

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

LBP – UMR 7021

THÈSE

Lazare SALADIN

soutenue le : 24 février 2023

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

Développement de nouvelles sondes photo-modulables basées sur la photo-oxydation dirigée et leurs applications en bioimagerie

THÈSE dirigée par :

Dr. Mayeul Collot

Chargé de recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Christine Goze

Pr. Arnaud Gautier

Maître de conférences, université de Bourgogne

Professeur, université Sorbonne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. Claire Deo

Dr. Rémi Métivier

Dr. Alexandre Specht

Pr. Pascal Didier

Group leader, laboratoire européen de biologie moléculaire

Directeur de recherche, université Paris-Saclay

Directeur de recherche, université de Strasbourg

Professeur, université de Strasbourg

À mon grand-père Jean,

Remerciements

Un projet de thèse n'est pas seulement le travail d'un étudiant, mais également la collaboration entre de nombreuses personnes, sur le plan professionnel, mais également humain qui permet l'accomplissement de cette tâche. Ainsi, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont eu un impact au cours de ces trois ans, mais également dans la direction professionnelle que j'ai choisie.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Mayeul Collot qui a décidé de me confier ce projet qui lui tenait à cœur. Tout au long de ce doctorat, il a été un superviseur remarquable, toujours disponible pour discuter de l'avancée des travaux, mais également pour satisfaire ma curiosité scientifique sur des sujets n'ayant pas de lien direct avec le projet. De plus, un doctorat est un projet en binôme entre l'étudiant et le directeur de thèse qui suggère l'épanouissement des deux parties. Merci à Mayeul de m'avoir fait confiance sur la direction que pouvait prendre ce projet même si ce n'était pas celle qu'il avait imaginée avant mon arrivée. Je suis certain que cette confiance mutuelle a permis une superbe ambiance de travail et également l'obtention de résultats qui nous ont tous deux passionnés.

Ensuite, ce projet de thèse a été suivi de près par le professeur Pascal Didier qui a été pour moi un second encadrant investi pour m'aider à aborder un pan plus photo-physique dans lequel ses conseils et expertises m'ont été précieux. Il s'est toujours montré à l'écoute de mes théories, parfois tirées par les cheveux, et m'a permis d'en tirer le meilleur en particulier sur l'analyse de molécules uniques et les cinétiques de photo-conversion.

J'ai également eu la chance d'évoluer dans le laboratoire du Dr Andrey Klymchenko qui a été pour moi un environnement de travail optimal que ce soit dans la diversité des instruments disponibles, mais également dans l'effervescence des résultats et projets de toutes les personnes présentes dans ce laboratoire. Cette pluralité a permis l'obtention de connaissances de sujets variés avec de très riches discussions scientifiques lors des group meetings ainsi qu'en dehors avec de nombreux étudiants toujours motivés pour parler de leurs projets. À mon sens, Andrey a été un très bon chef d'équipe, toujours soucieux du bien-être et de la bonne entente entre les étudiants via des activités variées comme les barbecues, les bowlings et même un laser game ! Il s'est aussi montré disponible pour discuter des avancées scientifiques avec toujours avis très perspicaces et rigoureux. J'espère qu'on se recroisera en congrès afin de refaire un tennis entre deux conférences !

Je remercie également la Dr Christine Goze, le Pr Arnaud Gautier, la Dr Claire Deo, le Dr Rémi Métivier, le Dr Alexandre Specht et le Pr Pascal Dider pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux de thèse. Je suis certain que je ressortirais grandi de la discussion scientifique avec vous lors de ma soutenance de thèse.

