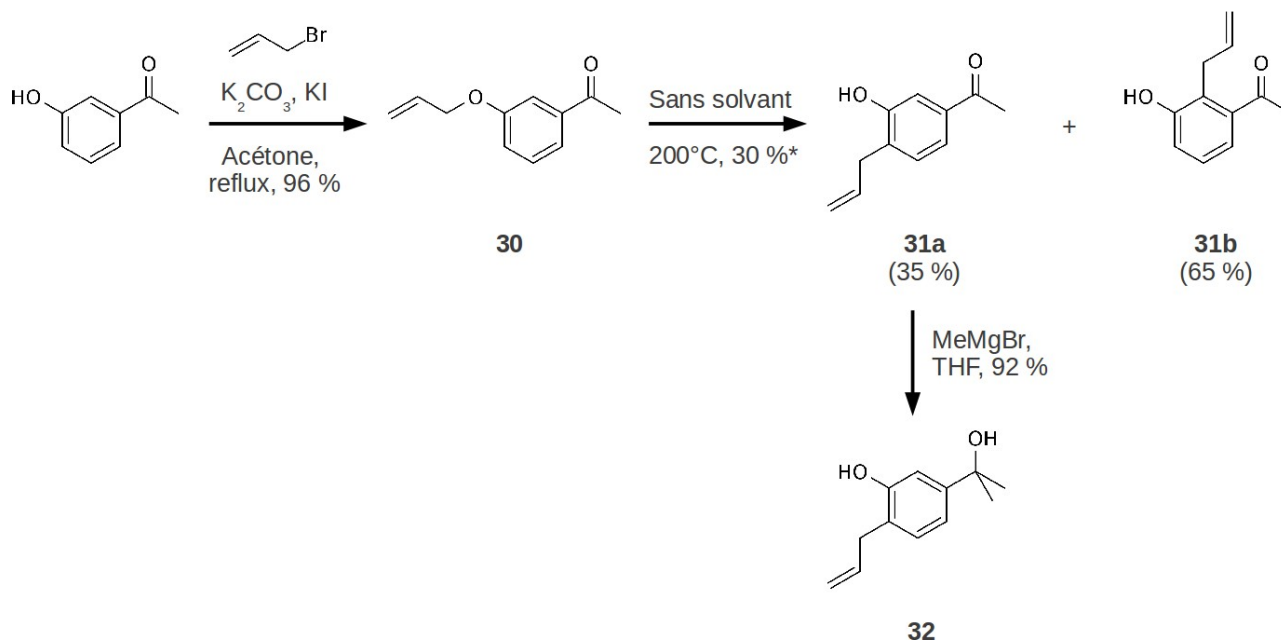


Figure III.12 : Synthèse du composé **32**.

Les données entre parenthèses représentent les proportions relatives des isomères **31a** et **31b**.

Le rendement "30 %*" représente le rendement brut de la réaction, non corrigé par rapport au réactif de départ **30** récupéré après réaction

Ces deux produits ont ensuite été investis dans une réaction de Grignard dans le THF avec le bromure de méthyle magnésium dans les conditions optimisées pour le 3'-hydroxy-acétophénone (Chapitre II, Figure II.36). L'isomère **31a** a réagi avec un rendement de 92 %, alors que la réaction avec **31b** n'a pas démarré, ce composé étant récupéré intact, vraisemblablement pour des raisons d'encombrement stérique.

L'alcool tertiaire **32** formé à partir du composé **31a** est ensuite utilisé comme synthon de départ pour la cyclisation du DDAO portant la chaîne allyle (Figure III.13).

La réaction de ce synthon **32** sur le réactif de Gibbs conduit à la formation du fluorophore attendu **34** avec un rendement global de 44 %. Les conditions réactionnelles sont les mêmes que celles mises en œuvre pour la synthèse du DDAO **25**. Seules les conditions d'oxydation lors de la dernière étape ont été durcies pour tenter de former la fonction acide au cours de cette étape, sans succès.

La synthèse du fluorophore **34** est résumée ci-dessous. Un aliquot de l'intermédiaire de synthèse **33** a été prélevé afin de s'assurer du bon déroulement de la réaction. Cet aliquot a été analysé par RMN du proton. Aucune autre analyse n'a été effectuée sur cet intermédiaire.

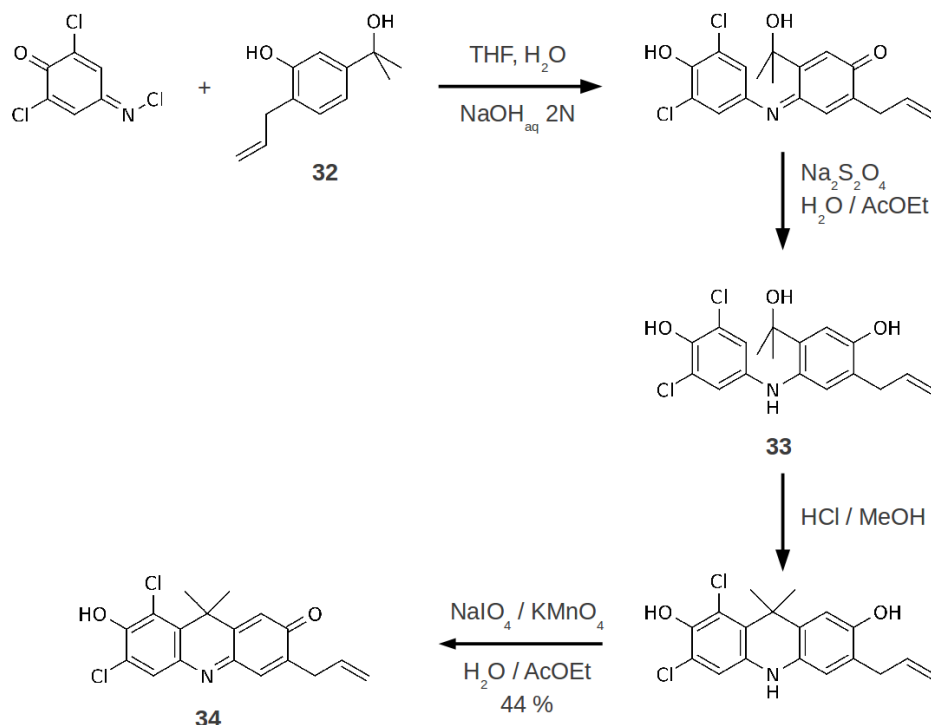


Figure III.13 : Synthèse de l'allyle-DDAO **34**.

III.2.2. Ozonolyse.

Le composé **34** obtenu après cyclisation a ensuite été soumis à différentes conditions d'oxydation. Une ozonolyse a été effectuée à 0°C, suivie d'une hydrolyse de l'intermédiaire ozonide en présence de peroxyde d'hydrogène. Une première ozonolyse a été effectuée sur une durée d'une heure. Le milieu réactionnel s'est entièrement décoloré, indiquant la dégradation du fluorophore. La réaction a été relancée sous un contrôle régulier du milieu réactionnel. La réaction a été arrêtée au premier signe d'une dégradation. Les conditions d'ozonolyse sont toutefois difficiles à contrôler et le milieu réactionnel s'est entièrement dégradé le temps de purger le ballon de l'ozone résiduel. Les produits de dégradation n'ont pas pu être identifiés. Une dégradation similaire a été remarquée lors d'une tentative d'ozonolyse du 4'-allyle-3'-hydroxy-acétophénone.

III.2.3. Coupure oxydative par KMnO_4 / NaIO_4 .

Une autre stratégie d'oxydation a été envisagée en effectuant une oxydation de l'alcène par du KMnO_4 pour former un α,β -diol, puis traitement de ce diol par le NaIO_4 . La coupure de la liaison carbone-carbone du diol doit entraîner la formation de l'acide attendu. Après une heure d'agitation en présence de periodate, l'intégralité du produit de départ a été consommée, mais la solution était claire, ce qui n'annonçait rien de bon. Le produit attendu n'est effectivement pas obtenu et les produits formés n'ont pas pu être identifiés.

II.2.4. Métathèse.

Le reste de fluorophore **34** a été investi dans une réaction de métathèse dans l'acrylate d'éthyle en présence de catalyseur de Grubbs II dans les conditions décrites par Spessard et Stoltz en 2002.^[234] Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 36 heures sous argon, jusqu'à disparition du fluorophore de départ, contrôlé sur plaque CCM. Plusieurs produits sont formés, mais les quantités récupérées sont trop faibles pour être analysées correctement.

IV. Couplages palladium sur un brome aromatique.

La présence d'un brome aromatique sur un composé ouvre de nombreuses possibilités de modifications opérées en conditions douces ou modérées. Il est possible de lier le composé à des cycles aromatiques par couplage de Suzuki, de le coupler à des résidus alcynes par couplage de Sonogashira ou des alcènes par couplage de Heck.

IV.1. Stratégie.

Dans le cas de la fonctionnalisation du DDAO, nous nous sommes plus orientés vers un couplage de Heck. Le DDAO est un fluorophore aromatique et une fois cagé, sa solubilité aqueuse est très limitée. La taille du groupement ajouté au fluorophore doit donc être la plus faible possible pour ne pas pénaliser encore la solubilité de façon trop importante. Un acrylate ou un propargylate semblent être de bons candidats. D'après les différentes expériences acquises au laboratoire, le

couplage de Heck, dont les conditions peuvent être conservées pour différents réactifs, semble être plus simple à mettre en œuvre qu'un couplage de Sonogashira.

Nos efforts se sont donc portés sur la synthèse de composés bromés du DDAO, pouvant être engagés dans des couplages de Heck sur des acrylates.

IV.2. Synthèse de dérivés bromés du DDAO.

IV.2.1. Bromation radicalaire du DDAO.

La première tentative de bromation a été effectuée par voie radicalaire sur une petite quantité de DDAO. Le brome est fourni par du NBS et la réaction est initiée par de l'AIBN sous un flash lumineux. Les positions que nous pensions atteindre sont les suivantes :

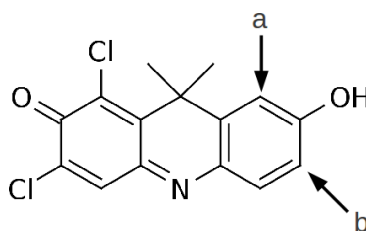


Figure III.14 : Bromations radicalaires envisagées.

Ces deux positions devraient avoir la même réactivité, la position "b" du phénol pourrait être favorisée, l'autre position pouvant subir l'influence de l'encombrement stérique des deux méthyles.

La réaction a entraîné la formation de très nombreux produits, dont la séparation n'a pas été effectuée, la masse attendue pour chaque produit étant trop faible pour pouvoir être analysée de manière correcte.

IV.2.2. Dérivés bromés du 3'-hydroxy-acétophénone.

Ne disposant plus d'un stock suffisant de DDAO pour explorer toutes les voies de bromation envisageables, il a été décidé d'effectuer cette modification sur la 3'-hydroxy-acétophénone, ce qui

permet de travailler confortablement sur de grandes quantités.

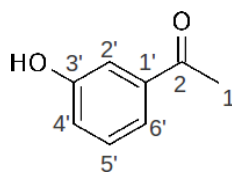


Figure III.15 : Numérotation du 3'-hydroxy-acétophénone.

Une réaction simple d'ortho-bromation des phénols a été décrite dans un brevet japonais par Hisao *et al.*^[235] Il s'agit de faire réagir la NBS sur l'hydroxyacétophénone dans le dichlorométhane à reflux. Cette méthode permet de travailler sur de très grosses quantités mais n'autorise pas un bon contrôle de la stéréospécificité de la bromation. De nombreux produits sont en effet formés. Après séparation sur colonne de silice, le composé bromé en position 2' est identifié par RMN ¹H (3 hydrogènes aromatiques, deux doublets (4') et (6') et un triplet (5'), figure de couplage typique de 3 hydrogènes aromatiques consécutifs). Les composés bromés en 4' et 6' sont différenciés par RMN ¹H (3 hydrogènes aromatiques) et par RMN 2D, en analysant la présence ou l'absence d'un couplage entre le carbone 2 et l'hydrogène porté par le carbone 4' ou 6'. Cet hydrogène présente une figure de couplage de doublet dédoublé en RMN ¹H, il est donc simple à repérer. Le carbone 2 a également une signature RMN caractéristique : δ (ppm) \approx 200. La présence d'un couplage indique le composé bromé en 4', l'absence de couplage indique le composé bromé en 6'.

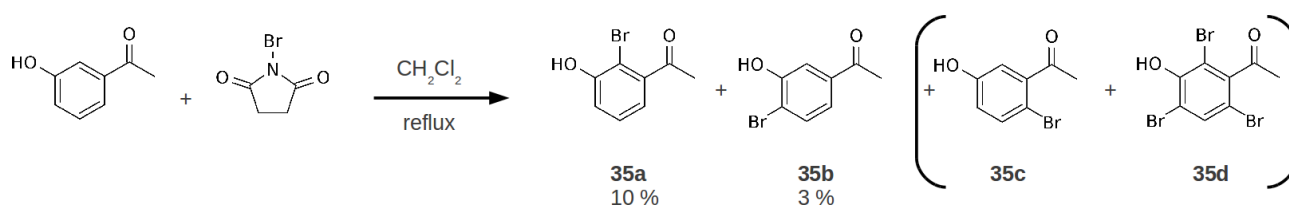


Figure III.16 : Réaction de la NBS sur l'hydroxyacétophénone.

Les produits **35c** et **35d** n'ont été obtenus qu'à travers une synthèse sur de grandes quantités.

Cette réaction mène à la formation des composés attendus, mais avec de très faibles rendements. Toutefois, comme les quantités de réactifs impliquées pour la synthèse sont élevées, les produits **35a** et **35b** sont obtenus en quantité suffisante pour la suite des réactions.

Les deux autres composés **35c** et **35d** ont été mis de coté, car ils ne présentent aucun intérêt pour la suite dans la synthèse des dérivés du DDAO.

L'étape suivante a été la réduction de l'acétophénone par le bromure de méthyle magnésium selon la réaction suivante :

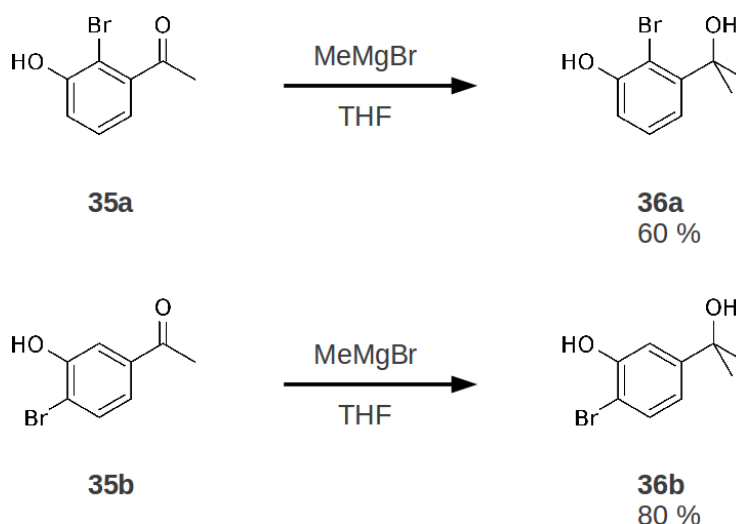
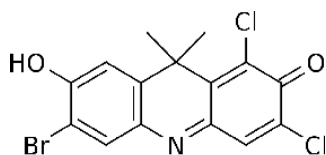


Figure III.17 : Méthylation des acétophénones bromées.

Les synthèses des dérivés bromés du DDAO ont ensuite été effectuées dans les conditions précédemment mises en œuvre pour la formation du DDAO **25** (Chapitre II, Figure **II.37**).

La cyclisation à partir du composé **36b** aboutit à la formation du dérivé bromé attendu **37** avec un rendement de 10 %.

La réaction à partir du produit **36a** n'aboutit pas à la formation du fluorophore attendu. La comparaison des analyses RMN des intermédiaires de synthèse avec l'analyse RMN du composé **33** (Figure **III.13**) nous laisse à penser que le composé **36a** a subi une substitution sur le brome. L'identification du produit formé et l'explication de la réaction ont été abandonnés faute de temps.



37

Figure III.18 : 6-bromo-1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethylacridin-2-one **37**.

IV.3. Couplage de Heck.

La totalité du composé **37** a été investie dans une réaction de Heck. Cette réaction a été menée dans un mélange de solvants : DIPEA anhydre et Xylène, dégazés soigneusement. L'acétate de palladium, en présence de tri-(*o*-tollyl)phosphine catalyse le couplage entre un brome aromatique et un alcène. Nous avons utilisé l'acrylate de méthyle afin d'introduire une fonction acide sur le fluorophore. La température du milieu réactionnel est augmentée progressivement jusqu'à 145°C. Après réaction, le brut est séparé par plaque CCM semi-préparative. La fraction migrant le plus haut est de couleur verte sur plaque et présente une faible fluorescence rouge sombre sous UV. Par extraction, nous récupérons 12,5 mg d'un produit. L'analyse RMN nous incite à croire qu'il peut s'agir de l'acrylate d'acridinone attendu.

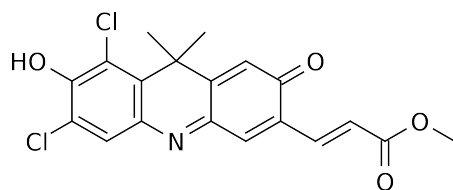


Figure III.19 : Structure attendue du dérivé du DDAO après couplage de Heck.

IV.4. Optimisation de la bromation en position 4.

Ces résultats nous ont permis de recentrer nos axes de recherches. Il nous est apparu important de développer une méthode de synthèse permettant d'obtenir le composé bromé **36b** (Figure III.17)

en quantité importante pour disposer de matériel suffisant à l'optimisation des réaction de formation du fluorophore et du couplage de Heck.

IV.4.1. Stratégie.

Deux stratégies de synthèse s'offrent à nous, présentant chacune des avantages et des inconvénients. Ces stratégies diffèrent par l'ordre des réactions qui seront effectuées, comme présenté sur la figure suivante :

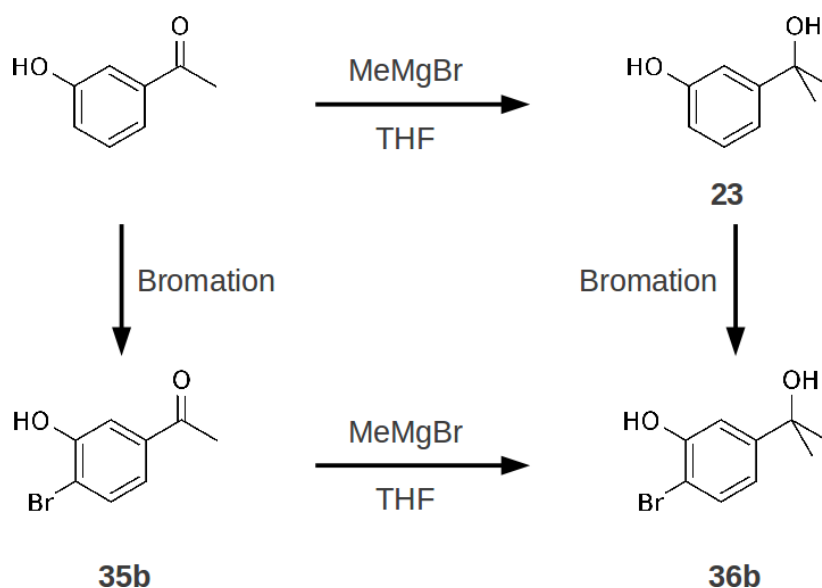


Figure III.20 : Voies de synthèse aboutissant au composé 36b.

Les deux voies de synthèse possibles sont la bromation à partir du phénol (23) ou la méthylation du dérivé 4'-bromo de l'acétophénone commercial (34b).

La stratégie consistant à effectuer la bromation dans un premier temps, puis la réduction du carbonyle, dont un exemple a été décrit auparavant, est intéressante car le composé de départ est relativement robuste et devrait supporter des conditions de réaction variées. De plus, la méthylation a montré un bon rendement et ne sera pas un facteur limitant. Il faudra en revanche composer avec le caractère électro-attracteur du carbonyle, pouvant orienter la bromation sur des positions non désirées.

En effectuant la bromation à partir du composé **23** réduit, l'orientation de l'addition ne sera plus affectée par l'influence du groupement attracteur. L'idée est que les différentes positions retrouveront une réactivité plus ou moins identiques entre elles. En contre partie, la présence d'un alcool tertiaire, en position benzylique qui plus est, limitera sans doute les conditions réactionnelles. Il ne devrait pas être possible, par exemple, de travailler en conditions acides ou sous chauffage. Le carbocation formé par déshydratation de l'alcool est en effet stabilisé par la position benzylique tertiaire, rendant cette déshydratation très facile.

Ces deux stratégies seront traitées successivement mais ont été explorées en parallèle.

IV.4.2. Bromations du phénol **23.**

Différentes voies de synthèse, reposant sur une réaction d'addition électrophile aromatique, ont été essayées à partir du phénol **23**.

Dans un premier temps, nous avons fait réagir le composé **23** directement sur le dibrome dans le THF à 0°C. Une grande partie du réactif de départ est récupéré après réaction. L'analyse du spectre RMN ¹H du brut ne montre pas les pics du produit (spectre identifié lors des premières bromations).

La présence de tétrachlorure de carbone est décrite pour parfois favoriser les monohalogénations des composés aromatiques. Nous avons donc repris cette synthèse en diluant le brome dans du CCl₄ puis de l'ajouter lentement au composé **23** dissous dans du THF. Le produit majoritairement formé ne migre pas sur plaque, ressemblant à ce que l'on observe lors d'une polymérisation des produits de réaction.

Le dibrome étant peut être trop réactif, nous avons utilisé la NBS comme donneur de brome. Nous l'avons fait réagir à froid dans le THF sur le composé **23**. La réaction ne démarrant pas dans ces conditions, le milieu réactionnel a été chauffé modérément. Le chauffage a été maintenu sur la nuit. Le produit attendu n'a pas été isolé.

IV.4.3. Bromations sur le 3'-hydroxy-acétophénone.

Nous avons utilisé les mêmes stratégies de synthèse à partir du 3'-hydroxyacétophénone. Le dibrome dans le THF entraîne la formation de nombreux composés, mais le produit attendu n'est pas isolable en quantité intéressante. La présence de CCl_4 n'apporte rien de mieux.

Nous avons également tenté de catalyser l'addition de brome par un acide de Lewis, l' AlBr_3 . Cette catalyse accélère la réaction. Bien que le dibrome réagisse seul, nous espérons que son activation permette de discriminer les différentes positions par leur facilité d'accès. La position 4' étant moins encombrée que la 2', cela aurait pu favoriser sa substitution. Mais cette tentative n'a pas été couronnée de succès.

Une substitution aromatique par l'intermédiaire d'une halogéno-amine a également été envisagée, sur le modèle de la chloration du benzaldéhyde par la N-chloropipéridine (Chapitre II, Figure **II.10**). La formation de N-bromopipéridine n'est pas envisageable car elle se dégrade violemment à l'air. Une alternative publiée en 1993 par Fujisaki *et al.* décrit l'*ortho*-bromation sélective sur des phénols fonctionnalisés en présence d'amine primaire ou secondaire.^[236] Pour cette synthèse, nous avons utilisé la n-butylamine en présence de NBS. L'intermédiaire bromo-amine doit se former *in situ* et la bromation de l'aromatique doit être effectuée dans un second temps. Si le dérivé bromé en 2' (**35a**) est effectivement obtenu avec un bon rendement de 37 %, le produit **35b** attendu n'a pas été isolé.

Une variante de cette synthèse a été essayée, en remplaçant la butylamine par de la diisopropyle amine, en espérant que son encombrement stérique limite son accès à la position 2'. Les produits isolés sont le dérivé mono-bromé en position 2' et le dibromé aux positions 2' et 4'.

Une autre piste prometteuse a été explorée en s'appuyant sur un article publié par Bovonsombat *et al.* en 2010.^[237] Il décrit la bromation du 3'-hydroxyacétophénone par la NBS en présence d'acide *para*-toluène sulfonique dans l'acétonitrile. Cette réaction est annoncée comme conduisant à la formation des produits bromés en positions 6' et 4', ainsi qu'au produit 4',6'-dibromé. Les résultats de l'analyse RMN ^1H des produits obtenus au laboratoire sont en contradiction avec ceux publiés. Le spectre du produit décrit comme le 4'-bromo (**35b**) est celui de 2'-bromo (**35a**). Toutefois, comme leur objectif était d'obtenir un phénol *para*-halogéné, ils n'ont sans doute pas approfondi l'analyse des autres produits.

IV.4.4. Bromation de l'ester 3-hydroxybenzoate de méthyle.

Une solution très satisfaisante a été obtenue en reprenant la synthèse décrite par Nie *et al.* en 2005.^[238] La réaction du dibrome sur le 3-hydroxy-benzoate de méthyle dans l'acide acétique conduit à la formation des dérivés bromés en position 4 et 6. Après séparation des produits formés, l'ester peut être réduit en alcool par 2 équivalents de MeMgBr (il faudra compter 1 équivalent supplémentaire, consommé dans l'ionisation du phénol).

L'ester méthylique a été synthétisé au laboratoire à partir de l'acide 3-hydroxycarboxylique, par estérification dans le méthanol sous catalyse acide. Le rendement de cette réaction est quantitatif. L'ester ainsi formé est ensuite solubilisé dans l'acide acétique puis du Br₂ est ajouté goutte à goutte. Après réaction, les deux produits formés, substitués en position 4 ou 6 sont séparés. L'identification des deux produits formés est faite par comparaison des spectres RMN ¹H de ces produits avec le spectre RMN ¹H de l'hydroxyacétophénone **35b** déjà caractérisé. Sa structure étant proche de celle de l'ester 4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle **39a**, on peut supposer que leurs spectres RMN sont proches également. Le produit **39b**, bromé en position 6 devrait avoir un spectre RMN plus éloigné. L'isomère bromé identifié comme étant le 4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle **39a** a été engagé dans une réaction de Grignard, puis l'analyse RMN du produit formé après méthylation a permis de confirmer les identifications effectuées après l'étape de bromation. Cette synthèse est résumée sur la figure suivante :

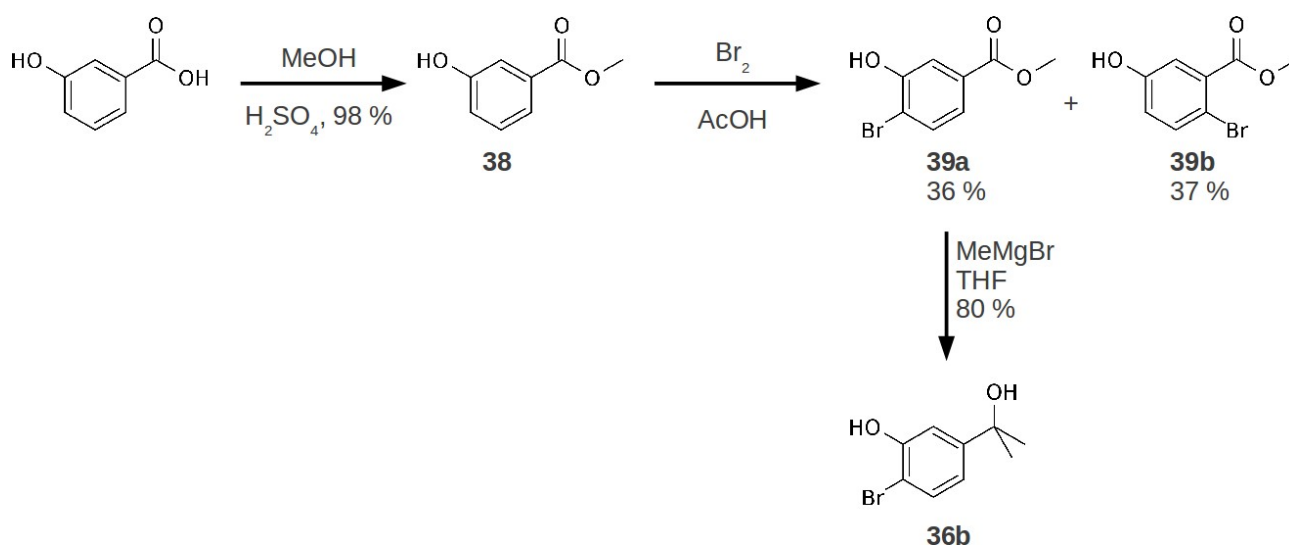


Figure III.21 : Synthèse du composé **36b** à partir de l'acide 3-hydroxybenzoïque.

La synthèse du fluorophore bromé a été relancée, mais semble être difficilement reproductible. Par manque de temps, elle a été mise en attente pour explorer une dernière stratégie de synthèse permettant la fonctionnalisation du fluorophore au niveau du cœur acridine.

V. Dérivés aminés du DDAO.

La présence d'une fonction amine pourrait permettre de rendre un même dérivé du DDAO compatible avec deux applications différentes.

La première application est l'insertion de la fonction acide carboxylique recherchée par l'intermédiaire de la formation d'une liaison amide entre le fluorophore et un diacide.

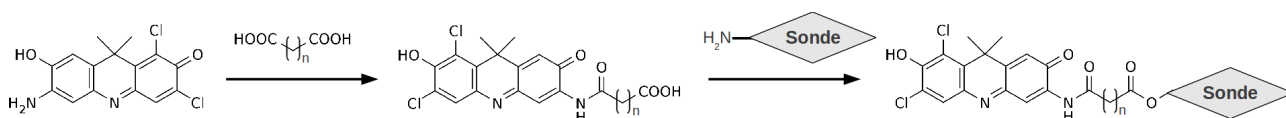


Figure III.22 : Insertion de la fonction acide carboxylique par réaction d'un dérivé aminé du DDAO sur un diacide.

La seconde application est la mise au point d'un dérivé pro-fluorescent du DDAO, sensible à l'action des thiols. Une coumarine pro-fluorescente réactive aux thiols a été décrite par Yi *et al.* en 2009.^[27] Suite à la réaction de l'amine sur l'anhydride maléïque, un transfert d'électron photo-induit éteint la fluorescence de la coumarine. La réaction d'un thiol sur le système maléïque par addition de Michael en modifie l'état électronique, ce qui se traduit par une annihilation du transfert d'électron et une restauration de la fluorescence.

Il pourrait être intéressant d'étudier les effets de la transposition d'un tel système sur le DDAO, bien que cela ne soit pas une priorité sur ce projet.

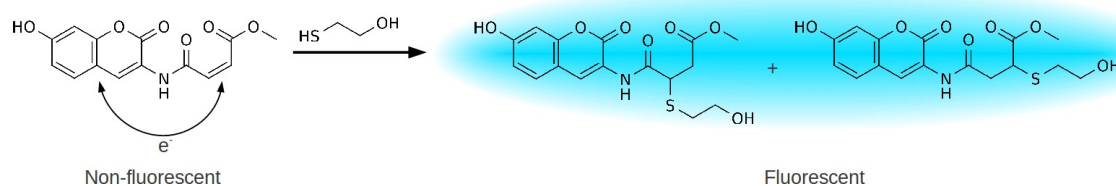


Figure III.23 : Activation de la fluorescence d'une coumarine par addition 1,4 d'un thiol sur un groupement maléamide. D'après Yi *et al.*^[27]

Notre stratégie de synthèse a été inspirée de celle décrite par Yi *et al.*^[27]. La réaction spontanée de l'amine aromatique de la coumarine sur l'anhydride maléïque est intéressante et pourrait être appliquée à d'autres anhydrides comme l'anhydride succinique. La réaction d'une amine aromatique portée par le DDAO pourrait être suffisante pour réagir sur cet anhydride et ainsi incorporer la fonction acide attendue sur le fluorophore.

La réaction de couplage sera peut être plus difficile à initier à cause du pKa du phénol du DDAO (pKa = 5) plus faible que le pKa de la coumarine décrite (7-hydroxycoumarine, pKa = 8-9) et proche d'une amine aromatique. Le couple anilinium/aniline a en effet un pKa de 4,6-4,7. Un équilibre entre le phénate et l'ammonium n'est donc pas à exclure sur l'acridinone. Un tel équilibre demanderait une activation basique pour le couplage. Le couplage semble toutefois simple à mettre en œuvre et la synthèse d'un dérivé amino du DDAO une voie de fonctionnalisation intéressante.

V.1. Stratégies de synthèse.

Nous avons envisagé deux stratégies de synthèse pour introduire la fonction NH₂, illustrées figure suivante :

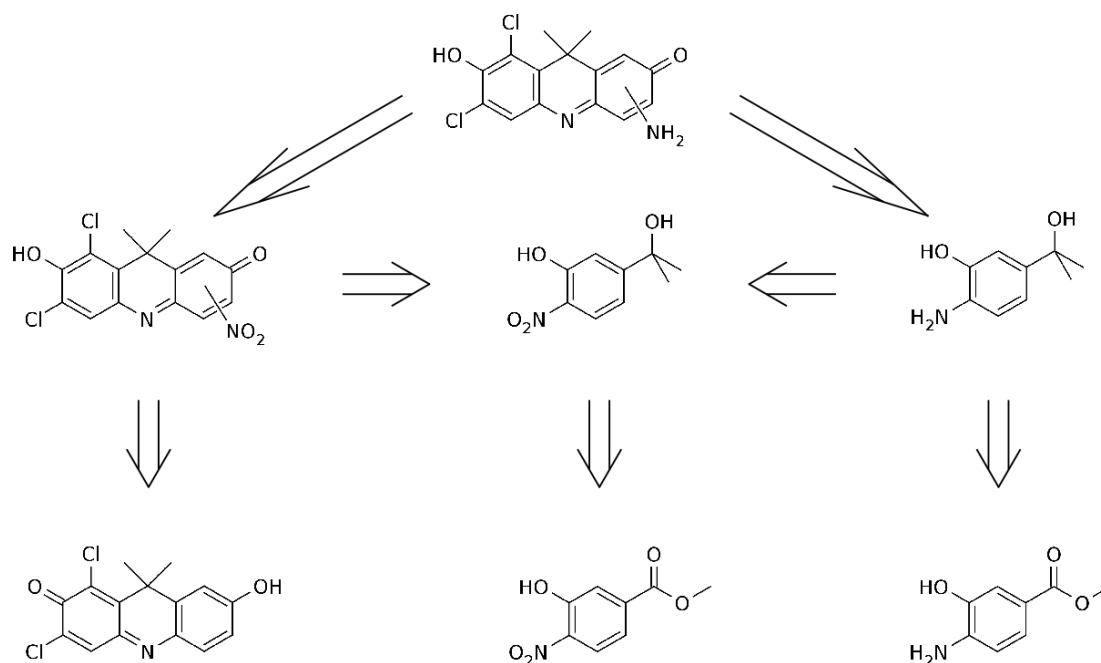


Figure III.24 : Schéma rétrosynthétique de la formation du dérivé aminé du DDAO.

Comme cela est représenté sur la Figure III.24, les voies possibles de synthèses sont

nombreuses. Néanmoins, les voies directes seront explorées en priorité, à savoir la nitration du DDAO, puis la réduction de la fonction *nitro*, ainsi que la réduction de l'ester benzyliques *amino* commercial. Les "passages" entre voies directes seront explorés en cas d'impasse sur ces voies de synthèse directes. La réduction de l'ester *nitro* sera effectuée en parallèle car le temps investi sur cette réaction n'est pas très important et surtout, cela nous donnera un accès rapide à une porte de sortie en cas de difficultés avec le dérivé *amino*.

V.2. Synthèse par nitration du DDAO.

La première voie de synthèse étudiée a été la nitration du DDAO, puis réduction du *nitro* en amine.

Cette voie présente l'avantage de travailler sur un fluorophore dont la synthèse est déjà connue, et cela limite ainsi le nombre de nouvelles étapes de synthèse à élaborer.

Une nitration par l'acide nitrique dans un mélange sulfonitrique a été écartée car elle est effectuée dans des conditions acides très dures. Afin de préserver au maximum l'intégrité du DDAO, nous avons opté pour une nitration par le NO_2BF_4 dans l'acétonitrile. Ce réactif permet de travailler à basse température et en s'affranchissant des conditions acides fortes rencontrées lors de nitrations classiques.

La réactivité du NO_2BF_4 est bonne, l'intégralité du DDAO de départ est consommé en 2 heures environ (disparition du produit sur plaque CCM de contrôle). La purification du brut réactionnel sur plaque CCM semi-préparative permet de récupérer le produit attendu **40** avec un rendement de 26 %.

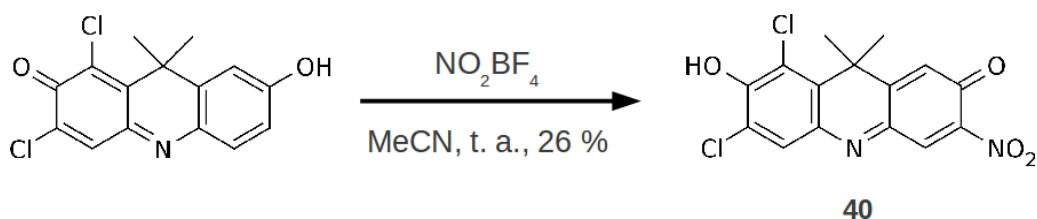


Figure III.25 : Synthèse du NO_2 -DDAO **40**.

L'étape suivante a été la réduction du groupement *nitro* en amine. Le premier essai a été effectué

par une réduction à l'hydrosulfite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. L'utilisation de ce réducteur, dont l'efficacité est relativement faible, a été envisagée car il est utilisé dans la synthèse du DDAO (Chapitre II, Figure II.37). Il ne devrait donc pas être nocif pour le squelette acridine du fluorophore. Le NO_2 -DDAO **40** a été agité avec l'hydrosulfite de sodium dans un mélange eau / méthanol jusqu'à disparition du produit de départ. Le produit *amino* attendu **41** a été isolé par purification sur CCM semi-préparative. Le rendement de la réaction est toutefois très faible et le volume de produit récupéré est trop faible pour être engagé dans des réactions de couplage ultérieures.

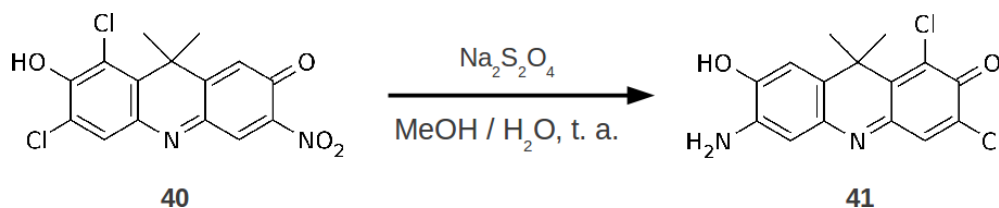


Figure III.26 : Synthèse du NH_2 -DDAO **41**.

Pour augmenter les rendements de la réduction du *nitro* en amine, une hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon a été effectuée. Le NO_2 -DDAO **40** a été solubilisé dans du méthanol en présence de catalyseur Pd/C puis agité une nuit sous atmosphère de dihydrogène. Aucune conversion n'a été observée après une nuit (contrôle sur plaque CCM), cette réaction a donc été arrêtée.

La faible efficacité de la réaction de nitration ainsi que les difficultés rencontrées pour la réduction du groupement *nitro* en amine impliquent de travailler sur des quantités initiales importantes de DDAO. Ce fluorophore est issu d'une synthèse effectuée au laboratoire, la quantité de produit disponible est donc limitée et coûteuse en temps. Nous avons donc décidé de mettre cette stratégie de nitration/réduction sur le fluorophore en attente et nous reporter sur la modification des synthons de départ, les esters méthyliques des acides 3-hydroxy-4-nitrobenzoïque et 4-amino-3-hydroxybenzoïque, commercialement disponibles et accessibles en quantité plus importante.

V.3. Synthèse à partir d'esters d'acides benzoïques.

V.3.1. Méthylation des produits commerciaux.

Les réductions des deux esters d'acides benzoïques commerciaux ont été effectuées en parallèle.

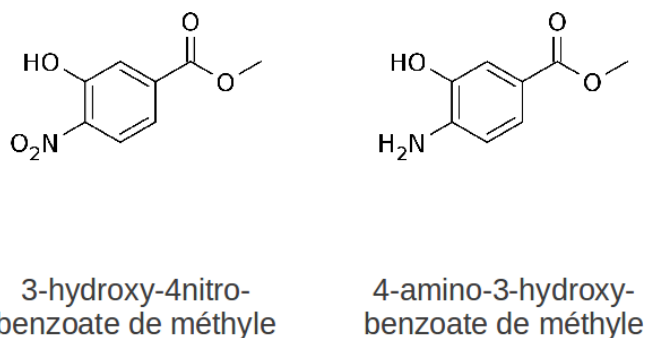


Figure III.27 : Esters des acides benzoïques nitro et amino commerciaux.

Les conditions de Grignard étant très basiques, la présence d'une amine et d'un phénol sur la même molécule induit un très fort risque de précipitation. L'amine déprotonée est également susceptible de réagir sur l'ester. Nous nous attendions donc à une réaction difficile. Le composé *nitro* nous semblait plus apte à réagir proprement, bien que des additions nucléophiles aromatiques par des organo-magnésiens aient été décrites sur des composés nitrés portant une fonction carbonyle, sans que celle-ci ne soit affectée. Toutefois, ces réactions ont été décrites à très basse température et nous espérons qu'à température ambiante, l'ester soit suffisamment réactif pour que la réaction soit relativement propre.

La réaction a été effectuée dans les mêmes conditions que les réactions de Grignard précédentes, avec 3 équivalents de magnésien pour l'ester *nitro* et 4 pour l'ester *amino*, la déprotonation de l'amine consommant un équivalent de réactif. Les deux synthèses ont conduit à la formation de très nombreux composés, présentant une trainée presque continue sur la CCM de contrôle. La purification et l'analyse de ces produits n'a rien donné de concluant.

Pour éviter les réactions parallèles en conditions basiques, rencontrées lors des réductions de Grignard, la fonction amine doit être protégée. Une protection concomitante du phénol est parfaitement envisageable et permettrait de s'affranchir du phénomène de précipitation du phénol en fin de méthylation par le bromure de méthyle magnésium.

V.3.2. Protection de l'amine du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

Le composé *nitro* étant impossible à protéger, cette voie de synthèse a été écartée.

De nombreux groupements protecteurs résistants aux conditions de la réaction de Grignard ont été décrits pour protéger les amines. Un groupement idéal dans notre cas serait un groupement protégeant également le phénol. En effet, la présence d'un éther, non réactif aux organo-magnésiens, permettra de s'affranchir de la formation du phénate et ainsi du problème de précipitation rencontré avec le phénol. La déprotection du phénol doit pouvoir être effectuée séparément de celle de l'amine. Cela permet en effet de régénérer le phénol libre, nécessaire à la première étape de la synthèse du fluorophore tout en gardant l'amine masquée et ainsi évitant toute réactivité parasite.

Le groupement benzyle a retenu notre attention. Il permet en effet de protéger les phénols et les amines et la réaction de protection se fait dans les mêmes conditions, semblables aux conditions de Williamson, par réaction sur le bromure de benzyle dans la DMF à chaud, en présence de K_2CO_3 et de KI. La déprotection est généralement décrite par hydrogénolyse catalysée. Toutefois, d'autres méthodes existent pour la déprotection de ce groupement.

Jung *et al.*^[239] a décrit un clivage très efficace d'un éther benzylique de cyclohexane en utilisant l'iodure de triméthylesilane dans le chloroforme à température ambiante.

La déprotection de la dibenzyle amine peut être effectuée en conditions acides à chaud (HBr ou HCl à reflux).^{[240][241]} Comme l'étape de cyclisation lors de la synthèse du fluorophore est effectuée dans un mélange $HCl_{aq}/MeOH$ à reflux, il est envisageable que la déprotection de l'amine se fasse *in situ*.

Dans le cas où les conditions ne seraient pas suffisantes au clivage des groupements benzyles de l'amine, des techniques alternatives seront utilisées, comme une photolyse 405 nm en présence de 9,10-dicyano-anthracène^[242] ou une hydrogénolyse catalysée par le palladium en présence d'acide formique.^[243]

La synthèse envisagée est représentée Figure **III.28**.