Au cours de ces trois années, j'ai également pu parler à de nombreux chercheurs de divers sujets scientifiques comme de la biologie, de la photo-physique, de la microscopie et de la chimie. Ayant initialement une formation de chimiste organicien, ces échanges m'ont permis de découvrir tous ces domaines passionnants. Ainsi je remercie la Dr Halina Anton, le Dr Frédéric Przybilla, le Dr Dmytro Dziuba, le Dr Emmanuel Boutant, la Dr Julie Karpenko et la Dr Monique Dontenwill. Je remercie également les chercheurs des plateformes scientifiques, la plateforme d'imagerie, Michel Morciano, Ludovic Richert et Romain Vauchelles, la plateforme de spectroscopie, Nicolas Humbert, l'assistante de prévention Tania Steffan, la plateforme de RMN et de spectroscopie de masse, Estefania Oliva, Delphine Garnier et Chen Deng, ainsi que les deux gestionnaires qui ont réalisé un travail remarquable, Marlyse Wernert et Ingrid Barthel. Sans le travail dévoué de toutes ces personnes, les manipulations nécessaires pendant ces travaux de thèse auront été très compliquées.

Je remercie les autres permanents de l'équipe nanochimie et de bioimagerie, le Dr Andreas Reisch, en particulier pour avoir bien ri avec lui lors de mes pauses prolongées en haut des escaliers pendant la rédaction de ce manuscrit. Ainsi que le Dr Phillippe Chabert pour s'être occupé des commandes du laboratoire, mais surtout pour ses délicieux gâteaux qu'il amenait régulièrement au laboratoire.

Je tiens à remercier tous mes collègues doctorants que j'ai pu croiser pendant ma thèse. Caterina pour l'organisation de jeux de rôle très sympa, Lucie qui a toujours été motivée par la mise en place d'activité dans le laboratoire, Deep pour sa gentillesse, tu es certainement la personne la plus gentille de tout le laboratoire ! Mary qui m'a appris la culture cellulaire et introduit à la biologie, Carla qui par sa rigueur a amené un environnement sain et propre dans le labo de chimie ainsi que pour le sac La Femme, Sonia que je connais depuis l'école d'ingénieur, c'est super d'avoir fait un bout de thèse avec toi ! Nathan pour toutes ces histoires épiques racontées pendant le café du matin, Valentine qui vient d'arriver, mais avec qui je suis sûr de passer de bon moment dans le bureau. Chloé avec qui j'ai effectué de nombreuses pauses pendant la rédaction, ces pauses étaient un très bon moment de décompression pour moi. Je tiens particulièrement à remercier Sophie, la meilleure collègue de bureau que j'aurai pu avoir, j'ai adoré notre complicité pendant les deux premières années de thèse, ça n'a pas été évident quand tu es partie, mais ça prouve à quel point c'était sympa au bureau avec toi ! La thèse est une période de doute et de remise en question permanente aussi bien sur les résultats scientifiques que personnellement, ainsi je souhaite sincèrement remercier Antoine avec qui j'ai pu partager tous ces moments de doutes et de joies, il est clair que sans toi la thèse aurait été bien plus morose, on formait déjà un super duo en école d'ingénieur, on ne pouvait rêver mieux que de continuer trois ans de plus en thèse ! Je remercie également les autres doctorants avec qui j'ai partagé de bons moments, Anne, Bohdan, Dmytro,

Fei, Kyong, Julia, Manon, Mélissa, Nina, Omblin, Paraskevi, Pauline, Raphaël, Sriyajee, Stefano, Sylvie, Tanushree, Xinyue et Yann.

Dans un laboratoire, il y a également les figures de sagesse, les Post-docs, je les remercie tous chaudement pour l'aide qu'ils ont pu apporter. Le Dr Neckebroek qui nous a laissés régulièrement garder sa chienne Fifou et avec qui c'était toujours très sympa de discuter. Dans ce laboratoire, si une question ne trouvait pas de réponse auprès des stagiaires, des doctorants, des Post-docs et des permanents, l'ultime recours était de demandé à Ilya et là, la question trouvait une réponse, merci Ilya pour le partage de ton expertise et de ton aide pendant deux ans. Merci Rémi, la personne la plus passionnée du labo en science, pour toutes ces discussions endiablées autour de la chimie. Merci à Elisabete pour son aide pour les questions de biologies et sa bonne humeur inégalable, Aller Sporting ! Mais aussi Tesla.