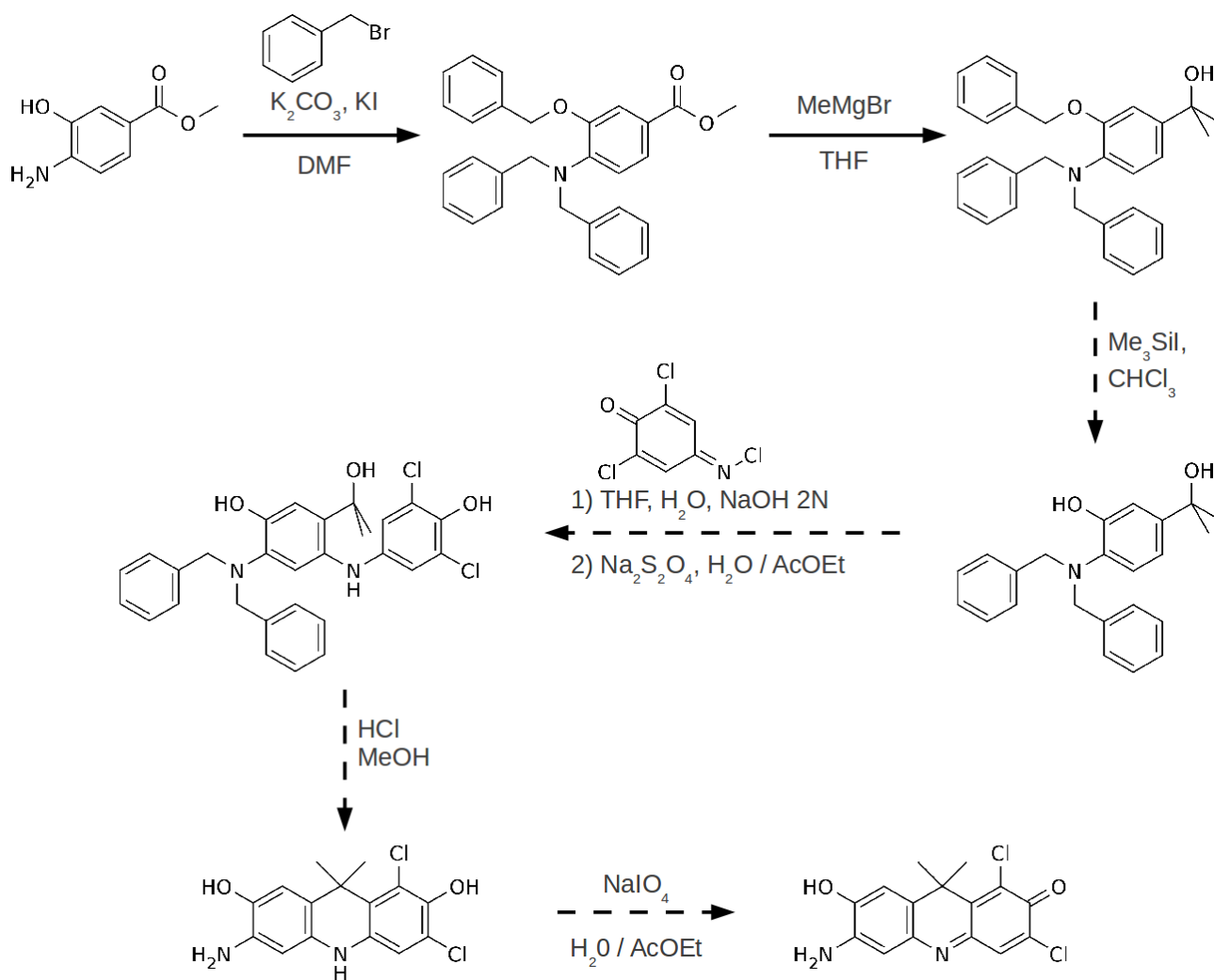


Figure III.28 : Synthèse envisagée à partir du 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle.

L'étape de protection effectuée dans le DMF anhydre à 120°C a donné un résultat qui n'était pas complètement attendu. La RMN ^1H du produit principal formé présentait des signaux et des intégrations qui ne correspondaient pas avec le composé attendu tri-benzylé. Une analyse en masse nous a indiqué que le produit **42** portait 4 groupements benzyles. Ce résultat peut être expliqué par une saponification préalable de l'ester benzylique.

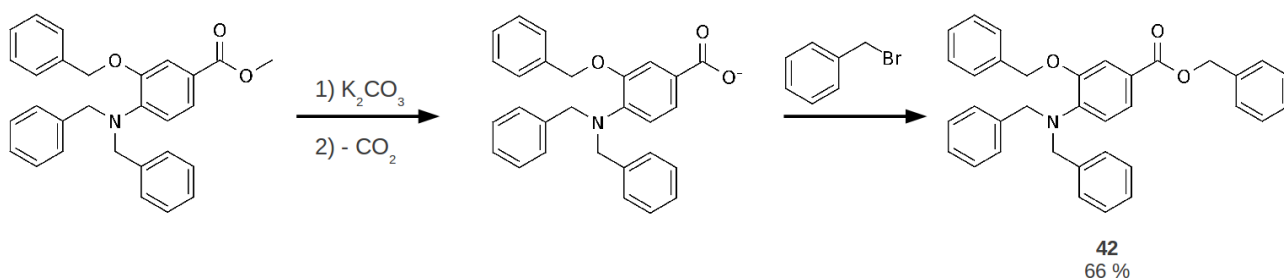


Figure III.29 : Mécanisme proposé pour la formation du composé **42**.

Le produit obtenu n'est pas exactement le produit attendu. Néanmoins, cela ne portera aucun préjudice à la suite de la synthèse. L'ester benzylique sera, de même que l'ester méthylique initial, réactif au bromure de méthyle magnésium.

L'étape de réduction de l'ester a été facilitée par la présence du O-benzyle. Le composé **42** a été solubilisé dans le THF puis le mélange est refroidi à 0°C. Le MeMgBr est ensuite ajouté en une fois. Le composé **43** est obtenu avec un rendement quantitatif.

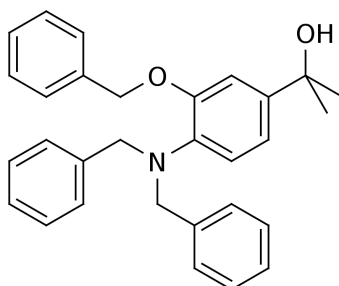


Figure III.30 : Composé **43**.

Après la réduction de l'ester, le phénol doit être libéré afin de pouvoir initier la cyclisation du fluorophore. La déprotection est effectuée dans les conditions décrites par Jung *et al.*^[239] en présence d'un équivalent de Me₃SiI. Après réaction, du méthanol est ajouté au milieu réactionnel pour dégrader l'éther de triméthyle silane formé et régénérer le phénol. La RMN ¹H ne correspond pas à celle du produit attendu. Un singulet à 3,06 ppm intégrant pour 3 hydrogènes n'était pas attendu et les pics correspondant aux benzyles sont toujours présents. Le spectre de masse nous permet d'identifier formellement le produit comme étant l'éther méthylique du composé **41**. L'alcool étant plus réactif que l'éther, la totalité du Me₃SiI a été employée à la formation de l'éther de silane à

partir de l'alcool. Le méthanol ajouté en fin de réaction a réagi sur le carbone benzylique, profitant de la qualité de groupe partant de l'oxyde de triméthyle silane. La Figure III.30 illustre cette réaction.

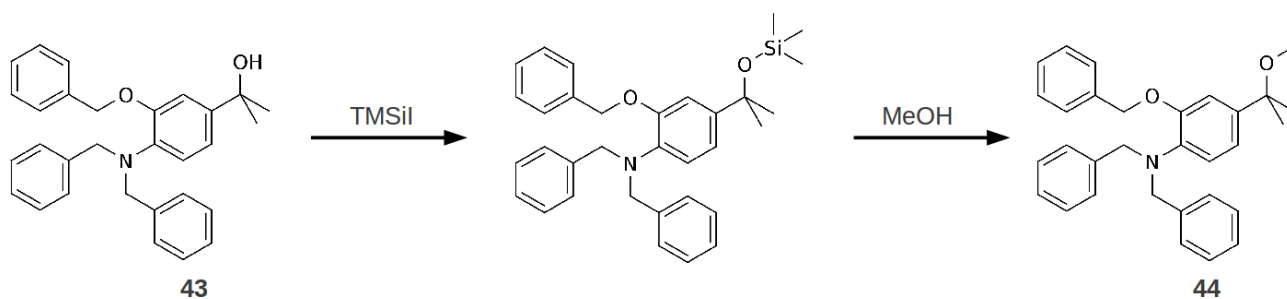


Figure III.31 : Réaction avec l'iodure de triméthylesilane.

Il semble possible d'obtenir le produit attendu en modifiant les conditions réactionnelles. Comme le premier équivalent de Me_3SiI est consommé par l'alcool, l'ajout d'un équivalent supplémentaire devrait agir sur l'éther benzylique. Une deuxième modification à apporter au mode opératoire est le traitement de la réaction. En traitant le produit formé avec de l'eau, en lieu et place du méthanol, la fonction alcool devrait être reconstituée. Nous n'avons toutefois pas eu le temps de vérifier cette hypothèse en relançant la déprotection dans ces nouvelles conditions.

VI. Modifications du pont diméthyle.

La deuxième stratégie de synthèse, présentée en début de chapitre, aboutissant à l'insertion d'une fonction acide sur le fluorophore est la modification chimique des deux méthyles présents en position 9 du squelette acridine.

Ces deux méthyles n'étant pas benzyliques, leur réactivité est limitée. Nous avons donc préféré effectuer les modifications en amont, par insertion d'un bras fonctionnalisé sur un dérivé de l'acétophénone.

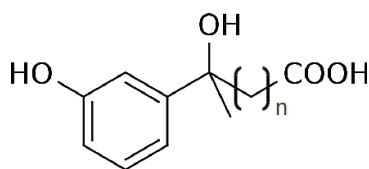


Figure III.32 : Structure générale du synthon recherché.

VI.1. Insertion d'un acide carboxylique aliphatique.

La première voie de synthèse explorée est l'insertion d'une chaîne portant une fonction acide. En partant de l'acridinone, une réaction organo-métallique semble appropriée. Différents acides carboxyliques aliphatiques portant un brome sur le carbone terminal sont disponibles commercialement.

Toutefois, la transformation directe d'un bromo-acide en magnésien ne peut pas être effectuée. En effet, une fois le magnésium inséré, le composé devient une base très forte. Il sera donc instantanément consommé en arrachant un proton acide.

Neutraliser l'acide par une base organique pourrait éviter cette réaction parasite. Mais dans ce cas, le carboxylate risquerait de précipiter dans le THF, comme nous avons eu le problème avec l'acétophénone.

VI.1.1. Couplage avec un organo-magnésien.

Une première réponse a été apportée par les travaux de Ren *et al.* en 2004,^[244] décrivant la formation d'un dérivé magnésien sur un ester aliphatique. Le réactif est préparé en deux temps, puis est mis en présence d'un carbonyle pour former l'alcool correspondant, comme illustré ci-dessous :

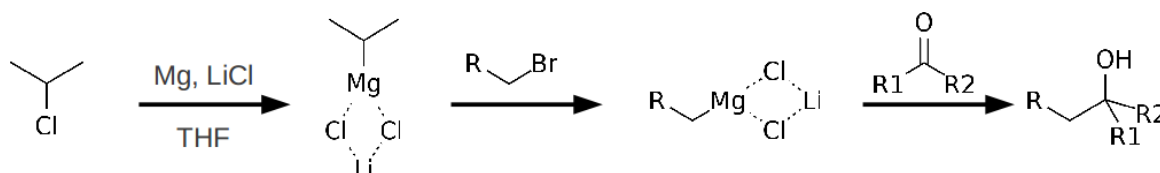


Figure III.33 : Préparation et réaction d'un composé $R-MgCl \cdot LiCl$. D'après Ren *et al.*^[244]

Nous avons préparé, dans un premier temps un ester portant un brome sur le carbone terminal à partir de l'acide 6-bromo-hexanoïque à travers la réaction suivante :

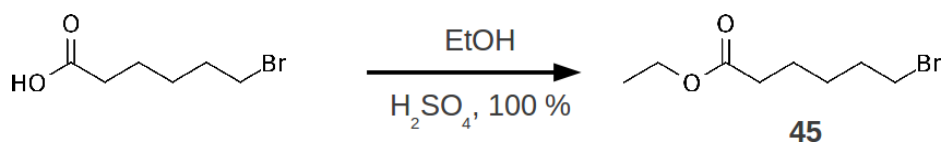


Figure III.34 : Synthèse du 6-bromohexanoate d'éthyle **45**.

En parallèle, du chlorure d'isopropyle est dissous dans du THF et mis à réagir avec du magnésium en présence de LiCl afin de former un intermédiaire réactif $i\text{Pr-MgCl}\cdot\text{LiCl}$. Après réaction, le composé **45** est ajouté au milieu réactionnel pour former l'organo-magnésien **47**.

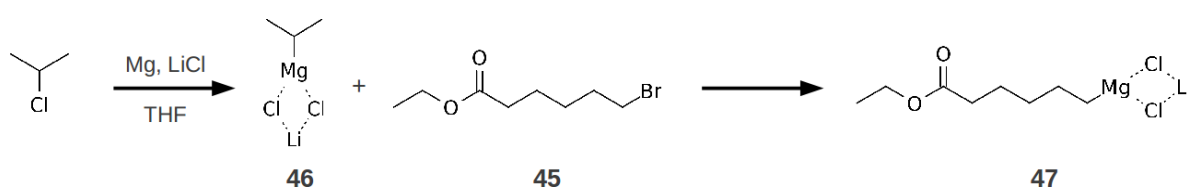


Figure III.35 : Synthèse de l'organo-magnésien **47**.

La préparation du composé **47** étant le facteur limitant dans l'obtention du dérivé phénolique attendu, nous ne voulions pas en sacrifier lors de la réaction sur l'acétophénone. Comme ce composé n'est pas décrit comme étant réactif vis à vis des esters, nous avons décidé d'acétyler la 3'-hydroxy-acétophénone. Ainsi, un seul équivalent de composé **47** sera nécessaire à l'obtention de l'alcool tertiaire précurseur du fluorophore.

Le 3'-acétoxyacétophénone **48** a été obtenu facilement par réaction du 3'-hydroxy-acétophénone sur de l'anhydride acétique en présence de pyridine, avec un rendement quasi quantitatif.

La réaction du magnésien **47** sur ce composé a par contre réservé une surprise. Le produit récupéré après réaction est le 3'-hydroxy-acétophénone. Le magnésien a réagi sur l'ester pour libérer le phénol. La réactivité du magnésien sur l'ester, non attendue, peut s'expliquer par les propriétés de groupe partant du phénol, jouant probablement le rôle de force motrice dans la réaction.

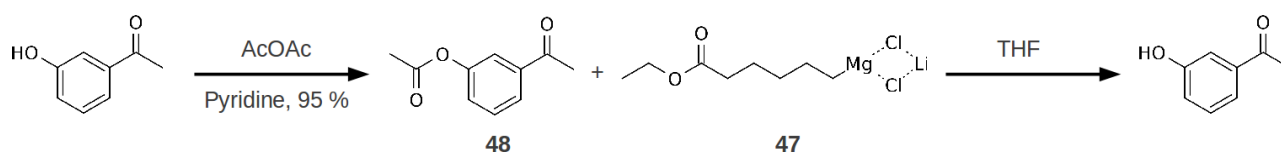


Figure III.36 : Synthèse du 3'-acétoxy-acétophénone **48** et réactivité du magnésien **47**.

VI.1.2. Couplage avec un organo-zincique.

Afin de favoriser la réaction sur le carbonyle, nous avons décidé d'effectuer cette réaction sur un composé plus réactif, le chlorure de 3-méthoxybenzoyl. L'organométallique réagira sans problème sur le chlorure d'acide pour former la cétone correspondante. Toutefois, un organo-magnésien est susceptible de réagir sur cette cétone, bien qu'elle soit moins réactive que le chlorure d'acide de départ. Le bis-adduit pourra ainsi être synthétisé, diminuant de fait le rendement de la formation du mono-adduit souhaité. Nous avons donc décidé de travailler avec un organo-zincique, moins réactif que le magnésien, décrit pour ne pas réagir spontanément sur le carbonyle d'une cétone ou d'un aldéhyde.^[245] La réaction s'arrêtera donc à la cétone, sur laquelle pourra réagir, dans un deuxième temps, le bromure de méthyle magnésium. La déprotection du phénol sera effectuée en dernière étape.

La préparation de l'organozincique se fait à partir de zinc activé par transfert d'électron généré par du lithium et stabilisé par du naphthalène, dans les conditions décrites par Zhu *et al.* en 1991.^[245] Le zinc activé est ensuite mis en présence de 4-bromo-butanoate d'éthyle pour former le bromure de 4-zincbutanoate d'éthyle **49**. La formation de l'organozincique est contrôlée par le suivi, en RMN ¹H, de la disparition du pic correspondant au CH₂-Br (3,46 ppm) et l'apparition d'un pic -CH₃ (1,04 ppm) suite à l'hydrolyse d'un aliquot prélevé dans le milieu réactionnel. Cette préparation est résumée Figure III.37.

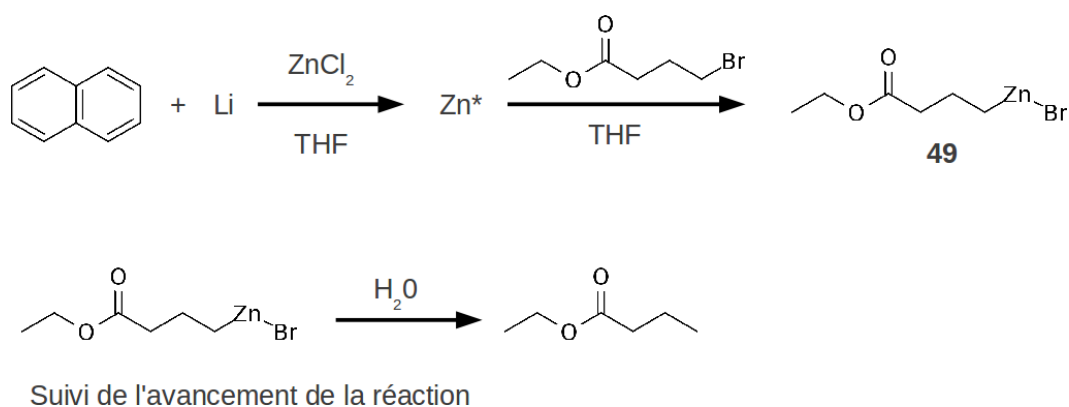


Figure III.37 : Synthèse de l'organo-zincique **49** et suivi de la réaction.

L'organo-zincique réagit ensuite sur le chlorure de 3-méthoxybenzoyle pour former le produit **50** avec un rendement assez mauvais de 26 %. L'ester éthylique est ensuite saponifié pour obtenir l'acide correspondant **51**. En effet, la présence de l'ester lors de la méthylation entraînerait le risque de sa réduction en alcool tertiaire, interdisant toute réoxydation pour régénérer la fonction acide qui nous intéresse.

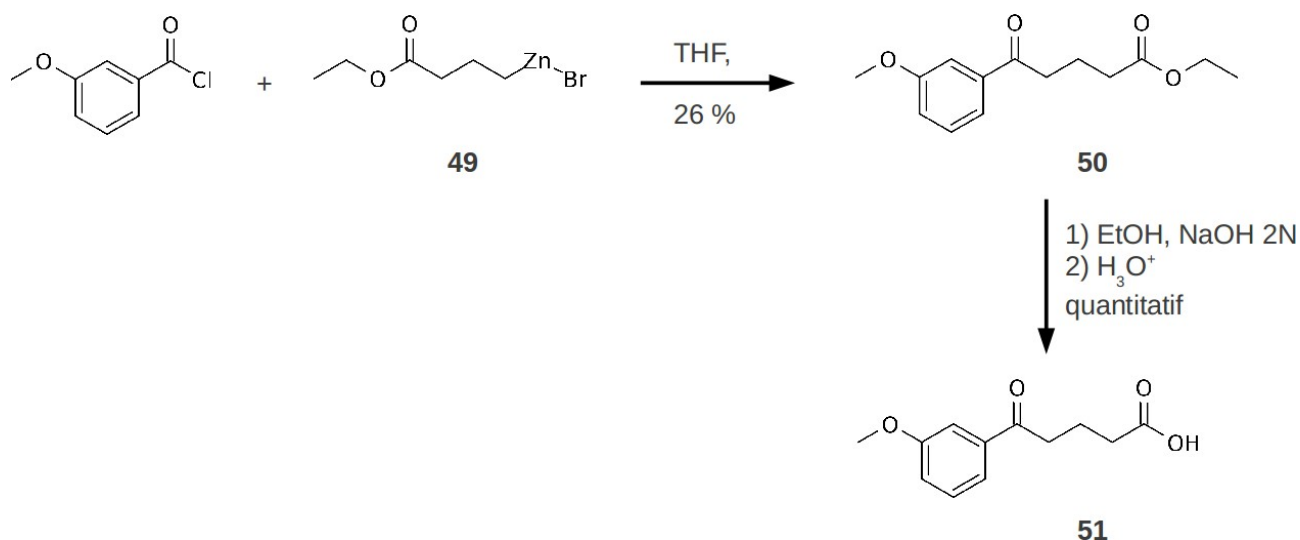


Figure III.38 : Couplage de l'organo-zincique **49** et le 3-méthoxy-benzoyle, puis saponification de l'ester éthylique **50** pour former le composé **51**.

Le composé **51** ainsi obtenu a été engagé dans une réaction de Grignard afin de réduire la cétone et d'obtenir le synthon précurseur du fluorophore qui nous intéresse. Le produit récupéré n'est pas le produit attendu. Il ne présente en effet pas le signal caractéristique du méthyle en RMN ^1H (singulet

attendu entre 1,5 et 2 ppm par analogie au signal des méthyles du DDAO, mais intégrant ici pour 3 hydrogènes) mais semble être un produit de cyclisation, dont la structure n'a pas pu être établie.

VI.2. Insertion d'un alcool aliphatique.

Une dernière stratégie de synthèse a été imaginée à partir du 4-bromobutane-1-ol.

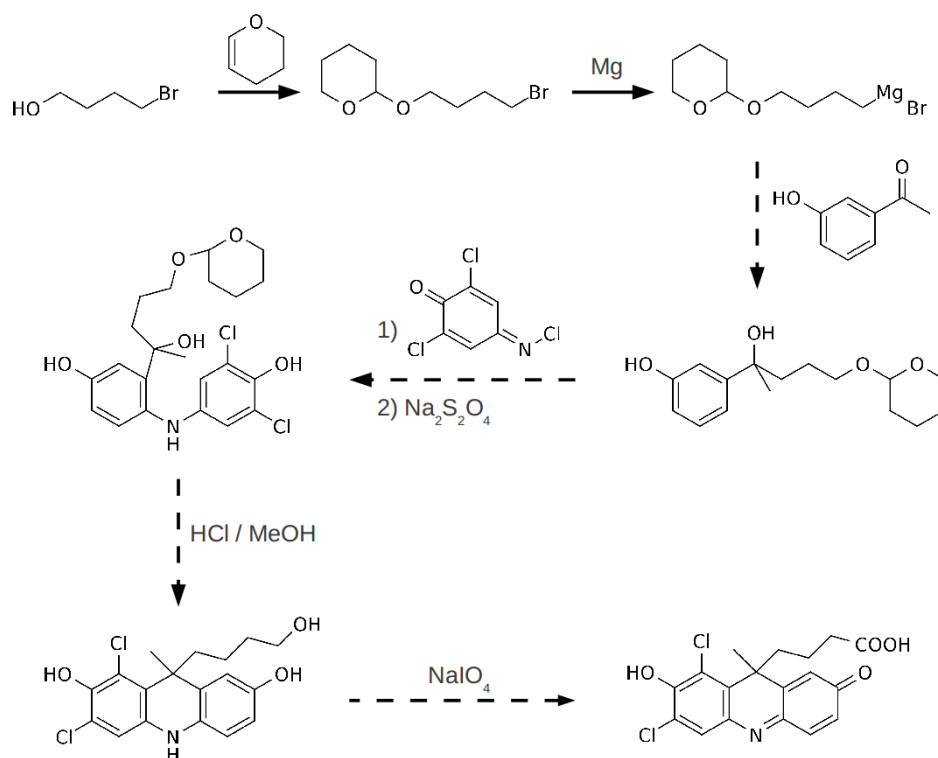


Figure III.39 : Voie de synthèse imaginée à partir du 4-bromobutane-1-ol.

L'alcool sera protégé dans un premier temps par un groupement tétrahydropyrane (THP), afin de ne pas être déprotoné lors de la préparation du magnésien. Après incorporation du magnésium, une réaction de Grignard sera effectuée sur la 3'-hydroxy-acétophénone, puis le produit obtenu sera directement investi dans la réaction de cyclisation avec le réactif de Gibbs.

Le groupement protecteur THP semble parfaitement adapté à cette voie de synthèse. Il est en effet résistant vis à vis des réactions de Grignard ainsi qu'aux conditions basiques rencontrées en début de cyclisation. Sa déprotection se fait en milieu acide. Il est donc légitime d'imaginer une déprotection *in situ* lors de l'étape de fermeture du cycle central, effectuée dans HCl à reflux, pour

libérer l'alcool. Enfin, la dernière étape étant une étape d'oxydation, l'alcool pourra être directement oxydé en acide correspondant. Cette voie de synthèse permet donc de s'affranchir des étapes de déprotection et d'oxydation et devrait permettre d'obtenir le fluorophore en un minimum d'étapes.

La protection de l'alcool est effectuée facilement dans le dichlorométhane par réaction de l'alcool sur le 2,3-dihydropyrane en présence d'acide *para*-toluène sulfonique. Le rendement du produit isolé n'est que de 75 %, mais comme le produit est invisible sur plaque, la purification s'est faite en aveugle et le rendement réel est sans doute plus élevé.

La formation du magnésien est effectuée dans le THF anhydre, après activation du magnésium par des cristaux d'iode. La formation du magnésien est suivie comme décrit précédemment pour l'organo-zincique, par hydrolyse d'un aliquot prélevé dans le milieu réactionnel et analyse RMN ^1H en suivant la disparition du pic du $-\text{CH}_2\text{-Br}$ et l'apparition d'un pic $-\text{CH}_3$. Toutefois, ce procédé n'est pas optimal, car il est impossible de différencier les résultats de l'hydrolyse effectuée volontairement pour l'analyse de ceux d'une éventuelle hydrolyse parasite qui serait survenue dans le milieu réactionnel. Une alternative serait de traiter l'aliquot prélevé par un lithien, comme le méthyle lithium et de contrôler l'apparition d'un carbone ou de 3 hydrogènes supplémentaires en RMN ^{13}C ou ^1H .

Après formation du magnésien, le produit est engagé dans une réaction avec le 3'-hydroxyacétophénone dans les conditions similaires à la synthèse du DDAO (Chapitre II, Figure II.37). Malheureusement, l'ajout de l'acétophénone a sans doute été trop rapide et une prise en masse est apparue avant que la réaction ait pu avoir lieu.

Les synthèses effectuées à partir du 4-bromo-butane-1-ol sont résumées Figure III.40.

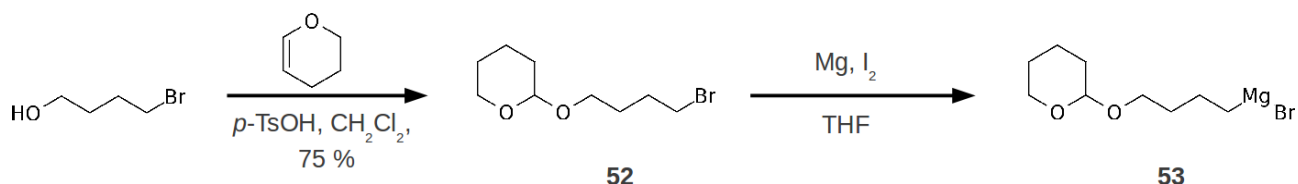


Figure III.40 : Synthèse des composés 52 et 53 à partir du 4-bromo-butane-1-ol.

Le temps a joué contre nous et il n'a pas été possible de relancer cette synthèse en date de rédaction du manuscrit.

VII. Conclusion.

A travers ces réactions, nous avons exploré une très grande partie des possibilités de fonctionnalisation du fluorophore DDAO. Bien qu'aucune des voies de synthèse envisagées n'ait été validée par l'obtention d'un fluorophore couplé à un motif de reconnaissance vis à vis d'une protéine, certaines synthèses, inachevées faute de temps, sont prometteuses et nécessitent d'être reprises.

Deux stratégies de synthèse en particulier, à partir du bromobutanol et de l'ester benzylique *amino*, doivent être poursuivies. Elles n'ont en effet pas été arrêtées par manque de réactivité, mais à cause du temps qui a joué contre nous.

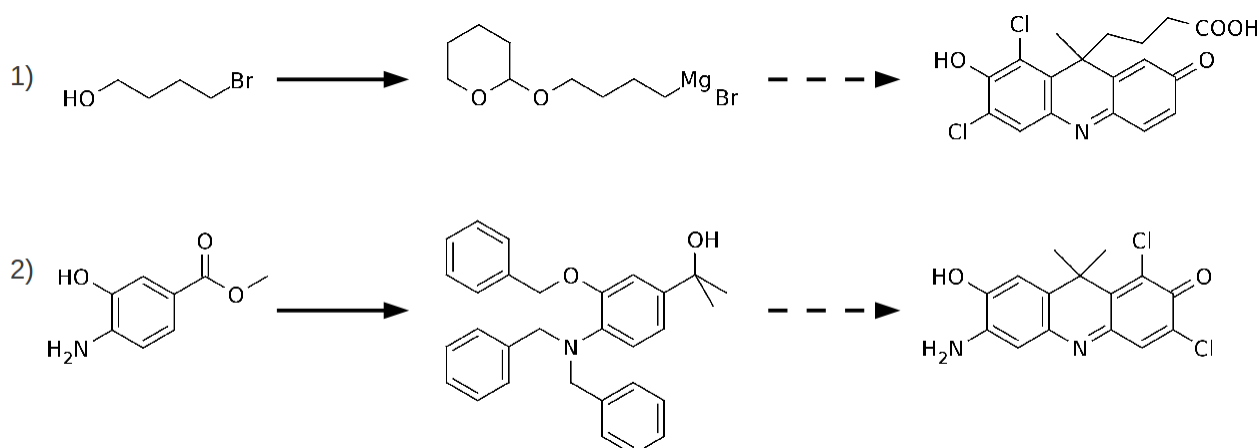


Figure III.41 : Voies de synthèse prometteuses, devant être poursuivies.

1) à partir du 4-bromo-butane-1-ol, Figure III.39.

2) à partir du 4-amino-3-hydroxy-benzoate de méthyle, Figure III.28.

Ces deux synthèses sont prometteuses et permettraient d'obtenir un fluorophore DDAO fonctionnalisé sur deux positions différentes, ce qui susceptible d'augmenter ses possibilités d'utilisation, et par là même son intérêt en biologie.

Chapitre IV

Perspectives

Mes travaux, effectués au cours de ma thèse de doctorat, ont permis de développer et de caractériser un nouveau fluorophore photo-activable émettant hors du champ d'auto-fluorescence des cellules, le PENB-DDAO. Ce composé présente de bonnes propriétés de photolyse à 1 photon et de très bonnes propriétés à 2 photons. Il est de plus compatible avec des expérimentations sur systèmes vivants.

On ne peut toutefois pas encore parler de sonde car rien ne lui permet, à l'heure actuelle, de reconnaître une protéine d'intérêt dans une cellule.

Pour pouvoir être couplé à un motif de reconnaissance et ainsi former une sonde fonctionnelle, de nombreuses voies de synthèses ont été explorées pour obtenir un dérivé du fluorophore DDAO portant une fonction acide carboxylique.

Deux voies de synthèse semblent plus prometteuses et passent par l'insertion d'une fonction amine sur le cœur acridinone du fluorophore ou la substitution d'un des deux éthyles par un alcool aliphatique, qui sera ensuite oxydé en acide.

Pour l'avenir du développement d'une sonde à cœur DDAO, ces deux voies de synthèses doivent être reprises, en corrigeant les erreurs qui en ont causé l'arrêt, et être validées.

Une fois les synthèses des fluorophores achevées, il faudra s'assurer que leurs propriétés de physico-chimiques (longueurs d'onde, brillance, solubilité, pKa...) ne sont pas altérées par rapport à celles du DDAO. Il faudra donc caractériser ces nouveaux fluorophores de la même manière que le DDAO l'a été.

Les nouveaux fluorophores seront ensuite couplés aux motifs de reconnaissance NDA et O-benzyleguanine, puis leurs propriétés physico-chimiques seront contrôlées à nouveau.

Avant d'entreprendre la synthèse de la sonde photo-activable finale, des expérimentations sur cellules vivantes seront menées avec les fluorophores fonctionnalisés. Cette étape est nécessaire, car il nous manque des informations sur le devenir du fluorophore dans les cellules.

Les expérimentations menées précédemment nous ont simplement indiqué que les acétates de DDAO et le PENB-DDAO pouvaient pénétrer dans les cellules après une simple incubation et que la photo-activation était effective. Mais les fluorophores demeuraient libres dans le cytoplasme et

leur concentration élevée. Nous n'avons pas observé de baisse notable de la fluorescence, mais du fait de la forte concentration, une dégradation lente ou modérée du fluorophore a pu passer inaperçue.

La marquage d'une protéine largement présente dans la cellule, comme de l'actine, avec le fluorophore fonctionnalisé, mais non cagé, permettra d'avoir une image fixe du fluorophore dans le milieu cellulaire. On pourra ainsi visualiser de manière plus pertinente la stabilité, ou l'instabilité, du DDAO dans la cellule.

La marquage sera préférentiellement effectué avec le DDAO couplé à une O-benzyle guanine, qui se liera de manière covalente au SNAP-tag exprimé en fusion avec l'actine. La formation d'une liaison covalente permettra d'effectuer un lavage post-incubation et ainsi obtenir une image propre du cytosquelette.

Les informations que nous pourrons tirer de ces expérimentations concernent la stabilité et la brillance du fluorophore en cellules.

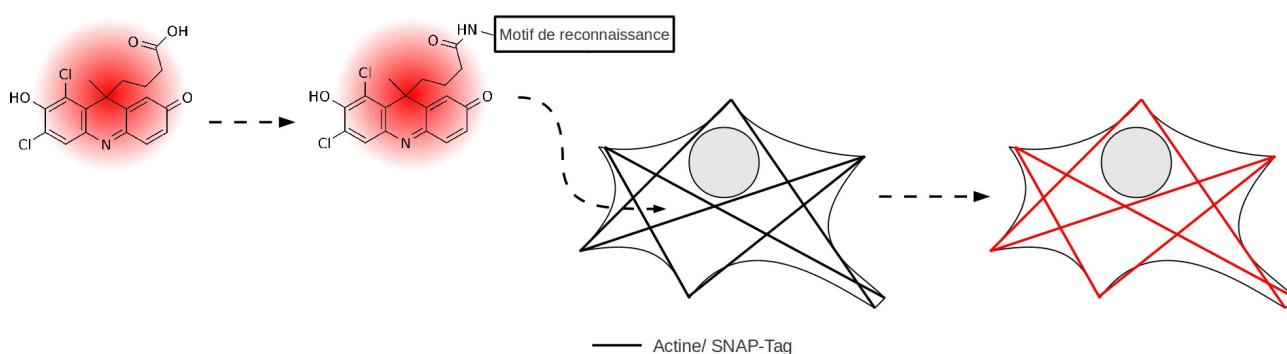


Figure IV.1 : Couplage du DDAO-acide à un motif de reconnaissance et marquage de l'actine.

La synthèse des sondes photo-activables finales sera ensuite effectuée.

Comme nous envisageons de synthétiser des sondes portant des motifs de reconnaissance différents, ils seront insérés en dernière étape, à partir du même fluorophore cagé portant une fonction ester activé.

La première étape de la synthèse sera l'estérification de la fonction acide, afin qu'elle n'interfère pas dans le couplage avec la cage, qui sera effectué par une réaction de Mitsunobu. Après liaison du DDAO au groupement photolabile, l'ester sera activé puis les motifs de reconnaissance pourront être insérés.

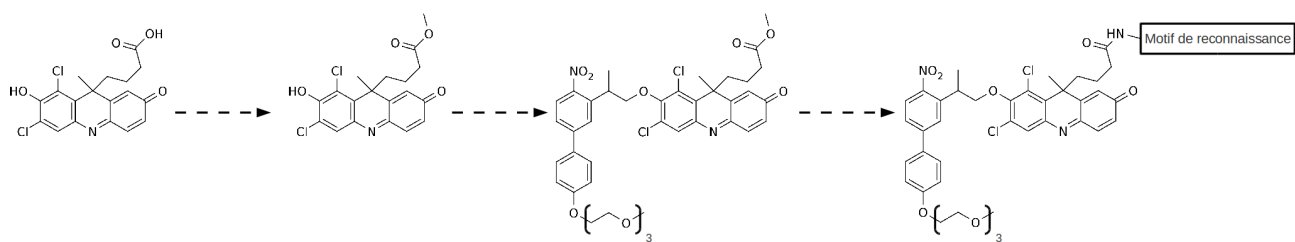


Figure IV.2 : Synthèse de la sonde photoactivable à partir du DDAO-acide.

Les propriétés physico-chimiques de ces sondes devront être contrôlées de manière analogues à celles du PENB-DDAO.

La spécificité du marquage devra également être contrôlée *in vitro*, par exemple par réaction de la sonde sur un lysat cellulaire contenant une protéine, dont la masse moléculaire est connue, exprimée avec le tag de reconnaissance. Une migration sur gel, suivie d'une irradiation permettra de déterminer la taille de la protéine marquée par comparaison de la migration de la bande fluorescente par rapport aux témoins.

Un autre test pourra être effectué par marquage compétitif entre la sonde préparée au laboratoire et une sonde réactive commerciale de réactivité connue et dont la longueur d'onde de fluorescence est différente de celle du DDAO (une fluorescéine par exemple) sur une solution de protéine réactive. Chacune des deux sondes sera testée individuellement et l'intensité de la fluorescence émise après purification déterminera le marquage maximal pour chaque sonde. Un marquage par un mélange équimolaire des deux sondes sera ensuite effectué. La fluorescence émise pour chaque longueur d'onde sera comparée aux maximas précédemment mesurés. L'efficacité du marquage de notre sonde pourra ainsi être déterminée par comparaison à la sonde commerciale de référence.

Une fois que l'on sera assuré de la spécificité et de la sélectivité du marquage, les sondes pourront être engagées dans des expérimentations cellulaires, d'abord sur des systèmes connus, comme la polymérisation des filaments d'actine, afin de valider l'efficacité de notre sonde.

Des expérimentations nouvelles pourront alors être envisagées, comme le suivi de l'internalisation de récepteurs membranaires, le passage d'une protéine d'un compartiment cellulaire à un autre ou la colocalisation de plusieurs protéines par microscopie multicolore.

Une application comme sonde intra-cellulaire pourrait également être envisagée pour le fluorophore acide.

Une telle sonde pourrait être utilisée pour suivre une lignée cellulaire lors du développement d'un embryon. Une carte de lignage a été établie pour le Zébrafish sans marqueur, par génération de seconde et troisième harmonique.^[246] J'ai pu discuter avec le Dr. N. Peyriéras, co-auteur de cette publication, à l'école thématique MiFoBio. Il est apparu qu'un marqueur intra-cellulaire photo-activable pourrait être intéressant pour pouvoir suivre des divisions cellulaires localement. L'intérêt d'un fluorophore photo-activable non-protéique est que l'incubation de l'embryon suffit à faire pénétrer la sonde dans les cellules. Il est donc envisageable de travailler sur des souches diverses d'embryons de Zébrafish. Une telle stratégie a été menée en utilisant une fluorescéine photo-activable.^[247]

L'avantage du DDAO sur la fluorescéine est sa fluorescence rouge, se différenciant de celle de la GFP utilisée pour marquer les membranes de la souche de Zébrafish que nous avons utilisés au MiFoBio. La photo-activation du PENB-DDAO a permis la libération de fluorescence rouge sur ces embryons.

Le problème qui se pose est que le DDAO libéré est susceptible de diffuser à travers la membrane cellulaire. Nous avons en effet observé une légère augmentation du bruit de fond lors de décaageage sur cellules HeLa en bi-photon. La photolyse étant ciblée sur une petite zone du cytoplasme, l'explication de l'augmentation du bruit de fond pourrait être une fuite de fluorophore à travers la membrane plasmique. La présence d'une deuxième charge négative, par la présence d'un carboxylate, devrait limiter cette diffusion.

Il serait intéressant d'envisager des expérimentations de ce type.

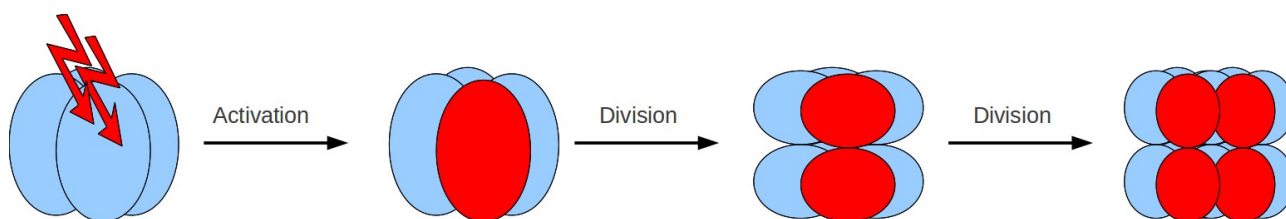


Figure IV.3 : Activation de la fluorescence sur une cellule et suivi phylogénique des divisions.

Enfin, le DDAO a ouvert la voie au développement de fluorophores photo-activables rouges présentant une réponse très intéressante à une irradiation à 2 photons.

Deux nouvelles cages, solubles dans l'eau et présentant une efficacité de photolyse bi-photon

remarquable, sont en cours de développement au laboratoire. Ces cages sont construites sur la même plateforme biphenyle-éthyle que le PENB. Le couplage de ces nouvelles cages au DDAO semble tout à fait faisable. Cela permettrait d'améliorer encore les propriétés de photo-activation de la fluorescence observées avec le PENB-DDAO, mais surtout permettrait de surmonter les problèmes de solubilité rencontrés en milieu aqueux avec le PENB-DDAO.

Chapitre V

Conclusion

Le développement de sondes fluorescentes photo-activables pour le marquage de protéines est un enjeu de recherche majeur en biologie et chimie biologique.

Mes travaux de recherche, effectués au cours de ma thèse, ont démarré grâce à des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sur la synthèse d'une coumarine photo-activable, dont la fluorescence était partiellement masquée par le phénomène d'auto-fluorescence des cellules.

La recherche de l'augmentation des longueurs d'onde m'ont fait progressivement abandonner le squelette chromène-2-one pour me tourner vers un cœur fluorescent acridinone. Cela a permis la synthèse du premier fluorophore photo-activable combinant une efficacité élevée de photolyse à 2 photons et une libération de fluorescence hors du champ d'auto-fluorescence des cellules mammifères, le PENB-DDAO.

La photolyse de ce composé libère un fluorophore rouge, le DDAO ($\lambda_{\text{ex}} = 645 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$, pour une brillance de $3400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 645 nm) avec une cinétique rapide ($< 15 \mu\text{s}$). L'efficacité de la libération du DDAO lors d'une irradiation à 2 photons est remarquable ($\delta_u = 3,7 \text{ GM}$). De plus, la photolyse du fluorophore cagé ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$) est indépendante de la visualisation de la fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$). Cela autorise un excellent contrôle de la photo-activation de la fluorescence.

La photo-fragmentation du PENB-DDAO suite à une irradiation à 1 ou 2 photons a également été démontrée *in vivo* par libération de fluorescence sur cellules HeLa.

L'évolution du PENB-DDAO en sonde photo-activable par couplage à des motifs de reconnaissance vis à vis de protéines n'a pas encore pu être finalisée.

De nombreuses voies de synthèses ont été envisagées et explorées, mais se sont, pour un bon nombre d'entre-elles, révélées être des impasses. Deux stratégies se démarquent toutefois et semblent prometteuses. Elles doivent être reprises et validées pour achever le développement d'une sonde photo-activable à cœur fluorescent acridinone.

Mes travaux ont, je l'espère, contribué au développement d'une nouvelle génération de fluorophores photo-activables de haute sensibilité à une irradiation à 2 photons, permettant la mise

au point de futures sondes fluorescentes photo-activables efficaces pour l'imagerie de protéines cellulaires.

Plus personnellement, cette thématique multi-disciplinaire, aux frontières de la chimie, de la biologie, de la physique et de la microscopie, a été une expérience extrêmement enrichissante, tant par la découverte de nouvelles techniques que par la rencontre de personnes venant d'horizons très différents et m'a fait pleinement prendre conscience de l'importance de l'ouverture à des domaines à priori très éloignés de notre domaine de compétences initial.

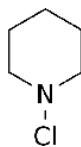
Chapitre VI

Partie

Expérimentale

N-chloropipéridine

(1)

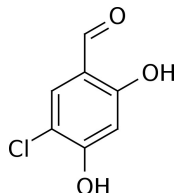


Dans un ballon sec, 8 mL de pipéridine (79,8 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 380 mL de Et₂O anhydre. 11,9 g de NCS (87,8 mmol ; 1,1 éq.) sont ensuite ajoutés progressivement. Le milieu réactionnel est agité sous argon pendant 4h. Après réaction, le milieu réactionnel est extrait par H₂O puis la phase aqueuse est lavée par 60 mL d'Et₂O. Les fractions organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le produit 1 est obtenu sous forme d'une huile jaune à odeur de chlore caractéristique (8,7 g ; 79 mmol ; ρ = 90 %).

RMN : ¹H ; 200 MHz ; CDCl₃ ; δ (ppm) : 3,12 (s ; 4H) ; 1,70 (m ; 4H) ; 1,44 (s ; 2H).

5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldéhyde

(2)



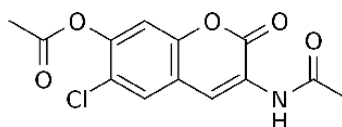
8,90 g de N-chloropipéridine **1** (64,4 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 200 mL d'un mélange H₂O/H₂SO₄ (1:1 V/V). 8,48 g de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (70,9 mmol ; 1,1 éq.) sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel. Une coloration apparaît instantanément puis se décolore progressivement vers le rose. Un précipité se forme durant la réaction. Après une agitation de 24h, la suspension est filtrée. Le précipité est rincé à l'eau froide puis séché sous vide.

Le produit 2 est récupéré sous forme d'un solide rose (9,65 g ; 54,7 mmol ; ρ = 85 %).

RMN : ¹H ; 200 MHz ; CDCl₃ ; δ (ppm) : 11,27 (s ; 1H) ; 9,71 (s ; 1H) ; 7,53 (s ; 1H) ; 6,63 (s ; 1H) ; 6,21 (s ; 1H).

7-acétyloxy-6-chloro-3-acétamide-coumarine

(3)



15,22 g de 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldéhyde **2** (88,2 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 500 mL d'anhydride acétique. 10,43 g de N-acétylglycine (88,2 mmol ; 1 éq.) et 21,7 g de NaOAc (264 mmol ; 3 éq.) sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 24h puis est refroidi dans de l'eau glacée. On observe la formation d'un précipité. La précipité est filtré, rincé à l'eau froide puis séché sous vide.

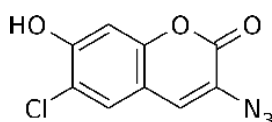
Le solide ainsi obtenu est repris dans de l'AcOEt puis refiltré. Le filtrat est éliminé et le solide recueilli est séché sous vide.

Le produit attendu **3** est obtenu pur sous forme d'un solide brun (5,21 g ; 17,4 mmol ; $\rho = 20\%$)

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 8,62 (s ; 1H) ; 8,05 (s ; 1H) ; 7,50 (s ; 1H) ; 2,37 (s ; 3H) ; 2,18 (s ; 3H).

3-azido-6-chloro-7-hydroxycoumarine

(5)



1 g de coumarine **3** (3,38 mmol ; 1 éq.) est dissout dans un mélange HCl/EtOH (17,5 mL / 8,8 mL). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 1h30. Puis le milieu réactionnel est refroidi dans la glace. La 3-amino-6-chloro-7-hydroxycoumarine **4** formée lors de cette étape n'est pas isolée.

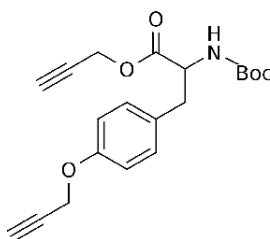
Le milieu réactionnel est refroidi à -5°C dans un mélange eau / glace / NaCl. Sous agitation, 0,348 g de NaNO_2 (5,07 mmol ; 1,5 éq.) sont ajoutés lentement, en veillant à ce que la température reste sous les 5°C . Après 10 minutes, 0,546 g de NaN_3 sont ajoutés au mélange précédent, toujours à froid. Après 15 minutes d'agitation, le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et séché sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide brun (0,160 g ; 0,67 mmol ; $\rho = 20\%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 7,70 (s ; 1H) ; 7,54 (s ; 1H) ; 6,97 (s ; 1H).

2-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino]-3-[4-(prop-2-yne-1-yloxy)phényl]propanoate de prop-2-yne-1-yle

(6)



0,5 g de N-Boc-tyrosine (1,77 mmol ; 1 éq.) et 0,73 g de K_2CO_3 (5,31 mmol ; 3 éq.) sont dissous dans 5 mL de DMF anhydre. 0,6 mL de bromure de propargyle à 80 % dans le toluène (5,32 mmol ; 3 éq.) sont alors ajoutés lentement sous agitation. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 21h.

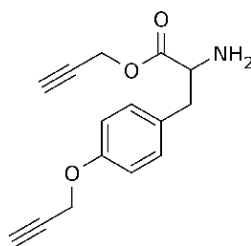
Après réaction, le brut est extrait avec H_2O / Et_2O (50 mL / 30 mL). La phase aqueuse est ensuite lavée deux fois par 30 mL d' Et_2O . Les phases organiques sont combinées puis séchées sur Na_2SO_4 . Le solvant est évaporé sous vide.

Le produit **6** attendu est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair (0,49 g ; 1,36 mmol ; $\rho = 77\%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; CDCl_3 ; δ (ppm) : 7,09 (d ; J = 8 Hz ; 2H) ; 6,91 (d ; J = 8 Hz ; 2H) ; 4,74 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 4,71 (d ; 2 Hz ; 1H) ; 4,67 (d ; J = 2 Hz ; 2H) ; 3,05 (t ; J = 2 Hz ; 1H) ; 2,51 (m ; 2H) ; 1,41 (s ; 9H).

2-amino-3-[4-(prop-2-yne-1-yloxy)phényl]propanoate de prop-2-yne-1-yle

(7)



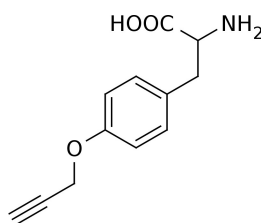
Sous agitation à 0°C, 1,75 mL d'acide acétique sont dilués au goutte à goutte dans 15 mL de MeOH anhydre. 0,49 g du composé **6** (1,36 mmol ; 1 éq.). Le mélange est ensuite réchauffé à température ambiante et l'agitation est maintenue 4h. Après réaction, le solvant est évaporé sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide jaune (0,391 g ; 1,33 mmol ; $\rho = 98 \%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; MeOD- d_4 ; δ (ppm) : 7,17 (d ; J = 10 Hz ; 2H) ; 6,92 (d ; J = 10 Hz ; 2H) ; 4,80 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 4,76 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 4,72 (d ; J = 2 Hz ; 2H) ; 4,31 (m ; 1H) ; 3,33 (m ; 2H) ; 3,16-2,99 (m ; 2H).

Acide 2-amino-3-[4-(prop-2-yne-1-yloxy)phényl]propanoïque

(8)

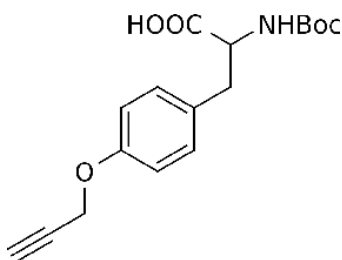


0,391 g du composé **7** (0,23 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans un mélange de 3,5 mL d'une solution aqueuse de NaOH 2N et 2,5 mL de MeOH. Le mélange est agité 24h à température ambiante. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 5,65 par ajout d'HCl puis le mélange est laissé cristalliser dans la glace. Le précipité est filtré et séché sous vide.

Le produit **8** attendu est obtenu sous forme d'un solide jaune pâle (0,276 g ; 1,29 mmol ; $\rho = 97 \%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; MeOD- d_4 ; δ (ppm) : 7,17 (d ; J = 10 Hz ; 2H) ; 6,92 (d ; J = 10 Hz ; 2H) ; 4,72 (d ; J = 2 Hz ; 2H) ; 4,31 (m ; 1H) ; 3,34 (t ; J = 2 Hz ; 1H) ; 3,16-2,99 (m ; 2H).

Acide 2-[(tert-butoxy)carbonylamino]-3-[4-(prop-2-yne-1-yloxy)phényl]propanoïque
(9)



82 mg du composé **6** (0,23 mmol ; 1 éq.) sont suspendus dans un mélange de 5,88 mL d'une solution aqueuse de NaOH 2N et 4,2 mL de MeOH. Le milieu réactionnel est agité 3h à température ambiante puis est acidifié par HCl. Le mélange est refroidi dans la glace.

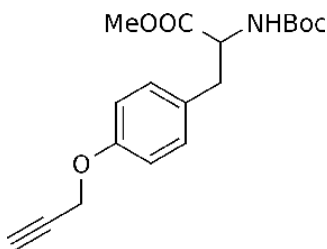
Il se forme deux phases. Elles sont extraites par H_2O / AcOEt (10 mL / 20mL) puis la phase aqueuse est lavée deux fois par 10 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur Na_2SO_4 . Le solvant est évaporé sous vide.

Le produit **9** est récupéré sous forme d'une huile jaune pâle (66 mg ; 0,21 mmol ; ρ = 90 %).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; MeOD- d_4 ; δ (ppm) : 7,19 (d ; J = 10 Hz ; 2H) ; 6,94 (d ; J = 10 Hz ; 2H) ; 4,71 (d ; J = 2 Hz ; 2H) ; 4,34 (m ; 1H) ; 3,34 (t ; J = 2 Hz ; 1H) ; 3,18-3,02 (m ; 2H) ; 1,42 (s ; 9H).

2-[[**(tert-butoxy)carbonyl**]amino]-3-[4-(**prop-2-yne-1-yloxy**)phényle]propanoate de méthyle

(10)



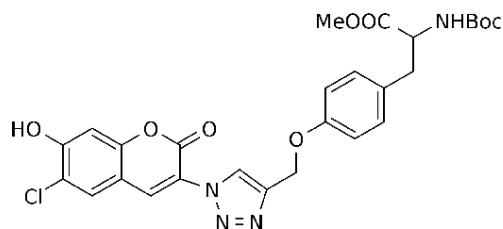
100 mg de l'ester méthylique de la N-Boc-tyrosine (0,3 mmol ; 1 éq.) et 124 mg de K_2CO_3 (0,9 mmol ; 3 éq.) sont suspendus dans 1 mL de DMF anhydre. 0,100 mL de bromure de propargyle à 80 % dans le toluène (0,9 mmol ; 3 éq.) sont ajoutés au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 16h à température ambiante puis est extrait par H_2O / CH_2Cl_2 (15 mL / 10 mL). La phase aqueuse est lavée trois fois par 7 mL de CH_2Cl_2 . Les différentes fractions organiques sont combinées et séchées sur Na_2SO_4 . Le solvant est évaporé sous vide.

Le produit **10** est récupéré sous forme d'une huile jaune très pâle (88 mg ; 0,237 mmol ; $\rho = 80\%$).

RMN : 1H ; 200 MHz ; $CDCl_3$; δ (ppm) : 7,05 (d ; $J = 8$ Hz ; 2H) ; 6,89 (d ; $J = 8$ Hz ; 2H) ; 4,97 (d ; $J = 10$ Hz ; 1H) ; 4,65 (d ; $J = 2$ Hz ; 2H) ; 4,53 (dd ; $J = 10$ Hz et 6 Hz ; 1H) ; 3,69 (s ; 3H) ; 2,51 (t ; $J = 2$ Hz ; 1H) ; 1,40 (s ; 9H).

2-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino]-3-(4-[[1-(6-chloro-7-hydroxy-2-oxochromène-3-yl)-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy]phenyl)propanoate de méthyle

(11)



92 mg de 3-azido-6-chloro-7-hydroxycoumarine **5** (1,2 éq. ; 0,387 mmol) sont suspendus dans 2 mL d'un mélange H₂O / tBuOH (1:1 v/v). 88 mg du composé **10** (1 éq. ; 0,313 mmol) sont ajoutés. Sous agitation, on ajoute 0,643 mL d'une solution aqueuse fraîchement préparée d'ascorbate de sodium 1M (2 éq. ; 0,643 mmol) ainsi que 0,944 mL d'une solution aqueuse de CuSO₄·5H₂O 0,5M (1,5 éq. ; 0,472 mmol). Le mélange réactionnel est agité 72h à température ambiante puis le brut réactionnel est filtré pour éliminer le cuivre métallique formé lors de la réaction. Le précipité est rincé par de l'AcOEt, qui est ensuite combiné au filtrat. Le solvant est évaporé sous vide et le brut de réaction est purifié sur colonne de silice (éluant : AcOEt / Hept. 70/30).

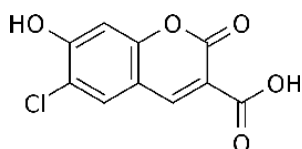
Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide orange (87 mg ; 0,157 mmol ; $\rho = 50\%$).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; acétone-d₆ ; δ (ppm) : 8,57 (s ; 1H) ; 8,46 (s ; 1H) ; 7,88 (s ; 1H) ; 7,09 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 6,97 (s ; 1H) ; 6,91 (d ; J = 9 Hz ; 2H) ; 5,96 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 5,17 (s ; 2H) ; 4,24 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 3,55 (s ; 3H) ; 1,24 (s ; 9H).

$\lambda_{\text{ex}} = 397 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 476 \text{ nm}$ (PBS/DMSO 9/1).

acide 3-carboxylique-6-chloro-7-hydroxy-coumarine

(12)



25 g de 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldéhyde (1 éq. ; 145 mmol) sont solubilisés dans 134 mL de pyridine. 30,1 g d'acide malonique (2 éq. ; 290 mmol) et 2 mL d'aniline sont ajoutés au milieu

réactionnel. Le mélange est agité 12h à température ambiante puis 180 mL d'EtOH sont ajoutés. Il se forme un précipité jaune qui est récupéré par filtration.

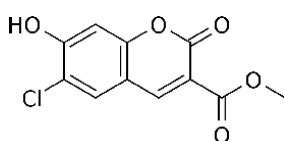
Le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide jaune (26,4 g ; 110 mmol ; $\rho = 75 \%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 8,62 (s ; 1H) ; 7,96 (s ; 1H) ; 6,87 (s ; 1H)

$\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 446 \text{ nm}$ (PBS/DMSO 9/1).

6-chloro-7-hydroxy-coumarine-3-carboxylate de méthyle

(13)



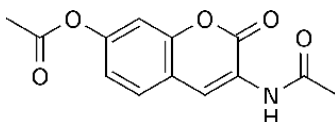
13, 8 g de l'acide 3-carboxylique-coumarine **12** (1 éq. ; 57,6 mmol) sont dissous dans 150 mL de MeOH. 0,61 mL de H_2SO_4 (0,2 éq. ; 11,5 mmol) sont ajoutés à la solution. Le mélange est chauffé à reflux pendant 17h. après réaction, le milieu réactionnel est refroidi dans la glace. On observe une cristallisation. Le solide est filtré et lavé à l'eau froide puis séché sous vide.

Le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide jaune vert (11 g ; 46 mmol ; $\rho = 81 \%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 8,54 (s ; 1H) ; 7,96 (s ; 1H) ; 6,91 (s ; 1H) ; 3,85 (s ; 3H).

Acétate de 3-acétylamino-7-ylcoumarine

(14)



12,08 g de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (1 éq. ; 70 mmol) sont dissous dans 350 mL d'anhydride acétique. 8,25 g de N-acétylglycine (1 éq. ; 70 mmol) et 17,23 g d'acétate de sodium anhydre (3 éq. ; 210 mmol) sont ajoutés à la solution. Le mélange est agité à reflux pendant 4h. Après réaction, le milieu réactionnel est refroidi puis de la glace pilée est ajoutée dans le ballon. un précipité se

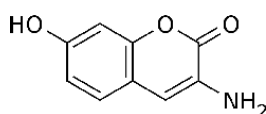
forme. Le solide est filtré, lavé à l'eau froide puis séché sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide jaune (3,66 g ; 14,01 mmol ; $\rho = 20\%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 9,74 (s ; 1H) ; 8,61 (s ; 1H) ; 7,75 (d ; 8,6 Hz ; 1H) ; 7,27 (d ; 2,1 Hz ; 1H) ; 7,13 (dd ; 8,6 Hz et 2,1 Hz ; 1H) ; 2,30 (s ; 3H) ; 2,16 (s ; 3H).

3-amino-7-hydroxycoumarine

(15)



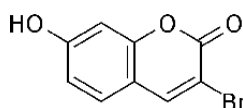
1 g de coumarine **14** (3,83 mmol ; 1 éq.) est dissout dans un mélange HCl/EtOH (17,5 mL / 8,8 mL). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 3h. Après réaction, le solvant est évaporé sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide foncé (0,676 g ; 3,82 mmol ; $\rho = 99\%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 7,50-7,46 (m ; 2H) ; 6,87-6,80 (m ; 2H).

3-bromo-7-hydroxycoumarine

(16)



- Par réaction de Sandmeyer à partir de la 3-amino-7-hydroxycoumarine **15** :

100 mg de 3-amino-7-hydroxycoumarine **15** (1 éq. ; 0,56 mmol) sont dissous dans un mélange de 1 mL HBr et 2 mL H₂O puis le mélange est refroidi dans un mélange eau / glace / NaCl à -5°C. 117 mg de NaNO₂ (3 éq. ; 1,69 mmol) sont ensuite ajoutés par petites fractions. Après ajout, le mélange est agité dans un bain de glace.

Après 20 minutes, 404 mg de CuBr (5 éq. ; 2,80 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est alors chauffé à 80°C pendant 3h. Après réaction, le milieu réactionnel est refroidi puis extrait par H₂O / AcOEt. La phase organique est récupérée et séchée sur Na₂SO₄. Le solvant est évaporé sous

vide.

Le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide beige. La masse récupérée n'a pas pu être pesée précisément pour déterminer le rendement de la réaction. Elle est inférieure à 10 mg, le rendement est donc inférieur à 7 %.

- Par bromation de la 7-hydroxycoumarine :

1,00 g de 7-hydroxycoumarine (1 éq. ; 6,17 mmol) et 1,10 g de bromure de tétra-*n*-butylammonium (TBAB) (1 éq. ; 6,17 mmol) sont mélangés dans un ballon. Le mélange est chauffé à 100°C pour liquéfier le TBAB. Après liquéfaction du mélange réactionnel, 1,10 g de NBS (1 éq. ; 6,17 mmol) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité durant 4h à 100°C. Le mélange est alors refroidi à température ambiante puis la mélasse formé lors du refroidissement est dissoute dans de l'AcOEt. Cette solution est alors lavée 3 fois par de l'eau désionisée. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄ puis l'AcOEt est évaporé sous vide. Le brut de réaction est purifié sur colonne de silice (éluant : Hept. / AcOEt : 70/30).

Le produit attendu est récupéré avec sous forme d'un solide jaune très pâle (446 mg ; 1,85 mmol ; $\rho = 30\%$).

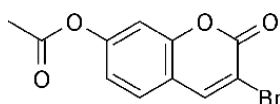
RMN : ¹H ; 300 MHz ; DMSO-*d*₆ ; δ (ppm) : 8,52 (s ; 1H) ; 7,56 (d ; J = 6 Hz ; 1H) ; 6,85 (dd ; 6 Hz et 1,5 Hz ; 1H) ; 6,78 (d ; 1,5 Hz ; 1H).

MS(ES-APCI) : m/z : 238,9 [M+H]⁺ (⁷⁹Br) ; 241,0 [M+H]⁺ (⁸¹Br).

$\lambda_{\text{ex}} = 384 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ (PBS/DMSO 99/1).

Acétate de 3-bromocoumarine-7-yl

(17)



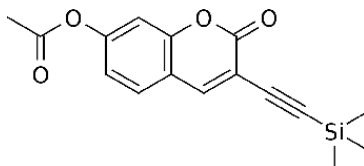
1,02 g de 3-bromo-7-hydroxycoumarine **16** (1 éq. ; 4,23 mmol) sont dissous dans 4 mL d'anhydride acétique. 5 gouttes de pyridine sont ensuite ajoutées au mélange réactionnel qui est agité à température ambiante pendant une nuit. Après réaction, le solvant est évaporé sous vide.

Le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide blanc (975 mg ; 3,47 mmol ; $\rho = 82\%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 8,63 (s ; 1H) ; 7,75 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 7,33 (d ; J = 3 Hz ; 1H) ; 7,20 (dd ; 9,0 Hz et 3,0 Hz ; 1H) ; 2,30 (s ; 3H).

Acétate de 3-[2-(triméthylsilyl)éthynyl]coumarine-7-yl

(18)



300 mg d'acétate de 3-bromocoumarine-7-yl **17** (1 éq. ; 1,06 mmol) sont dissous dans 10 mL de dioxane anhydre. 733 μl de triméthylsilyl-acétylène (5 éq. ; 5,3 mmol), 10 mg de CuI (0,05 éq. ; 0,053 mmol) et 276 μl de diisopropyle-éthyle-amine (DIPEA) (1,5 éq. ; 1,59 mmol) sont ajoutés à la solution. Le milieu est ensuite mis sous vide, puis sous atmosphère d'argon. Ce cycle vide/argon est répété 10 fois pour dégazer le milieu réactionnel. 61 mg de tétrakis[triphenylephosphine]palladium (0,05 éq. ; 0,053 mmol) sont alors ajoutés au milieu réactionnel qui est agité une nuit sous argon à température ambiante.

Après réaction, le milieu est filtré sur papier, puis le filtre est rincé par du dichlorométhane. Le solvant est évaporé sous vide. Un solide noir brillant est récupéré.

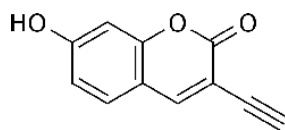
Ce brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éluant Hept. / AcOEt : 70/30).

Le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide jaune ocre (91 mg ; 0,303 mmol ; ρ = 30 %)

RMN : ^1H ; 200 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 8,37 (s ; 1H) ; 7,75 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,30 (d ; J = 4 Hz ; 1H) ; 7,19 (dd ; J = 9 Hz et 3 Hz ; 1H) ; 2,31 (s ; 3H) ; 0,25 (s ; 9H).

3-éthynyl-7-hydroxycoumarine

(19)



91 mg de la coumarine **18** (1 éq. ; 0,3 mmol) sont dissous dans 1,5 ml de THF. La solution est refroidie à -5°C puis 0,3 mL de fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) à 1M dans le THF (1 éq. ; 0,3 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel qui prend instantanément une coloration rouge brun. L'agitation est maintenue 1h puis le THF est évaporé sous vide.

Le brut de réaction est purifié sur colonne de silice (éluant Hept. / AcOEt : 1/1).

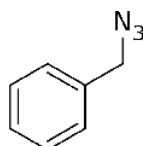
Le produit attendu est un solide (8,4 mg ; 0,045 mmol ; $\rho = 15\%$).

RMN : ^1H ; 200 MHz ; acétone- d_6 ; δ (ppm) : 8,37 (s ; 1H) ; 7,75 (d ; $J = 8\text{ Hz}$; 1H) ; 7,30 (d ; 4 Hz ; 1H) ; 7,19 (dd ; $J = 9\text{ Hz}$ et 3 Hz ; 1H) ; 2,31 (s ; 3H) ; 0,25 (s ; 9H).

$\lambda_{\text{ex}} = 398\text{ nm}$ (dans un mélange PBS/DMSO : 99/1).

Azoture de benzyle

(20)



1,39 mL de bromure de benzyle (1 éq. ; 11,7 mmol) sont dissous dans 5 ml de dichlorométhane. La solution est refroidie à 0°C puis 3,82 g d'azoture de sodium (5 éq. ; 58,5 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après une agitation sur une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est extrait par $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La phase organique est séchée sur Na_2SO_2 puis le solvant est évaporé sous vide.

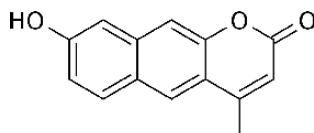
Le produit attendu est récupéré sous forme d'une huile incolore fluide (1,52 g ; 11,4 mmol ; $\rho = 97\%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; CDCl_3 ; δ (ppm) : 7,45-7,28 (m ; 5H) ; 4,53 (s ; 2H).

IR : 2375 cm^{-1} (élongation $-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$).

8-hydroxy-4-methylbenzo[g]chromen-2-one

(21a)



1,6 g de dihydroxynaphtalène (1 éq. ; 10 mmol) sont dissous dans 12 mL d' H_2SO_4 80%. Le mélange est refroidi à 0°C puis 3,2 mL d'acétoacétate d'éthyle (2,5 éq. ; 25 mmol) sont ajoutés lentement. Le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation pendant 2 jours à température ambiante.

Après réaction, de l'eau glacée est ajoutée au milieu réactionnel. On observe la formation d'un précipité qui est filtré, rincé à l'eau froide puis dissout dans une solution de NaOH 10%. Une deuxième filtration permet d'éliminer ce qui n'a pas été solubilisé. Le filtrat est ensuite acidifié par HCl concentré. Le précipité formé est filtré puis recristallisé dans l'acide acétique. Le milieu de recristallisation est laissé à 4°C pendant 4h puis le précipité est formé.

Le produit attendu est récupéré par filtration puis séché sous vide. Il se présente sous la forme d'un solide brun foncé brillant (920 mg ; 4,07 mmol ; $\rho = 41\%$).

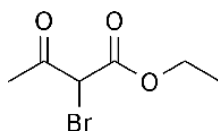
RMN : ^1H ; 200 MHz ; acétone- d_6 ; δ (ppm) : 8,27 (s ; 1H) ; 7,97 (d ; J = 10 Hz ; 1H) ; 7,54 (s ; 1H) ; 7,26 (d ; J = 4 Hz ; 1H) ; 7,18 (dd ; J = 8 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 6,28 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 2,57 (d ; J = 2 Hz ; 3H).

$\lambda_{\text{ex}} = 350\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 509\text{ nm}$ (PBS/DMSO : 99/1).

$\epsilon = 6000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 350 nm (PBS/DMSO : 99/1).

2-bromo-acétoacétate d'éthyle

(22)



2,40 mL d'acétoacétate d'éthyle (1 éq. ; 20 mmol) sont solubilisés dans 30 mL de THF anhydre. La solution est refroidie à 0°C puis 560 mg de NaH (1,2 éq. ; 24 mmol) sont ajoutés par fractions au milieu réactionnel. Le mélange est agité 30 minutes, sous argon, à température ambiante.

Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à 0°C puis 1,20 mL de Br₂ (1,1 éq. ; 2,2 mmol) dilués dans 10 mL de CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés en une fois.

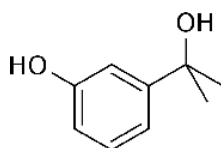
Le mélange est agité 20 minutes à température ambiante. Le brut est ensuite filtré sur un petit tampon de silice pour éliminer le NaBr formé puis le solvant est évaporé sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous la forme d'une huile (4,10 g ; 19,6 mmol ; $\rho = 98\%$).

RMN : ¹H ; 200 MHz ; CDCl₃ ; δ (ppm) : 5,17 (s ; 1H) ; 4,30 (q ; 7,3 Hz ; 2H) ; 2,45 (s ; 2H) ; 1,32 (t ; J = 6 Hz ; 3H).

3-(2-hydroxypropane-2-yl)phénol

(23)



La verrerie est lavée à l'acétone, séchée puis placée à l'étuve au moins 4 heures avant d'être utilisée.

Dans un ballon rodé bicol de 1000 mL, dont 1 col est couplé à une ampoule à addition de 100 mL, sec et préalablement purgé à l'argon, on dilue 43 mL de MeMgBr 3M (4 éq., 138 mmol) dans 420 mL de THF anhydre. On agite très fortement la solution.

On dissout 4 g de 3'-hydroxy-acétophénone (1 éq., 29,3 mmol) dans 80 mL de THF anhydre.

A l'aide de l'ampoule à addition, le 3'-hydroxyacétophénone est ajouté très lentement au

MeMgBr (goutte à goutte, 1 goutte toutes les 4 secondes environ).

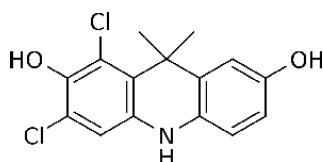
Le milieu est laissé sous très forte agitation pendant 4h.

Après réaction, l'excédent de magnésien est neutralisé par de l'eau puis le milieu est acidifié par HCl dilué. Le THF est évaporé sous vide.

On extrait ensuite 2 fois la phase aqueuse par de l'AcOEt. On regroupe les différentes phases organiques, qui sont séchées sur Na₂SO₄, puis le solvant est évaporé. Le produit est récupéré sous forme d'un solide beige clair (5,75 g ; 25 mmol ; ρ = 85 %).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,04 (t ; J = 9 Hz ; 1H) ; 6,87 (s ; 1H) ; 6,85 (d ; 9 Hz ; 1H) ; 6,55 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 1,43 (s ; 6H).

1,3-dichloro-9,9-diméthyle-10H-acridine-2,7-diol
(24)



On dissout 2,16 g de 3-(2-hydroxypropane-2-yl)phénol **23** (1 éq., 14,2 mmol) dans 6,8 mL de THF. On obtient une solution jaune très pâle. On ajoute ensuite sous agitation 3,00 g de 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide (1 éq., 14,2 mmol). Une coloration rouge apparaît. Quand le deuxième produit est dissout, on ajoute 6,8 mL d'eau distillée. On refroidit le milieu à 0°C dans un bain de glace. En maintenant le milieu réactionnel à 0°C, on ajoute goutte à goutte 15 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 2 M. La solution vire instantanément au bleu foncé intense. Après ajout de la soude, le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM, le produit formé apparaissant bleu sur plaque.

Après réaction, la soude est neutralisée par une solution de NH₄Cl, 2 M (20 mL). Après 30 minutes d'agitation, le composé est extrait par AcOEt/NH₄Cl_(aq). La phase aqueuse est extraite plusieurs fois par AcOEt jusqu'à présenter une coloration bleue très pâle. On regroupe toutes les fractions organiques, puis on ramène le volume de la phase organique à 350 mL par évaporation sous vide.

La phase organique recueillie est ensuite agitée très vigoureusement avec une solution aqueuse

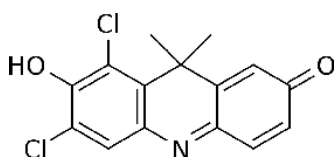
de Na₂S₂O₄ (34 g dans 340 mL d'eau). Après 15 minutes d'agitation, la phase organique est isolée, puis agitée une seconde fois avec une solution aqueuse de Na₂S₂O₄ (34 g dans 340 mL d'eau). La solution devient brun clair. On récupère la phase organique, qui est lavée 2 fois par une solution saturée en NaCl, puis séchée sur Na₂SO₄. Un produit intermédiaire brun est récupéré par évaporation. Il est stocké à -20°C pour la nuit.

On reprend le produit formé dans 13,6 mL de méthanol. On ajoute lentement 340 mL d'une solution d'HCl_{aq}, 6M, préalablement dégazée par bullage d'argon. Sous argon, on agite la solution à reflux (bain à 100°C) pendant 1h30. Après réaction, on laisse refroidir la milieu à TA, puis le produit et extrait 2 fois par AcOEt/NaCl_{aq}. La phase organique est ensuite séchée. Le solvant est évaporé sous vide, puis le produit **24** est récupéré sous forme d'un solide brun.

RMN : ¹H ; 300 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) : RMN : ¹H ; 300 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) : 7,61 (s ; 1H) ; 7,38 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 6,81 (s ; 1H) ; 6,60 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 1,75 (s ; 6H)

1,3(6,8)-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyle-acridine-2-one (DDAO)

(25)



La synthèse est identique à celle du composé **24**, jusqu'à la dernière étape. Après extraction, la phase organique est ramenée à un volume de 550 mL.

Elle est ensuite vigoureusement agitée avec une solution aqueuse de NaIO₄ (4 g dans 135 mL H₂O) pendant 15 minutes. La solution prend progressivement une coloration rouge sombre. On suit la formation du produit par CCM, le produit formé apparaissant rouge fluorescent sur plaque en irradiant à 365 nm. La phase organique est isolée, lavée 2 fois par NaCl_{aq} puis séchée sur Na₂SO₄. Le solvant est évaporé sous vide. Le produit est purifié par 2 lavages à l'éthanol (5 mL).

Le produit **25** est récupéré sous forme d'un solide violet foncé (1,72 g ; 5,57 mmol ; ρ = 40 %).

RMN : ¹H ; 400 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) : 7,74 (s ; 1H) ; 7,49 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,06 (d ; 4 Hz ; 1H) ; 6,85 (dd ; J = 8 Hz et 4 Hz ; 1H) ; 1,78 (s ; 6H)

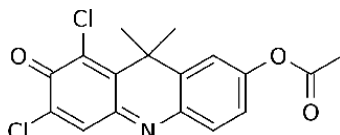
¹³C ; 400 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) : 172,00 ; 162,54 ; 158,44 ; 158,06 ; 145,76 ;

141,14 ; 140,85 ; 139,23 ; 134,86 ; 134,58 ; 134,23 ; 132,52 ; 116,44 ; 115,86 ; 114,03 ; 113,58 ; 38,74 ; 26,22.

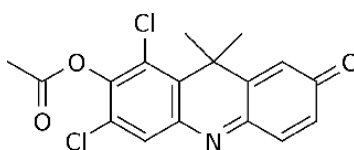
MM-[ES+APCI]⁺ : m/z : 307,9 [M+H]⁺ (³⁵Cl-³⁵Cl) ; 309,9 [M+H]⁺ (³⁵Cl-³⁷Cl).

MM-[ES+APCI]⁻ : m/z : 305,8 [M-H]⁻ (³⁵Cl-³⁵Cl) ; 307,9 [M-H]⁻ (³⁵Cl-³⁷Cl).

Acétate de 6,8-dichloro-9,9-diméthyl-7-oxoacridine-2-yl
(26a)



Acétate de 1,3-dichloro-9,9-diméthyl-7-oxoacridine-2-yl
(26b)



100 mg de DDAO 25 (1 éq. ; 0,33 mmol) sont dissous dans 5 mL de CH₂Cl₂ anhydre. 0,307 mL d'anhydride acétique (10 éq. ; 3,25 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel ainsi qu'une goutte de pyridine. Le mélange est agité sous argon pendant une nuit. Après réaction, le solvant est évaporé sous vide.

Les produits **26a** et **26b** sont obtenus sous forme de solides rouges (103,9 mg ; 0,294 mmol ; r = 90 %).

26a RMN : ¹H ; 200 MHz ; DMSO-d₆, δ (ppm) : 7,86 (s ; 1H) ; 7,69 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,60 (s ; 1H) ; 7,24 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 2,31 (s ; 3H) ; 1,82 (s ; 6H).

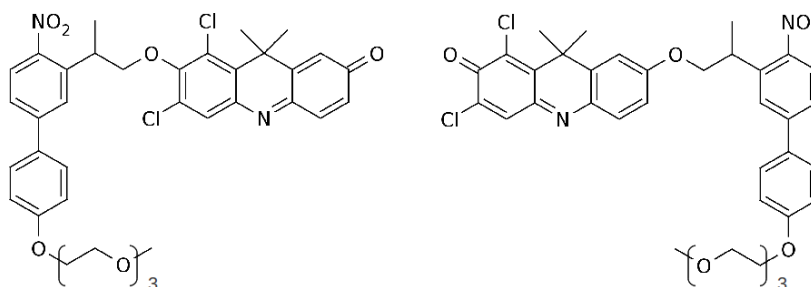
¹³C ; 400 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) : 172,56 ; 153,24 ; 147,55 ; 139,44 ; 139,41 ; 138,00 ; 134,28 ; 132,40 ; 131,90 ; 128,17 ; 126,75 ; 121,88 ; 120,67 ; 38,79 ; 25,93 ; 20,92.

26b RMN : ¹H ; 200 MHz ; DMSO-d₆, δ (ppm) : 7,96 (s ; 1H) ; 7,47 (d ; J = 10 Hz ; 1H) ; 6,94 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 6,72 (dd ; J = 10 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 2,46 (s ; 3H) ; 1,75 (s ; 6H)

^{13}C ; 400 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 168,85 ; 149,74 ; 146,06 ; 143,53 ; 136,37 ; 136,06 ; 135,38 ; 132,37 ; 131,99 ; 131,27 ; 128,67 ; 120,95 ; 120,65 ; 38,00 ; 28,00 ; 19,93.

7(2)-{3-(2-propyle)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrobiphényle}-6,8-dichloro-9,9-diméthylacridine-2-one (PENB-DDAO)

(27)



Dans un ballon de 10 mL sec sous argon, 100 mg de DDAO **25** (1 éq., 0,325 mmol) et 272 mg de PENB (2 éq., 0,649 mmol) sont dissous dans 2,4 mL de benzène anhydre (milieu réactionnel 1).

Dans un ballon sec de 5 mL sous argon, 255 mg de triphénylphosphine (3 éq., 0,975 mmol) et 192 μl de diisopropyl azodicarboxylate (3 éq., 0,975 mmol) sont dissous dans 1,2 mL de benzène anhydre. Le mélange est agité puis ajouté lentement au milieu réactionnel 1. Le ballon de 5 mL est ensuite rincé avec 1,2 mL de benzène anhydre, qui sont ensuite ajoutés au goutte à goutte au milieu réactionnel.

Le mélange réactionnel est agité 5h sous argon à température ambiante. Après réaction, le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est purifié par HPLC (pompe Waters[®] 600, panneau de controle Waters[®] 600 controller, détecteur Waters[®] 2996, colonne Phenomenex[®] Synergi 250x10,00 mm 10 μm , élution : gradient linéaire de 100% de TFA aqueux (0,1% v/v) à 100% d'acétonitrile sur 30 minutes, flux d'éluant 4 mL par minute. Le profil d'élution est enregistré grace au logiciel Chromeleon[®], temps de rétention 31,35 minutes). **27a** and **27b** sont obtenus sous forme d'une huile visqueuse orange foncée (138 mg ; 0,195 mmol ; ρ = 60%).

27a : RMN : ^1H ; 300 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 7,97 (d ; 1,4 Hz ; 1H) ; 7,92 (d ; J = 8,7 Hz ; 1H) ; 7,76-7,70 (m ; 2H) ; 7,41 (d ; J = 9,8 Hz ; 1H) ; 7,07 (d ; J = 9,8 Hz ; 2H) ; 6,86 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 6,67 (dd ; J = 9,8 Hz et J = 1,9 Hz ; 1H) ; 4,42 (t ; J = 8,5 Hz ; 1H) ; 4,30-4,25 (m ; 1H) ; 4,16-4,13 (m ; 3H) ; 3,90-3,83 (m ; 1H) ; 3,77-3,74 (m ; 3H) ; 3,60-3,50 (m ; 8H) ; 3,43-3,40

(m ; 3H) ; 3,22 (s ; 3H) ; 1,67 (d ; J = 3,1 Hz ; 6H).

^{13}C ; 400 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 186,81 ; 159,12 ; 155,85 ; 152,52 ; 152,40 ; 148,41 ; 147,80 ; 144,13 ; 140,64 ; 139,59 ; 137,70 ; 133,47 ; 132,06 ; 131,75 ; 130,31 ; 128,47 ; 128,42 ; 126,93 ; 126,07 ; 125,11 ; 124,81 ; 115,02 ; 77,09 ; 77,06 ; 71,23 ; 69,91 ; 69,89 ; 69,75 ; 69,56 ; 68,85 ; 67,29 ; 57,99 ; 37,61 ; 34,52 ; 27,97 ; 27,95

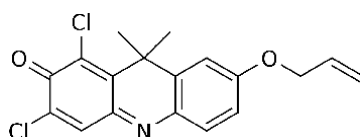
HRMS : m/z = 708,1998 (calculé pour $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8$: 708,2005).

UV : λ_{max} = 390 nm, ϵ = 10000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans du PBS ; 11000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans un mélange PBS/MeCN 1:1 v/v.

27b a été détecté en HPLC (temps de rétention = 32,03 min.) mais a été obtenu en proportions trop faibles ($\leq 5\%$) pour pouvoir être analysé en RMN.

1,3-dichloro-9,9-diméthyle-7-(prop-2-ène-1-yloxy)acridine-2-one

(28)



200 mg de DDAO **25** (1 éq. ; 0,65 mmol) sont dissous dans 3 ml de DMF anhydre. 0,14 ml de bromure d'allyle (2,2 éq. ; 1,43 mmol) et 260 mg de K_2CO_3 (3 éq. ; 1,95 mmol) sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est chauffé à 130°C durant une nuit.

Après réaction, le milieu est extrait par de l'eau acide et de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée 5 fois avec de l'eau pour éliminer la DMF résiduelle puis la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant est évaporé sous vide.

Le brut de réaction est ensuite purifié sur colonne de silice (éluant Hept. / AcOEt : 1/1).

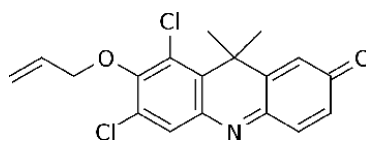
Le produit attendu est obtenu sous la forme d'un solide rouge (205 mg ; 0,59 mmol ; ρ = 90 %). Les isomères **28** et **29** sont présents, dans des proportions 9:1.

28 RMN : ^1H ; 400 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 7,80 (s ; 1H) ; 7,60 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,31 (d ; 4 Hz ; 7,05 (dd ; J = 8 Hz et 4 Hz ; 1H) ; 6,11-6,01 (m ; 1H) ; 5,45 (d ; J = 12 Hz ; 1H) ; 5,31 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 4,73 (d ; J = 4 Hz ; 2H) ; 1,83 (s ; 6H).

^{13}C ; 400 MHz , DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 172,40 ; 161,93 ; 147,07 ; 140,98 ; 140,62 ; 139,36 ; 135,31 ; 135,23 ; 133,61 ; 133,14 ; 133,02 ; 118,23 ; 114,65 ; 113,57 ; 68,91 ; 39,44 ; 26,04.

6,8-dichloro-9,9-diméthyle-7-(prop-2-ène-1-yloxy)acridin-2-one

(29)



La verrerie est lavée à l'acétone et séchée à l'étuve avant utilisation.

50 mg de DDAO 25 (1 éq. ; 0,16 mmol) sont dissous dans 1,2 mL de THF anhydre. 40 μ L d'alcool allylique (3 éq. ; 0,49 mmol) est ajouté à la solution. Le mélange est agité sous argon.

Dans un deuxième ballon, 128 mg de triphénylène phosphine (3 éq. ; 0,49 mmol) et 96 μ L de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (3 éq. ; 0,49 mmol) sont dissous dans 0,6 mL de THF anhydre. Ce mélange est ajouté au goutte à goutte au premier mélange. Le ballon est rincé avec 0,6 mL de THF anhydre, qui est ensuite également ajouté au premier mélange. Le mélange final est agité sous argon pendant 4h.

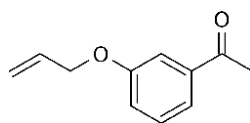
Après réaction, le solvant est évaporé sous vide puis le brut de réaction est purifié sur colonne de silice (éluant : Hept. / AcOEt : 9/1). Le produit obtenu est un solide rouge composé d'un mélange des isomères 29 et 28 en proportions respectives de 91% et 9% (masse totale récupérée : 49 mg ; 0,14 mmol ; ρ = 86 %).

29 RMN : ^1H ; 400 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 7,85 (s ; 1H) ; 7,44 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 6,91 (s ; 1H) ; 6,70 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 6,20-6,10 (m ; 1H) ; 5,47 (d ; J = 12 Hz ; 1H) ; 5,32 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 4,60 (d ; J = 4 Hz ; 2H) ; 1,76 (s ; 6H).

^{13}C , 400 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 186,00 ; 152,61 ; 152,53 ; 147,86 ; 140,69 ; 139,72 ; 132,86 ; 132,11 ; 131,75 ; 131,74 ; 128,50 ; 128,49 ; 127,37 ; 118,87 ; 74,22 ; 37,40 ; 28,04.

O-allyle-acétophénone

(30)



Le verrerie est lavée à l'acétone et séchée à l'étuve avant utilisation.

5,00 g de 3'-hydroxy-acétophénone (1 éq. ; 36,8 mmol) sont dissous dans 200 mL d'acétone fraîchement distillé. 10,1 g de K_2CO_3 (2 éq. ; 73,5 mmol) et 0,61 g de KI (0,1 éq. ; 3,7 mmol) sont ajoutés à la solution. 3,5 mL de bromure d'allyle (1,1 éq. ; 40,4 mmol) sont ensuite ajoutés puis le mélange est agité à reflux pendant 18h.

Après réaction, l'acétone est évaporé. Le brut est repris dans de l'eau puis extrait par Et_2O . La phase aqueuse est extraite une deuxième fois par Et_2O . Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_2 puis le solvant est évaporé sous vide.

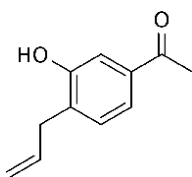
Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (6,26 g ; 35,5 mmol ; $\rho = 96\%$).

RMN : 1H ; 300 MHz ; $CDCl_3$; δ (ppm) : 7,54 (d ; $J = 8$ Hz ; 1H) ; 7,51 (d ; $J = 3$ Hz ; 1H) ; 7,37 (t ; $J = 8$ Hz ; 1H) ; 7,13 (dd ; $J = 8$ Hz et 3 Hz ; 1H) ; 6,13-6,00 (m ; 1H) ; 5,44 (d ; 15 Hz ; 1H) ; 5,31 (d ; $J = 12$ Hz ; 1H) ; 4,59 (d ; $J = 5$ Hz ; 2H) ; 2,59 (s ; 3H).