Merci aux stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, Ophélie avec sa bonne humeur constante, JB pour son humour et son habilité aux bollas, et Maxence qui m'a initié au Tour de France, merci pour toute l'aide apportée dans ce projet. Je remercie également les autres stagiaires Corentin, Baylar Emre, Khanh-Nam, Mario, Nour, Sophie.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Antoine Mirloup qui a été un mentor pour moi. Je l'ai rencontré lors de mon stage de M1 à Heliatek à Ulm en Allemagne, il a pu me faire découvrir le monde des fluorophores organiques et me transmettre sa passion pour la chimie. Il m'a ensuite dirigé vers son laboratoire de thèse avec les Drs Gilles Ulrich et Nicolas Leclerc pour effectuer mon stage de M2 sur les BODIPYs. Ensuite pendant ma thèse il a obtenu un post-doc à la faculté de pharmacie et a partagé tous les cafés du matin pour discuter, mais également répondre à mes interrogations en chimie et aussi en parentalité. Merci pour tout, je te souhaite plein de bonheur avec Lara et ta fille Coline !

Avant d'effectuer une thèse, il y a tout un parcours de formation et de rencontre, c'est pourquoi j'ai une pensée pour mes amis d'école primaire, Alexandre, Arnaud et Billy. Au collège, Thibault, mais aussi Lucas que je vois encore depuis 13 ans, merci de m'avoir appris l'humour ahah ! Mes amis de lycée, Allyson, Augustin, Charles-Efflam, Charles-Louis, Charlotte, Enguerrand, Juliette, Laëtitia, Louis-Albert, Oscar, Pierre-Antoine, Rodolphe, Saidhbhe, Thibault, Willy, Zoé D, Zoé C, Caroline et Agathe. Mes amis de prépa, Arthur, Camille, Joffrey, Manon, Merlin, Pierre, Théo. Et enfin tous mes amis d'école d'ingénieur, Alan, Alex, Arthur, Barbara, Camille, Cécou, Chloë, Clara, Clémentine, Dan, Hugo, Hypolite Lisa, Marek, Mathieu, Maude, Milane, Nina, Paul, Rodolphe, Sibylina, Quentin T, Quentin W, et Ziyed. Mais également ma famille de l'ECPM, Augustin, Tatiana, Sarah-Julie, Nathan, Amandine, Paul-Alexander, Eliette et Noa.

Je remercie également toutes les personnes rencontrées pendant mon stage de M2 avec qui j'ai passé de super moments, en particulier les soirées poker. Alexandra, Antoinette, Corentin, Fabien, Gilles, Julien, Marie, Nicolas L, Nicolas K, Stéphane, Thibault. C'est en particulier dans ce laboratoire que j'ai pu apprendre la rigueur lors de synthèse de chimie organique et que j'ai commencé à développer des compétences en spectroscopie.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'aide de Maxime Dolet, qui sans le savoir m'a écrit un programme python qui m'a été vital pour l'obtention des résultats de cette thèse.