^{13}C ; 300 MHz ; $CDCl_3$; δ (ppm) : 200,02 ; 160,24 ; 139,68 ; 134,61 ; 130,86 ; 122,32 ; 121,18 ; 117,97 ; 114,80 ; 69,94 ; 26,99.

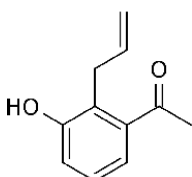
3'-hydroxy-4'-(prop-2-ène-1-yl)-acétophénone

(31a)



3'-hydroxy-2'-(prop-2-ène-1-yl)-acétophénone

(31b)



6,5 g de O-allyle-acétophénone **30** (37 mmol) sont dégazés par une alternance de mise sous vide et de mise sous atmosphère d'argon. Dix cycles sont répétés puis le produit est agité à 200°C sous argon pendant 17h. Le brut est ensuite purifié sur colonne de silice (éluant Hept. / AcOEt : 1/1). Un mélange des isomères 31a et 31b est récupéré (1,95 g ; 12,3 mmol ; $\rho = 30\%$).

Le mélange est purifié sur une deuxième colonne de silice (éluant Hept. : CH₂Cl₂ / AcOEt : 60/32/8) pour fournir les deux isomères purs **31a** et **31b** avec des proportions relatives de 35 % et 65 %.

31a (0,683 g ; 4,3 mmol ; $\rho_{\text{global}} = 10,5\%$).

RMN : ¹H, 400 MHz, MeOD-d₄, δ (ppm) : 7,39 (dd ; 8Hz et 1,2 Hz ; 1H) ; 7,35 (d ; 1,2 Hz ; 1H) ; 7,14 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 6,02-5,92 (m ; 1H) ; 5,06-4,99 (m ; 2H) ; 3,38 (d ; 6,4 Hz ; 2H) ; 2,51 (s ; 3H).

¹³C, 400 MHz, MeOD-d₄, δ (ppm) : 200,56 ; 156,62 ; 137,79 ; 137,51 ; 134,49 ; 131,18 ; 121,44 ; 116,31 ; 115,03 ; 35,43 ; 26,79.

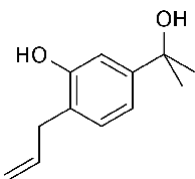
31b (1,27 g ; 8 mmol ; $\rho_{\text{global}} = 19,5\%$).

RMN : ¹H, 400 MHz, MeOD-d₄, δ (ppm) : 7,11-7,08 (m ; 2H) ; 6,96-6,93 (m ; 1H) ; 5,99 (m ; 1H) ; 4,96-4,85 (m ; 2H) ; 3,58 (d ; J = 8 Hz ; 2H) ; 2,48 (s ; 3H).

¹³C, 400 MHz, MeOD-d₄, δ (ppm) : 205,84 ; 157,24 ; 141,81 ; 138,41 ; 127,98 ; 126,29 ; 120,77 ; 119,04 ; 115,09 ; 30,99 ; 30,68.

5-(2-hydroxypropane-2-yl)-2-(prop-2-ène-1-yl)phénol

(32)



La verrerie est lavée à l'acétone, séchée puis placée à l'étuve au moins 4 heures avant d'être utilisée.

Dans un ballon rodé tricol de 250 mL, dont 1 col est couplé à une ampoule à addition de 100 mL, sec et préalablement purgé à l'argon, on dilue 7,7 mL de MeMgBr 3M (4 éq., 22,7 mmol) dans 45 mL de THF anhydre. On agite très fortement la solution.

On dissout 1 g de 3'-hydroxy-4'-(prop-2-ène-1-yl)-acétophénone (1 éq., 5,68 mmol) dans 20 mL de THF anhydre.

A l'aide de l'ampoule à addition, le 3'-hydroxy-4'-(prop-2-ène-1-yl)-acétophénone est ajouté très lentement au MeMgBr (goutte à goutte, 1 goutte toutes les 4 secondes environ).

Le milieu est laissé sous très forte agitation pendant 4h.

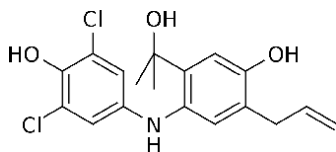
Après réaction, l'excédent de magnésien est neutralisé par de l'eau puis le milieu est acidifié par HCl dilué. Le THF est évaporé sous vide.

On extrait ensuite 2 fois la phase aqueuse par de l'AcOEt. On regroupe les différentes phases organiques, qui sont séchées sur Na₂SO₄, puis le solvant est évaporé. Le produit est récupéré sous forme d'un solide blanc (1,01 g ; 5,2 mmol ; ρ = 92 %).

RMN : ¹H ; 400 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,00 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 6,96 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 6,89 (dd ; J = 8 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 6,00-5,96 (m ; 1H) ; 5,05-5,23 (m ; 2H) ; 3,34 (d ; 6,4 Hz ; 2H) ; 1,51 (s ; 6H).

2,6-dichloro-4-[[4-hydroxy-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-5-(prop-2-ène-1-yl)phényl]amino]phénol

(33)



On dissout 100 mg de 5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(prop-2-ène-1-yl)phénol **31a** (1 éq., 0,52 mmol) dans du THF (0,76 mL) dans un ballon de 25 mL. On obtient une solution jaune très pâle. On ajoute ensuite sous agitation 110 mg de 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide (1 éq., 0,52 mmol). Une coloration rouge apparaît. Quand le deuxième produit est dissout, on ajoute 0,26 mL d'eau distillée. Le milieu est refroidi à 0°C dans un bain de glace. En maintenant le milieu réactionnel à 0°C, on ajoute goutte à goutte 0,55 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 2 M. La solution vire instantanément au bleu foncé intense. Après ajout de la soude, le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM, le produit formé apparaissant bleu sur plaque.

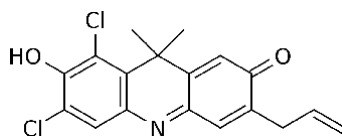
Après réaction, la soude est neutralisée par une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 M (1,5 mL). Après 30 minutes d'agitation, le composé est extrait par AcOEt/ $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois par AcOEt jusqu'à présenter une coloration bleue très pale. On regroupe toutes les fractions organiques, puis on ramène le volume de la phase organique à 15 mL par évaporation sous vide.

La phase organique recueillie est ensuite agitée très vigoureusement avec une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1,3 g dans 15 mL d'eau). Après 15 minutes d'agitation, la phase organique est isolée, puis agitée une seconde fois avec une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1,3 g dans 15 mL d'eau). La solution devient brun clair. On contrôle la réaction par CCM, le produit formé apparaissant brun sur plaque. On récupère la phase organique, qui est lavée 2 fois par une solution saturée en NaCl, puis séchée. Un produit intermédiaire brun est récupéré par évaporation. Le brut de réaction est analysé en RMN.

RMN : ^1H ; 300 MHz ; MeOD- d_4 ; δ (ppm) : 6,88 (d ; J = 6 Hz ; 2H) ; 6,74 (d ; J = 3 Hz ; 2H) ; 6,00-5,91 (m ; 1H) ; 5,04-4,98 (m ; 2H) ; 3,30 (d ; J = 6 Hz ; 2H) ; 1,54 (s ; 6H).

6,8-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyle-3-(prop-2-ène-1-yl)acridin-2-one

(34)



Le composé intermédiaire de synthèse **33** est repris dans 0,5 mL de MeOH. 12,5 mL d'une solution d'HCl 2N préalablement dégazée par bullage d'argon est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange est agité à reflux 1h30 sous argon. Après refroidissement, le mélange est extrait par une solution de NaCl saturée et AcOEt. La phase aqueuse est extraite une seconde fois par AcOEt. Les phases organiques sont ensuite combinées et leur volume est ramené à 20 mL par évaporation du solvant.

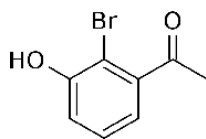
Cette phase est ensuite agitée fortement avec 5 mL d'une solution aqueuse de NaIO₄ (1,3 éq. ; 150 mg ; 0,7 mmol) et 5 mL d'une solution aqueuse de KMnO₄ (0,13 éq. ; 9 mg ; 0,07 mmol) pendant 15 minutes. Le milieu réactionnel devient progressivement rouge sombre. Les deux phases sont ensuite séparées, puis la phase organique est lavée une fois par une solution aqueuse de NaCl saturée et séchée sur Na₂SO₄. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le brut d'extraction purifié sur colonne de silice (éluant : Hept. / AcOEt : 1/1).

Le produit **34** est récupéré sous forme d'un solide noir (80 mg ; 0,23 mmol ; $\rho = 40\%$).

RMN : ¹H, 300 MHz, acétone-d₆, δ (ppm) : 7,67 (s ; 1H) ; 7,36 (s ; 1H) ; 7,06 (s ; 1H) ; 6,11-5,97 (m ; 1H) ; 5,20-5,08 (m ; 2H) ; 3,39 (d ; 7,5 Hz ; 2H) ; 1,85 (s ; 6H).

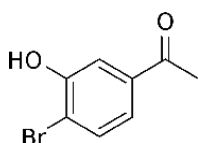
2'-bromo-3'-hydroxy-acétophénone

(35a)



4'-bromo-3'-hydroxy-acétophénone

(35b)



Dans un ballon sec purgé à l'argon, 32 g de 3'-hydroxy-acétophénone (1 éq. ; 235 mmol) sont mis en suspension dans 640 mL de CH₂Cl₂ anhydre. 41,6 g de NBS (1 éq. ; 235 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel.

On observe une dissolution complète des produits en chauffant à 40°C. Le milieu réactionnel est maintenu à reflux pendant 20h. Le solvant est ensuite évaporé et le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éluant : Hept./AcOEt/CH₂Cl₂ ; 50/10/40).

6 produits sont isolés. Par ordre d'éluion, il y a le composé tribromé **35d**, puis le composé **35a**, **35b** et **35c**. Du produit de départ n'ayant pas réagi est récupéré en fin d'éluion.

35a : solide blanc ; 5,1 g ; 23,7 mmol ; ρ = 10,1 %.

RMN : ¹H ; 300 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,24 (t ; 7,8 Hz ; 1H) ; 6,98 (dd ; 8,3 Hz et 1,3 Hz ; 1H) ; 6,91 (dd ; 7,5 Hz et 1,5 Hz ; 1H) ; 2,56 (s ; 3H).

35b : solide blanc ; 1,52 g ; 7,07 mmol ; ρ = 3 %

RMN : ¹H ; 400 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,59 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,45 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 7,36 (dd ; J = 8 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 2,55 (s ; 3H).

¹³C ; 400 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 199,57 ; 155,97 ; 138,98 ; 134,61 ; 121,95 ; 117,18 ; 116,26 ; 26,779.

35c : RMN : ¹H ; 300 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,40 (d ; 8,8 Hz ; 1H) ; 6,91 (d ; 2,8 Hz ;

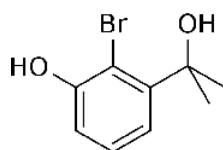
1H) ; 6,79 (dd ; 8,8 Hz et 2,8 Hz ; 1H) ; 2,55 (s ; 3H).

¹³C ; 300 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 203,54 ; 158,49 ; 143,71 ; 135,75 ; 120,33 ; 116,71 ; 107,89 ; 30,49.

35d : RMN : ¹H ; 300 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,76 (s ; 1H) ; 2,53 (s ; 3H)

2-bromo-3-(2-hydroxypropane-2-yl)phénol

(36a)



La verrerie est lavée à l'acétone, séchée et mise à l'étuve minimum 4h avant la manipulation. Le ballon est refroidit bouché par des septi dans un dessiccateur puis mis sous argon. L'ampoule à addition est refroidie sur le montage, sous argon.

Dans un ballon tricol de 250 mL, sec et purgé à l'argon, 10 mL de MeMgBr 3M dans Et₂O (4 éq. ; 27,2 mmol) sont dissous dans 100 mL de THF anhydre.

1,5 g de 2-bromo-3-hydroxy-acétophénone **35a** (1 éq. ; 6,98 mmol) est dissout dans 25 mL de THF anhydre, puis ajouté à température ambiante très lentement au milieu réactionnel, par l'ampoule à addition (goutte à goutte, sur 4 heures).

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation une nuit à température ambiante.

Après réaction, l'excès d'organo-magnésien est neutralisé par ajout d'eau (10 mL), puis le THF est évaporé sous vide.

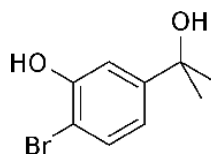
Le brut réactionnel est ensuite extrait par AcOEt/HCl aq 0,5 N. puis purifié sur colonne de silice (éluant : Hept/AcOEt/CH₂Cl₂ ; 50/10/40).

Le produit est récupéré sous forme d'une poudre blanchâtre (950 mg ; 4,3 mmol ; ρ = 62%).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; MeOD-d₄ ; δ (ppm) : 7,27 (dd ; J = 9 Hz et 3 Hz ; 1H) ; 7,12 (t ; J = 9 Hz ; 1H) ; 6,81 (dd ; J = 9 Hz et 3 Hz ; 1H) ; 1,73 (s ; 6H).

4-bromo-3-(2-hydroxypropane-2-yl)phénol

(36b)



La verrerie est lavée à l'acétone, séchée et mise à l'étuve minimum 4h avant la manipulation. Le ballon est refroidit bouché par des septi dans un dessiccateur puis mis sous argon. L'ampoule à addition est refroidie sur le montage, sous argon.

- Synthèse à partir du 4'-bromo-3'-hydroxy-acétophénone 35b :

Dans un ballon tricol de 250 mL, sec et purgé à l'argon, 6,2 mL de MeMgBr 3M dans Et₂O (4 éq. ; 18,6 mmol) sont dissous dans 40 mL de THF anhydre.

1 g de 2-bromo-3-hydroxy-acétophénone **35b** (1 éq. ; 4,65 mmol) est dissout dans 20 mL de THF anhydre, puis ajouté à température ambiante très lentement au milieu réactionnel, par l'ampoule à addition (goutte à goutte, sur 4 heures).

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation une nuit à température ambiante.

Après réaction, l'excès d'organo-magnésien est neutralisé par ajout d'eau (10 mL), puis le THF est évaporé sous vide.

Le brut réactionnel est ensuite extrait par AcOEt/HCl_{aq.} 0,5 N. puis purifié sur colonne de silice (éluant : Hept/AcOEt/CH₂Cl₂ ; 50/10/40).

Le produit est récupéré sous forme d'une poudre blanchâtre (860 mg ; 3,72 mmol ; ρ = 80 %).

- Synthèse à partir du 4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle 39a :

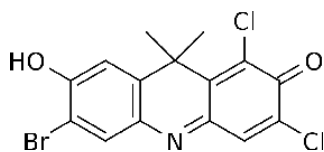
Les conditions réactionnelles sont identiques.

1 g de 4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle **39a** (1 éq. ; 4,3 mmol) dissout dans 10 mL de THF anhydre est additionné très lentement à une solution de 4,76 mL de MeMgBr 3M (3,3 éq. ; 14,3 mmol) dilué dans 80 mL de THF anhydre. Après réaction, le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide blanc (924 mg ; 4 mmol ; ρ = 93 %)

RMN : ¹H ; 300 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) : 9,99 (s ; 1H) ; 7,35 (d ; J = 9 Hz ; 1H) ; 7,12 (d ; 3 Hz ; 1H) ; 6,77 (dd ; J = 9 Hz et 3 Hz ; 1H) ; 1,37 (s ; 6H).

3-bromo-6,8-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyle-acridin-2-one

(37)



On dissout 500 mg de 4-bromo-3-(2-hydroxypropane-2-yl)phénol **36b** (1 éq., 2,17 mmol) dans 1 mL de THF. On ajoute ensuite sous agitation 456 mg de 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide (1 éq., 2,15 mmol). Une coloration rouge apparaît. Quand le deuxième produit est dissout, on ajoute 1 mL d'eau distillée. On refroidit le milieu à 0°C dans un bain de glace. En maintenant le milieu réactionnel à 0°C, on ajoute goutte à goutte 2,3 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 2M. La solution vire instantanément au bleu foncé intense. Après ajout de la soude, le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM, le produit formé apparaissant bleu sur plaque.

Après réaction, la soude est neutralisée par une solution de NH₄Cl, 2 M (20 mL). Après 30 minutes d'agitation, le composé est extrait par AcOEt/NH₄Cl_(aq). La phase aqueuse est extraite plusieurs fois par AcOEt jusqu'à présenter une coloration bleue très pale. On regroupe toutes les fractions organiques, puis on ramène le volume de la phase organique à 53 mL par évaporation sous vide.

La phase organique recueillie est ensuite agitée très vigoureusement avec une solution aqueuse de Na₂S₂O₄ (5,3 g dans 52 mL d'eau). Après 15 minutes d'agitation, la phase organique est isolée, puis agitée une seconde fois avec une solution aqueuse de Na₂S₂O₄ (5,3 g dans 52 mL d'eau). La solution devient brun clair. On récupère la phase organique, qui est lavée 2 fois par une solution saturée en NaCl, puis séchée sur Na₂SO₄. Un produit intermédiaire brun est récupéré par évaporation. Il est stocké à -20°C pour la nuit.

On reprend le produit formé dans 2,1 mL de méthanol. On ajoute lentement 52 mL d'une solution d'HCl_{aq}, 2M, préalablement dégazée par bullage d'argon. Sous argon, on agite la solution à reflux (bain à 100°C) pendant 1h30. Après réaction, on laisse refroidir la milieu à TA, puis le produit et extrait 2 fois par AcOEt/NaCl_{aq}.

Après extraction, la phase organique est ramenée à un volume de 84 mL. Elle est ensuite vigoureusement agitée avec une solution aqueuse de NaIO₄ (612 mg dans 21 mL H₂O) pendant 15 minutes. La solution prend progressivement une coloration rouge sombre. On suit la formation du produit par CCM, le produit formé apparaissant rouge fluorescent sur plaque en irradiant à 365 nm.

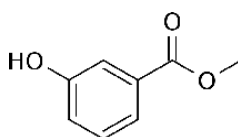
La phase organique est isolée, lavée 2 fois par NaCl_{aq} puis séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant est évaporé sous vide. Le brut de réaction est purifié sur colonne de silice (éluant : Hept. / AcOEt : 7/3).

Le produit **37** est récupéré sous forme d'un solide violet foncé (98,5 mg ; 0,25 mmol ; $\rho = 11,5 \%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) : 7,74 (s ; 2H) ; 7,13 (s ; 1H) ; 1,78 (s ; 6H).

3-hydroxybenzoate de méthyle

(38)



Dans un ballon de 100 mL, 5 g d'acide 3-hydroxybenzoïque (1 éq ; 36,2 mmol) sont dissous dans 30 mL de méthanol. Sous agitation, 6 gouttes d'acide sulfurique 98 % sont ajoutées au mélange. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit.

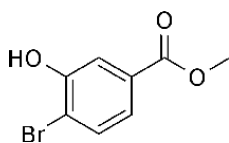
Après réaction, l'acide sulfurique est neutralisé par 10 mL d'une solution aqueuse de NaHCO_3 , 1M, puis l'excès de NaHCO_3 est traité par HCl 10 % jusqu'à arrêt du dégagement gazeux. Le méthanol est ensuite évaporé sous vide, puis la phase aqueuse est extraite 2 fois par AcOEt. Les phases organiques sont combinées et séchées sur Na_2SO_4 , puis le solvant est évaporé sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide blanc (5,54 g ; 35,8 mmol ; $\rho = 98 \%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 9,81 (s ; 1H) ; 7,40-7,35 (m ; 2H) ; 7,30 (t ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,03 (dd ; J = 8 Hz et 3 Hz ; 1H) ; 3,82 (s ; 3H).

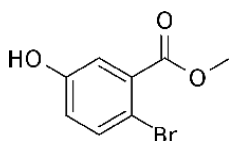
4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle

(39a)



2-bromo-5-hydroxybenzoate de méthyle

(39b)



Dans un ballon de 100 mL, 4,80 g de 3-hydroxybenzoate de méthyle (1 éq. ; 31,6 mmol) sont dissous dans 4 mL d'acide acétique. Sous agitation, on ajoute au goutte à goutte 1,63 mL de Br₂ (1 éq ; 31,6 mmol). La solution prend instantanément une coloration rouge.

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24h. Après réaction, le milieu réactionnel est traité par 480 mL d'une solution saturée de NaHSO₃, afin de neutraliser le dibrome n'ayant pas réagi, puis extrait par 480 mL d'AcOEt. La phase organique est lavée par 480 mL d'une solution de NaCl puis séchée. Le solvant est évaporé sous vide.

Le brut réactionnel est ensuite purifié sur colonne de silice (éluant : Hept./AcOEt 7/3). Deux produits sont isolés, il s'agit des 2 isomères 4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle et 2-bromo-5-hydroxybenzoate de méthyle.

4-bromo-3-hydroxybenzoate de méthyle **39a** : solide blanc (2,60 g ; 11,3 mmol ; ρ = 36 %).

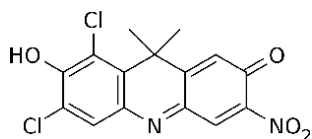
RMN : ¹H ; 300 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) = 10,72 (s ; 1H) ; 7,62 (d ; 8,3 Hz ; 1H) ; 7,52 (d ; 2,2 Hz ; 1H) ; 7,3 (dd ; 8,3 Hz et 2,2 Hz ; 1H) ; 3,33 (s ; 3H).

2-bromo-5-hydroxybenzoate de méthyle **39b** : solide blanc floconneux (2,70 g ; 11,7 mmol ; ρ = 37 %).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; DMSO-d₆ ; δ (ppm) = 10,09 (s ; 1H) ; 7,49 (d ; 8,8 Hz ; 1H) ; 7,14 (d ; 3,3 Hz ; 1H) ; 6,87 (dd ; 8,8 Hz et 3,3 Hz ; 1H) ; 3,83 (s ; 3H).

6,8-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-3-nitroacridin-2-one

(40)



204 mg de DDAO 25 (1 éq. ; 0,66 mmol) sont dissous dans 20 ml d'acétonitrile séché sur tamis 3 Å. La solution est refroidie à 0°C puis 77,3 mg de NO₂BF₄ (1 éq. ; 0,66 mmol) sont ajoutés en une fois au milieu réactionnel. La solution devient instantanément rose. Le mélange est agité sous argon pendant 2h30 à température ambiante.

Après réaction, le MeCN est évaporé puis le brut est extrait par de l'AcOEt et de l'eau. La phase organique est séchée et évaporée. On obtient un brut d'extraction brun foncé.

Le brut est purifié sur plaque de silice semi-préparative.

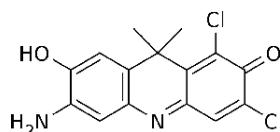
Le produit attendu est récupéré sous forme d'un solide brun rouge (62 mg ; 0,18 mmol ; ρ = 27 %).

RMN : ¹H ; 400 MHz ; acétone-d₆ ; δ (ppm) : 8,30 (s ; 1H) ; 7,70 (s ; 1H) ; 7,55 (s ; 1H) ; 1,98 (s ; 6H).

MM-[ES+APCI]⁺ : m/z : 353 [M+H]⁺ (³⁵Cl-³⁵Cl) ; 354,8 [M+H]⁺ (³⁵Cl-³⁷Cl).

3-amino-6,8-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethylacridin-2-one

(41)



62,4 mg de 6,8-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-3-nitroacridin-2-one **40** (1 éq. ; 0,18 mmol) sont dissous dans un mélange de 6 mL d'H₂O et 6 mL de MeOH. 1,5 g de Na₂S₂O₄ (49 éq. ; 8,83 mmol) sont ajoutés progressivement au milieu réactionnel qui est agité ensuite une nuit à température ambiante.

Le lendemain, le méthanol est évaporé sous vide puis la phase aqueuse est extraite par AcOEt. La phase organique est récupérée. Après évaporation du solvant sous vide, le brut d'extraction est purifié par CCM semi-préparative (éluant : Hept. / AcOEt : 4/6). La tâche la moins polaire

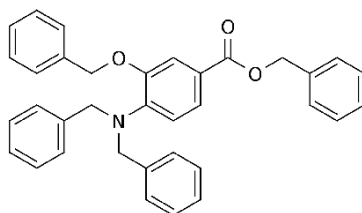
correspond au produit attendu, mais il est récupéré en très faible quantité.

RMN : ^1H ; 400 MHz ; acétone- d_6 ; δ (ppm) : 7,55 (s ; 1H) ; 6,70 (s ; 1H) ; 6,30 (s ; 1H) ; 1,80 (s ; 6H).

ESI Scan : m/z : 323,03 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (^{35}Cl - ^{35}Cl) ; 325,03 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (^{35}Cl - ^{37}Cl).

3-(benzyloxy)-4-(dibenzylamino)benzoate de benzyle

(42)



La verrerie est préalablement lavée à l'acétone, séchée et mise à l'étuve une nuit. K_2CO_3 et KI sont séchés sur P_2O_5 sous vide pendant 12 h.

Dans un ballon de 50 mL sec et purgé à l'argon, suspendre 500 mg de 4-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle (1 éq. ; 3mmol) dans 15 mL de DMF anhydre. Ajouter 2,5 mL de bromure de benzyle (7 éq. ; 21 mmol), 2,90 g de K_2CO_3 (7 éq. ; 21 mmol) et 1,50 g de KI (3 éq. ; 9 mmol). Le milieu est agité sous argon à 100°C pendant 36 h.

Après réaction, le brut réactionnel est dilué dans 300 mL d'AcOEt, puis extrait par 300 mL d'HCl 1M. La phase organique est ensuite lavée par 300 mL d'une solution saturée de NaCl, séchée puis le solvant est évaporé sous vide. Le brut est ensuite purifié par chromatographie flash (éluant : gradient progressif de 100% Hept. à 100% AcOEt.).

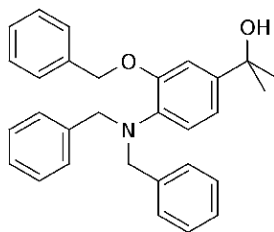
Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune visqueuse (1,02 g ; 2,00 mmol ; ρ = 66%).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 7,61 (d ; J = 2 Hz ; 1H) ; 7,47-7,32 (m ; 12H) ; 7,24-7,17 (m ; 9H) ; 6,88 (d ; J = 8 Hz ; 1H) ; 5,28 (s ; 2H) ; 5,25 (s ; 2H) ; 4,39 (s ; 4H).

MM-[ES+APCI] $^+$: m/z : 514,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[3-(benzyloxy)-4-(dibenzylamino)phenyl]propan-2-ol

(43)



La verrerie est préalablement lavée à l'acétone, séchée et placée à l'étuve une nuit.

Dans un ballon tricol de 100 mL, séché et purgé à l'argon, 930 mg de 3-(benzyloxy)-4-(dibenzylamino)benzoate de benzyle **42** (1 éq. ; 1,84 mmol) sont dissous dans 20 mL de THF anhydre. Le mélange est mis dans un bain de glace à 0°C. Sous argon et sous agitation, 1,36 mL de MeMgBr 3M (2,2 éq ; 4,08 mmol) sont ajoutés à la seringue en une fois.

Le mélange réactionnel est agité fortement à température ambiante sous argon pendant une nuit.

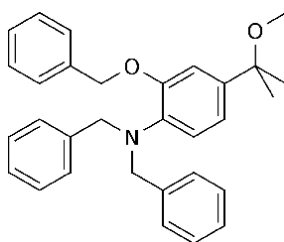
Après réaction, le milieu réactionnel est neutralisé par de l'eau, puis le THF est évaporé sous vide. La phase aqueuse résiduelle est ensuite extraite par AcOEt. La phase organique est ensuite lavée par une solution saturée de NaCl, séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé sous vide.

Le brut d'extraction est finalement purifié sur colonne de silice (éluant : Hept./AcOEt. : 2/8 puis Hept./CH₂Cl₂/AcOEt. : 5/4/1). Le produit attendu est obtenu sous forme d'une huile jaune (480 mg ; 1,1 mmol ; ρ = 60%).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; CDCl₃ ; δ (ppm) = 7,50-7,47 (m ; 2H) ; 7,40-7,33 (m ; 4H) ; 7,30-7,20 (m ; 9H) ; 7,18 (d ; 2Hz ; 1H) ; 6,88 (dd ; J = 8 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 6,83 (t , 8Hz , 1H) ; 5,22 (s ; 2H) ; 4,28 (s ; 4H) ; 1,55 (s ; 6H).

N,N-dibenzyl-2-(benzyloxy)-4-(2-methoxypropan-2-yl)aniline

(44)



La verrerie est lavée à l'acétone, séchée et mise à l'étuve 3 h au préalable.

Dans un ballon de 5 mL, sec et purgé à l'argon, 400 mg de 2-[3-(benzyloxy)-4-(dibenzylamino)phenyl]propan-2-ol **43** (1 éq. ; 0,91 mmol) sont dissous dans 0,5 mL de CH₂Cl₂ anhydre. Sous agitation et sous argon, 0,17 mL de MeSiI (1,3 éq. ; 1,19 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange réactionnel est agité 3 h sous argon.

Après réaction, 0,2 mL de méthanol sont ajoutés puis le diiode formé pendant la réaction est neutralisé par une solution saturée de NaHSO₃. La suspension obtenue est extraite par du CH₂Cl₂, puis la phase organique est rincée par de l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé sous vide. Le brut d'extraction est purifié sur colonne de silice (éluant : Hept./CH₂Cl₂ 30/70 puis 20/70).

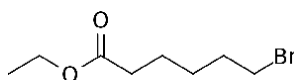
Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune (120 mg ; 0,27 mmol ; ρ = 30%).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; CDCl₃ ; δ (ppm) = 7,53 (d ; J = 7 Hz ; 2H) ; 7,44-7,24 (m ; 13H) ; 7,13 (s ; 1H) ; 6,85 (s ; 2H) ; 5,29 (s ; 2H) ; 4,35 (s ; 4H) ; 3,06 (s ; 3H) ; 1,54 (s ; 6H).

MM-[ES+APCI] m/z : 452,2 [M+H]⁺.

6-bromohexanoate d'éthyle

(45)



1 g d'acide 6-bromohexanoïque (1 éq. ; 5,13 mmol) est suspendu dans 15 mL d'EtOH absolu. Le milieu réactionnel est mis à chauffer. lorsqu'un léger reflux est atteint, 60 μ L d'H₂SO₄ sont ajoutés à la solution. Le mélange est agité à reflux 4h.

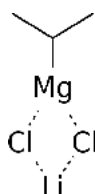
Après réaction, 70 ml d'eau glacée sont ajoutés au milieu, un léger précipité se forme. Le mélange réactionnel est extrait par AcOEt / H₂O. La phase organique est récupérée, séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé sous vide.

Le produit est obtenu sous forme d'une huile (1,10 g ; 4,93 mmol ; ρ = 96 %).

RMN : ¹H ; 300 MHz ; CDCl₃ ; δ (ppm) : 4,14 (q ; J = 6 Hz ; 2H) ; 3,42 (t ; J = 6 Hz ; 2H) ; 2,32 (t ; 6 Hz ; 2H) ; 1,94-1,84 (m ; 2H) ; 1,72-1,62 (m ; 2H) ; 1,54-1,46 (m ; 2H) ; 1,27 (t ; J = 6 Hz ; 3H).

Chlorure d'isopropylmagnésium, chlorure de lithium

(46)



La verrerie est séchée et placée à l'étuve la veille de son utilisation. Le magnésium et le LiCl sont séchés sous vide sur P₂O₅ pendant 12h avant leur utilisation.

Sous argon, 2,67 g de Mg (1 éq. ; 110 mmol) et 4,24 g de LiCl (1 éq. ; 100 mmol) sont suspendus dans 50 mL de THF anhydre.

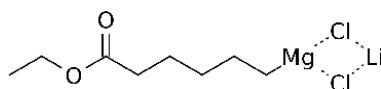
Dans un ballon bicol, sous argon, 9,14 mL de 2-chloropropane (1 éq. ; 100 mmol) sont dilués dans 50 mL de THF anhydre. Le contenu du bicol est ajouté dans la suspension de magnésium et de LiCl au moyen d'une canule.

Le mélange est agité sous argon pendant 12h. La conversion est prélevant un aliquot de la suspension. Cet aliquot est hydrolysé et extrait. La conversion du 2-chloropropane en magnésien entraîne la formation de propane lors de l'hydrolyse. La présence de 2-chloropropane résiduel est contrôlée par RMN.

Après disparition totale du 2-chloropropane, le mélange stocké sous argon.

6-(chloromagnésio)hexanoate d'éthyle, chlorure de lithium

(47)

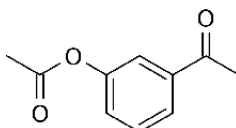


La verrerie est séchée et placée à l'étuve la veille de son utilisation.

Dans un ballon sec et purgé à l'argon, 200 mg de 6-bromohexanoate d'éthyle **45** est diué dans 0,4 mL de THF anhydre. La solution est refroidie à -40°C . Le magnésien **46** est transféré dans le milieu réactionnel sous argon au moyen d'une canule. Le mélange est agité sous argon, à -40°C pendant 12h. La conversion est contrôlée en prélevant un aliquot du milieu réactionnel. Après hydrolyse de l'aliquot, la disparition du signal $-\text{CH}_2\text{-Br}$ [3,42 (t ; J = 6 Hz ; 2H)] est contrôlée.

3'-acétoxyacétophénone

(48)



Dans un ballon purgé à l'argon, 5 g de 3'-hydroxyacétophénone (1 éq. ; 36,7 mmol) sont dissous dans 250 mL de CH_2Cl_2 . 34,66 mL d'anhydride acétique (10 éq. ; 367 mmol) sont ajoutés à la solution. 5 mL de pyridine sont enfin additionnés au milieu réactionnel.

Le mélange est agité 4h sous argon. Après réaction, le CH_2Cl_2 est évaporé sous vide et 200 mL d'eau glacée sont ajoutés, permettant d'hydrolyser l'anhydride acétique résiduel.

La phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 puis le solvant est évaporé sous vide.

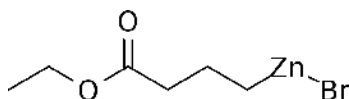
Le produit est récupéré sous la forme d'une huile jaune fluide (6,21 g ; 34,9 mmol ; $\rho = 95\%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; CDCl_3 ; δ (ppm) : 7,83 (dd ; J = 8 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 7,68 (t ; J = 2 Hz ; 1H) ; 7,49 (t ; J = 8 Hz ; 1H) ; 7,30 (dd ; J = 8 Hz et 2 Hz ; 1H) ; 2,61 (s ; 3H) ; 2,34 (s ; 3H).

$d = 1,136 \text{ g.cm}^{-3}$

4-(bromozincio)butanoate d'éthyle

(49)



Dans un ballon sec de 50 mL, préalablement purgé à l'argon, on mélange 0,213 g de lithium (2 équ. ; 30,6 mmol) et 3,99 g de naphthalène (2,02 équ. ; 31,2 mmol).

On ajoute 15 mL de THF anhydre. On agite fortement, toujours sous argon. La solution reste incolore pendant 1 à 2 minutes, puis vire rapidement au vert-noir. On laisse réagir pendant 4h sous forte agitation.

Dans un deuxième ballon de 50 mL, sec et purgé à l'argon, on dissout 2,09 g de $ZnCl_2$ (1 équ. ; 15,4 mmol) dans 15 mL de THF. La solubilisation n'est pas complète, la solution reste légèrement trouble. On transvase cette suspension à travers une canule dans le premier ballon.

On laisse réagit une nuit sous argon, à température ambiante et sous forte agitation.

La solution passe progressivement de noire à grisâtre.

Après une nuit 0,734 mL de 4-bromobutanoate d'éthyle (0,3 équ. ; 5,13 mmol) sont ajoutés sous argon dans le milieu réactionnel.

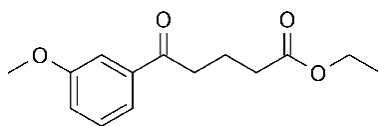
On laisse réagit à température ambiante sous argon pendant 3 heures.

La conversion du produit de départ est contrôlée par RMN. Pour cela, on prélève 1 mL de solution. On ajoute de l'eau pour hydrolyser le produit formé, l'organozincique réagit sur l'eau pour former l'alcène correspondant. On effectue une micro-extraction Et_2O/H_2O . La phase organique est évaporée, puis le résidu est analysé par RMN. On constate la disparition du pic $-CH_2-Br$ [3,46 ppm (t ; 6,4 Hz ; 2H)] et l'apparition d'un pic $-CH_3$ [1,04 ppm (t ; J = 7 Hz ; 3H)]. On en conclue à la conversion totale du produit de départ et à la formation de l'organozincique attendu.

Le milieu réactionnel est utilisé tel quel pour la suite de la réaction.

5-(3-méthoxyphényl)-5-oxopentanoate d'éthyle

(50)



La solution de 4-(bromozincio)butanoate d'éthyle 49 est refroidie à -20°C . 0,8 mL de chlorure de 3-méthoxybenzoyle (1 éq. ; 5,64 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le suivi de la réaction se fait sur plaque CCM.

Après réaction, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution aqueuse de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puis extraite par AcOEt. La phase organique est récupérée, séchée sur Na_2SO_4 puis l'acétate d'éthyle est évaporé sous vide.

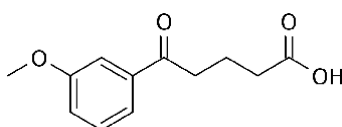
Le brut d'extraction est purifié sur colonne de silice (éluant : Hept. / AcOEt : 7/3).

Le produit attendu est récupéré sous la forme d'une huile (332 mg ; 1,33 mmol ; $\rho = 26\%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; CDCl_3 ; δ (ppm) : 7,58 (d ; $J = 8$ Hz ; 1H) ; 7,50 (s ; 1H) ; 7,28 (t ; $J = 8$ Hz ; 1H) ; 7,11 (d , 8 Hz ; 1H) ; 4,13 (q ; $J = 6$ Hz ; 2H) ; 3,81 (s ; 3H) ; 3,08 (t ; $J = 6$ Hz ; 2H) ; 2,45 (t ; $J = 6\text{Hz}$; 2H) ; 2,08 (t ; $J = 6$ Hz ; 2H) ; 1,26 (t ; $J = 6$ Hz ; 3H).

Acide 5-(3-méthoxyphényl)-5-oxopentanoïque

(51)



191 mg de l'ester 50 (1 éq. ; 0,77 mmol) sont solubilisés dans 1 mL d'EtOH. 1 mL d'une solution aqueuse de NaOH est ajoutée au milieu réactionnel. Un précipité se forme instantanément, puis se solubilise progressivement. Le mélange est agité 1h30 à température ambiante.

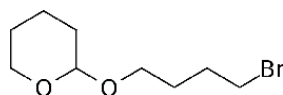
Après disparition du produit de départ, le milieu est acidifié par HCl 10%. Un précipité se forme. La suspension est extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 puis le solvant est évaporé sous vide.

Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide jaune (170 mg ; 0,77 mmol ; $\rho = 100\%$).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; MeOD- d_4 ; δ (ppm) : 7,61-7,57 (m ; 2H) ; 7,16-7,10 (m ; 2H) ; 3,83 (s ; 3H) ; 3,09-3,03 (m ; 2H) ; 2,43-2,36 (m ; 2H) ; 2,00-1,93 (m ; 2H).

2-(4-bromobutoxy)oxane

(52)



Dans un ballon de 500 mL, 9,18 mL de 4-bromobutane-1-ol (1 éq. ; 92 mmol) sont dilués dans 135 mL de dichlorométhane. 16,8 mL de 2,3-dihydropyrane sont ajoutés lentement à la solution.

Sous agitation, 875 mg d'acide *para*-toluènesulfonique, monohydrate (0,05 éq. ; 4,6 mmol) sont ensuite ajoutés au mélange, qui se colore progressivement de jaune pâle à noir.

Après une nuit sous agitation, le milieu réactionnel est neutralisé par 100 mL d'une solution de K_2CO_3 , 0,1 M. La phase organique est isolée, puis la phase aqueuse est extraite une fois par du dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées et séchées puis le solvant est évaporé sous vide.

Le brut de réaction est ensuite purifié sur colonne de silice (éluant : Hept./Et $_2$ O 5/1).

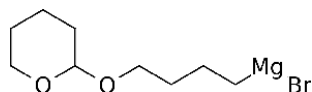
Le produit attendu est récupéré sous forme d'une huile jaune pâle (16 g ; 67 mmol ; ρ = 75 %).

RMN : ^1H ; 300 MHz ; CDCl_3 ; δ (ppm) = 4,55 (m ; 1H) ; 3,86-3,70 (m ; 2H) ; 3,55 (t ; 6,6 Hz ; 2H) ; 3,50-3,36 (m ; 2H) ; 1,88-1,81 (m ; 3H) ; 1,75-1,66 (m ; 3H) ; 1,57-1,49 (m ; 4H)

^{13}C ; 300 MHz ; CDCl_3 ; δ (ppm) = 99,04 ; 66,82 ; 62,50 ; 45,17 ; 31,02 ; 30,00 ; 27,44 ; 25,81 ; 19,91.

2-[4-(bromomagnésio)butoxy]oxane

(53)



La verrerie est séchée et placée à l'étuve la veille de son utilisation.

Dans un ballon sec et purgé à l'argon, 4,86 g de Mg (20 éq. ; 210 mmol) sont suspendus dans 100 mL de THF anhydre. Deux cristaux d'I₂ sont ajoutés. La suspension est agitée pendant 1h30.

2,5 g de 2-(4-bromobutoxy)oxane **52** (1 éq. ; 10,5 mmol) dilués dans 10 mL de THF anhydre sont alors ajoutés lentement au milieu réactionnel. Le milieu est agité une nuit sous argon.

L'avancement de la réaction est contrôlé par l'hydrolyse d'un aliquot suivi par un contrôle RMN de la disparition du pic -CH₂-Br. Le produit est identique au produit de départ.

La suspension est alors progressivement chauffée jusqu'au reflux. Elle prend alors une couleur gris vert. Après une agitation de 4h à reflux, le milieu réactionnel est refroidi et le contrôle RMN indique la disparition du signal -CH₂-Br et l'apparition d'un signal à 0,8 ppm intégrant pour 3H.

Le milieu réactionnel est alors transféré vers un ballon sec et purgé à l'argon au moyen d'une canule, pour être stocké.

Bibliographie

- [1] Lippincott-Schwartz, J.; Altan-Bonnet, N.; Patterson, G. H. "Photobleaching and Photoactivation: Following Protein Dynamics in Living Cells." ; *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, S7-S14.
- [2] Chudakov, D. M.; Belousov, V. V.; Zaraisky, A. G.; Novoselov, V. V.; Staroverov, D. B.; Zorov, D. B.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A. "Kindling Fluorescent Proteins for Precise in Vivo Photolabeling." ; *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 191-194.
- [3] Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. "Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution." ; *Science* **2006**, 313, 1642-1645.
- [4] Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. "Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) Provides Sub-Diffraction-Limit Image Resolution." ; *Nat. Methods* **2006**, 3, 793-795.
- [5] Toomre, D.; Bewersdorf, J. "A New Wave of Cellular Imaging." ; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, 26, 285-314.
- [6] Tatavarty, V.; Kim, E.; Rodionov, V.; Yu, J. "Investigating Sub-Spine Actin Dynamics in Rat Hippocampal Neurons With Super-Resolution Optical Imaging." ; *PLoS ONE* **2009**, 4, e7724.
- [7] Lakowicz, J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition." ; Springer, New York, **2006**.
- [8] Göppert-Mayer, M. "Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens Zweier Lichtquanten in Einem Elementarakt." ; *Naturwissenschaften* **1929**, 17, 932.
- [9] Göppert-Mayer, M. "Über Elementarakte Mit Zwei Quantensprungen." ; *Ann. Phys. (Leipzig)* **1931**, 401, 273-294.
- [10] Kaiser, W.; Garrett, C. G. B. "Two-Photon Excitation In CaF₂: Eu²⁺." ; *Phys. Rev. Lett.* **1961**, 7, 229-231.
- [11] Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. "Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 3244-3266.
- [12] Denk, W.; Stickler, J. H.; Webb, W. W. "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy." ; *Science* **1990**, 248, 73-76.
- [13] Rubart, M. "Two-Photon Microscopy of Cells and Tissues." ; *Circ. Res.* **2004**, 95, 1154-1166.
- [14] Furuta, T.; Wang, S. S. H.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. "Brominated 7-Hydroxycoumarin-4-Ylmethyls: Photolabile Protecting Groups With Biologically Useful Cross-Sections for Two Photon Photolysis." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 1193-1200.
- [15] Taroni, P.; Pifferi, A.; Torricelli, A.; Comelli, D.; Cubeddu, R. "In Vivo Absorption and Scattering Spectroscopy of Biological Tissues." ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 124-129.
- [16] Brown, E. B.; Shear, J. B.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y.; Webb, W. W. "Photolysis of Caged Calcium in Femtoliter Volumes Using Two-Photon Excitation." ; *Biophys. J.* **1999**, 76, 489-499.
- [17] Herschel, J. F. W. "On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless." ; *Phil. Trans. R. Soc. London* **1845**, 135, 143-145.
- [18] Stokes, G. G. "On the Change of Refrangibility of Light." ; *Phil. Trans. R. Soc. London* **1852**, 142, 463-562.
- [19] Kaufman, T. S.; Rúveda, E. A. "The Quest for Quinine: Those Who Won the Battles and Those Who Won the War." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 854-885.
- [20] Lavis, L. D.; Raines, R. T. "Bright Ideas for Chemical Biology." ; *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142-155.
- [21] Udenfriend, S. "Development of the Spectrophotofluorometer and Its Commercialization." ; *Protein Sci.* **1995**, 4, 542-551.
- [22] Kasha, M. "Charcterization of Electronic Transitions in Complex Molecules." ; *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, 9, 14-19.

- [23] Zelent, B.; Kusba, J.; Gryczynski, I.; Johnson, M. L.; Lakowicz, J. R. "Time-Resolved and Steady-State Fluorescence Quenching of *N*-Acetyl-Tryptophanamide by Acrylamide and Iodide." ; *Biophys. Chem.* **1998**, 73, 53.
- [24] de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. "Signaling Recognition Events With Fluorescent Sensors and Switche." ; *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515–1566.
- [25] De Silva, A. P.; Moody, T. S.; wright, G. D. "Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) Sensors as Potent Analytical Tools." ; *Analyst* **2009**, 134, 2385-2393.
- [26] Matsumoto, T.; Urano, Y.; Shoda, T.; Kojima, H.; Nagano, T. "A Thiol-Reactive Fluorescence Probe Based on Donor-Excited Photoinduced Electron Transfer: Key Role of Ortho Substitution." ; *Org. Lett.* **2007**, 9, 3375-3377.
- [27] Yi, L.; Li, H.; Sun, L.; Liu, L.; Zhang, C.; Xi, Z. "A Highly Sensitive Fluorescence Probe for Fast Thiol-Quantification Assay of Glutathione Reductase." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 4034-4037.
- [28] Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. "Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 4562–4588.
- [29] Komatsu, T.; Johnsson, K.; Okuno, H.; Bito, H.; Inoue, T.; Nagano, T.; Urano, Y. "Real-Time Measurements of Protein Dynamics Using Fluorescence Activation-Coupled Protein Labeling Method." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 6745-6751.
- [30] Weber, G. "Intramolecular Transfer of Electronic Energy in Dihydrodiphosphopyridine Nucleotide." ; *Nature* **1957**, 180, 1409.
- [31] Whitby, L. G. "A New Method for Preparing Flavin-Adenine Dinucleotide." ; *Biochem. J.* **1953**, 54, 437–442.
- [32] Cavaluzzi, M. J.; Borer, P. N. "Revised UV Extinction Coefficients for Nucleoside-5'-Monophosphates and Unpaired DNA and RNA." ; *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e13.
- [33] Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D.; Basey, A. "The Handbook: a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Vol. 10th Ed.. Molecular Probes." ; Eugene, OR, **2005**.
- [34] Bright, F. V.; Munson, C. A. "Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy for Illuminating Complex Systems." ; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 500, 71–104.
- [35] Owicki, J. C. "Fluorescence Polarization and Anisotropy in High Throughput Screening: Perspectives and Primer." ; *J. Biomol. Screen* **2000**, 5, 297–306.
- [36] Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein From the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*." ; *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223-239.
- [37] Shimomura, O. "Structure of the Chromophore of *Aequorea* Green Fluorescent Protein." ; *FEBS Lett.* **1979**, 104, 220-222.
- [38] Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. "Primary Structure of the *Aequorea Victoria* Green- Fluorescent Protein." ; *Gene* **1992**, 111, 229-233.
- [39] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." ; *Science* **1994**, 263, 802-805.
- [40] Tsien, R. Y. "The Green Fluorescent Protein." ; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544.
- [41] Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A. "Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues." ; *Physiol. Rev.* **2010**, 90, 1103-1163.
- [42] Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. "Understanding, Improving and Usind the Green Fluorescent Protein." ; *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 448-455.
- [43] Weber, G. "Polarization of the Fluorescence of Macromolecules II. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin." ; *Biochem. J.* **1952**, 51, 155–167.

- [44] Daniel, E.; Weber, G. "Cooperative Effects in Binding by Bovine Serum Albumin. i. the Binding of 1-Anilino-8-Naphthalenesulfonate. Fluorimetric Titrations." ; *Biochemistry* **1966**, *5*, 1893–1900.
- [45] Weber, G.; Farris, F. J. "Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(Dimethylamino)Naphthalene." ; *Biochemistry* **1979**, *18*, 3075–3078.
- [46] Hudson, E. N.; Weber, G. "Synthesis and Characterization of Two Fluorescent Sulfhydryl Reagents." ; *Biochemistry* **1973**, *12*, 4154–4161.
- [47] Maggiora, L. L.; Smith, C. W.; Zhang, Z. Y. "A General Method for the Preparation of Internally Quenched Fluorogenic Protease Substrates Using Solid-Phase Peptide Synthesis." ; *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3727-3730.
- [48] Tyagi, S.; Kramer, F. R. "Molecular Beacons: Probes That Fluoresce Upon Hybridization." ; *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [49] Stewart, W. W. "Synthesis of 3,6-Disulfonated 4-Aminonaphthalimides." ; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7615–7620.
- [50] Karpovich, D. S.; Blanchard, G. J. "Relating the Polarity-Dependent Fluorescence Response of Pyrene to Vibronic Coupling. Achieving a Fundamental Understanding of the Py Polarity Scale." ; *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3951–3958.
- [51] Smalley, M. K.; Silverman, S. K. "Fluorescence of Covalently Attached Pyrene as a General RNA Folding Probe." ; *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 152–166.
- [52] Sahoo, D.; Narayanaswami, V.; Kay, C. M.; Ryan, R. O. "Pyrene Excimer Fluorescence: a Spatially Sensitive Probe to Monitor Lipid-Induced Helical Rearrangement of Apolipoprotein III." ; *Biochemistry* **2000**, *39*, 6594–6601.
- [53] Whitaker, J. E.; Haugland, R. P.; Moore, P. L.; Hewitt, P. C.; Reese, M.; Haugland, R. P. "Cascade Blue Derivatives: Water Soluble, Reactive, Blue Emission Dyes Evaluated as Fluorescent Labels and Tracers." ; *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 119-130.
- [54] Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G. M.; Kruger, P. E.; Pfeffer, F. M. "Anion Recognition and Sensing in Organic and Aqueous Media Using Luminescent and Colorimetric Sensors." ; *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094.
- [55] Süßmeier, F.; Langhals, H. "Novel Fluorescence Labels: the Synthesis of Perylene-3,4,9-Tricarboxylic Imide." ; *Eur. J. Org. Chem* **2001**, 607-610.
- [56] Kohl, C.; Weil, T.; Qu, J.; Müllen, K. "Towards Highly Fluorescent and Water-Soluble Perylene Dyes." ; *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5297–5310.
- [57] Davenport, L.; Shen, B.; Joseph, T. W.; Straher, M. P. "A Novel Fluorescent Coronenyl-Phospholipid Analogue for Investigations of Submicrosecond Lipid Fluctuations." ; *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *109*, 145-156.
- [58] Sun, W. C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. "Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes." ; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107–3110.
- [59] Valeur, B. "Molecular Fluorescence: Principles and Applications." ; Wiley–VCH, Weinheim, **2002**.
- [60] Grandberg, I. I.; Denisov, L. K.; Popova, O. A. "7-Aminocoumarins." ; *Chem. Heterocycl. Compd. (N.Y.)* **1987**, *23*, 117–142.
- [61] Puliti, D. "Sondes Fluorogéniques Pour la Détection et L'étude de la Dynamique de Protéines Cellulaires." Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France, **2010**.
- [62] Eaton, D. F. "Reference Materials for Fluorescence Measurement." ; *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107–1114.
- [63] Schulman, S. G.; Threatte, R. M.; Capomacchia, A. C.; Paul, W. L. "Fluorescence of 6-Methoxyquinoline, Quinine, and Quinidine in Aqueous Media." ; *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 876-880.
- [64] Jayaraman, S.; Verkman, A. S. "Quenching Mechanism of Quinolinium-Type Chloride-Sensitive Fluorescent Indicators." ; *Biophys. Chem.* **2000**, *85*, 49-57.

- [65] Shults, M. D.; Carrico-Moniz, D.; Imperiali, B. "Optimal Sox-Based Fluorescent Chemosensor Design for Serine/Threonine Protein Kinases." ; *Anal. Biochem.* **2006**, 352, 198-207.
- [66] Tsien, R. Y. "New Calcium Indicators and Buffers With High Selectivity Against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures." ; *Biochemistry* **1980**, 19, 2396-2404.
- [67] Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. "A New Generation of Ca²⁺ Indicators With Greatly Improved Fluorescence Properties." ; *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 3440-3450.
- [68] Larsen, T. A.; Goodsell, D. S.; Cascio, D.; Grzeskowiak, K.; Dickerson, R. E. "The Structure of DAPI Bound to DNA." ; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, 7, 477-491.
- [69] Crissman, H. A.; Hirons, G. T. "Staining of DNA in Live and Fixed Cells." ; *Methods Cell Biol.* **1994**, 41, 195-209.
- [70] Petit, J. M.; Denis-Gay, M.; Ratinaud, M. H. "Assessment of Fluorochromes for Cellular Structure and Function Studies by Flow Cytometry." ; *Biol. Cell* **1993**, 78, 1-13.
- [71] Ghosh, P. B.; Whitehouse, M. W. "7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole: a New Fluorogenic Reagent for Amino Acids and Other Amines." ; *Biochem. J.* **1968**, 108, 155-156.
- [72] Andrews, J. L.; Ghosh, P.; Ternai, B.; Whitehouse, M. W. "Ammonium 4-Chloro-7-Sulfobenzofurazan: a New Fluorogenic [Sic] Thiol-Specific Reagent." ; *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 214, 386-396.
- [73] Anderson, M. T.; Baumgarth, N.; Haugland, R. P.; Gerstein, R. M.; Tjioe, T.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. "Pairs of Violet-Light-Excited Fluorochromes for Flow Cytometric Analysis." ; *Cytometry* **1998**, 33, 435-444.
- [74] Baeyer, A. "Ueber Eine Neue Klasse Von Farbstoffen.." ; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1871**, 4, 555-558.
- [75] Sun, W. C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. "Synthesis of Fluorinated Fluoresceins." ; *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6469-6475.
- [76] Graber, M. L.; Dilillo, D. C.; Friedman, B. L.; Pastorizamunoz, E. "Characteristics of Fluoroprobes for Measuring Intracellular pH." ; *Anal. Biochem.* **1986**, 156, 202-212.
- [77] Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. "Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4888-4894.
- [78] Kamiya, M.; Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y. "An Enzymatically Activated Fluorescence Probe for Targeted Tumor Imaging." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3918-3929.
- [79] Lavis, L. D.; Chao, T. Y.; Raines, R. T. "Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging." ; *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 252-260.
- [80] Johnson, I. "Fluorescent Probes for Living Cells." ; *Histochem. J.* **1998**, 30, 123-140.
- [81] Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. "Design and Synthesis of Fluorescent Probes for Selective Detection of Highly Reactive Oxygen Species in Mitochondria of Living Cells.." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10324-10325.
- [82] Whitaker, J. E.; Haugland, R. P.; Ryan, D.; Hewitt, P. C.; Haugland, R. P.; Prendergast, F. G. "Fluorescent Rhodol Derivatives: Versatile, Photostable Labels and Tracers." ; *Anal. Biochem.* **1992**, 207, 267-279.
- [83] Lee, L. G.; Berry, G. M.; Chen, C. H. "Vita Blue: a New 633-Nm Excitable Fluorescent Dye for Cell Analysis." ; *Cytometry* **1989**, 10, 151-164.
- [84] Whitaker, J. E.; Haugland, R. P.; Prendergast, F. G. "Spectral and Photophysical Studies of Benzo[C] Xanthene Dyes: Dual Emission pH Sensors.." ; *Anal. Biochem.* **1991**, 194, 330-344.
- [85] Chang, C. J.; Jaworski, J.; Nolan, E. M.; Sheng, M.; Lippard, S. J. "A Tautomeric Zinc Sensor for Ratiometric Fluorescence Imaging: Application to Nitric Oxide-Induced Release of Intracellular Zinc." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2004**, 101, 1129-1134.
- [86] Loudet, A.; Burgess, K. "BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic

- Properties.." ; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.
- [87] Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. "Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride(BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins." ; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806.
- [88] Thompson, V. F.; Saldaña, S.; Cong, J.; Goll, D. E. "A BODIPY Fluorescent Microplate Assay for Measuring Activity of Calpains and Other Proteases." ; *Anal. Biochem.* **2000**, *279*, 170-178.
- [89] Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. "Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters." ; *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4*, 105-111.
- [90] Waggoner, A. "Fluorescent Labels for Proteomics and Genomics." ; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 62-66.
- [91] Gruber, H. J.; Hahn, C. D.; Kada, G.; Riener, C. K.; Harms, G. S.; Ahrer, W.; Dax, T. G.; Knaus, H. G. "Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 Versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 Upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin." ; *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 696-704.
- [92] Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. "The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin With Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction." ; *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 395-390.
- [93] O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. "Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity." ; *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
- [94] Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. "A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases." ; *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 162-168.
- [95] Barani, A. E.; Durieux, A. C.; Sabido, O.; Freyssenet, D. "Age-Related Changes in the Mitotic and Metabolic Characteristics of Muscle-Derived Cells." ; *J. Appl. Physiol.* **2003**, *95*, 2089-2098.
- [96] Leprat, P.; Ratinaud, M. H.; Maftah, A.; Petit, J. M.; Julien, R. "Use of Nonyl Acridine Orange and Rhodamine 123 to Follow Assembly of Mitochondrial Membrane During L1210 Cell Cycle." ; *Exp. Cell Res.* **1990**, *186*, 130-137.
- [97] Corey, P. F.; Trimmer, R. W.; Biddlecom, W. G. "A New Chromogenic B-Galactosidase Substrate: 7-B-D-Galactopyranosyloxy-9,9-Dimethyl-9H-Acridin-2-One." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1646-1648.
- [98] Richard, J. A.; Meyer, Y.; Jolivel, V.; Massonneau, M.; Dumeunier, R.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Renard, P. Y.; Romieu, A. "Latent Fluorophores Based on a Self-Immolative Linker Strategy and Suitable for Protease Sensing." ; *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1707-1718.
- [99] Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. "Nonlinear Magic: Multiphoton Microscopy in the Biosciences." ; *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369-1377.
- [100] Mayer, G.; Heckel, A. "Biologically Active Molecules With a "Light Switch"." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4900-4921.
- [101] Goeldner, M.; Givens, R. "Dynamic Studies in Biology." ; Wiley-VCH, **2005**.
- [102] Puliti, D.; Warther, D.; Orange, C.; Specht, A.; Goeldner, M. "Small Photoactivatable Molecules for Controlled Fluorescence Activation in Living Cells." ; *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1023-1029.
- [103] McKinney, S. A.; Murphy, C. S.; Hazelwood, K. L.; Davidson, M. W.; Looger, L. L. "A Bright and Photostable Photoconvertible Fluorescent Protein for Fusion Tags." ; *Nat. Methods* **2009**, *2*, 131-133.
- [104] Subach, F. V.; Patterson, G. H.; Manley, S.; Gillette, J. M.; Lippincott-Schwartz, J.; Verkhusha, V. V. "Photoactivatable mCherry for High-Resolution Two-Color Fluorescence

- Microscopy.* ; *Nat. Methods* **2009**, 6, 153-159.
- [105] Amit, B.; Ben-Efraim, D. A.; Patchornik, A. "Light-Sensitive Amides. the Photosolvolysis of Substituted 1-Acyl-7 Nitroindolines." ; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 843-844.
- [106] Kaplan, J. H.; Forbush III, B.; Hoffman, J. F. "Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate From a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts." ; *Biochemistry* **1978**, 17, 1929 – 1935.
- [107] Engels, J.; Schlaeger, E. J. "Synthesis, Structure, and Reactivity of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate-Benzyltriesters." ; *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 907-911.
- [108] Wieboldt, R.; Gee, K. R.; Niu, L.; Ramesh, D.; Carpenter, B. K.; Hess, G. P. "Photolabile Precursor of Glutamate: Synthesis, Photochemical Properties, and Activation of Glutamate Receptors on a Microsecond Time Scale." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 8752-8756.
- [109] Corrie, J. E. T.; De Santis, A.; Katayama, Y.; Khodakhah, K.; Messenger, J. B.; Ogden, D. C.; Trentham, D. R. "Postsynaptic Activation at the Squid Giant Synapse by Photolytic Release of L-Glutamate From a "Caged" L-Glutamate." ; *J. Physiol. (Lond.)* **1993**, 465, 1-8.
- [110] Ramesh, D.; Wieboldt, R.; Billington, A. P.; Carpenter, B. K.; Hess, G. P. "Photolabile Precursors of Biological Amides: Synthesis and Characterization of Caged O-Nitrobenzyl Derivatives of Glutamine, Asparagine, Glycinamide, and 7 -Aminobutyramide." ; *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4599-4605.
- [111] Peng, L.; Goeldner, M. "Synthesis and Characterization of Photolabile Choline Precursors as Reversible Inhibitors of Cholinesterases: Release of Choline in the Microsecond Time Range." ; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 185-191.
- [112] Orange, C.; Specht, A.; Puliti, D.; Sakr, E.; Furuta, T.; Winsor, B.; Goeldner, M. "Synthesis and Photochemical Properties of a Light-Activated Fluorophore to Label His-Tagged Proteins." ; *Chem. Commun.* **2008**, 1217-1219.
- [113] Wilkins, B. J.; Yang, X.; Cropp, T. A. "Photochemical Control of FLaSH Labeling of Proteins." ; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4296-4298.
- [114] Hasan, A.; Stengele, K.; Giegrich, H.; Cornwell, P.; Isham, K. R.; Sachleben, R. A.; Pfeleiderer, W.; Foote, R. S. "Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Synthesis and Photodeprotection Rates." ; *Tetrahedron* **1997**, 53, 4247-4264.
- [115] Specht, A.; Goeldner, M. "1-(O-Nitrophenyl)-2,2,2-Trifluoroethyl Ether Derivatives as Stable and Efficient Photoremovable Alcohol-Protecting Groups." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 2008-2012.
- [116] Adams, S. R.; Kao, J. P. Y.; tsien, R. Y. "Biologically Useful Chelators That Take Up Ca²⁺ Upon Illumination." ; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7957-7968.
- [117] Momotake, A.; Lindegger, N.; Niggli, E.; Barsotti, R. J.; Ellis-Davies, G. C. R. "The Nitrodibenzofuran Chromophore: a New Caging Group for Ultra-Efficient Photolysis in Living Cells." ; *Nat. Methods* **2006**, 3, 35-40.
- [118] Pirrung, M. C.; Lee, Y. R.; Park, K.; Springer, J. B. "Pentadienylnitrobenzyl and Pentadienylnitropiperonyl Photochemically Removable Protecting Groups." ; *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5042-5047.
- [119] Pfeleiderer, W.; Giegrich, H. , *Preparation of Nucleoside Derivatives With Photolabile Protecting Groups. De 4444996 A1 19960620.. Ger. Offen.* **1996**
- [120] Walbert, S.; Pfeleiderer, W.; Steiner, U. E. "Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Mechanistic Studies of the 2-(2-Nitrophenyl)Ethyl Group." ; *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1601-1611.
- [121] Specht, A.; Thomann, J.; Alarcon, K.; Wittayanan, W.; Ogden, D.; Furuta, T.; Kurakawa, Y.; Goeldner, M. "New Photoremovable Protecting Groups for Carboxylic Acids With High Photolytic Efficiencies at Near-UV Irradiation. Application to the Photocontrolled Release of L-Glutamate." ; *ChemBioChem* **2006**, 7, 1690-1695.
- [122] Hagen, V.; Frings, S.; Wiesner, B.; Helm, S.; Kaupp, U. B.; Bendig, J. "[7-

- (Dialkylamino)Coumarin-4-yl]Methyl-Caged Compounds as Ultrafast and Effective Long-Wavelength Phototriggers of 8-Bromo-Substituted Cyclic Nucleotides." ; *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434-442.
- [123] Fedoryak, O. D.; Dore, T. M. "Brominated Hydroxyquinoline as a Photolabile Protecting Group With Sensitivity to Multiphoton Excitation." ; *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419-3422.
- [124] Park, C. H.; Givens, R. S. "New Photoactivated Protecting Groups. 6. *p*-Hydroxyphenacyl: a Phototrigger for Chemical and Biochemical Probes." ; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2453-2463.
- [125] Papageorgiou, G.; Barth, A.; Corrie, J. E. T. "Flash Photolytic Release of Alcohols From Photolabile Carbamates or Carbonates Is Rate-Limited by Decarboxylation of the Photoproduct." ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 216-220.
- [126] Ellis-Davies, G. C. R. "Caged Compounds: Photorelease Technology for Control of Cellular Chemistry and Physiology." ; *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619-628.
- [127] Denk, W. "Two-Photon Scanning Photochemical Microscopy: Mapping Ligand-Gated Ion Channel Distributions." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 6629-6633.
- [128] Warther, D.; Gug, S.; Specht, A.; Bolze, F.; Nicoud, J.; Mourot, A.; Goeldner, M. "Two-Photon Uncaging: New Prospects in Neuroscience and Cellular Biology." ; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753-7758.
- [129] Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J.; Neveu, P.; Jullien, L. "O-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups With Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation." ; *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865-6879.
- [130] Zhao, Y. R.; Zheng, Q.; Dakin, K.; Xu, K.; Martinez, M. L.; Li, W. H. "New Caged Coumarin Fluorophores With Extraordinary Uncaging Cross Sections Suitable for Biological Imaging Applications." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653-4663.
- [131] Hagen, V.; Dekowski, B.; Nache, V.; Schmidt, R.; Geissler, D.; Lorenz, D.; Eichhorst, J.; Keller, S.; Kaneko, H.; Benndorf, K.; Wiesner, B. "Coumarinylmethyl Esters for Ultrafast Release of High Concentrations of Cyclic Nucleotides Upon One- and Two-Photon Photolysis." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7887-7891.
- [132] Hagen, V.; Dekowski, B.; Kotzur, N.; Lechler, R.; Wiesner, B.; Briand, B.; Beyermann, M. "{7-[Bis(Carboxymethyl)Amino]Coumarin-4-yl}Methoxycarbonyl Derivatives for Photorelease of Carboxylic Acids, Alcohols/Phenols, Thioalcohols/Thiophenols, and Amines." ; *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1621-1627.
- [133] Furuta, T.; Takeuchi, H.; Isozaki, M.; Takahashi, Y.; Kanehara, M.; Sugimoto, M.; Watanabe, T.; Noguchi, K.; Dore, T. M.; Kurahashi, T.; Iwamura, M.; Tsien, R. Y. "Bhc-cNMPs as Either Water-Soluble or Membrane-Permeant Photoreleasable Cyclic Nucleotides for Both One- and Two-Photon Excitation." ; *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1119.
- [134] Gug, S.; Charon, S.; Specht, A.; Alarcon, K.; Ogden, D.; Zietz, B.; Léonard, J.; Haacke, S.; Bolze, F.; Nicoud, J.; Goeldner, M. "Photolabile Glutamate Protecting Group With High One- and Two-Photon Uncaging Efficiencies." ; *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303-1307.
- [135] Gug, S.; Bolze, F.; Specht, A.; Bourgoigne, C.; Goeldner, M.; Nicoud, J. "Molecular Engineering of Photoremovable Protecting Groups for Two-Photon Uncaging." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 9525-9529.
- [136] Fedoryak, O. D.; Sul, J. Y.; Haydon, P. G.; Ellis-Davies, G. C. R. "Synthesis of a Caged Glutamate for Efficient One- and Two-Photon Photorelease on Living Cells." ; *Chem. Commun.* **2005**, 3664-3666.
- [137] Ellis-Davies, G., WO 2008094922 A1 20080807. PCT Int. Appl. **2008**
- [138] Ellis-Davies, G. C. R.; Matsuzaki, M.; Paukert, M.; Kasai, H.; Bergles, D. E. J. "4-Carboxymethoxy-5,7-Dinitroindolyl-Glu: an Improved Caged Glutamate for Expedient Ultraviolet and Two-Photon Photolysis in Brain Slices." ; *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6601-6604.
- [139] Zhu, Y.; Pavlos, C. M.; Toscano, J. P.; Dore, T. M. "8-Bromo-7-Hydroxyquinoline as a Photoremovable Protecting Group for Physiological Use: Mechanism and Scope." ; *J. Am. Chem.*

Soc. **2006**, 128, 4267-4276.

[140] Fino, E.; Araya, R.; Peterka, D. S.; Salierno, M.; Etchenique, R.; Yuste, R. "*RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic Spine.*" ; *Front. Neural Circuits* **2009**, 3, 1-9.

[141] Rial Verde, E. M.; Zayat, L.; Etchenique, R.; Yuste, R. "*Photorelease of GABA With Visible Light Using an Inorganic Caging Group.*" ; *frontiers in neural circuits* **2008**, 2, 1-8.

[142] Mitchison, T. J.; Sawin, K. E.; Theriot, J. A.; Gee, K.; Mallavarapu, A. "*Caged Fluorescent Probes.*" ; *Meth. Enzymol.* **1998**, 291, 63-77.

[143] Ottl, J.; Gabriel, D.; Marriott, G. "*Preparation and Photoactivation of Caged Fluorophores and Caged Proteins Using a New Class of Heterobifunctional, Photocleavable Cross-Linking Reagents.*" ; *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 143-151.

[144] Krafft, G. A.; Sutton, W. R.; Cummings, R. T. "*Photoactivable Fluorophores. 3. Synthesis and Photoactivation of Fluorogenic Difunctionalized Fluoresceins.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 301-303.

[145] Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. D.; Samuel, R.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. "*A Photoactivatable Push-Pull Fluorophore for Single-Molecule Imaging in Live Cells.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9024-9025.

[146] Belov, V. N.; Bossi, M. L.; Fölling, J.; Boyarskiy, V.; Hell, S. W. "*Rhodamine Spiroamides for Multicolor Single-Molecule Switching Fluorescent Nanoscopy.*" ; *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 10762.

[147] Gramlich, G.; Nau, W. M. "*A Photoactivable Fluorophore Based on Thiadiazolidinedione as Caging Group.*" ; *Org. Lett.* **1999**, 1, 603-606.

[148] Majjigapu, J. R. R.; Kurchan, A. N.; Kottani, R.; Gustafson, T. P.; Kutateladze, A. G. "*Release and Report: a New Photolabile Caging System With a Two-Photon Fluorescence Reporting Function.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12458-12459.

[149] Gagey, N.; Neveu, P.; Jullien, L. "*Two-Photon Uncaging With the Efficient 3,5-Dibromo-2,4-Dihydroxycinnamic Caging Group.*" ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 2467-2469.

[150] Gagey, N.; Emond, M.; Neveu, P.; Benbrahim, C.; Goetz, B.; Aujard, I.; Baudin, J. B.; Jullien, L. "*Alcohol Uncaging With Fluorescence Reporting: Evaluation of O-Acetoxyphenyl Methyloxazolone Precursors.*" ; *Org. Lett.* **2008**, 10, 2341-2344.

[151] Blake, J. A.; Lukeman, M.; Scaiano, J. C. "*Photolabile Protecting Groups Based on the Singlet State Photodecarboxylation of Xanthone Acetic Acid.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4127-4135.

[152] Warther, D.; Bolze, F.; Léonard, J.; Gug, S.; Specht, A.; Puliti, D.; Sun, X.; Kessler, P.; Lutz, Y.; Vonesch, J.; Winsor, B.; Nicoud, J.; Goeldner, M. "*Live-Cell One- and Two-Photon Uncaging of a Far-Red Emitting Acridinone Fluorophore.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2585-2590.

[153] Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T. "*Highly Activatable and Rapidly Releasable Caged Fluorescein Derivatives.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6696-6697.

[154] Lee, H. M.; Priestman, M. A.; Lawrence, D. S. "*Light-Mediated Spatial Control via Photolabile Fluorescently Quenched Peptide Cassettes.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1446-1447.

[155] Hinner, M. J.; Johnsson, K. "*How to Obtain Labeled Proteins and What to do With Them.*" ; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 766-776.

[156] Das, S. C.; Panda, D.; Nayak, D.; Pattnaik, A. K. "*Biarsenical Labeling of Vesicular Stomatitis Virus Encoding Tetracysteine-Tagged M Protein Allows Dynamic Imaging of M Protein and Virus Uncoating in Infected Cells.*" ; *J. Virol.* **2009**, 83, 2611-2622.

[157] Andresen, M.; Schmitz-Salue, R.; Jakobs, S. "*Short Tetracysteine Tags to B-Tubulin Demonstrate the Significance of Small Labels for Live Cell Imaging.*" ; *Mol. Biol. Cell* **2004**, 15, 5616-5622.

[158] Uttamapinant, C.; White, K. A.; Baruah, H.; Thompson, S.; Fernández-Suárez, M.;

- Puthenveetil, S.; Ting, A. Y. "A Fluorophore Ligase for Site-Specific Protein Labeling Inside Living Cells." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 10914-10919.
- [159] Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. "Conversion of a Protein to a Homogeneous Asymmetric Hydrogenation Catalyst by Site-Specific Modification With a Diphosphinerhodium(i) Moiety." ; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306-307.
- [160] Davies, C. L.; Dux, E. L.; Duhme-Klair, A. "Supramolecular Interactions Between Functional Metal Complexes and Proteins." ; *Dalton Trans.* **2009**, 10141-10154.
- [161] Miller, L. W.; Cai, Y.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W. "In Vivo Protein Labeling With Trimethoprim Conjugates: a Flexible Chemical Tag." ; *Nat. Methods* **2005**, *2*, 255-257.
- [162] Guignet, E. G.; Hovius, R.; Vogel, H. "Reversible Site-Selective Labeling of Membrane Proteins in Live Cells." ; *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 440.
- [163] Kapanidis, A. N.; Ebricht, Y. W.; Ebricht, R. H. "Site-Specific Incorporation of Fluorescent Probes Into Protein: Hexahistidine-Tag-Mediated Fluorescent Labeling With (Ni²⁺:Nitrilotriacetic Acid)*N*-Fluorochrome Conjugates." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12123-12125.
- [164] Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampé, R.; Piehler, J. "High-Affinity Adaptors for Switchable Recognition of Histidine-Tagged Proteins." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205-10215.
- [165] Lata, S.; Gavutis, M.; Tampe, R.; Piehler, J. "Specific and Stable Fluorescence Labeling of Histidine-Tagged Proteins for Dissecting Multi-Protein Complex Formation." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2365-2372.
- [166] Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. "Metals, Toxicity and Oxidative Stress." ; *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161-1208.
- [167] Goldsmith, C. R.; Jaworski, J.; Sheng, M.; Lippard, S. J. "Selective Labeling of Extracellular Proteins Containing Polyhistidine Sequences by a Fluorescein–Nitrilotriacetic Acid Conjugate." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 418-419.
- [168] Hauser, C. T.; Tsien, R. Y. "A Hexahistidine-Zn²⁺-Dye Label Reveals STIM1 Surface Exposure." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 3693-3697.
- [169] Ojida, A.; Honda, K.; Shinmi, D.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Hamachi, I. "Oligo-Asp Tag/Zn(II) Complex Probe as a New Pair for Labeling and Fluorescence Imaging of Proteins." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452-10459.
- [170] Honda, K.; Nakata, E.; Ojida, A.; Hamachi, I. "Ratiometric Fluorescence Detection of a Tag Fused Protein Using the Dual-Emission Artificial Molecular Probe." ; *Chem. Commun.* **2006**, 4024-4026.
- [171] Honda, K.; Fujishima, S. H.; Ojida, A.; Hamachi, I. "Pyrene Excimer-Based Dual-Emission Detection of a Oligoaspartate Tag-Fused Protein by Using a ZnII–DpaTyr Probe." ; *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1370-1372.
- [172] Sakamoto, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. "Molecular Recognition, Fluorescence Sensing, and Biological Assay of Phosphate Anion Derivatives Using Artificial Zn(II)–Dpa Complexes." ; *Chem. Commun.* **2009**, 141-152.
- [173] Anai, T.; Nakata, E.; Koshi, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. "Design of a Hybrid Biosensor for Enhanced Phosphopeptide Recognition Based on a Phosphoprotein Binding Domain Coupled With a Fluorescent Chemosensor." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6232-6239.
- [174] Hirayama, T.; Taki, M.; Kodan, A.; Kato, H.; Yamamoto, Y. "Selective Labeling of Tag-Fused Protein by Tryptophan-Sensitized Luminescence of a Terbium Complex." ; *Chem. Commun.* **2009**, 3196-3198.
- [175] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. "Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [176] Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. "Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells." ; *Science* **1998**, *281*, 269-272.
- [177] Halo, T. L.; Appelbaum, J.; Hobert, E. M.; Balkin, D. M.; Schepartz, A. "Selective

- Recognition of Protein Tetraserine Motifs With a Cell-Permeable, Pro-Fluorescent Bis-Boronic Acid." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438-439.
- [178] Uchinomiya, S.; Nonaka, H.; Fujishima, S.; Tsukiji, S.; Ojidaab, A.; Hamachi, I. "Site-Specific Covalent Labeling of His-Tag Fused Proteins With a Reactive Ni(II)-NTA Probe." ; *Chem. Commun. (Camb.)* **2009**, 5880-5882.
- [179] Nonaka, H.; Fujishima, S.; Uchinomiya, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. "FLAG-Tag Selective Covalent Protein Labeling via a Binding-Induced Acyl-Transfer Reaction." ; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6696-6699.
- [180] Ren, H.; Xiao, F.; Zhan, K.; Kim, Y.; Xie, H.; Xia, Z.; Rao, J. "A Biocompatible Condensation Reaction for the Labeling of Terminal Cysteine Residues on Proteins." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 9658-9662.
- [181] Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. "A General Method for the Covalent Labeling of Fusion Proteins With Small Molecules in Vivo." ; *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- [182] Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Correa, I. R. J.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. "An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells." ; *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128-136.
- [183] Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Friedman Ohana, R.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G. et al. "HaloTag: a Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis." ; *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373-382.
- [184] Mizukami, S.; Watanabe, S.; Hori, Y.; Kikuchi, K. "Covalent Protein Labeling Based on Noncatalytic B-Lactamase and a Designed FRET Substrate." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016-5017.
- [185] Gallagher, S. S.; Sable, J. E.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W. "An in Vivo Covalent TMP-Tag Based on Proximity-Induced Reactivity." ; *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 547-556.
- [186] Chen, I.; Ting, A. Y. "Site-Specific Labeling of Proteins With Small Molecules in Live Cells." ; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 35-40.
- [187] Foley, T. L.; Burkart, M. D. "Site-Specific Protein Modification: Advances and Applications." ; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 12-19.
- [188] Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.; Ting, A. Y. "Site-Specific Labeling of Cell Surface Proteins With Biophysical Probes Using Biotin Ligase." ; *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99-104.
- [189] Howarth, M.; Takao, K.; Hayashi, Y.; Ting, A. Y. "Targeting Quantum Dots to Surface Proteins in Living Cells With Biotin Ligase." ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 7583-7588.
- [190] Kulman, J. D.; Satake, M.; Harris, J. E. "A Versatile System for Site-specific Enzymatic Biotinylation and Regulated Expression of Proteins in Cultured Mammalian Cells." ; *Protein Expr. Purif.* **2007**, *52*, 320-328.
- [191] Lin, C.; Ting, A. Y. "Transglutaminase-Catalyzed Site-Specific Conjugation of Small-Molecule Probes to Proteins in Vitro and on the Surface of Living Cells." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4542-4543.
- [192] Fernandez-Suarez, M.; Baruah, H.; Martinez-Hernandez, L.; Xie, K. T.; Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R.; Ting, A. Y. "Redirecting Lipoic Acid Ligase for Cell Surface Protein Labeling With Small-Molecule Probes." ; *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1483-1487.
- [193] Baruah, H.; Puthenveetil, S.; Choi, Y.; Shah, S.; Ting, A. Y. "An Engineered Aryl Azide Ligase for Site-Specific Mapping of Protein-Protein Interactions Through Photo-Cross-Linking." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 7018-7021.
- [194] Puthenveetil, S.; Liu, D. S.; White, K. A.; Thompson, S.; Ting, A. Y. "Yeast Display Evolution of a Kinetically Efficient 13-Amino Acid Substrate for Lipoic Acid Ligase." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16430-16438.
- [195] Dierks, T.; Schmidt, B.; Borissenko, L. V.; Peng, J.; Preusser, A.; Mariappan, M.; von Figura,

- K. "Multiple Sulfatase Deficiency Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the Human Ca-Formylglycine Generating Enzyme." ; *Cell* **2003**, 113, 435-444.
- [196] Carlson, B. L.; Ballister, E. R.; Skordalakes, E.; King, D. S.; Breidenbach, M. A.; Gilmore, S. A.; Berger, J. M.; Bertozzi, C. R. "Function and Structure of a Prokaryotic Formylglycine-Generating Enzyme." ; *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 20117-20125.
- [197] Marraffini, L. A.; DeDent, A. C.; Schneewind, O. "Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria." ; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, 70, 192-221.
- [198] Popp, M. W.; Antos, J. M.; Grotenbreg, G. M.; Spooner, E.; Ploegh, H. L. "Sortagging: a Versatile Method for Protein Labeling." ; *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 707-708.
- [199] Tanaka, T.; Yamamoto, T.; Tsukiji, S.; Nagamune, T. "Site-Specific Protein Modification on Living Cells Catalyzed by Sortase." ; *ChemBioChem* **2008**, 9, 802-807.
- [200] Antos, J. M.; Chew, G.; Guimaraes, C. P.; Yoder, N. C.; Grotenbreg, G. M.; Wei-Lin Popp, M.; Ploegh, H. L. "Site-Specific N- and C-Terminal Labeling of a Single Polypeptide Using Sortases of Different Specificity." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10800-10801.
- [201] Yamamoto, T.; Nagamune, T. "Expansion of the Sortase-Mediated Labeling Method for Site-Specific N-Terminal Labeling of Cell Surface Proteins on Living Cells." ; *Chem. Commun. (Camb.)* **2009**, 977-1140.
- [202] Yin, J.; Liu, F.; Li, X.; Walsh, C. T. "Labeling Proteins With Small Molecules by Site-Specific Posttranslational Modification." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7754-7755.
- [203] George, N.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, N.; Johnsson, K. "Specific Labeling of Cell Surface Proteins With Chemically Diverse Compounds." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8896-8897.
- [204] Vivero-Pol, L.; George, N.; Krumm, H.; Johnsson, K.; Johnsson, N. "Multicolor Imaging of Cell Surface Proteins." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12770-12771.
- [205] Zhou, Z.; Cironi, P.; Lin, A. J.; Xu, Y.; Hrvatin, S.; Golan, D. E.; Silver, P. A.; Walsh, C. T.; Yin, J. "Genetically Encoded Short Peptide Tags for Orthogonal Protein Labeling by Sfp and AcpS Phosphopantetheinyl Transferases." ; *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 337-346.
- [206] Wang, L.; Schultz, P. G. "Expanding the Genetic Code." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 34-66.
- [207] Liu, C. C.; Schultz, P. G. "Adding New Chemistries to the Genetic Code." ; *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 413-444.
- [208] Zhang, Z.; Smith, B. A. C.; Wang, L.; Brock, A.; Cho, C.; Schultz, P. G. "A New Strategy for the Site-Specific Modification of Proteins in Vivo." ; *Biochemistry* **2003**, 46, 6735-6746.
- [209] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. "Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction." ; *Science* **2000**, 287, 2007-2010.
- [210] Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. "Reaction Mechanism and Kinetics of the Traceless Staudinger Ligation." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8820-8828.
- [211] Huisgen, R. "1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565-632.
- [212] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. "Click Chemistry: Diverse Chemical Function From a Few Good Reactions." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 2004-2021.
- [213] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. "Copper(i)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216.
- [214] Deiters, A.; Cropp, T. A.; Mukherji, M.; Chin, J. W.; Anderson, J. C.; Schultz, P. G. "Adding Amino Acids With Novel Reactivity to the Genetic Code of *Saccharomyces Cerevisiae*." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11782-11783.
- [215] Link, A. J.; Tirrell, D. A. "Cell Surface Labeling of *Escherichia Coli* via Copper(i)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11164-11165.
- [216] Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. "Presentation and Detection of Azide Functionality

- in *Bacterial Cell Surface Proteins.*" ; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10598-10602.
- [217] 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, 16793-16797.
- [218] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. "A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry." ; *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097-3099.
- [219] Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. "Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions." ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 120, 2285-2287.
- [220] 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, 664-667.
- [221] Orange, C. "Un Nouveau Fluorophore Photoactivable Pour les Études Spatio-Temporelles de la Dynamique du Cytosquelette D'actine ; les Interactions des Protéines À Domaine SH3, le Cas De Bzz1p." Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, **2007**.
- [222] Gug, S. "Synthèse et Caractérisation de Groupements Protecteurs Photolabiles À Deux Photons. Applications Biologiques." Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, **2008**.
- [223] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. "A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes." ; *Org. Lett.* **2004**, 6, 4603-4606.
- [224] Frisch, B.; Hassane, F. S.; Schuber, F. "Conjugation of Ligands to the Surface of Preformed Liposomes by Click Chemistry." ; *Methods Mol. Biol.* **2010**, 605, 267-277.
- [225] Ganguly, N. C.; De, P.; Dutta, S. "Mild Regioselective Monobromination of Activated Aromatics and Hetero-Aromatics With N-Bromosuccinimide in Tetrabutylammonium Bromide." ; *Synthesis* **2005**, 7, 1103-1108.
- [226] Elangovan, A.; Lin, J. H.; Yang, S. W.; Hsu, H. Y.; Ho, T. "Synthesis and Electrogenated Chemiluminescence of Donor-Substituted Phenylethynylcoumarins." ; *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8086-8092.
- [227] Tao, Z. F.; Quian, X.; Fan, M. "Regioselective Synthesis and Photooxygenations of Furonaphthopyrones Starting From 2,7-Naphthalenediol." ; *Tetrahedron* **1997**, 53, 13329-11338.
- [228] Casey, K. G.; Quitevis, E. L. "Effect of Solvent Polarity on Nonradiative Processes in Xanthene Dyes: Rhodamine B in Normal Alcohols." ; *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 6590-6594.
- [229] Blackaby, W. P.; Blurton, P.; Burkamp, F. F.; Stephen, R.; Jennings, A.; Lewis, R. T.; MacLeod, A. M.; Street, L. J.; Thomas, S.; Van Niel, M. B.; Wilson, K. , WO2003GB03376 A1 20030804. PCT Int. Appl. **2004**
- [230] Lukashov, N. V.; Latyshev, G. V.; Donez, P. A.; Skryabin, G. A.; Beletskaya, I. P. "Elaboration of New Approaches to the Synthesis of Pharmacologically Active Steroids." ; *New Research on Biotechnology and Medicine* **2006**, 49-55.
- [231] Rao, Y. J.; Jagadeesh, S. G.; Krupadanam, G. L. D. "A New Synthesis of 2'-Methyl-2',3'-Dihydrofuranochromones." ; *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **2000**, 39B, 958-960.
- [232] Garner, A. L.; Koide, K. "Oxidation State-Specific Fluorescent Method for Palladium(II) and Platinum(IV) Based on the Catalyzed Aromatic Claisen Rearrangement." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16472-16473.
- [233] Thalji, R. K.; Ahrendt, K. A.; Bergman, R. G.; Ellman, J. A. "Annulation of Aromatic Imines via Directed C-H Activation With Wilkinson's Catalyst." ; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9692-9693.
- [234] Spessard, S. J.; Stoltz, B. M. "Progress Toward the Synthesis of Garsubellin a and Related Phloroglucins: the Direct Diastereoselective Synthesis of the Bicyclo[3.3.1]Nonane Core." ; *Org. Lett.* **2002**, 4, 1943-1946.
- [235] Hisao, E.; Shizuo, F. , Preparation of O-Bromophenols, JP 06025049 a JP 1993-12357. Jpn.

Kokai Tokkyo Koho **1993**

[236] Fujisaki, S.; Eguchi, H.; Omura, A.; Okamoto, A.; Nishida, A. "Halogenation Using N-Halogenocompounds. i. Effect of Amines on Ortho-Bromination of Phenols With NBS." ; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 1576-1579.

[237] Bovonsombat, P.; Ali, R.; Khan, C.; Leykajarakul, J.; Pla-on, K.; Aphimanchindakul, S.; Pungcharoenpong, N.; Timsuea, N.; Arunrat, A.; Punpongjareorn, N. "Facile P-Toluenesulfonic Acid-Promoted Para-Selective Monobromination and Chlorination of Phenol and Analogues." ; *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6928-6935.