Ensuite, je remercie chaudement ma famille qui a toujours été d'une intention et d'une bienveillance. Premièrement mes parents, ma mère qui m'a montré un amour désintéressé sans failles et avec qui se crée de nouveaux liens forts, je suis certain que notre relation continuera d'évoluer et j'ai hâte de la découvrir. Mon père, mon meilleur ami, qui m'a appris l'importance de travailler avec passion et qui m'ont laissé avec ma mère la liberté d'évoluer comme je l'entendais. Ma sœur, pour qui les sciences n'ont jamais été son fort, mais qui a tout de même été ma première prof de math en m'apprenant $1 + 1 = 2$ et a ainsi ouvert la voie à mes études scientifiques. Mon frère, qui m'a initié à mes 13 ans au codage informatique sur Python, à l'époque je ne m'attendais pas à ce que cela me serve autant. Ma grand-mère Marie-Hélène, qui a été un véritable pilier lors de mes années lycée et de classes préparatoires, merci de m'avoir accompagné lors de ces années charnières. Mon grand-père Jean, qui a été mon modèle scientifique dans ma famille et qui m'a montré par ses choix de vie qu'il fallait suivre ses rêves. Même si tu n'es plus là, sache que je te dédie cette thèse et que je penserai fort à toi lors de ma soutenance et dans la suite de ma carrière scientifique, je sais que tu aurais été infiniment fier. Mes grands-parents paternels, Régis et Brigitte, j'ai toujours pris beaucoup de plaisir auprès de vous à Malachappe et à la cité des fleurs. Ma grande tante Tatie Anne, merci de ton soutien et de m'avoir offert mon doudou Zalachappe que je n'ai jamais quitté. Mes oncles et tantes, Juliette et Pierre, Thibault, Patrick et Françoise, Patricia et Jérôme. Mes cousins, Arthur, Paul, Adèle, Alma, Louis, Estelle et Grégoire, Quentin, Alexis, Léa et Hélène ainsi que mon petit cousin Lucas. J'ai également une petite pensée pour tous les animaux de mon enfance, les brebis blanche et noire, Maryline et Mistinguette, Ernest, Carapatte, Magno, Thérèse, Girolle, Nausica, Soumo, Soumine, Bou, Banzai, Shazam, Oumaï, Geisha, Pirate.

Ces dernières années, ma famille s'est agrandie avec ma belle-famille que je remercie chaleureusement pour leur accueil, Michel et Colette, Patrick et Laurence, Erika et Matthieu, Karine, Aïnoha et Tiphaine.

Enfin, la plus importante dans ma vie, celle qui m'accompagne depuis ces six dernières années, ma meilleure amie et mon amour, Kim. Je suis tellement heureux de t'avoir rencontrée, notre amour a tout de suite été une évidence. J'ai la certitude que tu ne mesures pas l'importance que tu as dans ma vie, tu m'as profondément changé. À tes côtés, j'ai la conviction d'être devenu quelqu'un de meilleur, plus ouvert, plus sensible. Tu es pour moi un exemple de bienveillance, de résilience, d'intelligence. Tu m'apportes la stabilité dont j'ai besoin, tu me permets de prendre du recul sur qui je suis, mes convictions, mes choix. Je ne sais pas si j'arriverai à devenir le chercheur que je rêve d'être, mais je suis certain qu'à tes côtés je serai heureux. Je suis très fier d'avoir pu être témoin de ton évolution, de t'avoir vu devenir Docteur, de te voir avoir le courage de te lancer dans une nouvelle voie professionnelle qui, je suis sûr, te permettra de pleinement t'épanouir dans le monde des arts qui t'a toujours été cher. Merci pour tout, vraiment. Je t'aime.

Table des matières

Liste des abréviations et acronymes.....	1
Chapitre I. Introduction.....	5
I.1. Fluorescence	5
I.1.1. Principe.....	5
I.1.2. Niveaux d'énergie et transitions	7
I.2. Sondes fluorescentes.....	13
I.2.1. Fluorophores organiques.....	13
I.2.2. Paramètres des sondes fluorescentes.....	14
I.3. Microscopie de fluorescence	20
I.3.1. Microscopie conventionnelle.....	20
I.3.2. Microscopie de super résolution.....	21
I.4. Sondes photo-modulables	22
I.5. Contexte de la thèse	39
Chapitre II. Coumarines photo-convertibles.....	43
II.1. Famille des coumarines	43
II.2. Choix de l'aromatique	44
II.2.1. Synthèse.....	44
II.2.2. Caractérisations spectroscopiques.....	46
II.3. Mécanisme DPIC	53
II.4. Microscopie	60
II.5. N-alkylation du pyrrole	63
II.5.2. Synthèse.....	63
II.5.3. Caractérisation spectroscopique.....	65
II.5.4. Microscopie	70
II.6. Conclusion sur les coumarines photo-convertibles	72