[238] Nie, Z.; Perretta, C.; Lu, J.; Su, Y.; Margosiak, S.; Gajiwala, K. S.; Cortez, J.; Nikulin, V.; Yager, K. M.; Appelt, K.; Chu, S. "Structure-Based Design, Synthesis, and Study of Potent Inhibitors of -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III as Potential Antimicrobial Agents." ; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1596-1609.

[239] Jung, M. E.; Lyster, M. A. "Quantitative Dealkylation of Alkyl Ethers via Treatment With Trimethylsilyl Iodide. a New Method for Ether Hydrolysis." ; *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3761-3764.

[240] Green, T. W.; Wuts, P. G. M. "Protective Groups in Organic Synthesis. Second Edition." ; Wiley-interscience, **1991**.

[241] Delfourne, E.; Darro, F.; Portefaix, P.; Galaup, C.; Bayssade, S.; Bouteille, A.; Le Corre, L.; Bastide, J.; Collignon, F.; Lesur, B.; Frydman, A.; Kiss, R. "Synthesis and in Vitro Antitumor Activity of Novel Ring D Analogues of the Marine Pyridoacridine Ascidiemin: Structure-Activity Relationship." ; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3765-3771.

[242] Pandey, G.; Sudha Rani, K. "Photosensitized Single Electron Transfer Initiated N-Debenzylation. a Convenient and Mild Approach." ; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4157-4158.

[243] Yagi, H.; Thakker, D. R.; Lehr, R. E.; Jerina, D. M. "Removal of Benzyl-Type Protecting Groups From Peptides by Catalytic Transfer Hydrogenation With Formic Acid." ; *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3442-3444.

[244] Ren, H.; Krasovskiy, A.; Knochel, P. "Stereoselective Preparation of Functionalized Acyclic Alkenylmagnesium Reagents Using I-PrMgCl.LiCl." ; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4215-4217.

[245] Zhu, L.; Wehmeyer, R. M.; Rieke, R. D. "The Direct Formation of Functionalized Alkyl(Aryl)Zinc Halides by Oxidative Addition of Highly Reactive Zinc With Organic Halides and Their Reactions With Acid Chlorides, α,β -Unsaturated Ketones, and Allylic, Aryl, and Vinyl Halides." ; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1445-1453.

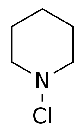
[246] Olivier, N.; Luengo-Oroz, M. A.; Duloquin, L.; Faure, E.; Savy, T.; Veilleux, I.; Solinas, X.; Débarre, D.; Bourguine, P.; Santos, A.; Peyriéras, N.; Beaurepaire, E. "Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Nonlinear Microscopy." ; *Science* **2010**, *329*, 967-971.

[247] Russek-Blum, N.; Nabel-Rosen, H.; Levkowitz, G. "Two-Photon-Based Photoactivation in Live Zebrafish Embryos." ; *J. Vis. Exp.* **2010**, *24*, 1902.

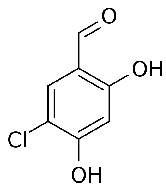
Annexes

Annexe.

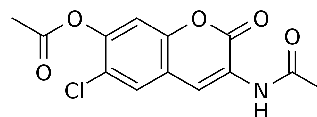
Molécules synthétisées.



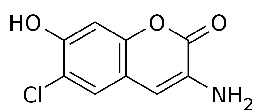
1



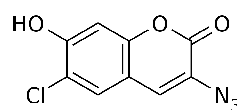
2



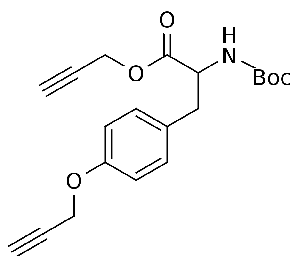
3



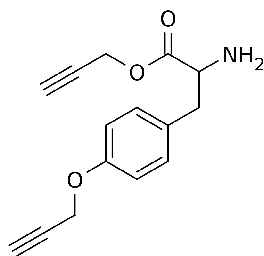
4



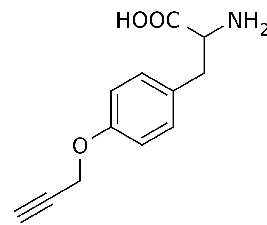
5



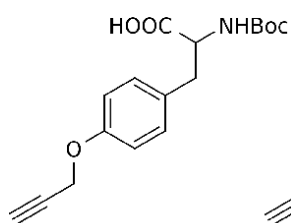
6



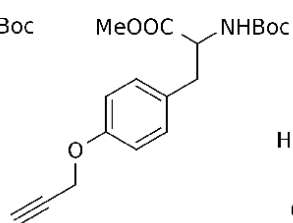
7



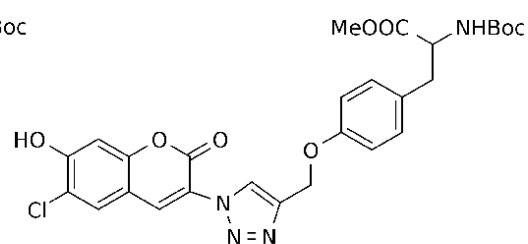
8



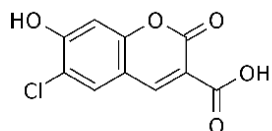
9



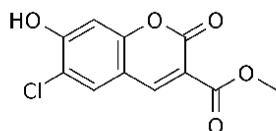
10



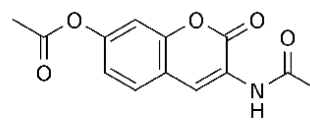
11



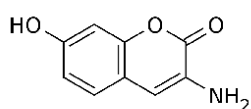
12



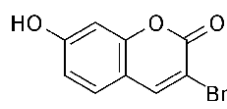
13



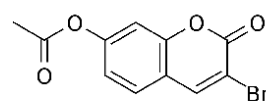
14



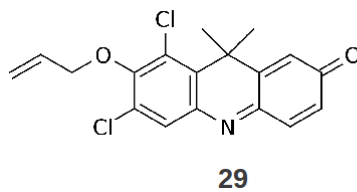
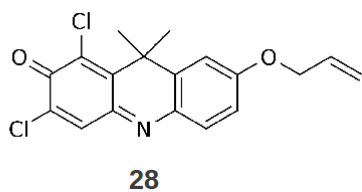
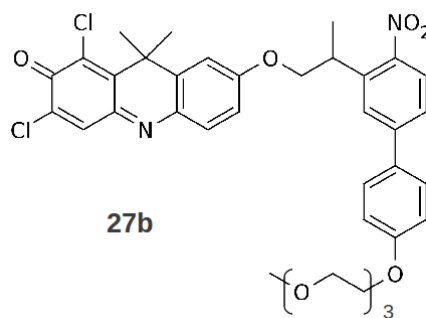
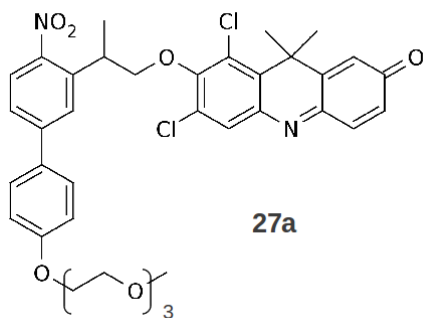
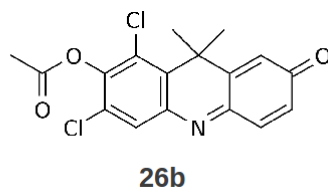
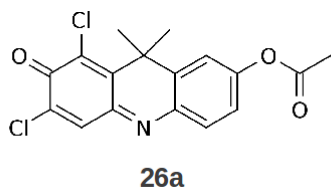
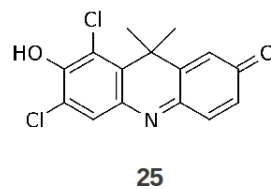
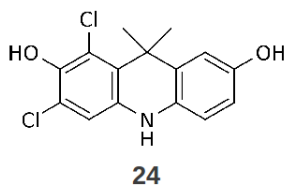
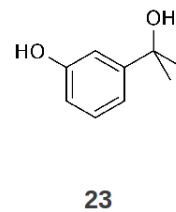
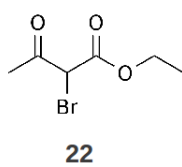
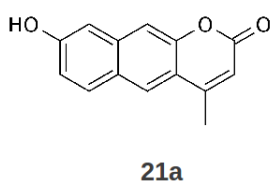
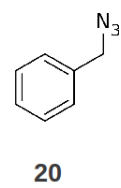
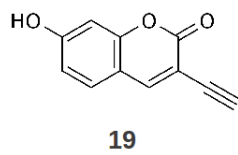
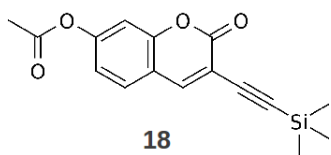
15

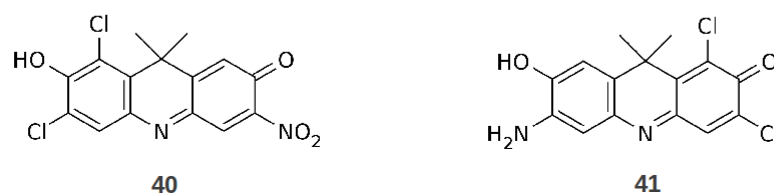
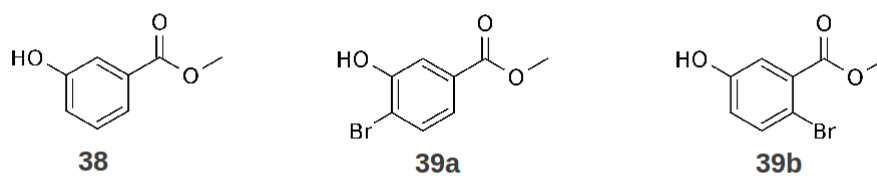
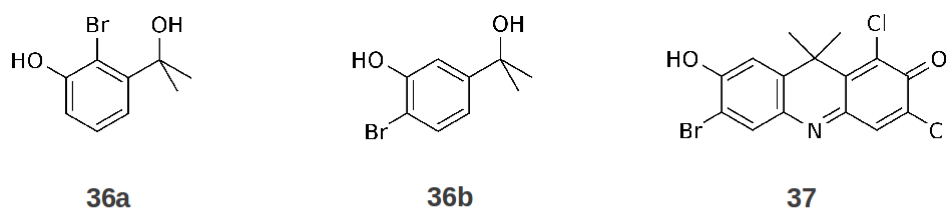
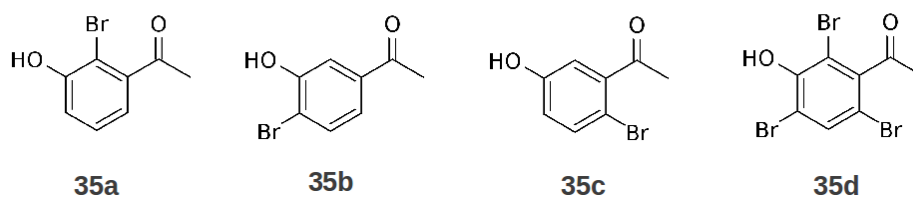
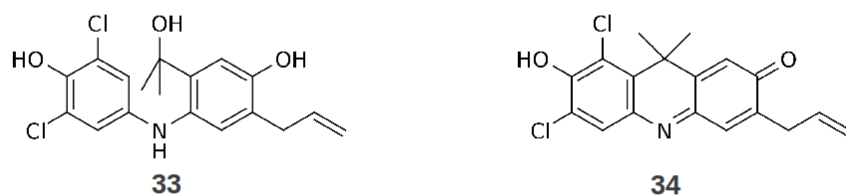
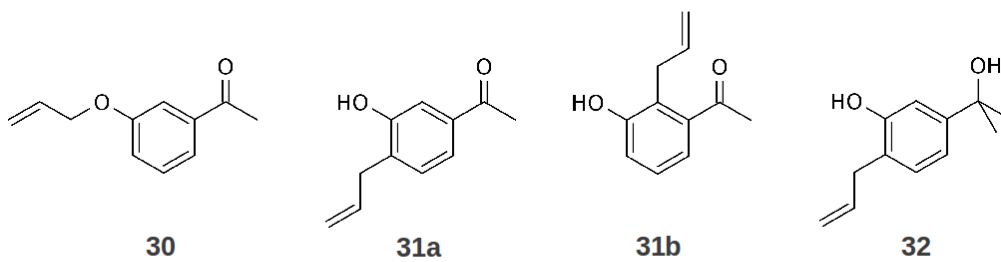


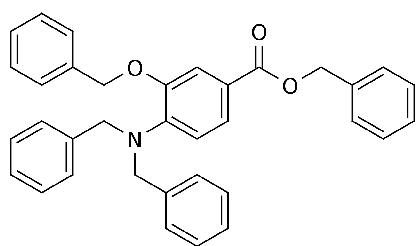
16



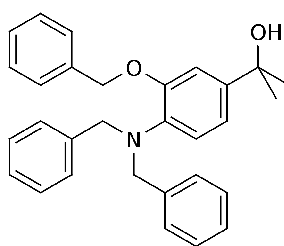
17



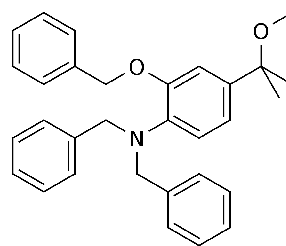




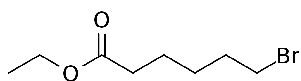
42



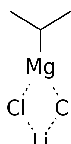
43



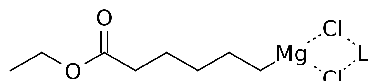
44



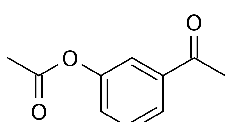
45



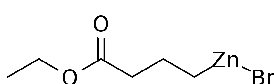
46



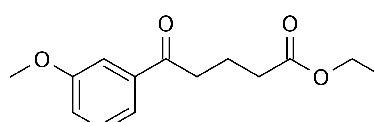
47



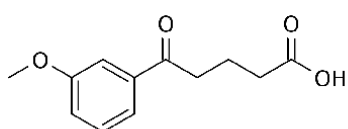
48



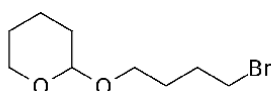
49



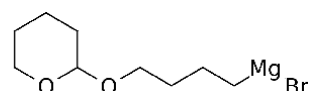
50



51



52



53

Live-Cell One- and Two-Photon Uncaging of a Far-Red Emitting Acridinone Fluorophore

David Warther,[†] Frédéric Bolze,[‡] Jérémie Léonard,[§] Sylvestre Gug,^{†,‡}
 Alexandre Specht,[†] David Puliti,[†] Xiao-Hua Sun,[‡] Pascal Kessler,[‡] Yves Lutz,[‡]
 Jean-Luc Vonesch,[‡] Barbara Winsor,[¶] Jean-François Nicoud,[‡] and
 Maurice Goeldner^{*,†}

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 Route du Rhin 67401 Illkirch Cédex, France, Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, France, Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504, 23 rue du Loess, BP43, 67034 Strasbourg Cédex 2, France, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Imaging Center Technology Platform, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cédex, France, and Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7156 CNRS, Université de Strasbourg, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg Cédex, France

Received September 3, 2009; E-mail: goeldner@unistra.fr

Abstract: Total synthesis and photophysical properties of PENB-DDAO, a photoactivatable 1,3-dichloro-9,9-dimethyl-9*H*-acridin-2(7)-one (DDAO) derivative of a far-red emitting fluorophore, are described. The photoremovable group of the DDAO phenolic function comprises a donor/acceptor biphenyl platform which allows an efficient ($\geq 95\%$) and rapid ($< 15 \mu\text{s}$ time-range) release of the fluorescent signal and displays remarkable two-photon uncaging cross sections ($\delta_a \cdot \Phi_u = 3.7 \text{ GM}$ at 740 nm). PENB-DDAO is cell permeable as demonstrated by the triggering of cytoplasmic red fluorescent signal in HeLa cells after one-photon irradiation (λ_{exc} around 360 nm) or by the generation of a red fluorescent signal in a delineated area of a single cell after two-photon photoactivation ($\lambda_{\text{exc}} = 770 \text{ nm}$).

Introduction

The search for red-emitting fluorescent labels that are controlled in time and space has become a major challenge in cellular imaging. Most efforts have been put on developing photoactivatable fluorescent protein tags for use as protein fusions,¹ focusing more recently on red-emitting genetically encoded proteins² as powerful tools for live cell imaging. However, in many cases the development of small photoactivatable fluorophore molecules (caged fluorophores) are of particular interest for intracellular protein dynamics.³ These probes allow a rapid and efficient light-induced fluorescence enhancement, leading to spatiotemporal control of the luminescent signal in biological systems. While photoactivated fluorescence is well described in the chemical literature,⁴ biological applications require specific photophysical properties. The phenolic group of fluorescein was first targeted in this respect,⁵ subsequent extensions include rhodamine,⁶ Q-rhodamine,⁷ and

resorufin,⁷ using *o*-nitrobenzyl (*o*-NB) derivatives as caging groups. Similar *o*-NB caging groups were used on fluorescein derivatives with improved fluorescent properties (TokyoGreen).⁸ Hydroxycoumarin derivatives were modified using either *o*-NB⁹ or *o*-nitrophenethyl (DMNPB)¹⁰ derived caging groups resulting in enhanced two-photon uncaging sensitivity. A different photochemical reaction was recently described on a masked push-pull fluorophore by photochemical conversion of a nonfluorescent aromatic azido-DCDHF label into the corresponding fluorescent anilino derivative.¹¹ Alternative approaches described alcohol and carboxylic acid uncaging systems with concomitant release of fluorescent coumarin¹² and xanthone,¹³ respectively, as reporter molecules.

[†] UMR 7199 CNRS, Université de Strasbourg.

[‡] UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg.

[§] UMR 7504 CNRS, Université de Strasbourg.

[‡] Imaging Center Technology Platform.

[¶] UMR 7156 CNRS, Université de Strasbourg.

(1) Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4247–4260.

(2) Subach, F. V.; Patterson, G. H.; Manley, S.; Gillette, J. M.; Lippincott-Schwartz, J.; Verhusha, V. V. *Nat. Methods* **2008**, *6*, 153–159.

(3) Theriot, J. A.; Mitchison, T. J. *Nature* **1991**, *351*, 126–131.

(4) Zweig, A. *Pure Appl. Chem.* **1973**, *33*, 389–410.

(5) Krafft, G. A.; Sutton, W. R.; Cummings, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 301–303.

(6) Ottl, J.; Gabriel, D.; Marriott, G. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 143–151.

(7) Mitchison, T. J.; Sawin, K. E.; Theriot, J. A.; Gee, K.; Mallavapuru, A. *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 63–78.

(8) Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6696–6697.

(9) Zhao, Y.; Zheng, Q.; Dakin, K.; Xu, K.; Martinez, M. L.; Li, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.

(10) Orange, C.; Specht, A.; Puliti, D.; Sakr, E.; Furuta, T.; Winsor, B.; Goeldner, M. *Chem. Commun.* **2008**, 1217–1219.

(11) Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. D.; Samuel, R.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9204–9205.

(12) Gagey, N.; Emond, M.; Neveu, P.; Benbrahim, C.; Goetz, B.; Aujard, I.; Baudin, J.-B.; Jullien, L. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2341–2344.

(13) Blake, J. A.; Lukeman, M.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4127–4135.

The development of photoremovable protecting groups that are susceptible to rapidly and efficiently release a fluorescent probe inside a cell requires excitation wavelengths in the near-UV or visible regions,¹⁴ to minimize cell damages compared to UV excitation. Alternatively, caging groups that are responsive to two-photon excitation (IR excitation) would not only overcome the problems related to cell damages but also to cellular autofluorescence. To date, 7-hydroxycoumarin-3-carboxamide derivatives are the only caged fluorophores for which two-photon uncaging excitation has been used,^{9,10} leading to two-photon uncaging cross sections $\delta_a \cdot \Phi_u \leq 0.6$ Goeppert-Mayer (GM, 1 GM = 10^{-50} cm⁴·s·photon⁻¹·molecule⁻¹) at 740 nm for the 1-(2-nitrophenyl)ethyl cage (where δ_a is the two-photon absorption cross section and Φ_u is the uncaging quantum yield).¹⁵ Another important constraint concerning the development of caged fluorophores is the selection of probes displaying high brightness at long wavelengths (>600 nm) and that are available in large quantities to allow convenient syntheses. Most long wavelength-emitting fluorophores possess rather complex structures¹⁶ and do not necessarily contain a chemical function modifiable by a photoactivatable group to abolish the fluorescence. Resorufin derivatives were the only red-emitting probes displaying a simple backbone and possessing an appropriate phenolic function for caging.⁶ Unfortunately these derivatives are extremely prone to bleaching, preventing reliable time-dependent fluorescence measurements.

Red-emitting caged fluorophores which can be efficiently uncaged by two-photon photolysis remain highly desirable tools. These probes are best adapted for live-cell imaging, limiting toxicity, and autofluorescence background, as well as allowing a remarkable increase in the spatial resolution of the fluorescent signal. Here we report the synthesis, together with the chemical and photophysical properties, of a caged 1,3-dichloro-9,9-dimethyl-9*H*-acridin-2(7)-one (DDAO) derivative,¹⁷ a far-red emitting fluorophore ($\lambda_{em} = 658$ nm) using a 3-(2-propyl)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrobiphenyl (PENB) group as the phenolic caging moiety. This caged fluorophore, besides allowing a rapid and efficient release of the fluorescent signal, displayed remarkable two-photon uncaging cross sections ($\delta_a \cdot \Phi_u = 3.7$ GM at 740 nm).

Experimental Section

All chemicals and reagents were purchased from Alfa Aesar, Acros, Sigma Aldrich, or TCI and used without any further purification. Solvents were purified and dried by standard procedures (see Supporting Information). TLCs were run on Merck precoated aluminum plates (Si 60 F254). Column chromatographies were run on Merck Silica Gel (60–120 mesh). ¹H and ¹³C spectra were performed with a 300 MHz Bruker Advance 300, 200 MHz Bruker Advance 200, or Ultrashield plus 400 MHz Advance III 400 instrument in CDCl₃ (internal standard 7.24 ppm for ¹H and 77 ppm for ¹³C spectra) or DMSO-*d*₆ (internal standard 2.5 ppm for ¹H and 39.5 ppm for ¹³C spectra).

Mass spectra were recorded with a Agilent QToF 4 GHz introdirect electrospray. Analysis HPLC methods 1 and 2 and purification HPLC method 3 are described in the Supporting

Information. UV–visible spectra were performed on a Uvikon XL from BioTek Instruments and monitored with the software LabPower 3000. Fluorescence spectra were performed on a Fluoromax 4 from Horiba JobinYvon and monitored with the software Fluorescence. 1,3-Dichloro-9,9-dimethyl-9*H*-acridin-2(7)-one (DDAO **1**) was prepared as described by Corey et al.,¹⁷ 2-ethyl-4-iodo-1-nitrobenzene and 2-(5-iodo-2-nitrophenyl)propan-1-ol were prepared as described by Bühler et al.¹⁸ and by Walbert et al.,¹⁹ respectively.

4-Tris-ethoxy(methoxy)-1-bromo-benzene (5). NaH (1.6 g; 36.6 mmol) was slowly added to a solution of *p*-bromophenol (3.0 g; 13.6 mmol) in dry THF (50 mL), and the mixture was heated to reflux during 1 h. *Tris*-ethoxy(methoxy)-*p*-toluenesulfonate (5.6 g; 27.6 mmol) was rapidly added and the solution was refluxed for an additional 12 h. After cooling, the mixture was poured in 100 mL of a 2 M solution of H₂SO₄ and was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried on MgSO₄, and solvent was removed under vacuum. Crude product was purified by column chromatography (SiO₂; heptane/AcOEt 70:30 v:v). 4-Tris-ethoxy(methoxy)-1-bromo-benzene was obtained as a slightly yellow oil (4.0 g; 90%).

¹H NMR, CDCl₃, δ (ppm) = 7.5 (d; 2H); 6.65 (d; 2H); 3.8 (m; 2H); 3.7 (m; 2H); 3.6 (m; 4H); 3.5 (m; 4H); 3.3 (s; 2H). ¹³C NMR, CDCl₃, δ ; (ppm) = 113.90; 129.60; 127.72; 116.85; 71.69; 70.60; 70.49; 70.41; 70.33; 69.03; 67.31; 58.81.

4-Tris-ethoxy(methoxy)phenylboronic Acid (6). 4-Tris-ethoxy(methoxy)-1-bromo-benzene (1.2 g; 3.27 mmol) was suspended in dry THF under argon and cooled to –78 °C. *N*-BuLi (3.43 mL; 1.6 M in hexane) was then dropwise added. Solution was stirred at –78 °C during 30 min. Trimethylborate (500 mg; 4.8 mmol) was added and the mixture was allowed to warm up to room temperature during 12 h. Reaction medium was then hydrolyzed by a 7% HCl solution, extracted with ethyl acetate, and then dried on MgSO₄. The solvent was removed under vacuum and the crude product was used without further purification.

3-(2-Propyl-1-ol)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrobiphenyl (PENB-OH, 2). 2-(5-Iodo-2-nitrophenyl)propan-1-ol (507 mg; 1.66 mmol) was suspended in dry toluene (30 mL) under argon. Tetrakis triphenylphosphine palladium (200 mg; 0.19 mmol) was then slowly added to the mixture and stirred until it was fully dissolved. Na₂CO₃ in water (20 mL) was then added. The mixture was then heated at 110 °C during 30 min. 4-Tris-ethoxy(methoxy)phenylboronic acid (1 g; 3.29 mmol) was dissolved in ethanol (3 mL) and dropwise added to the mixture. The reaction was stirred at 110 °C and followed by TLC. After reaction, the mixture was cooled to room temperature, diluted with brine, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was then washed with water and dried on MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified on column chromatography (SiO₂; cyclohexane/AcOEt 2/8 v:v). PENB-OH was obtained as a slight yellow viscous oil (320 mg; 46%). ¹H NMR, CDCl₃, δ (ppm) = 7.79 (d; 1H); 7.58 (d; 1H); 7.45 (m; 3H); 6.98 (d; 3H); 4.14 (m; 2H); 3.85 (m; 4H); 3.65 (m; 6H); 3.50 (m; 4H); 3.31 (s; 3H); 1.30 (t; 3H). ¹³C NMR, CDCl₃, δ (ppm) = 159.0; 148.42; 144.86; 138.82; 131.16; 128.06; 125.87; 124.63; 124.57; 114.78; 99.23; 71.51; 70.42; 70.23; 70.12; 69.26; 67.18; 58.29; 36.11; 17.29.

7(2)-{3-(2-Propyl)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrobiphenyl}-6,8-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one (PENB-DDAO, 3a and 3b). In a dry 10 mL round flask, DDAO (100 mg; 0.325 mmol) and PENB (272 mg; 0.649 mmol) are dissolved in anhydrous benzene under argon.

In a dry 5 mL round flask, triphenylphosphine (255 mg; 0.975 mmol) and diisopropyl azodicarboxylate (192 μ L; 0.975 mmol) are dissolved in anhydrous benzene (1.2 mL) under argon and stirred before being added slowly to the previous mixture. The 5 mL flask

(14) (a) For reviews see: *Dynamic studies in Biology, Phototriggered, Photoswitches and Caged Biomolecules*; Goeldner, M., Givens, R., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005. (b) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.

(15) Dakin, K.; Li, W.-H. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 959.

(16) For a useful chart see: Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.

(17) Corey, P. F.; Trimmer, R. W.; Biddlecom, W. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, *103*, 1646–1648.

(18) Bühler, S.; Lagoja, I.; Giegrich, H.; Stengele, K.-P.; Pfeleiderer, W. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 620–659.

(19) Walbert, S.; Pfeleiderer, W.; Steiner, U. E. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.

is washed with 1.2 mL of anhydrous benzene, which is then dropwise added to the reaction mixture.

This mixture is stirred at room temperature for 5 h under argon. After reaction, the solvent is removed under vacuum. The crude mixture is purified by HPLC (method 3, retention time: 31.35 min.). **3a** and **3b** are obtained as a dark-orange viscous oil, with 60% yields. **3a**: $^1\text{H NMR}$, DMSO, 300 MHz, δ (ppm) = 7.97 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz); 7.92 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz); 7.76–7.70 (m, 2H); 7.41 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz); 7.07 (d, 2H, $J = 9.8$ Hz); 6.86 (d, 1H, $J = 2$ Hz); 6.67 (dd, 1H, $J = 9.8$ Hz; 1.9 Hz); 4.42 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz); 4.30–4.25 (m, 1H); 4.16–4.13 (m, 3H); 3.90–3.83 (m, 1H); 3.77–3.74 (m, 3H); 3.60–3.50 (m, 8H); 3.43–3.40 (m, 3H); 3.22 (s, 3H); 1.67 (d, 6H, $J = 3.1$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$, DMSO, 400 MHz, δ (ppm) = 186.81; 159.12; 155.85; 152.52; 152.40; 148.41; 147.80; 144.13; 140.64; 139.59; 137.70; 133.47; 132.06; 131.75; 130.31; 128.47; 128.42; 126.93; 126.07; 125.11; 124.81; 115.02; 77.09; 77.06; 71.23; 69.91; 69.89; 69.75; 69.56; 68.85; 67.29; 57.99; 37.61; 34.52; 27.97; 27.95. HRMS: $m/z = 708.1998$ (calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8$: 708.2005). UV: $\lambda_{\text{max}} = 390$ nm, $\epsilon = 10000$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ in PBS. **3b** was detected on HPLC (retention time = 32.03 min.) but was obtained in too low amounts ($\leq 5\%$) to be identified by NMR.

Spectral Properties. Fluorescence Quantum Yield (Φ_f). Solutions of DDAO in PBS and rhodamine B²⁰ in acidic ethanol (ethanol with TFA 6% v/v, $\Phi_{\text{rhodamine B}} = 0.49$) with OD's around 0.2 at 498 nm are precisely measured before being diluted 10-times in their respective solvent. Both DDAO and rhodamine B solutions are excited at 498 nm, and fluorescence emissions are measured from 510 to 800 nm. The emission spectra are corrected by the fluorimeter's software, and the fluorescence curves are integrated (area under the curve = I). The fluorescence quantum yield of DDAO is then calculated according to

$$\Phi_f = \Phi_{\text{Rhodamine B}} \frac{I_{\text{DDAO}} \text{OD}_{\text{Rhodamine B}}}{I_{\text{Rhodamine B}} \text{OD}_{\text{DDAO}}} \quad (1)$$

One-Photon Quantum Yield of Disappearance (Φ_{dis}). The quantum yield for the photoconversion of PENB-DDAO is determined by comparison with the photolysis of PMNB-Glu ($\Phi_{\text{dis}} = 0.1$)²¹ in phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.4) (PB) at 25 °C, which is taken as reference. Solutions of PENB-DDAO and PMNB-Glu are prepared from stock solutions in DMSO and are adjusted to an OD of 0.3 at 315 nm in a acetonitrile/PB (1:1) mixture. A mixture of both solutions (3.5 mL, 1:1) are then exposed to a 1000 W Hg Lamp from Hanovia focused on the entrance slit of a monochromator at 315 (± 0.2 nm). Several 200 μL aliquots are taken at different times: 0, 1, 2, 3.5, 5, and 8 min and are subjected to reversed-phase HPLC (method 2) to determine the extent of the photolytic conversions. The retention times of PENB-DDAO and PMNB-Glu are 32.96 and 20.78 min, respectively. Quantum yields are calculated according to formula 2, by considering the conversions up to 30%, to limit, as much as possible, errors due to undesired light absorption by side products during photolysis (slopes are determined from the graphical representation of the photolytic conversion).

$$\Phi_{\text{dis}} = \Phi_{\text{disPMNB-Glu}} \frac{\text{slope}_{\text{PENB-DDAO}}}{\text{slope}_{\text{PMNB-Glu}}} \quad (2)$$

Ratio of Released DDAO (percent_{released DDAO}). The ratio of released DDAO from irradiated PENB-DDAO is determined by HPLC analysis. A 500 μL portion of a 1.95×10^{-5} M solution of PENB-DDAO in a mixture of acetonitrile/PB (1:1) was irradiated during 30 min at 315 nm to ensure a complete conversion of the starting compound. This mixture was analyzed by HPLC (method

1, retention time: 24.43 min) and compared to the HPLC analysis (method 1) of a 500 μL of a 1.61×10^{-5} M solution of DDAO in PB, taken as a reference (retention time = 24.40 min). The ratio of released DDAO was the calculated according to formula 3 ($I =$ area of the corresponding HPLC peak).

$$\text{percent}_{\text{released DDAO}} = \frac{[\text{DDAO}_{\text{reference}}] I_{\text{released DDAO}}}{[\text{PENB-DDAO}] I_{\text{DDAOREference}}} 100 \quad (3)$$

One-Photon Uncaging Quantum Yield (Φ_u). This quantum yield corresponds to the overall yield of released DDAO after one-photon excitation of PENB-DDAO and is calculated according to

$$\Phi_u = \frac{\Phi_{\text{dis}} \times \text{percent}_{\text{released DDAO}}}{100} \quad (4)$$

Kinetics of the Uncaging Process. The kinetics of the uncaging process was measured by following the fluorescence release. The photolysis of PENB-DDAO 3 in a 100- μL buffer solution is triggered impulsively by the one-photon absorption of a unique, nanosecond, UV laser pulse at 355 nm (~ 30 mJ/cm²). A light emitting diode (LED) operating around 590 nm continuously excites the fluorescence of the released chromophores while a photomultiplier tube (PMT) monitors the amount of fluorescence collected at wavelengths > 640 nm.

Two-Photon Uncaging Cross-Section at 740 nm. Solutions of PENB-DDAO and PMNB-Glu, taken as a reference (two-photon cross-section of 3.13 GM at 740 nm),²¹ are prepared from stock solutions in DMSO and are adjusted to an OD of 0.5 in acetonitrile/PB (1:1 v/v) at 370 nm (740 nm/2). A 100 μL portion of each solution is irradiated during 50 min by mode-locked titanium: sapphire laser, Tsunami, Spectra Physics, 100 fs, 80 MHz) at 740 nm. The measurements were performed at $P = 250$ mW, in the quadratic dependence range for such chromophore.²¹ After irradiation, 80 μL of each solution is analyzed by HPLC (method 1 for PMNB-Glu; retention time, 20.08 min, and method 2 for PENB-DDAO, retention time, 32.96 min). The areas of the peaks are determined and the percent of remaining caged species is reported on a graph. Each result is the mean of at least three independent measurements. The ratio between the slopes determined from the graphical representation of the photolytic conversion allows an estimation of a cross section of 3.7 GM for PENB DDAO (using CouOAc²² as primary standard, for which the two-photon uncaging action cross section of 1.07 at 740 nm is accurate within a factor of 2).

Two-Photon Cross-Section Measurements by Fluorescence Release Analyses. A 100 μL portion of a solution of PENB-DDAO (OD = 0.05) was irradiated by two-photon excitation at 740, 760, 780, 800, 840, and 900 nm, respectively (same conditions as before) during 45 min at identical laser power.²¹ After irradiation, fluorescence of each sample was recorded on a spectrofluorimeter (Fluorolog from Jobin-Yvon). Excitation was performed at 600 nm, and emission was recorded from 610 to 800 nm. The fluorescence curves were integrated ($I =$ area under the curve) and the two-photon cross sections were determined by comparison with the 3.7 GM two-photon cross-section value (determined by HPLC) obtained by excitation at 740 nm, according to

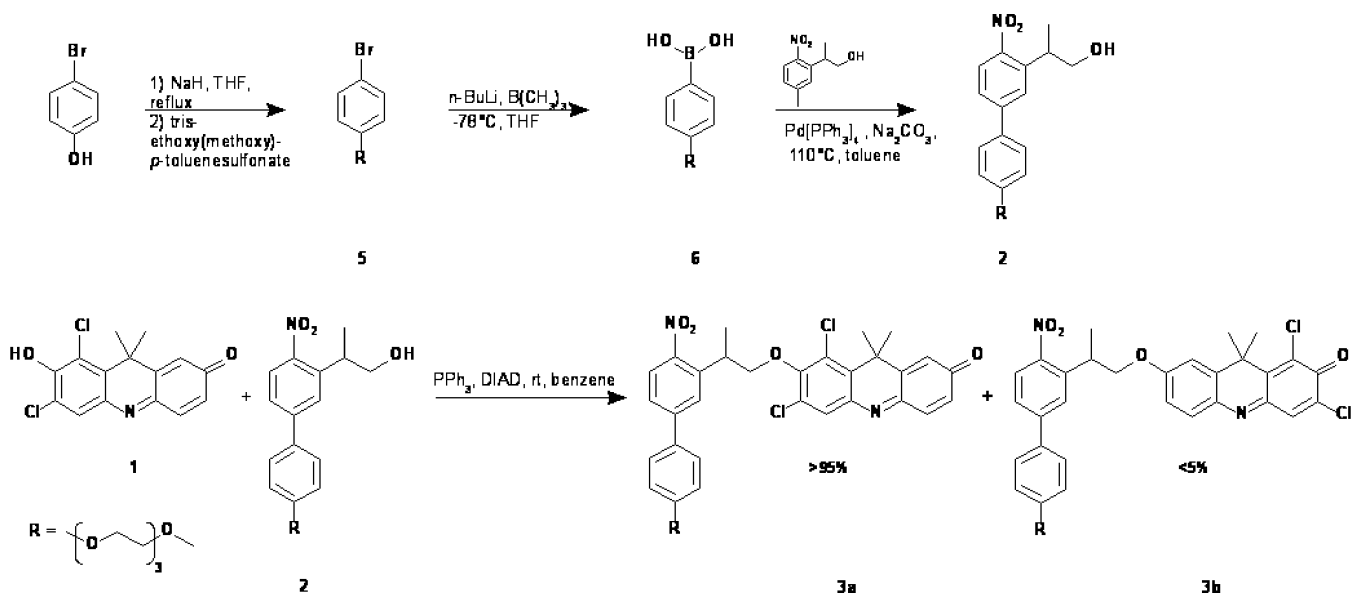
$$\delta_a \cdot \Phi_u = 3.7 \times \frac{I}{I_{740 \text{ nm}}} \quad (5)$$

Cell Imaging. For all experiments HeLa cells were incubated for 30 min with a solution of PENB-DDAO in HBSS (1.95×10^{-5} M) prepared from a stock solution of PENB-DDAO 3 in DMSO

(20) Casey, K. G.; Quitevis, E. L. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 6590–6594.
(21) Gug, S.; Bolze, F.; Specht, A.; Bourgoigne, C.; Goeldner, M.; Nicoud, J.-F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525–9529.

(22) Furuta, T.; Wang, S. S.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1193–1200.

Scheme 1. Synthesis of PENB-OH 2 and PENB-DDAO 3



(1.95×10^{-3} M). Observations were performed with a Water objective Leica HCX PL Apo W Corr Cs NA 1,20 between 10 to 15 s after irradiation. The switch between uncaging with the HBO lamp (340–380 nm) or one (405 nm)- or two-photon laser (770 nm), and excitation for imaging at 633 nm, was done manually, generating a slight variability in the time-delays. Pre- and postuncaging acquisitions were performed in the transmitted light and fluorescence channels (excitation at 633 nm and detection between 643 and 700 nm) to check for cell morphology and monitor background signal or uncaging of PENB-DDAO 3, respectively. For one-photon uncaging cells have been irradiated by a 340 to 380 nm monophotonic excitation light for 2 min with a 50W HBO lamp. For two-photon uncaging a delineated cytoplasmic area ($\sim 5 \times 5 \mu\text{m}$) of one cell has been irradiated during 2 s by a 770 nm two-photon laser. The power at the output of the objective was 1 mW. For time-lapse imaging uncaging was performed with a 405 nm-wavelength laser diode focused on a cytoplasmic region of $5 \times 5 \mu\text{m}$ in one cell during 1 s. Z-stacks of 10 μm (10 planes with a Z-step of 1 μm) including the whole cell volume were performed. The power at the output of the objective was around 500 μW . The fluorescence emission (643–700 nm) and transmitted light were recorded by performing a 4D (X, Y, Z, T) acquisition during 5 min at a frequency of one image every 11 s. A median filter (3×3) is applied to the stacks to smooth the images.

For FRAP-type experiments one-photon uncaging was performed with a HBO lamp, as described above. Then a small region of interest, ROI, (diameter of 5 μm) in the cytoplasm of one cell was defined. The averaged fluorescence intensity inside this ROI but also in the whole cell and the background were measured during time (1 image every 514 ms during 15 s), before, during, and after photobleaching (photobleaching was performed with the 488, 514, 543, and 633 nm lasers at their maximal power).

For the analysis of the fluorescence recovery curves, each image is background subtracted, corrected for photobleaching, and then normalized according to Phair and Misteli.²³

$$I_{\text{corr}} = \frac{T_0 I_t}{T_t I_0}$$

with T_0 and I_0 being the averaged intensity of the whole cell and the region of bleach, respectively, before photobleaching and where T_t and I_t are the averaged intensity of the same regions during time.

(23) Phair, R. D.; Misteli, T. *Nature* **2000**, *404*, 604–609.

To lower or avoid rapid diffusion of the fluorophore, cells (with uncaged fluorophores) were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, washed once with HBSS, and then incubated in methanol. Cells were then irradiated (uncaging conditions as above) and a FRAP experiment was performed as for living cells.

Results and Discussion

Synthesis and optical properties. Several reasons prompted the selection of the DDAO chromophore. DDAO is a far-red emitting fluorophore with acceptable brightness ($\epsilon\Phi_f = 3600$ at 658 nm) and surprisingly, despite its fairly simple tricyclic structure, it has been scarcely used in the literature.^{24,25} The presence of a phenol group for which a $\text{p}K_a$ around 5.0 has been determined, ensures its complete deprotonation in a neutral biological buffer (pH 7.4). Importantly, the formation of the phenolate is accompanied by a huge shift of its absorbance: from 478 to 645 nm (see $\text{p}K_a$ determination in Supporting Information, Figure S1) together with a large enhancement of its fluorescence (not shown). This phenol was therefore targeted for its modification by a photoactivatable group. Scheme 1 shows the transformation of this phenol group into a corresponding ether function using a Mitsunobu coupling reaction with the hydroxyl group of 3-(2-propyl-1-ol)-4'-tris-ethoxy(methoxy)-4-nitrophenyl (2) used as a photoremovable protecting group.²⁶ PENB (2) was prepared using an adapted procedure derived from the synthesis of a 4'-methoxy biphenyl derivative (PMNB),²⁶ the methoxy group of the PMNB derivative being replaced by a more water-soluble tris-ethoxy(methoxy) group.

The caged PENB-DDAO (3a and 3b) was obtained as a $\sim 95/5$ mixture of isomers. Since both isomers are photoactivatable precursors of the same DDAO fluorophore in buffered medium, they were not separated. Importantly, compound(s) 3 can easily be synthesized at larger scale (>100 mg), facilitating

(24) Richard, J.-A.; Meyer, Y.; Jolivet, V.; Massonneau, M.; Dumeunier, R.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1707–1718.

(25) Bolinger, P.-Y.; Stamou, D.; Vogel, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5544–5549.

(26) Gug, S.; Charon, S.; Specht, A.; Alarcon, K.; Ogden, D.; Zietz, B.; Leonard, J.; Hacke, S.; Bolze, F.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303–1307.

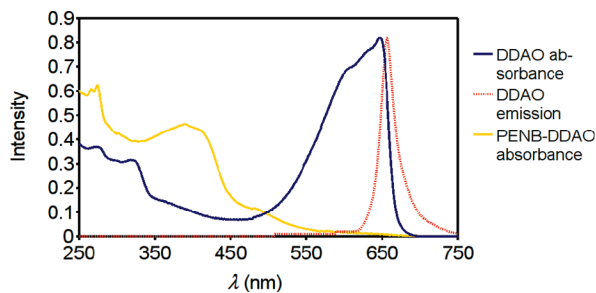


Figure 1. Overlay of PENB-DDAO **3** and DDAO **1** absorbance (concentration = 1.6×10^{-5} M) and DDAO emission (excitation at 600 nm) in acetonitrile/phosphate buffer (pH 7.4) mixture (1:1). Fluorescence emission of PENB-DDAO is not reported because it was not measurable at the same concentration.

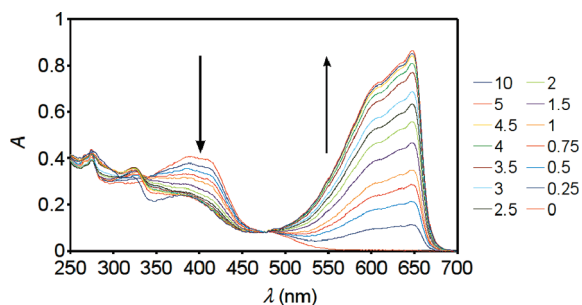


Figure 2. Photolysis of PENB-DDAO **3** in acetonitrile/phosphate buffer (pH 7.4) mixture (1:1). Irradiation at 315 nm.

further chemical modifications of this fluorophore. The structure of **3a** was nonambiguously established as described in the Supporting Information.

Figure 1 displays an overlay of the UV absorption spectra of DDAO **1** and the caged-DDAO **3** as well as the fluorescence emission spectrum of DDAO ($\lambda_{\text{em}} = 658$ nm). Interestingly, the caging group and the fluorophore possess nonoverlapping high absorbance areas, between 300–360 and 590–650 nm, respectively. This leads to an ideal situation where the caged fluorophore can be unmasked ($\lambda_{\text{exc}} < 400$ nm) and concomitantly excited at wavelength ≥ 590 nm for fluorescence imaging without background noise from the remaining caged-DDAO **3**, which is totally nonfluorescent at these wavelengths. In addition, this large absorption area of DDAO will allow efficient fluorescence excitation between 590 and 620 nm avoiding direct fluorescence excitation, and corresponding to a large Stokes-shift. Finally, the sensitivity to photobleaching of the DDAO chromophore is of the same order of magnitude than Rhodamin B (see Supporting Information).

Stability. Contrary to benzylic DDAO ethers, which have been synthesized as pro-fluorophores for penicillin G acylase²⁴ and which were unstable in neutral buffer, the caged fluorophore **3** was fully stable to hydrolysis in the dark in buffered medium at pH 7.4 (no alteration was detected by UV absorbance spectroscopy analysis after 48 h).

One-Photon Photolysis. Quantum Yield Determinations. The photochemical transformation (uncaging) of compound(s) **3** into the DDAO molecule **1** is shown in Figure 2 ($\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm). The presence of isosbestic points reveals, at first, a uniform photochemical transformation, analogous to the photolytic transformation of the PMNB-caged glutamate²⁶ while longer irradiation times lead to subsequent evolution of the photolytic reaction. HPLC analysis of the reaction indicates a $\geq 95\%$ conversion into the DDAO chromophore. Finally, the quantum

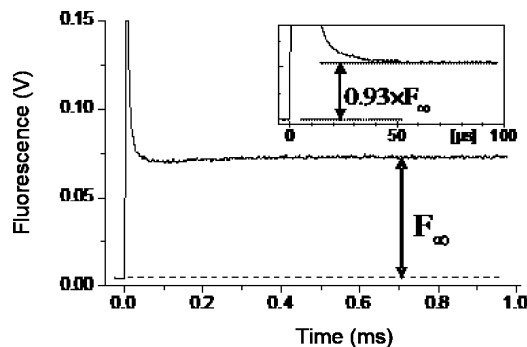


Figure 3. Kinetics of the impulsive photolysis of PENB-DDAO **3** in acetonitrile/phosphate buffer (pH 7.4) mixture (1:1). After a strong initial peak due to the intense photolysis pulse, the asymptotic fluorescence level F_{∞} is reached in less than 0.5 ms. (Inset) Zoom at shorter times: more than 90% of F_{∞} is released in less than 50 μs .

yield of photofragmentation of the PENB-DDAO molecule has been determined using PMNB-Glu²⁶ as a reference and gives a value of $\Phi_{\text{u}} = 0.1$, leading to a high one-photon induced uncaging efficiency ($\epsilon\Phi_{\text{u}} = 1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 365 nm).

Kinetic Measurements. The large spectral shift observed during the uncaging process allowed us, for the first time, to use the detection of the fluorescent signal to monitor the fragmentation kinetics. Uncaging excitation at 355 nm can be accompanied in an independent manner by continuous fluorescence excitation at 590 nm, since the caged compound does not absorb at 590 nm (see Figure 2). Figure 3 shows the detected fluorescent signal as a function of delay time. At time zero, the very large excitation intensity of the photolysis UV pulse generates intense parasitic nanosecond-long emission, which saturates the detector over microseconds. Then, in less than 50 μs a stationary level of fluorescence F_{∞} is reached, which represents 12% of that obtained after complete photolysis of the sample. Most importantly, while the detector is saturated by the initial emission peak (i.e., 40–50 μs after the photolysis pulse, see the inset), more than 90% of F_{∞} is already released. Therefore we conclude that the time constant associated with the dominant process of fluorescence release is shorter than 15 μs . This upper value is in agreement with the reported kinetics for an *o*-nitrophenethyl (DMNPB) caged hydroxycoumarin derivative that was determined by following the absorbance increase at 410 nm after laser flash photolysis.¹⁰

Two-Photon Photolysis. While efficient alcohol two-photon uncaging has been described that leads to the generation of coumarin derivatives as fluorescent reporters,²⁷ direct two-photon fluorophore uncaging has been sparingly described in the literature,^{9,10,15} which focuses on hydroxycoumarin derivatives. The selected PMNB-caging group, composed of a donor/acceptor–biphenyl platform, displayed a remarkable two-photon uncaging cross-section for glutamate release (3.2 and 0.45 GM at 740 and 800 nm, respectively).^{21,26} The two-photon uncaging cross-section $\delta_{\text{s}}\Phi_{\text{u}}$ of the caged-DDAO molecule **3** determination gave values of 3.7 GM at 740 nm. Figure 4 displays the two-photon uncaging cross-section spectrum from 740 to 840 nm and which is ≥ 2 GM from 740 to 780 nm. The two-photon uncaging efficiency is similar to that previously measured for the uncaging of glutamate (PMNB-Glu).^{21,26}

Cell Imaging. Finally, to investigate cellular applications using the PENB-DDAO derivative, we showed its cellular perme-

(27) Gagey, N.; Neveu, P.; Benbrahim, C.; Goetz, B.; Aujard, I.; Baudin, J.-B.; Jullien, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9986–9998.

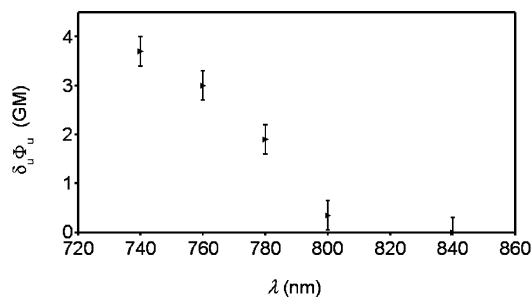
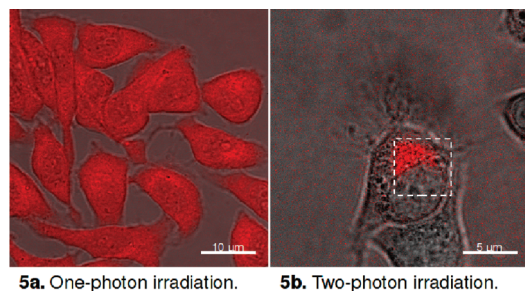


Figure 4. Two-photon uncaging action cross-section ($\delta_a\Phi_u$) of PENB-DDAO **3**.



5a. One-photon irradiation. **5b.** Two-photon irradiation.

Figure 5. Overlay of transmitted light and fluorescence after incubation of HeLa cells with 19.5 μM PENB-DDAO for 30 min and irradiation by a 340–380 nm one-photon excitation (a) or a 770 nm two-photon excitation (b). Irradiation area $\approx 5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. Fluorescence: excitation at 633 nm, recording between 643 and 700 nm.

ability on HeLa cells and the triggering of a cytoplasmic red fluorescent signal after either monophoton excitation in the range of 340–380 nm (Figure 5a) or two-photon excitation at 770 nm of a delineated area of one cell (Figure 5b). Moreover, it is worthwhile to notice that although the two-photon irradiation area (dotted square in Figure 5b) encompasses part of the nucleus, there is no resulting fluorescence in the nucleus. This suggests that either the PENB-DDAO derivative, in the time frame of the experiment, does not penetrate the nucleus or that fluorescence is quenched within the nucleus.

To assess cellular diffusion of the released fluorophore, we initially performed time-lapse experiments which showed an instant disappearance of the fluorescent signal (Supporting Information, Figure S6). However, considering the time resolution of a Z-scan analysis, we were not able to track the fluorescent signal (not shown). Although in agreement with a freely diffusing cellular species, like a small unbound fluorophore, we decided to perform FRAP-type experiments to establish unambiguously a cellular diffusion process. After photobleaching of a small cytoplasmic area, we could clearly establish a fast and almost full recovery of the fluorescent signal on living cells, while similar experiments performed on fixed

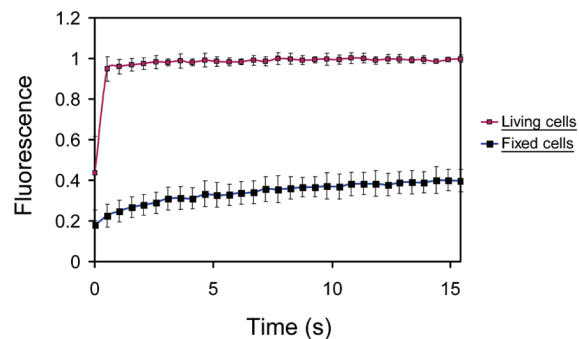


Figure 6. Fluorescence recovery after photobleaching on fixed cells (blue) and living cells (red).

cells showed only a scarce recovery (Figure 6). Clearly, the photoliberated fluorophore diffuses freely and rapidly within the cytoplasm rather than sticking to the membrane or to cellular compartments.

Control figures showing fluorescence and transmitted light before irradiation and time-lapse imaging are available in the Supporting Information, Figures S4, S5, and S6. Importantly, this experiment demonstrates for the first time the possibility to turn on a fluorescent signal in a precise area of a single cell using a caged fluorophore.

Conclusions

We describe here the total synthesis of a photoactivatable acridinone derivative (PENB-DDAO **3**), which upon photolysis rapidly (μs time-range) and efficiently ($\geq 95\%$), releases 1,3-dichloro-9,9-dimethyl-9H-acridin-2(7)-one (DDAO), a far-red emitting fluorophore. PENB-DDAO is the first caged fluorophore to encompass both very high two-photon sensitivity (uncaging cross section $\delta_a\Phi_u \geq 3.7 \text{ GM}$ at 740 nm) and far-red emission wavelength requirements ($\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$). Two-photon triggering of a red fluorescent signal in HeLa cells represents promising preliminary results for potentially sophisticated dynamic live-cell imaging studies.

Acknowledgment. The authors thank Dr. Pascal Didier and Prof. Yves Mely for two-photon irradiations, we thank Aline Huber for technical assistance, the ANR (Contract No. PCV 07 1-0035), the CNRS, the French Ministry of Research, and the Université de Strasbourg for financial support.

Supporting Information Available: Solvent preparation, HPLC methods, determination of the structure of PENB-DDAO **3a** and **3b**, $\text{p}K_a$ determination of DDAO, aqueous solubility assays, comparative bleaching experiments, control figures for live-cell imaging, time-lapse microscopy figure. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA9074562



Two-photon uncaging: New prospects in neuroscience and cellular biology

D. Warther^a, S. Gug^{a,b}, A. Specht^a, F. Bolze^b, J.-F. Nicoud^b, A. Mourot^c, M. Goeldner^{a,*}

^aLaboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch cedex, France

^bLaboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch cedex, France

^cUniversity of California Berkeley, Department of Molecular and Cell Biology, 121 Life Sciences Addition, Berkeley, CA 94720-3200, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2010

Revised 21 April 2010

Accepted 26 April 2010

Available online 29 April 2010

Keywords:

Photochemistry

Caged neurotransmitters

Caged fluorescence

Live cell imaging

ABSTRACT

An uncaging process refers to a fast and efficient release of a biomolecule after photochemical excitation from a photoactivatable precursor. Two-photon excitation produces excited states identical to standard UV excitation while overcoming major limitations when dealing with biological materials, like spatial resolution, tissue penetration and toxicity and has therefore been applied to the uncaging of different biological effectors. A literature survey of two-photon uncaging of biomolecules is described in this article, including applications in cellular- and neurobiology.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biology is entering a new phase due to the development of sophisticated methods to scrupulously investigate the extraordinary complexity of cellular processes. These methods necessitate to comply with a spatial and temporal organization of the biological system of interest. Control of cellular processes can only be attained using triggering methods which are orthogonal to their cellular environment. Photochemical activation of an inert biological precursor offers a unique, orthogonal way to attain this spatiotemporal control. Photoactivatable precursors of biological effectors, called ‘caged compounds’, encompass different biological domains involving light-activatable neurotransmitters, second messengers, enzyme or receptor binders as well as small molecule gene regulators. A series of well-established criteria are closely associated to these caged biomolecules. First, the photolytic reaction requires to be efficient and fast to generate a localized concentration jump of the biomolecule in a time frame in agreement with the elicited cellular process. The photoresponsive precursor should be functionally inert as well as non toxic to the cellular system and so should be the photolytic fragment.

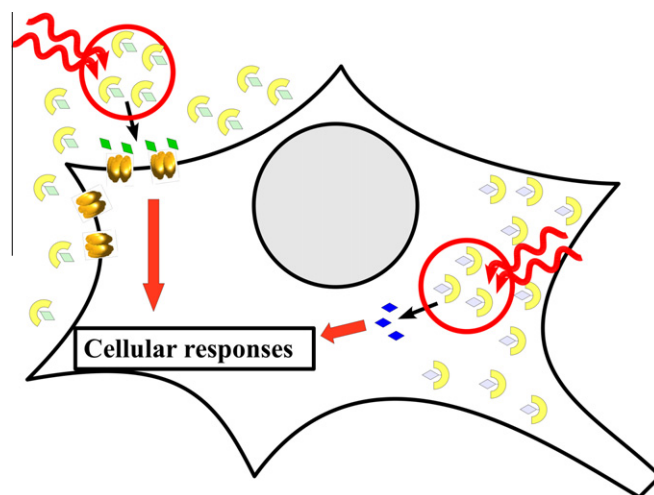
A series of recent reviews have extensively described the different caging groups¹ as well as the biological applications thereof.² Among the more recent outcomes related to this methodology is the two-photon (2P) uncaging process which induces a photolytic reaction with a remarkable spatial resolution, allowing to analyze

cellular processes with a finer spatiotemporal control. Scheme 1 illustrates the two-photon uncaging concept.

2. Results and discussion

2.1. Two-photon uncaging: principle

After two-photon excitation, a molecule reaches an excited state and can either return to its ground state by light emission,



Scheme 1. Two-photon uncaging for focused biological effects.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 68 85 41 62.

E-mail addresses: goeldner@bioorga.u-strasbg.fr, goeldner@unistra.fr (M. Goeldner).

leading to two-photon induced fluorescence and application thereof in imaging such as two-photon excitation microscopy, or can be subject to chemical reactions leading to bond cleavage or rearrangements. This later process is of particular interest in the photoliberation of biologically active substances. Indeed, the fine spatiotemporal localization of the liberation at the focal point of the laser system, due to a quadratic dependence of the excitation probability versus the electric field of the exciting light, allows sub-cellular control of the released substance. In addition, the use of IR light to induce this two-photon process is less damaging to cells than more energetic UV light used in classical illumination.^{2c} Furthermore, the penetration of IR light in living tissues is much more efficient than UV. The efficiency of a two-photon induced photochemical reaction is usually described as $\delta_a\Phi_u$, in the same manner as for one photon ($\varepsilon\Phi_u$).

The practical use of two-photon excitation to induce uncaging of biomolecules has been described for the first time a decade ago.³ The strategy developed in this direction consisted first in testing the two-photon uncaging efficiency of the different caging groups described so far in the literature for one-photon excitation. Table 1 summarizes these results showing the structures of these caging groups and the corresponding two-photon action cross sections ($\delta_a\Phi_u$) expressed in Göppert–Mayer (GM) units (1 GM = 10^{-50} cm⁴ s photon⁻¹). The efficacy of the photoliberation is not only linked to the two-photon absorption cross section δ_a , but also to the efficiency of the photochemical reaction Φ_u . Thus both δ_a and Φ_u have to be optimized.

Classically described cages are based on dipolar donor–acceptor systems (typically methoxy/nitro for nitrobenzyl, nitrophenylalkyls and nitroindolyl platforms, Fig. 1a).^{1c} This architecture is well known in non-linear optics for leading to efficient materials. Numerous works on molecular engineering of such probes proved that an increase in the donor or acceptor efficiency, or an elongation of the conjugated system (Fig. 1b) led to an increased δ_a .⁴ We have to note that the introduction of aromatic heterocycles (such as thiophene, furan...) can also improve the 2P absorption cross section. Recently, we described new architectures derived from symmetrical acceptor–acceptor systems based on a fluorenyl core (Fig. 1c) showing impressive δ_a .⁵ For these systems, the elongation of the delocalization pathway should also lead to an increase of δ_a . For the improvement of Φ_u the relation between structure and properties are less explored, and result mainly from experimental observations. The selected molecules referred mostly to the uncaging of second messengers (Ca²⁺, cAMP) or neurotransmitters such as glutamate, GABA or glycine.

2.2. Two-photon uncaging: a survey

For all these systems, the chromophoric part can be described as electron donor and/or acceptor groups linked together by conjugated systems. Nevertheless, few classes of cages can be highlighted: the 2-nitrobenzyl series (*o*-NB), 2-nitrophenylalkyl series, 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4ylmethyl series (Bhc-), nitroindolyl series (NI-), 8-bromo-7-hydroxyquinoline series (BHQ-) and *trans*-cinnamate ester series. Generally, the two-photon uncaging action cross sections of described cages are measured, at best, at two wavelengths, around 740 nm (higher efficiency for most cages, but corresponding to low laser efficiency and stability) and around 800 nm (most available lasers). However, only a few cages are described with two-photon uncaging action cross section spectra from 740 to 900 nm.^{3b,5,12,20}

Initially, the widely used *o*-NB and Bhc series were tested for two-photon uncaging, with low efficiencies for the *o*-NB series (<0.3 GM) and better efficiency for Bhc series, both at 740 and 800 nm (0.4 GM and 2 GM, respectively for a broad range of caged substances). Since then, many groups of chemists began

to perform molecular engineering on these cages to increase their two-photon sensitivity (either δ_a or Φ_u). For example, the efficiency of the photochemical reaction of the *o*-NB group has been increased by introduction of an electronegative atom in benzylic position⁸ compared to the parent simple *o*-NB.³ Surprisingly, the elongation of the conjugated system by an ethynylbenzene or a vinylbenzene (which should increase the δ_a) did not lead to an increase in the 2P uncaging action cross section,⁸ probably due to competitive side photochemical reactions and a poor uncaging quantum yield. In addition, the substitution of the methoxy group by a better electron donating group (mainly OH, NH₂ or NR₂), which should also increase the δ_a , did not increase significantly the two-photon uncaging action cross section, probably because of undesirable photochemical reactions due to these groups.⁸ A great improvement in the *ortho*-nitro series was achieved by replacing the benzylic group of the *o*-NB derivatives by a phenethyl group in such systems, leading to more efficient photolysis. The two-photon efficiency of such systems was improved compared to the parent *o*-NB analogs.^{17,18} A further improvement was obtained by elongating the conjugated system of these compounds with a stable benzene ring. Such systems can be seen as methoxynitrobiphenyl platforms, which are known to be efficient in two-photon absorption. This modification points out the crucial role of the link between the leaving group and the cage. Indeed, this methoxynitrobiphenyl system linked by a benzylic atom to the released group (*o*-NB series) does not display significant two-photon uncaging action cross section, but with an ethyl junction (phenethyl series) the 2P uncaging action cross sections were significantly increased. Various substances were caged (glutamate, and fluorophores: coumarin or acridinone (DDAO) derivatives) with efficient 2P induced photolysis (about 4 GM at 740 nm and 0.4 GM at 800 nm^{19,20}). Another system has been described in 2006, based on a nitro-dibenzofurane moiety, leading to $\delta_a\Phi_u$ of 0.6 GM at 720 nm. Structurally, this molecule is similar to a constrained analog of the previously described methoxynitrobiphenyl cage.

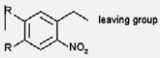
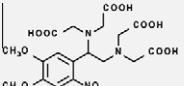
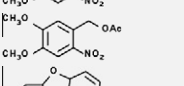
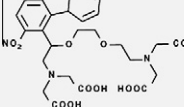
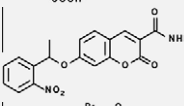
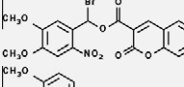
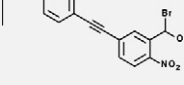
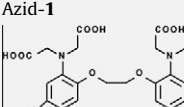
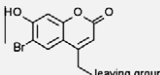
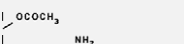
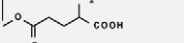
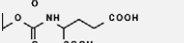
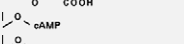
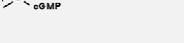
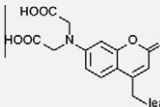
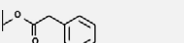
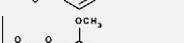
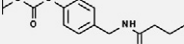
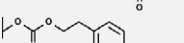
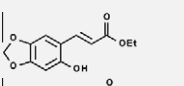
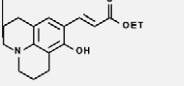
In 2008, another type of systems was introduced, based on symmetrical chromophores contrarily to all previously described donor–acceptor systems. A system based on a symmetrical bis-nitrostilbene was prepared and exhibited unprecedented two-photon uncaging action cross sections (over 3 GM in the 740–800 nm range with a maximum of 5 GM at 800 nm).⁵ It takes advantage both of the efficient link between the cage and the biological molecule (nitrophenethyl) leading to very good uncaging quantum yields, and the very high δ_a of the symmetrical bis-acceptor chromophore.

The heteroaromatic quinoline core has also been used to build interesting caging groups for carboxylic acids or phosphates.¹⁶ The 8-bromo-7-hydroxyquinoline (BHQ-series) present biologically relevant 2P uncaging action cross sections in the 0.4–0.6 GM range at 740 nm, while its efficiency drops at 800 nm ($\delta_a\Phi_u = 0.087$ GM).

Another very elegant and efficient way to release a caged alcohol concomitant to a fluorescent reporter is to use the photoisomerization of *trans*-cinnamate esters.¹² The two-photon sensitivity of such photochemical reactions is excellent (up to 4.7 GM at 750 nm) but, due to the low velocity of the uncaging process following photoisomerization, such cages have to be used to study slow biological processes.

Methoxynitroindolyl caging groups are commercially available with moderate efficiencies upon two-photon excitation (0.06 GM at 730 nm for glutamate uncaging). Various chemical modifications were also performed on this system, leading first to MDNI, by the introduction of a second nitro group on the benzene ring.^{13,15} Unfortunately, the two-photon efficiency $\delta_a\Phi_u$ is not significantly affected by this introduction of an electron

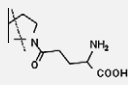
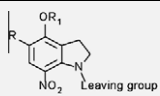
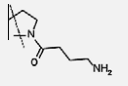

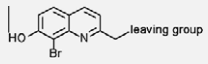

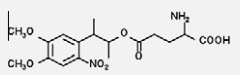
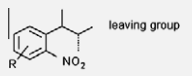
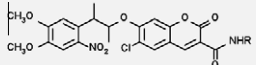
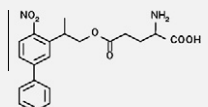
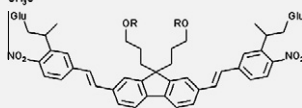
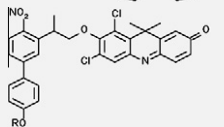
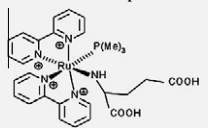
Table 1a
Two-photon sensitive caging groups (1/2)

Caging group	Two-photon cross section (wavelengths)
2-Nitrobenzyl (oNB-) series	
 DM-nitrophen (Ref. 3a)	0.013 GM (730 nm) caged Ca ²⁺
 (Ref. 3b)	0.03 GM (740 nm); 0.01 GM (800 nm) caged acetate
 NDBF-EGTA (Ref. 6)	0.6 GM (720 nm) caged Ca ²⁺
 NPE-hydroxycoumarin (Ref. 7)	0.68 GM (740 nm) caged fluorescence
 (Ref. 8)	0.065 GM (750 nm) caged carboxylate
 (Ref. 8)	0.05 GM (750 nm) caged carboxylate
Azid-1	
 AZID-1 (Ref. 3a)	1.4 GM (700 nm) caged Ca ²⁺
6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl (Bhc-)series	
 (Ref. 3b)	1.99 GM (740 nm); 0.42 GM (800) caged acetate
 (Ref. 3b)	0.89 GM (740 nm); 0.42 GM (800 nm) caged glutamate
 (Ref. 3b)	0.95 GM (740 nm); 0.37 GM (800 nm) caged glutamate
 (Ref. 9)	2.28 GM (740 nm); ~ 0.30 GM (800 nm) caged cAMP (equiv isomer)
 (Ref. 9)	1.95 GM (740 nm) caged cGMP (equiv isomer)
7-Bis(carboxymethyl)amino]coumarin-4-ylmethyl (BCMACM)series	
 (Ref. 10)	0.38 GM (740 nm)
 (Ref. 10)	2.47 GM (740 nm)
 (Ref. 10)	1.43 GM (740 nm)
 (Ref. 11)	1.24 GM (740 nm)
Coumarins from <i>trans</i>-cinnamate esters isomerization	
 (Ref. 12)	3.8 GM (750 nm) caged ROH
 (Ref. 12)	4.7 GM (750 nm) caged ROH

withdrawing group. Nevertheless, substitution of the methyl group on the phenolic part by a carboxylic acid chain increased by a fac-

tor 4 the two-photon uncaging action cross section (around 0.24 GM at 720 nm).

Table 1b
Two-photon sensitive caging groups (2/2)

Caging group		Two-photon cross section (wavelengths)
Nitroindoliny (NI-) series		
	MNI-Glu (Ref. 13)	 R = H; R ₁ = CH ₃ (MNI)
	MDNI-Glu (Ref. 13)	R = NO ₂ ; R ₁ = CH ₃ (MDNI)
	CNI-Glu (Ref. 14)	R = H; R ₁ = CH ₂ COOH (CNI)
	CDNI-Glu (Ref. 15)	R = NO ₂ ; R ₁ = CH ₂ COOH (CDNI)
	CNI-GABA (Ref. 14)	
	CDNI-GABA (Ref. 14)	
8-Bromo-7-Hydroxyquinoline (BHQ-) series		
	BHQ-OAc (Ref. 16)	 0.59 GM (740 nm); 0.087 GM (780 nm) caged acetate
	BHQ-OPO(OCH ₃) ₂ (Ref. 16)	0.43 GM (740 nm) caged phosphate
<i>o</i> -Nitrophenylalkyl series		
	DMNPB-Glu (Ref. 17)	 0.17 GM (720 nm) caged Glutamate
	DMNPB-coumarin (Ref. 18)	0.21 GM (740 nm) caged fluorescence
	PMNB-Glu (Ref. 19)	0.45 GM (800 nm) caged glutamate
	BNSF-Glu (Ref. 5)	5.0 GM (800 nm) caged glutamate
	PENB-DDAO (Ref. 20)	3.7 GM (740 nm) caged fluorescence
Rubidium complex		
	RuBI-Glu (Ref. 21)	

2.3. Photoactivatable fluorescence

Fluorescent imaging techniques have considerably increased our ability to unravel finer details of cellular events. One significant reason for these advances has been the development of fluorescent proteins, because proteins can be genetically encoded and targeted to defined cell types. A further refinement came from 'photoactivatable' fluorescent proteins (PAFPs), a small category of fluorescent proteins²² that allow for example to lower the diffraction barrier to nanometer resolution and has been used in photoactivated localization microscopy (PALM).²³ The fluorescence characteristics of photoactivatable proteins can be controlled by irradiation at a specific wavelength, intensity and duration, leading to tracking studies in living cells and organelles in a well define, spatiotemporal manner.²⁴ However, the large size of PAFP's combined with their 'limited' photophysical properties can restrict trafficking studies applications. Those limitations can be overcome by labeling fusion proteins with synthetic, small 'photoactivated' fluorophores (also called caged fluorophores). Besides their advantage in terms of

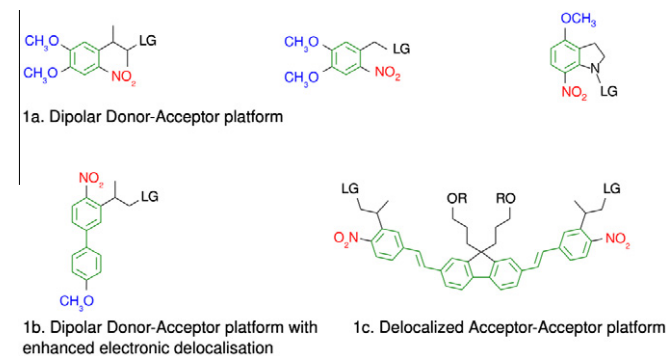


Figure 1. Platforms structures of commonly used cages showing donor groups (blue), acceptor groups (red) and conjugated system (green) (LG = leaving group).

Recently, some coordination complexes have been used for glutamate uncaging, but without determination of the $\delta_a\Phi_u$.²¹

size, new caged fluorophores specifically engineered for two-photon excitation may limit photoinduced cellular damage and should become important research tools for tracking proteins in cells. This technology may open the way to developments in emerging microscopies with nanometer resolution, such as PALM, which takes advantage of the intrinsic 3D resolution of the two-photon excitation (2P-PALM).²⁵

The general strategy for masking fluorescence is to perturb the electronic structure of the fluorophore by attaching a photoremovable group, thereby rendering the molecule either non-fluorescent or very weakly so. The phenolic group of fluorescein was first targeted in this respect;²⁶ subsequent extensions include rhodamine,²⁷ Q-rhodamine,²⁸ resorufin,²⁸ fluorescein²⁹ and hydroxycoumarin⁷ using *o*-nitrobenzyl (*o*-NB) derivatives as caging groups. Hydroxycoumarin was also modified using the *o*-nitrophenethyl (DMNPB)¹⁸ caging group, resulting in an enhanced two-photon uncaging sensitivity. A different photochemical reaction was recently described on a masked push-pull fluorophore by photochemical conversion of a non-fluorescent aromatic azido-DCDHF label into the corresponding fluorescent anilino derivative.³⁰ To date, 7-hydroxycoumarin-3-carboxamide derivatives are the only caged fluorophores for which two-photon uncaging excitation has been measured,^{7,18} leading to two-photon cross sections $\delta_a\Phi_u \leq 0.6$ GM at 740 nm for the 1-(2-nitrophenyl)ethyl cage.

Unfortunately, most of these 'caged' fluorophores will probably have limited use in cell biology either because of the poor 2P uncaging efficiencies of the used photoremovable groups or the unadapted biophysical properties that is, fluorophores which are prone to bleaching or which require too low excitation wavelengths. We have recently developed a new red emitting 'caged' fluorophore,²⁰ which is excited at wavelengths where tissue turbidity and cellular autofluorescence are low.³¹ This molecule uses the chemical and photophysical properties of a 1,3-dichloro-9,9-dimethyl-9H-acridin-2(7)-one (DDAO) derivative,³² a far-red emitting fluorophore ($\lambda_{em} = 658$ nm) which was caged using a donor-biphenyl-acceptor platform described previously for caging glutamate¹⁹ and displaying unprecedented two-photon uncaging cross sections at 740 nm ($\delta_a\Phi_u = 3.68$ GM).⁵

There is a clear need in caging more suitable fluorophores (red emitting) with better cages. But even with the best 'photoactivatable' fluorophore in hand, one major limitation for visualizing molecular events in living cells remains the specificity of the signal, that is the attachment of the fluorophore specifically to the cellular protein of interest. This limitation can be overcome by using small genetically encoded peptide tags and complementary small organic affinity probes³³ with sufficient specificity and affinity to be used in living cells. To be of practical use, such an approach has to provide a highly specific labeling reaction both in vitro and in vivo.³⁴

2.4. Two-photon uncaging in neurobiology

The nervous system is an extremely complex network of highly-specialized cells (around 100 billions) that sense external stimuli and carry information back and forth throughout the body. Each of these neurons is connected to thousands other neurons, making the task of mapping functional connectivity between cells extremely challenging. A prerequisite to understanding such a circuitry is the ability to manipulate precisely the activity of individual neurons. Mapping connectivity between neurons can be done by stimulating a pre-synaptic neuron and recording simultaneously excitatory or inhibitory responses from the post-synaptic cell. Because electrode-based recordings are limited to a few neurons at a time, it quickly became clear that optical methods would enable stimulating multiple areas of the brain, thereby generating precise input maps for neurons.³⁵ Nearly all neurons are excited by glutamate, making photorelease of glutamate an ideal strategy to stim-

ulate pre-synaptic cells. Yet, one-photon uncaging of glutamate suffers from lack of spatial specificity, because light is scattered by living tissues, resulting in a stimulated area that contains not only the cell of interest but also distant neurons whose dendrites pass by. To circumvent this issue, two-photon uncaging of glutamate has been developed. The first advance came from 'chemical two-photon uncaging', where a single molecule of glutamate is caged by two α -carboxy-2-nitrobenzyl (CNB) caging groups. Photorelease of glutamate in this case requires the sequential absorption of two photons, increasing the probability of double-uncaging at the focal point, and resulting in a significant improvement in the resolution of the stimulated area.^{36,37} Later two caged-glutamates with two-photon cross section were developed: Bhc-Glu^{3b} and MNI-glutamate.^{38,39} MNI-glutamate is commercially available and has contributed importantly to the detailed understanding of functional connectivity. Importantly, two-photon sensitive cages allow a finer spatial resolution but also a deeper tissue penetration, allowing mapping in thick brain slices.⁴⁰

Another great challenge in neurobiology is to study synaptic function and plasticity, that is the modulation of the synaptic strength with time. Two-photon photorelease of glutamate is sufficiently precise that it can be restricted to individual dendritic spines, and sufficiently time-controlled that it can mimic the kinetics and amplitude of unitary excitatory post-synaptic currents.^{39,41} Two-photon uncaging of MNI-glutamate has been used to measure the number, properties and location of receptors in single post-synaptic densities, and to induce synaptic plasticity, a remodeling of the synapse widely believed to be the mechanism by which memory is encoded and stored in the central nervous system (CNS).^{42–44}

Inhibition in the adult CNS is mainly controlled by the neurotransmitter GABA. Surprisingly, the development of adequate caged-GABA lags behind the caged-glutamates. A number of caged-GABAs have been engineered but they all have unfavorable photochemical (no two-photon cross section) and pharmacological properties (antagonist before photolysis), limiting their application in neurobiology.^{38,45–48} Antagonist properties are not desired for at least two reasons: (1) since photorelease is only partial, very high concentrations of caged-compounds are needed, and the excess of uncaged antagonist may mask the effect of photoreleased agonist; (2) incubation with an antagonist may change the physiology of the tissue over time, and induce epileptic events in case of caged-GABA. Recently a visible-light sensitive caged-GABA based on an inorganic ruthenium complex (RuBi-GABA) has been developed.⁴⁹ RuBi-GABA shows no antagonistic properties at concentrations used for photolysis. Furthermore because visible light is used instead of UV-light, this allows for a deeper uncaging in tissues than with classical cages. It will be very interesting to see if, like RuBi-glutamate,²¹ RuBi-GABA is sensitive to two-photon irradiation. More recently, the first two-photon sensitive caged GABAs have been engineered using the CNI, CDNI and N-DCAC photoremovable groups.⁵⁰ Unfortunately, those compounds also interfere with the GABA receptor function before photolysis, questioning the applicability of those probes outside of receptor mapping.

Besides extracellular photorelease of neurotransmitters, photomanipulation of intracellular chemistry (second messengers, transcription factors, RNA...) offers great promise in neurobiology. Second messengers like Ca^{2+} , inositol-1,4,5-triphosphate (IP3), cyclic nucleotides or ATP have been caged and used to control signal transduction cascades with one-photon excitation (for a recent review see.^{2c}) Two-photon sensitive caged Ca^{2+} , IP3 and cyclic nucleotides are still under development and haven't been used yet in neurobiology.^{3a,6,11,51,52} Two-photon intracellular uncaging can also be used to photoregulate transgene expression with high spatial resolution. This approach has very recently been applied to control the expression of genes in hippocampal cultures using a two-photon sensitive caged-doxycycline, a member of the tetracy-

cline antibiotics that can be used to control transcriptional activation.⁵³

Detailed investigations into the complex CNS require the development of better probes. The first need is in two-photon sensitive cages with fast photorelease and good photochemical efficiency, to allow the reduction of both the laser power needed for uncaging (and therefore photodamage to tissues) and the concentration of caged-compound used (and therefore adverse pharmacology). It has been shown for example that the millimolar range of concentrations classically used for MNI-glutamate dramatically antagonizes the GABAergic transmission.¹⁹ Following the development of MNI-Glu, new caged-glutamates with improved photochemical properties have been developed: MDNI-glu,¹³ DMNPB-Glu,¹⁷ CDNI-Glu,¹⁵ PMNB-Glu,¹⁹ BNSMB-Glu and BNSF-Glu.⁵ The last two compounds largely surpass the others in terms of two-photon cross section, and their use in neurobiology is greatly awaited.

3. Conclusion

Photochemistry provides a non-invasive means to investigate dynamic processes in biology.² Photocontrolling the activity of biomolecules can be achieved in different ways, including illumination of naturally photoreactive proteins (i.e., channelrhodopsins), the use of optical switches for reversible control of proteins and finally the uncaging process to release biomolecules. A major progress in this latter field was achieved using two-photon excitation which allowed a tremendous improvement in the spatial resolution while using less harmful and deeper penetrating irradiation wavelengths in the IR range. While there is plenty of room for new chemical developments in the two-photon uncaging field, applications in neurobiology and cellular biology are just beginning and are open to sophisticated developments.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Doris L. Fortin for careful reading of the manuscript and the ANR (Contrat PCV 07 1-0035), the CNRS, the French Ministry of Research and the Université de Strasbourg for financial support.

References and notes

- (a) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900; (b) Young, D. D.; Deiters, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 999; (c) *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers: Photoswitches and Caged Biomolecules*; Goeldner, M., Givens, R., Eds.; Wiley-VCH, 2005.
- (a) Lee, H.-M.; Larson, D. R.; Lawrence, D. S. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409; (b) Deiters, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47; (c) Ellis-Davies, G. C. R. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619; (d) Specht, A.; Bolze, F.; Omram, Z.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *HFSP J.* **2009**, *3*, 255.
- (a) Brown, E.; Shear, J. B.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y.; Webb, W. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489; (b) Furuta, T.; Wang, S. S.-A.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1193.
- Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244.
- Gug, S.; Bolze, F.; Specht, A.; Bourgoigne, C.; Goeldner, M.; Nicoud, J.-F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525.
- Momotake, A.; Lindegger, N.; Niggli, E.; Barsotti, R. J.; Ellis-Davies, G. C. R. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35.
- Zhao, Y. R.; Zheng, Q.; Dakin, K.; Xu, K.; Martinez, M. L.; Li, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653.
- Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Neveu, P.; Jullien, L. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865.
- Furuta, T.; Takeuchi, H.; Isozaki, M.; Takahashi, Y.; Kanehara, M.; Sugimoto, M.; Watanabe, T.; Noguchi, K.; Dore, T. M.; Kurahashi, T.; Iwamura, M.; Tsien, R. Y. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1119.
- Hagen, V.; Dekowski, B.; Kotzur, N.; Lechler, R.; Wiesner, B.; Briand, B.; Beyermann, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1621.
- Hagen, V.; Dekowski, B.; Nache, V.; Schmidt, R.; Geissler, D.; Lorenz, D.; Eichhorst, J.; Keller, S.; Kaneko, H.; Benndorf, K.; Wiesner, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887.
- (a) Gagey, N.; Neveu, P.; Benbrahim, C.; Goetz, B.; Aujard, I.; Baudin, J.-B.; Jullien, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9986; (b) Gagey, N.; Neveu, P.; Jullien, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2467.
- Fedoryak, O. D.; Sul, J.-Y.; Haydon, P. G.; Ellis-Davies, G. C. R. *Chem. Commun.* **2005**, 3664.
- Ellis-Davies, G. C. R. *PCT Int. Appl.*, WO 2008094922 A1 20080807, 2008.
- Ellis-Davies, G. C. R.; Matsuzaki, M.; Paukert, M.; Kasai, H.; Bergles, D. E. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6601.
- (a) Fedoryak, O. D.; Dore, T. M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419; (b) Zhu, Y.; Pavlos, C. M.; Toscano, J. P.; Dore, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267; (c) Davis, M. J.; Kragor, C. H.; Reddie, K. G.; Wilson, H. C.; Zhu, Y.; Dore, T. M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1721.
- Specht, A.; Thomann, J.-S.; Alarcon, K.; Wittayanan, W.; Ogden, D.; Furuta, T.; Kurakawa, Y.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690.
- Orange, C.; Specht, A.; Puliti, D.; Sakr, E.; Furuta, T.; Winsor, B.; Goeldner, M. *Chem. Commun.* **2008**, 1217.
- Gug, S.; Charon, S.; Specht, A.; Alarcon, K.; Ogden, D.; Zietz, B.; Léonard, J.; Haacke, S.; Bolze, F.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303.
- Warther, D.; Bolze, F.; Léonard, J.; Gug, S.; Specht, A.; Puliti, D.; Sun, X.-H.; Kessler, P.; Lutz, Y.; Vonesch, J.-L.; Winsor, B.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585.
- Fino, E.; Araya, R.; Peterka, D. S.; Salierno, M.; Etchenique, R.; Yuste, R. *Front. Neural Circuits* **2009**, *3*, 2.
- Lukyanov, K. A.; Chudakov, D. M.; Lukyanov, S.; Verkhusha, V. V. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 885.
- (a) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, W.; Olenych, S.; Bonifacio, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. *Science* **2006**, *313*, 1642; (b) Hell, S. W. *Science* **2007**, *316*, 1153.
- Lippincott-Schwartz, J.; Patterson, G. H. *Methods Cell. Biol.* **2008**, *85*, 45.
- Gould, T. J.; Verkhusha, V. V.; Hess, S. T. *Nat. Protocols* **2009**, *4*, 291; Hess, S. T.; Girirajan, T. P.; Mason, M. D. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258; Folling, J.; Belov, V.; Riedel, D.; Schonle, A.; Egner, A.; Eggeling, C.; Bossi, M.; Hell, S. W. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 321.
- Krafft, G. A.; Sutton, W. R.; Cummings, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 301.
- Ottl, J.; Gabriel, D.; Marriott, G. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 143.
- Mitchison, T. J.; Sawin, K. E.; Theriot, J. A.; Gee, K.; Mallavapar, A. *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 63.
- Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6696.
- Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. D.; Samuel, R.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9204.
- Billinton, N.; Knight, A. W. *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 175.
- Corey, P. F.; Trimmer, R. W.; Biddlecom, W. G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *103*, 1646.
- Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Science* **1998**, *281*, 269.
- (a) Gronemeyer, T.; Godin, G.; Johnsson, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 453; (b) Johnsson, N.; George, N.; Johnsson, K. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 47.
- Sjulson, L.; Miesenbock, G. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1588.
- Pettit, D. L.; Wang, S.; Gee, K.; Augustine, G. *Neuron* **1997**, *19*, 465.
- Wang, S. S.; Khiroug, L.; Augustine, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 8635.
- Canepari, M.; Nelson, L.; Papageorgiou, G.; Corrie, J. E.; Ogden, D. J. *Neurosci. Methods* **2001**, *112*, 29.
- Matsuzaki, M.; Ellis-Davies, G. C.; Nemoto, T.; Miyashita, Y.; Iino, M.; Kasai, H. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086.
- Nikolenko, V.; Poskanzer, K. E.; Yuste, R. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 943.
- Carter, A. G.; Sabatini, B. L. *Neuron* **2004**, *44*, 483.
- Matsuzaki, M.; Honkura, N.; Ellis-Davies, G. C.; Kasai, H. *Nature* **2004**, *429*, 761.
- Harvey, C. D.; Svoboda, K. *Nature* **2007**, *450*, 1195.
- Tanaka, J.; Horiike, Y.; Matsuzaki, M.; Miyazaki, T.; Ellis-Davies, G. C.; Kasai, H. *Science* **2008**, *319*, 1683.
- Molnar, P.; Nadler, J. V. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *391*, 255.
- Curten, B.; Kullmann, P. H.; Bier, M. E.; Kandler, K.; Schmidt, B. F. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 641.
- Papageorgiou, G.; Corrie, J. E. T. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9668.
- Trigo, F. F.; Papageorgiou, G.; Corrie, J. E.; Ogden, D. J. *Neurosci. Methods* **2009**, *181*, 159.
- Rial Verde, E. M.; Zayat, L.; Etchenique, R.; Yuste, R. *Front. Neural Circuits* **2008**, *2*, 2.
- Matsuzaki, M.; Hayama, T.; Kasai, H.; Ellis-Davies, G. C. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 255.
- Ellis-Davies, G. C. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1603.
- Kantevari, S.; Hoang, C. J.; Ogrodnik, J.; Egger, M.; Niggli, E.; Ellis-Davies, G. C. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 174.
- Cambridge, S. B.; Geissler, D.; Calegari, F.; Anastasiadis, K.; Hasan, M. T.; Stewart, A. F.; Huttner, W. B.; Hagen, V.; Bonhoeffer, T. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 527.