Chapitre III. BODIPYs	75
III.1. Famille des BODIPYs	75
III.2. PyrroloBODIPYs.....	78
III.2.2. Synthèse	78
III.2.3. Caractérisation spectroscopique	80
III.2.4. Microscopie.....	84
III.2.5. Microscopie de super résolution	98
III.2.6. DPIS.....	100
III.3. Conclusion BODIPYs	106
Chapitre IV. StyrylBODIPYs	109
IV.2. Choix des différents ASORMs.....	110
IV.3. Synthèse	112
IV.4. Propriétés spectroscopiques.....	113
IV.5. Microscopie confocale et de super-résolution	124
IV.6. Conclusion StyrylBODIPYs	128
Chapitre V. Méthodologie.....	131
V.1. Constantes photo-physiques	131
V.2. Analyse de molécules uniques.....	141
V.3. Conclusion méthodologie	151
Chapitre VI. Conclusion générale et perspectives	153
Chapitre VII. Références bibliographiques.....	159
Chapitre VIII. Partie expérimentale	167
VIII.1. Synthèse	167
VIII.2. Spectroscopy	237
VIII.3. Imaging.....	240

Liste des abréviations et acronymes

λ	Longueur d'onde	DMF	Diméthylformamide
ε	Coefficient d'extinction molaire	DMSO	Diméthylsulfoxyde
σ	Section efficace d'absorption	DO	Densité optique
Δ_{ss}	Déplacement de Stokes	DPBF	1,3-Diphenylisobenzofuran
τ	Temps de vie à l'état excité	<i>Et coll.</i>	Et collaborateurs
η	Rendement chimique	eq	équivalent
h	Constante de Planck	FRET	Förster resonance energy transfert
c	Vitesse de lumière	GFP	Green fluorescent protein
ϕ_f	Rendement quantique de fluorescence	paGFP	Photoactivable green fluorescent protein
ϕ_{Pt}	Rendement quantique de photo-transformation	HOMO	Orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie
ϕ_{Pc}	Rendement quantique de photo-conversion	HPF	Hydroxyphenyl fluorescéine
ϕ_{Bl}	Rendement quantique de photo-blanchiment	HPLC	High performance liquid chromatography
ϕ_{Δ}	Rendement quantique de génération d'oxygène singulet	HRMS	High resolution mass spectroscopy
ADN	Acide désoxyribonucléique	IUPAC	International union of pure and applied chemistry
APTES	(3-Aminopropyl) triethoxysilane	j	Constante de couplage
Ar	Aromatique	k_{nr}	Constante de vitesse de désexcitation non radiative
B	Brillance	k_r	Constante de vitesse de désexcitation radiative
BODIPY	4,4difluoro-4-bora-3a,4a,diaza-s-indacène	k_{Pt}	Constante de vitesse de photo-transformation

DCM	Dichlorométhane	k_{pc}	Constante de vitesse de photo-conversion
DFT	Théorie fonctionnelle de la densité	k_{bl}	Constante de vitesse de photo-blanchiment
DIPEA	N,N-diisopropylethylamine	LUMO	Orbitale moléculaire vacante de plus basse énergie
ODB	o-dibenzoylbenzene		
PALM	Photo-activated localization microscopy		
PDT	Thérapie photo-dynamique		
pH	Potentiel hydrogène		
pKa	Constante d'acidité d'un couple acide/base		
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle		
PSF	Fonction d'étalement du point		
RE	Réticulum endoplasmique		
RMN	Résonance magnétique nucléaire		
RT	Température ambiante		
ROS	Espèces réactives de l'oxygène		
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy		
TEA	Triéthylamine		
THF	Tétrahydrofurane		
UV	Ultra-violet		
Z	Numéro atomique		