Small photoactivatable molecules for controlled fluorescence activation in living cells

David Puliti, David Warther, Clelia Orange, Alexandre Specht, Maurice Goeldner *

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74, route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2010

Revised 1 July 2010

Accepted 7 July 2010

Available online 31 July 2010

Keywords:

Caged fluorescence
Two-photon uncaging
Cellular imaging
Photolabile linkers

ABSTRACT

The search for chemical probes which allow a controlled fluorescence activation in living cells represent a major challenge in chemical biology. To be useful, such probes have to be specifically targeted to cellular proteins allowing thereof the analysis of dynamic aspects of this protein in its cellular environment. The present paper describes different methods which have been developed to control cellular fluorescence activation emphasizing the photochemical activation methods known to be orthogonal to most cellular components and, in addition, allowing a spatio-temporal controlled triggering of the fluorescent signal.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Green fluorescent proteins and their genetically modified constructs have revolutionized cell biology allowing to visualize and track down cellular proteins in their intact environment. The use of GFPs as a noninvasive tool for studying protein dynamics prompted the engineering of mutants with improved fluorescence properties (emission wavelengths, brightness and photostability).¹ During these investigations, the development of photoactivatable fluorescent proteins (PA-FPs)² represented a real break through in the field, allowing in particular to analyse dynamic cellular processes using sophisticated optical imaging techniques. A large series of genetic variants have been produced allowing to generate different classes of PA-FPs either switching on fluorescence, changing colour or leading to a reversible on/off system after photoactivation.³ Despite these overwhelming successes, one might still ask the question how do such constructs alter the cellular responses of the GFP-appended proteins and in particular how affected are the dynamics of these cellular proteins, knowing the ~25 kDa molecular weight of the GFPs?⁴ Clearly, knowing that only small molecule-based probes can be used in native tissue, there is a increasing need for small photoactivatable fluorescent molecules, provided these are cell permeable and can be attached covalently or reversibly, but specifically, to the target cellular protein. This article summarizes the different approaches for cellular fluorescence photoactivation which have been developed recently as well as the different small tags which have been designed for a selective protein recognition.

2. Results and discussion

2.1. Small fluorescent molecules for cellular imaging

The need for convenient and reliable tests of cellular actors stimulated the development of fluorescence-based technologies. These tests include fluorogenic enzyme substrates as well as fluorescent ion indicators^{5–7} to generate, in a quantitative manner, a fluorescent signal either after enzymatic reaction or after specific ion recognition. Although, these fluorescent signals are used to monitor the activity of a cellular protein, these reporters have been covered by others and would exceed the scope of this review, therefore we will not further develop this aspect of fluorescence activation.

Most of these tests use small fluorescent molecules whilst the GFP's, taking advantage of the existence of a large colour palette, have been mainly used in FRET- and translocation-based systems to visualize dynamic cellular processes. Clearly, the main advantage of GFP's remain their convenient expression as fusion protein in most cellular systems, but despite the improvements displayed by recent genetic variants of GFP's,^{1b} the need for small fluorescent molecules with optimized photophysical properties remains critical for many cellular studies.⁸ The requirements for these fluorescent probes are multiple, their size should be small to minimize steric perturbations as well as to enable a better cellular penetration. The selected chromophores should be red-shifted emitting fluorophores with a high brightness which is defined as the product of the fluorescence quantum yield by the extinction coefficient at the excitation wavelength ($\Phi_{fl} \cdot \epsilon_{exc}$, $M^{-1} cm^{-1}$). Another desirable property is a good photostability, knowing in particular that

* Corresponding author.

E-mail address: goeldner@bioorga.u-strasbg.fr (M. Goeldner).

the GFP's are often prone to bleaching after sustained photoactivation. Finally, a large Stokes shift, the difference in nm between the absorption and emission wavelength maxima, will facilitate the fluorescent experimentations, that is, by preventing self-quenching phenomena. The largest caveats for these small molecules are their poor aqueous solubility, knowing that a high absorptivity does correlate with an increased conjugation of the chromophore involving often aromatic systems and decreasing thereof considerably their solubility in aqueous medium. The substitution of the chromophores with ionized functions, that is, carboxylates for fluorescein or rhodamine derivatives; sulfonates for Cy3 or Cy5 derivatives, does improve the solubility properties but it might also affect their ability to cross the cellular membranes by passive diffusion. The recent review by Lavis and Raines⁸ summarized exhaustively and accurately the overall properties of small fluorescent molecules.

2.2. Cellular fluorescence activation—concepts

Many strategies have been developed to activate fluorescence in response to an external stimuli (pH, local environment, etc.), we will focus on activation processes using a photochemical reaction.

2.2.1. The uncaging concept

Uncaging refers to a process where a biomolecule, after having been rendered functionally inactive by chemical appending of a photoactivatable group, can be unleashed through a fast and efficient photolytic reaction. The chemistry involved in these derivatives and the accompanying photolysis reactions have been described in details in the literature,^{9a-d} as well as the biological applications which have been recently reviewed.^{9e,9f}

2.2.1.1. Fluorescence uncaging. Amongst the described applications of the uncaging concept, a spatio-temporal controlled release of fluorescence by photochemical activation does represent a powerful tool for cellular biologists, especially when the fluorescent signal allows the tracking of a cellular component in living systems.^{9g} The experimental procedures have to be compatible with a biological environment, that is, the experiments require to be performed in a buffered aqueous medium and the excitation wavelengths should be above 350 nm to minimize damage to intracellular components (Scheme 1).

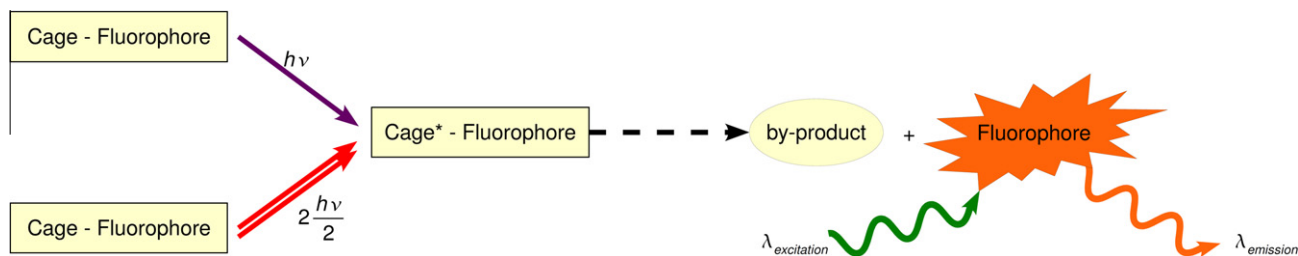
One-photon fluorescence uncaging. The light-induced fluorescence enhancement after an uncaging process is usually achieved by modifying a chemical function directly responsible for the fluorescent signal, that is, the aromatic hydroxyl or amino groups of usual fluorophores like fluorescein,¹⁰ rhodamine,¹¹ Q-rhodamine,¹² resorufin¹² and hydroxycoumarin derivatives.¹³ Most of these fluorescent derivatives used *o*-nitrobenzyl (*o*-NB) derivatives as photoremovable protecting groups. *o*-NB caging groups have also been used on TokyoGreen derivatives, fluorescein compounds with improved fluorescent properties.¹⁴ Hydroxycoumarins were also modified with different photoremovable groups such *o*-nitrophen-

ethyl derivatives,¹⁵ a caging group which displayed remarkable photolytic properties for the release of the neurotransmitter glutamate.¹⁶ Alternatively, the photochemical conversion of conjugated aromatic azido derivatives into corresponding anilino derivatives to generate fluorescent push-pull systems with high absorbance have been described recently.¹⁷ Photochromic rhodamine derivatives have been developed recently with light-induced fluorescence activation¹⁸ whilst a new kind of caged rhodamine derivatives were described using a diazoketone caging group incorporated into a spiro-9H-xantene fragment.¹⁹ These rhodamine-NN derivatives are nonfluorescent at the excitation of their fluorescent analogues and they can be uncaged under convenient irradiation conditions. In comparison to the *o*-NB caging groups, the diazoketone is less sterically demanding, less lipophilic and may represent a way to circumvent the toxic nitroso by-products which are generated during the photo-cleavage of *o*-NB type caging groups. The diazoketone caging group may be exportable to other fluorophore scaffolds.

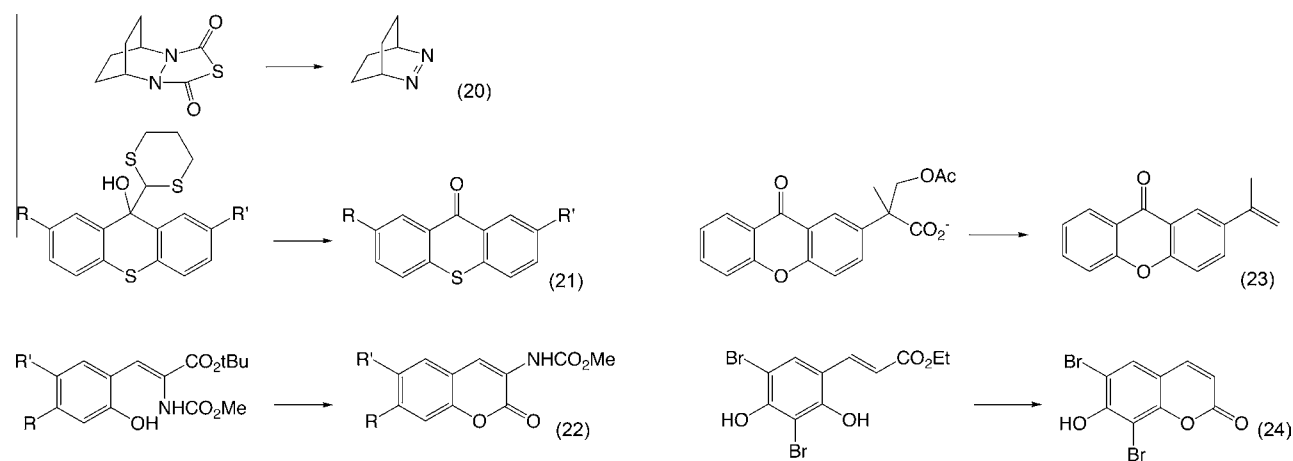
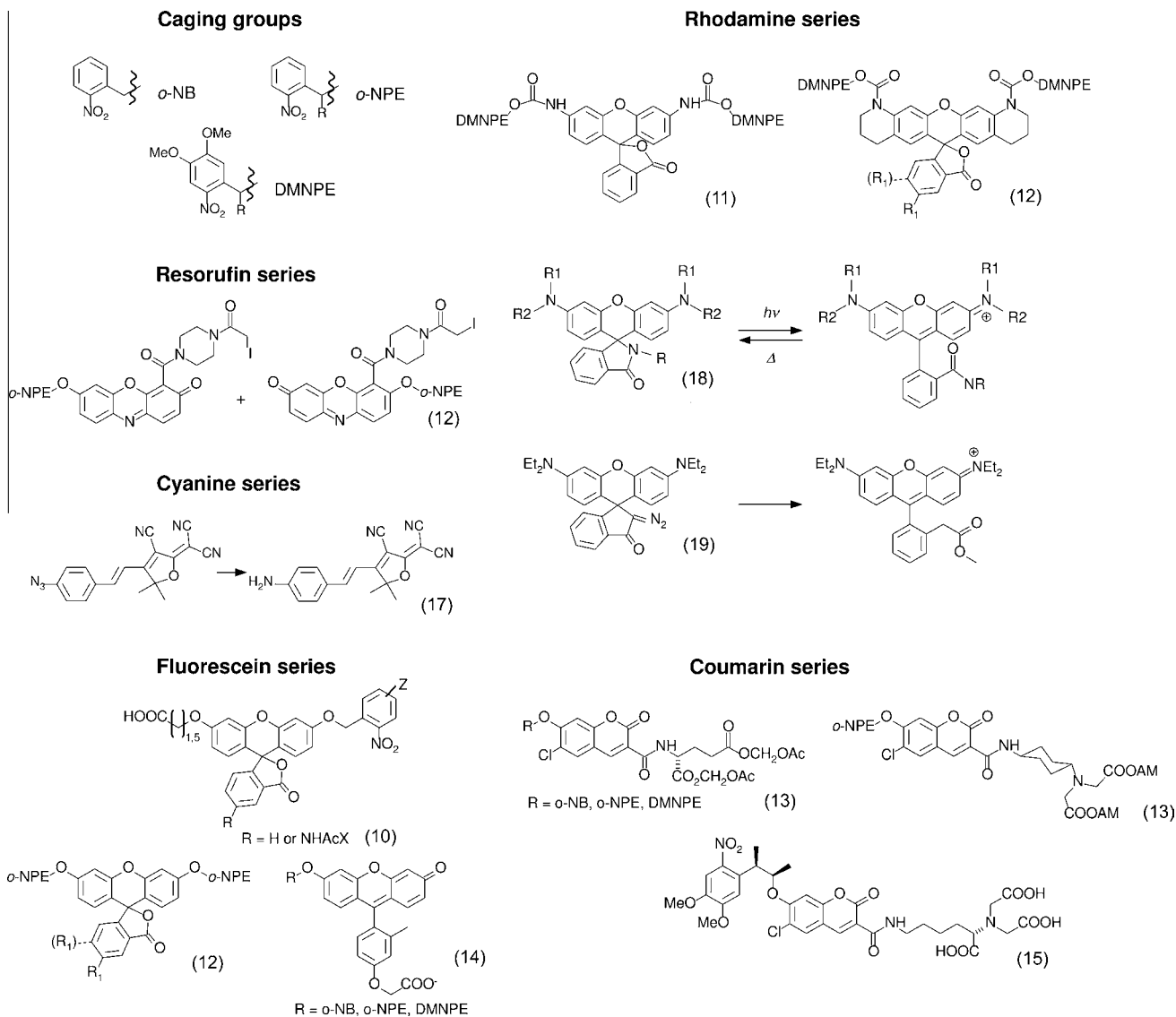
Figure 1 below summarizes the structures of the caged fluorophores which have been described in the literature.

Uncaging with fluorescent reporters. A series of articles have described the uncaging of chemical groups with concomitant formation of a fluorescent probe used as a reporter (Fig. 2). These molecules include the photochemical formation a diazabicyclo[2,2,2] derivative generated from a thiadiazolidinedione precursor,²⁰ a thioxanthone derivative from masked aromatic ketones,²¹ coumarin derivatives generated from hydroxycinnamic esters used to cage alcohols²² and xanthone derivatives used as a photolabile protecting group of carboxylic acids.²³ The fluorescent reporter approach is particularly attractive for an easy quantification of the photolytic reaction which is potentially very useful for biological applications. The major limitation concerning these probes is their excitation wavelength which are not well-adapted for in vivo experiments unless two-photon uncaging procedures can be applied.^{22,24}

Two-photon fluorescence uncaging. After two-photon excitation, at wavelengths $= hv/2$, a molecule reaches an excited state similar to that of one photon excitation and can be subject to chemical reactions leading to bond cleavage. This is of particular interest in the rapid photo-liberation of biologically active substances (two-photon uncaging) and has been mainly applied for a spatio-temporal controlled release of neurotransmitters.²⁵ The main advantage of two-photon excitation is that it produces excited states identical to standard UV excitation whilst overcoming major limitations when dealing with biological materials, like spatial resolution, tissue penetration and toxicity. Due to moderate uncaging cross-sections ($\delta a \cdot \Phi u$ where δa is the absorption cross-section and Φu the uncaging quantum yield) described for the usual photoremovable groups,^{25b,26} two-photon fluorescence uncaging, has been sparingly described in the literature by contrast to two-photon fluorescence excitation which has been widely developed for improved fluorescence imaging techniques²⁷ and displaying high



Scheme 1. Principle of fluorescence uncaging: one- or two-photon excitation of the caging group is followed by chemical cleavage leading to the release of the fluorophore together with a by-product.



two-photon excitation cross-sections.²⁸ A main difference between two-photon fluorescence uncaging and two-photon fluorescence

excitation is that, in the former case, the excitation process will be independently triggered by standard excitation allowing

subsequent biophysical experiments (single molecule fluorescence tracking, bleaching, etc.).

The few examples (Fig. 3) for two-photon fluorescence uncaging described in the literature include the *o*-NB¹³ and the *o*-nitrophenethyl¹⁵ hydroxycoumarin derivatives, whilst coumarins were also used as fluorescent reporters during two-photon alcohol uncaging.^{22,24} To improve these photolytic properties, our laboratory synthesized a donor–acceptor biphenyl platform derived from the photoremovable *o*-nitrophenethyl group, which increased substantially the two-photon uncaging cross-sections, reaching a value of 3.4 GM at 740 nm.^{29,30} Using this new caging group on a red-emitting acridinone fluorophore, we were able to unleash efficiently a fluorescent signal in HeLa cells by two-photon uncaging.³¹

2.2.2. Annihilation of quenching systems

2.2.2.1. Concepts. Besides fluorescence caging, which is a fluorescence extinction by direct chemical modification of the fluorophore, fluorescence extinction can be achieved by chemically linking a fluorophore to a quenching system via a linker. If the quenching system of such continuously quenched fluorophore can be effectively and specifically switched off (which then restores the fluorescence) as response to light, then the fluorophore–quencher pair is an interesting photoactivatable fluorescence reporter. The quenching mechanisms used in such fluorescence reporting systems are based either on a photoinduced electron transfer or on a resonant energy transfer.

2.2.2.2. Photoinduced electron transfer. During a photoinduced electron transfer an electron is transferred, after absorption of a photon of suitable energy, between the fluorophore and a partner of suitable orbital energy levels. The fluorophore and the partner for photoinduced electron transfer may be covalently linked but have to be disconnected from conjugation. The direction of the electron exchange depends on the reduction potentials of the implied species.

If it is the fluorophore that accepts an electron from a partner entity, the lowest singly occupied molecular orbital of the excited state of the fluorophore becomes fully occupied, and a fluorescent return to the ground state is no longer possible. The acceptance of an electron by the excited fluorophore results thus in a fluorescence quenching.

If the excited fluorophore donates its highest energy level electron to the partner entity, it thus loses the excitation energy. In this case too, the fluorescence is quenched by the photoinduced electron transfer.

A detailed description of the physical chemistry of the photoinduced electron transfer would however go beyond the scope of this article. If interested the reader may refer to the very informative literature existing on the subject.^{32–36}

Most fluorescent sensor systems, which make use of a photoinduced electron transfer mechanism, have in common that the fluorescence is restored after a specific interaction of the quencher and an analyte. The reason for this is that the interaction with the analyte changes the redox potential of the quencher so that the photoinduced electron transfer is no longer possible and the fluorescence is restored. The two most prominent ways of annihilating a photoinduced electron transfer quenching system are either a chemical reaction (e.g., a Michael Type addition of a thiol on a maleimide analogue)^{36–38} or the chelation of a cation (H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, etc.).^{5–7} Since these fluorescence activations are not photoinduced, we will not discuss them further. Yet, a system kept out our attention where a classical fluorescein-analogue caging system is significantly optimized by finely tuning an intramolecular photoinduced electron transfer.¹⁴

In this study, three mono-caged fluorescein analogues (amongst these the caged 2-Me-4-OCH₂COOH TokyoGreen) have been developed, which had remarkably low fluorescence quantum yields before photoactivation, compared to a mono *o*-NB caged fluorescein (Fig. 4). This is of particular interest because mono *o*-NB caged fluorescein still has a residual fluorescence quantum yield of 0.117 before photoactivation, which makes it unsuitable for bioimaging, despite its satisfying uncaging rate. In the past, totally nonfluorescent double-caged fluoresceins have been used for cellular investigation.¹¹ A major drawback of these probes is that two caging groups have to be deprotected in order to regenerate the fluorescence. This entails a higher photo toxicity for the observed cells compared to a singly caged fluorophore. The mono-caged fluorescein ether described by Krafft et al., which was fixed in the lactone form, yields a fluorophore after photoactivation which is less fluorescent than fluorescein.¹⁰

Kobayashi and co-workers lowered the fluorescence of the fluorophore before photoactivation by using 2-Me-4-OCH₂COOH TokyoGreen instead of fluorescein. In the described compounds, the oxidation potential of the benzene was finely tuned in order to show a drastic increase in fluorescence after cleavage of the caging group.

Before photoactivation the singlet-excited state of the TokyoGreen fluorophore is quenched by an intramolecular photoinduced electron transfer from the phenyl group of the TokyoGreen to its xantheno moiety, and after photoactivation, the electron transfer

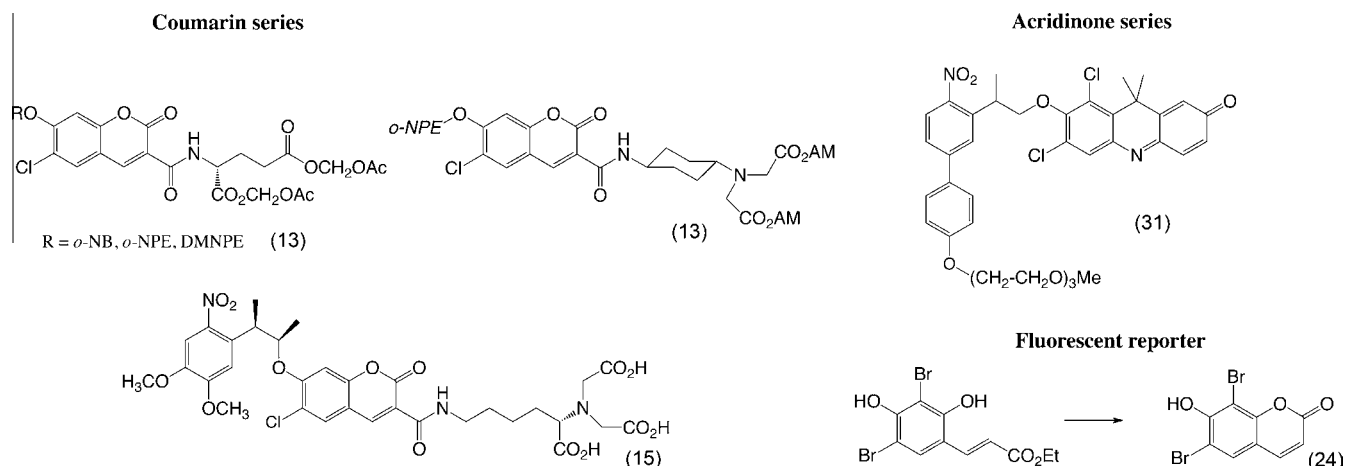


Figure 3. Fluorophores which have been subject to two-photon uncaging.

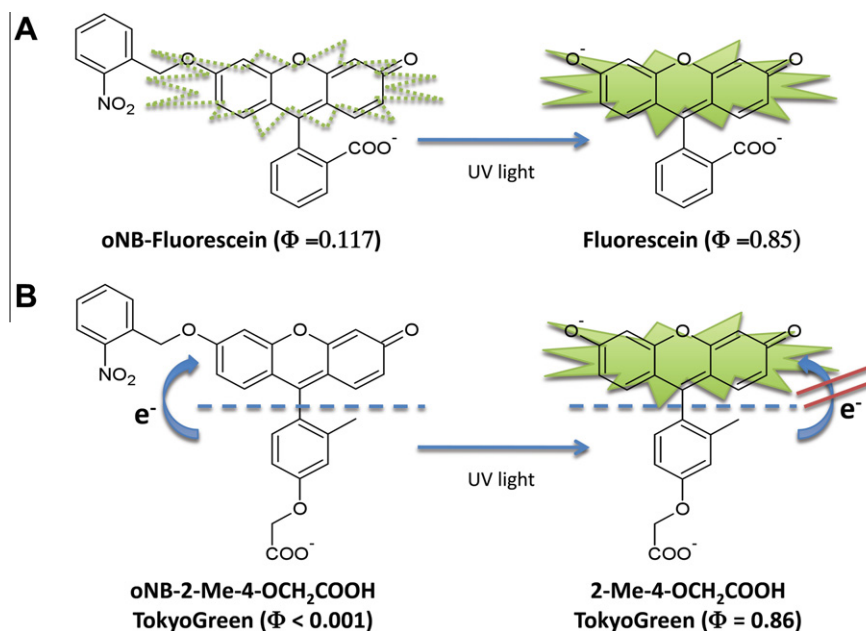


Figure 4. (A) The photolysis reaction of *o*-NB-fluorescein. (B) The photolysis reaction of *o*-NB-2-Me-4-OCH₂COOH TokyoGreen. An intramolecular photoinduced electron transfer makes the fluorescence before photoactivation 100 times lower than that of the *o*-NB-fluorescein.¹⁴

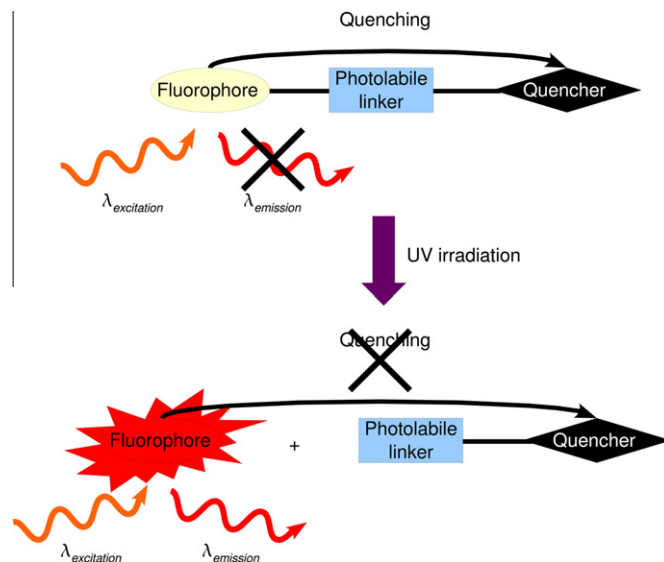
is no longer favoured. Indeed caged 2-Me-4-OCH₂COOH TokyoGreen is 100 times less fluorescent before photoactivation than mono *o*-NB fluorescein.

Photo-annihilation of a photoinduced electron transfer quenching system seems to be a promising way in the search for new photoactivatable fluorophores.

2.2.2.3. Photolabile linkers for quenched FRET. FRET-based tests using small fluorescent probes are well described for the analysis of the activity of proteases and esterases, see, for example, the seminal article published on the control of the activity of HIV protease using a fluorogenic peptide substrate.³⁹ Knowing that these enzymes generate a cleavage of their substrates, FRET was a rather obvious choice for the design of fluorescence-based tests. Extension of this concept to the deciphering of other cellular events required the design of a different strategy to allow the simultaneous triggering of protein activity together with fluorescence. Such concept was achieved by modifying a fluorescently-labelled protein, through a linker containing a photocleavable group that can suppress the protein activity and quench the fluorescence (Scheme 2). This concept was applied to a Smad2 protein construct via expressed protein ligation and using a 4,5-dialkoxy-2-nitrobenzyl derivative for the photolytic reaction.^{40a} More recently, the same concept was used to target mitochondrial compartments using MLS peptides (mitochondrial localization sequences) that are fluorescently labelled and connected to a quencher through a photolabile linker.^{40b} Photolysis produces a sharp increase of fluorescence which can be quantified by flow cytometry. On a similar principle are based SNAP-tag reactive photoactivatable and photo-convertible fluorophores which have recently been described by Johnsson and co-workers. In these systems a SNAP-tag reactive fluorophore is coupled via a photocleavable linker ether to a FRET quencher or to a fluorescent FRET acceptor.^{40c}

2.2.3. Photoswitchable probes

Caged fluorescently-labelled proteins are of primary interest for biological imaging, in particular for the analysis of protein dynamics^{41,11} and super-resolution multicolour fluorescence microscopy.¹⁶ Although, the light-directed activation allows a



Scheme 2. FRET-based quenching system controlled by photochemical cleavage of a linker.

spatio-temporal control of the protein activity, the method relies on a single activation process and might also generate toxic side-products. To overcome these limitations, photochromic systems such as the nitrobenzospiran derivatives⁴² have been developed. They allow an optical switching at appropriate wavelengths between a dark (colourless spiro form) and a colourful state (fluorescent open merocyanin form). A reversible FRET imaging method named OLID-FRET (Optical lock-in detection) has been developed accordingly, using this photo-convertible system⁴³ where the energy transfer reaction from a donor molecule (FITC-Phalloidin or GFP) can be reversibly governed allowing to increase substantially and unambiguously the sensitivity of FRET detection. The attachment of this photoreversible system to a green fluorescent-alkylguanine transferase (GFP-AGT) fusion protein using a SNAP-tag approach allowed to extend this methodology to *in vivo* imaging studies.

2.3. In vivo fluorescent protein labelling using small tags

A series of fusion proteins covalently modified with fluorescent probes have been exhaustively described in the literature⁴⁴ complementing judiciously the panel of GFP's and their genetic constructs by allowing to attach fluorophores with improved biophysical properties over the GFP's. Although many different tags have been described in the literature, only a very few have been demonstrated to allow intracellular imaging.⁴⁵ Nevertheless, as for the GFP's, these constructs will generate proteins with highly increased molecular weights over the native protein, emphasizing again the need for small tags and photoactivatable fluorophores.

2.3.1. Protein bioconjugation

The classic protein bioconjugation uses the chemical characteristics of the different functions present in the side chains of the canonical natural amino acids. Most protein modification methods are therefore exploiting the nucleophilic character of amino acid side chains like the thiol group of cysteines or the amino function of lysines. This approach has been successfully applied for the study of actin dynamics using a photoactivatable fluorescently-labelled protein by site specific cysteine coupling with a thiol-reactive caged carboxyfluorescein.¹¹

However, because proteins usually possess multiple copies of these residues, specific labelling might be difficult to achieve. Therefore several strategies have been developed to introduce unique functionalities into proteins that are chemically orthogonal to the 20 proteogenic amino acid side chains.

2.3.2. Incorporation of nonnatural amino acid into proteins

The incorporation of unnatural amino acid, allows to introduce site specifically into a protein, most functionalities.⁴⁶ This was accomplished by chemically aminoacylating a nonsense suppressor tRNA (tRNA_{CUA}) with the desired unnatural amino acid and by adding the aminoacyl tRNA to a transcription/translation system along with the gene of interest harbouring a TAG mutation at the target site. This technique allows to incorporate, site specifically, an unnatural amino acid with either unique spectroscopic or biophysical properties (e.g., fluorescent, photoactivatable amino acids), or functional groups that possess unique chemical reactivity orthogonal to those found in natural biomolecules. In the latter case, bioorthogonal reaction can be performed to site specifically label the protein of interest with the desired tag, as a typical example incorporation of an alkyne- or an azido-containing amino acid allows a subsequent specific Cu-free intracellular click-type reaction⁴⁷ to attach any probe to the protein. Although this methodology is quite powerful, it requires to be improved in the future, to

allow a larger production of protein and the routine use in mammalian cells.⁴⁸

2.3.3. Genetically encoded small peptide tags

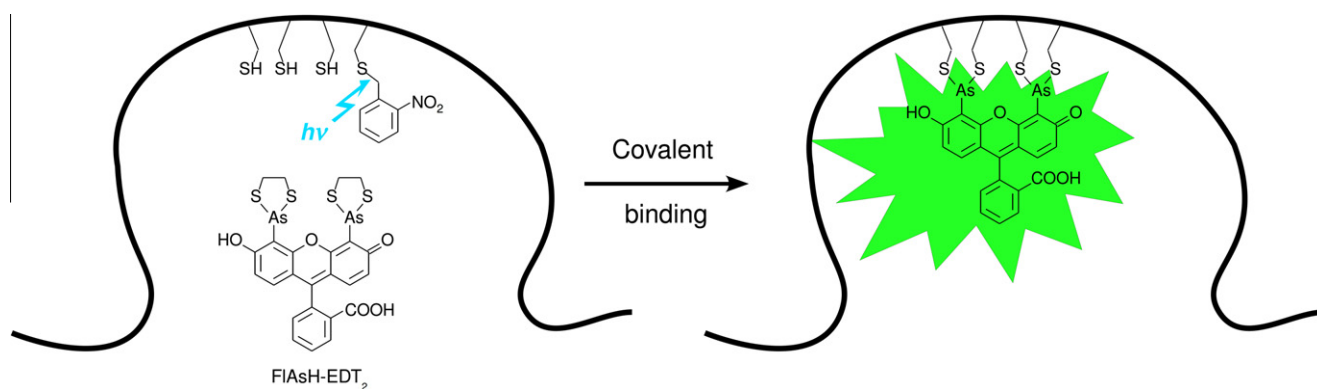
A specific peptide sequence, that can be genetically encoded into the protein of interest, can generate new functionalities for selective chemical modification. The specific recognition of a pro-fluorophore by a peptide motif to generate a fluorescent signal after reversible complex formation opens the way for specific labelling of recombinant proteins in vivo.

This methodology has first been described by Tsien and co-workers by developing the bis-arsenial-functionalized fluorescent dyes (FLAsH-EDT⁴⁹ and ReAsH-EDT⁵⁰). They were able to show that a tetracysteine motif CCXXCC, when situated in a hairpin structure, reacts selectively with bis-arsenite derivatives such as FLAsH and ReAsH, leading to a dramatic enhancement of fluorescence upon binding to this genetically encoded small motif. An interesting description of a photochemical control of fluorescence activation through protein FLAsH labelling has been described recently by incorporation of a caged cysteine into the tetracysteine motif of the protein sequence.⁵¹ (Scheme 3)

Similar to FLAsH and ReAsH, Schepartz and co-workers have recently reported an cell permeable and noncytotoxic bisboronic acid rhodamine-based dye (RhoBo).⁵² They were able to show an enhancement of fluorescence after binding of this bisboronic derivative to a SSXXSS-like peptide segment.

Besides the labelling of a pro-fluorophore by a peptide motif to generate a fluorescent signal, a small peptide motif can also be used to chemoselectively modify a protein of interest. The conventional His tag (–(His)_n–/Ni(II)–NTA) pair was used for fluorescent labelling of a protein on a cell surface.⁵³ This peptide motif was also used to enhance a specific fluorescence in the presence of His tagged protein in an in vitro context. Therefore a hydroxycoumarin fluorophore was joined via a linker to a metal–NTA moiety which forms a weak intramolecular complex, thereby quenching the fluorescence. In the presence of His tagged proteins, the fluorophore was displaced from his intramolecular complex leading to a dramatic enhancement of fluorescence.⁵⁴

Nevertheless, these approaches still suffer from the relatively low stability of the reversible complex formed between the label and the tag.⁵⁵ To address this question, tris–NTA probes have been developed displaying a much higher recognition affinity for the 6-His or 10-His tags.⁵⁶ Finally, potential cellular toxicity can be avoided by replacing Ni with nontoxic Zn–conjugates.⁵⁷ Altogether, these probes to be useful require to be cell permeable for intracellular applications, a first step in this direction was undertaken by developing a new cell permeable Ni–NDA derivative able to



Scheme 3. Photochemical control of a fluorescence activation by a caged peptide recognition motif.⁵¹

penetrate and eventually regenerate the Ni–NTA recognition motif within HeLa cells.¹⁴

3. Conclusion

The search for an ideal small pro-fluorescent probe that possesses all the desired physico-chemical properties for a specific cellular fluorescence activation in a spatial and time-controlled manner remains still a major challenge. New techniques for bioorthogonal protein labelling that exhibit fluorogenic properties have been described recently^{58,59} allowing to extend the tool box for controlled fluorescence activation on proteins. Concerning the smaller size probes, whilst the uncaging approach and especially the two-photon activation satisfies the spatio-temporal control of the fluorescent signal, the only small size fluorogenic tags developed for protein labelling are the tetracysteine tag and more recently the tetraserine tag (see Section 2.3). Nevertheless, these tags clearly recognize a restricted number of fluorophores whose biophysical properties are not necessarily optimal, therefore the search for new small fluorogenic tags that can be genetically encoded and which could recognize a large panel of fluorescent probes, including caged fluorophores, represents a future challenge for bioorganic chemist in the field of cellular imaging.

Acknowledgements

The authors thank the ANR (contract PCV 07 1-0035), the CNRS, the French Ministry of Research and the Université de Strasbourg for financial support.

References and notes

- For recent reviews see: (a) Tsien, R. Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612; (b) Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4247.
- (a) Lippincott-Schwartz, J.; Patterson, G. H. *Science* **2002**, *297*, 1873; (b) Subach, F. V.; Patterson, G. H.; Manley, S.; Gillette, J. M.; Lippincott-Schwartz, J.; Verkhusha, V. V. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 153.
- For a recent review see: Lippincott-Schwartz, J.; Patterson, G. H. *Trends Cell Biol.* **2009**, *11*, 555.
- Sharma, V.; Lawrence, D. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7290.
- Callan, J. F.; Silva, A. P.; Magri, D. C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8551.
- Rurack, K. *Spectrochim. Acta, Part A* **2001**, *57*, 2161.
- de Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D. *Analyst* **2009**, *134*, 2385.
- Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142.
- (a) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900; (b) Young, D. D.; Deiters, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 999; (c) Specht, A.; Bolze, F.; Osram, Z.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *HFSP J.* **2009**, *3*, 255; (d) *Dynamic Studies in Biology: Phototriggered, Photoswitches and Caged Biomolecules*; Goeldner, M., Givens, R., Eds.; Wiley-VCH, 2005; (e) Lee, H.-M.; Larson, D. R.; Lawrence, D. S. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409; (f) Priestman, M. A.; Lawrence, D. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1084*, 547; (g) Politz, J. C. *Trends Cell Biol.* **1990**, *9*, 284.
- Krafft, G. A.; Sutton, W. R.; Cummings, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 301.
- Ottl, J.; Gabriel, D.; Marriott, G. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 143.
- Mitchison, T. J.; Sawin, K. E.; Theriot, J. A.; Gee, K.; Mallavaparu, A. *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 63.
- Zhao, Y.; Zheng, Q.; Dakin, K.; Xu, K.; Martinez, M. L.; Li, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653.
- Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6696.
- Orange, C.; Specht, A.; Puliti, D.; Sakr, E.; Furuta, T.; Winsor, B.; Goeldner, M. *Chem. Commun.* **2008**, 1217.
- Specht, A.; Thomann, J.-S.; Alarcon, K.; Wittayanan, W.; Ogden, D.; Furuta, T.; Kurakawa, Y.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690.
- (a) Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. D.; Samuel, R.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9204; (b) Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. D.; Nishimura, S. Y.; Pomerantz, A. K.; Willets, K. A.; Lu, Z.; Wang, H.; Liu, N.; Samuel, R.; Weber, R.; Semyonov, A.; He, M.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 55.
- Belov, V. N.; Bossi, M. L.; Fölling, J.; Boyarskiy, V.; Hell, S. W. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10762.
- Belov, V. N.; Wurm, A. A.; Boyarskiy, V. P.; Jakobs, S.; Hell, S. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520.
- Gramlich, G.; Nau, W. M. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 603.
- Majjigapu, J. R. R.; Kurchan, A. N.; Kottani, R.; Gustafson, T. P.; Kutateladze, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12458.
- Gagey, N.; Emond, M.; Neveu, P.; Benbrahim, C.; Goetz, B.; Aujard, I.; Baudin, J.-B.; Jullien, L. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2341.
- Blake, J. A.; Lukeman, M.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4127.
- Gagey, N.; Neveu, P.; Jullien, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2467.
- (a) Ellis-Davis, G. C. R. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619; (b) Warther, D.; Gug, S.; Specht, A.; Bolze, F.; Nicoud, J.-F.; Mourou, A.; Goeldner, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753.
- Furuta, T.; Wang, S. S.-A.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1193.
- Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. *Science* **1990**, *248*, 73.
- Makarov, N. S.; Drobizhev, M.; Rebane, A. *Opt. Express* **2008**, *16*, 4029.
- Gug, S.; Charon, S.; Specht, A.; Alarcon, K.; Ogden, D.; Zietz, B.; Léonard, J.; Haacke, S.; Bolze, F.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303.
- Gug, S.; Bolze, F.; Specht, A.; Bourgogne, C.; Goeldner, M.; Nicoud, J.-F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525.
- Warther, D.; Bolze, F.; Léonard, J.; Gug, S.; Specht, A.; Puliti, D.; Sun, X.-H.; Kessler, P.; Lutz, Y.; Vonesch, J.-L.; Winsor, B.; Nicoud, J.-F.; Goeldner, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585.
- Ueno, T.; Urano, Y.; Setsukinai, K.; Takakusa, H.; Kojima, H.; Kikuchi, K.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14079.
- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer, 2006. ISBN-10:0-387-31278-1, ISBN-13:978-0-387-31278-1.
- Weller, A. *Pure Appl. Chem.* **1968**, *16*, 115.
- Marcus, R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1964**, *15*, 155.
- Yi, L.; Li, H.; Sun, L.; Zhang, C.; Xi, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4034.
- Matsumoto, T.; Urano, Y.; Shoda, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3375.
- Guy, J.; Caron, K.; Dufresne, S.; Michnick, S. W.; Skene, W. G.; Keillor, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11969.
- Matayoshi, E. D.; Wang, G. T.; Krafft, G. A.; Erickson, J. *Science* **1990**, *247*, 954.
- (a) Pellois, J.-P.; Hahn, M. E.; Muir, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7170; (b) Lee, H.-M.; Priestman, M. A.; Lawrence, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1446; (c) Maurel, D.; Banala, S.; Laroche, T.; Johnsson, K. *ACS Chem. Biol.* doi:10.1021/cb1000229.
- Marriott, G.; Heidecker, M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3170.
- Sakata, T.; Yan, Y.; Marriott, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 4759.
- Mao, S.; Benninger, R. K. P.; Petchprayoon, C.; Jackson, D.; Easley, C. J.; Piston, D. W.; Marriott, G. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4515.
- Johnsson, N.; Johnsson, K. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 31.
- O'Hare, H. M.; Johnsson, K.; Gautier, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488.
- (a) Beene, D. L.; Dougherty, D. A.; Lester, H. A. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 264; (b) Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. *Science* **1989**, *244*, 182; (c) Stromgaard, A.; Jensen, A. A.; Stromgaard, K. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 909.
- Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974.
- Young, T. S.; Ahmad, I.; Yin, J. A.; Schultz, P. G. *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 361.
- Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Science* **1998**, *28*, 269.
- (a) Adams, S. R.; Campbell, R. E.; Cross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063; (b) Gaietta, G.; Deerinck, T. J.; Adams, S. R.; Bouwer, J.; Tour, O.; Laird, D. W.; Sosinsky, G. E.; Tsien, R. Y.; Ellisman, M. H. *Science* **2002**, *296*, 503.
- Wilkins, B. J.; Yang, X.; Cropp, T. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4296.
- Halo, T. L.; Appelbaum, J.; Hobert, E. M.; Balkin, D. M.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438.
- Guignet, E. G.; Hovius, R.; Vogel, H. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 440.
- Kamoto, M.; Umezawa, N.; Kato, N.; Higuchi, T. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8004.
- Gronemeyer, T.; Godin, G.; Johnsson, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 453.
- Lata, S.; Gavutis, M.; Tampe, R.; Piehler, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2365.
- Hauser, C. T.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 3693.
- Mizukami, S.; Watanabe, S.; Hori, Y.; Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016.
- Hori, Y.; Ueno, H.; Mizukami, S.; Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16610.

Le développement d'outils d'investigation performants est une des clés de la compréhension de nombreux phénomènes biologiques. De part son caractère non invasif, le marquage de protéines par des sondes fluorescentes représente un outil de choix dans les explorations concernant l'expression ou la dynamique de protéines sur des cellules ou des organismes vivants.

Les sondes fluorescentes photo-activables sensibles aux irradiations bi-photons permettent d'associer une résolution spatiale élevée à une faible toxicité vis à vis des systèmes biologiques vivants. Ces sondes sont toutefois limitées par une faible sensibilité aux irradiations bi-photon et une émission de fluorescence à des longueurs d'onde auxquelles certains composants des cellules émettent également de la fluorescence, diminuant ainsi la spécificité du signal fluorescent émis par la sonde.

Le présent travail de thèse présente le développement d'une sonde fluorescente photo-activable émettant dans le rouge, hors de la zone d'émission des composants cellulaires et dont l'activation présente une sensibilité très élevée à une irradiation bi-photon.

Mots clés : synthèse de fluorophores ; fluorescence photo-activable ; irradiation bi-photon ; microscopie de fluorescence ; microscopie confocale ; marquage de protéines.

The development of new powerful investigation tools is one of the key points in the comprehension of many biological events. Fluorescent labeling of proteins is one of the most interesting tool for studying the expression and the dynamic of proteins, because of its non invasive aspect.

Two-photon sensitive photo-activatable fluorescent probes associate high spatial resolution to low toxicity toward living systems. But they are mainly limited by a low two-photon photo-activation efficiency and an emission of fluorescence within a wavelengths range where some cellular components also emit fluorescence, decreasing thereby the intrinsic fluorescent signal emitted by the dye.

This work describes the development of a new red-emitting two-photon photo-activatable fluorescent probe, which emits beyond the field of autofluorescence of the cells and shows a very high sensitivity to two-photon irradiation.

Key words : synthesis of fluorophores ; photo-activatable fluorescence ; two-photon irradiation ; fluorescence microscopy ; confocal microscopy ; protein labeling.