Chapitre I. Introduction

I.1. Fluorescence

I.1.1. Principe

La fluorescence représente l'un des phénomènes de désexcitation spontanée d'un état excité d'une molécule vers son état fondamental avec l'émission d'un photon. Il a été décrit pour la première fois pour une molécule organique par Sir John Herschell en 1845 avec le sulfate de quinine.^[1] Dans son article, il explique qu'en observant une solution de quinine sous le bon angle avec le bon angle d'incidence du soleil il est possible d'observer une couleur bleu ciel. Quelques années plus tard, Sir Georges Stokes approfondit la découverte en montrant que la lumière émise par la solution est différente de celle incidente.^[2] En effet, en irradiant la solution par des rayonnements UV il remarque que la lumière obtenue est bleue. Cette différence entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission porte son nom et s'appelle Déplacement de Stokes (figure I.1).^[3]

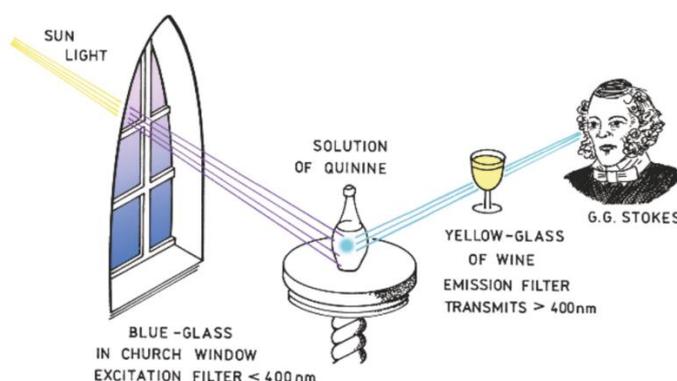


Figure I.1 Schéma expérimental de la découverte du déplacement de Stokes^[3]

Le premier phénomène à comprendre pour décrire la fluorescence est l'absorption d'énergie. Quand une molécule est excitée, un de ses électrons va être promu de son état fondamental vers un de ses états excités. Plusieurs transitions sont alors possibles dépendant de la quantité d'énergie qui est absorbée. Comme exemple, prenons le cas du formaldéhyde (figure I.2). Le groupe carbonyle est composé de quatre orbitales moléculaires, les orbitales liantes σ et π qui forment la liaison CO ainsi que les anti-liantes n portées par l'atome d'oxygène. Quatre transitions électroniques sont possibles en respectant les règles de symétries des orbitales : $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$. Dans une molécule, le nombre de transitions et l'énergie qui leur est liée dépend du nombre d'atomes et de la nature des atomes qui la compose.^[4]

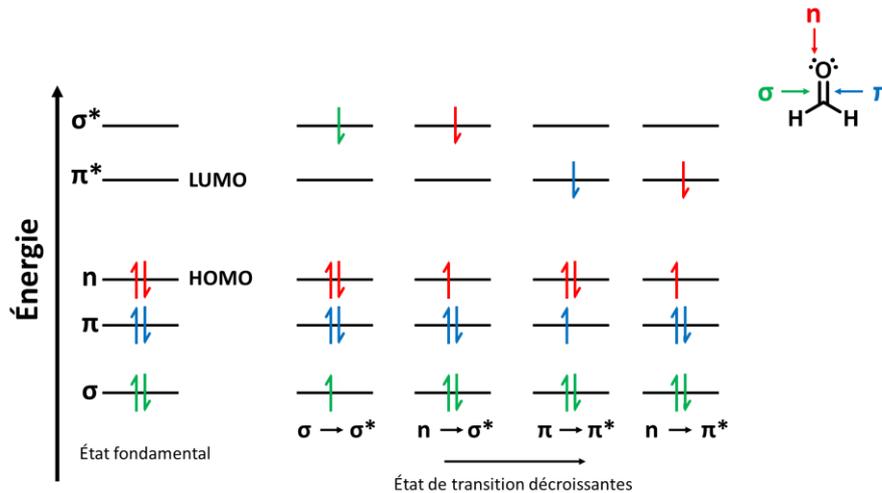


Figure I.2 Niveaux d'énergies des orbitales moléculaires du formaldéhyde^[4]

Afin de caractériser ces transitions, il est courant d'utiliser un spectrophotomètre d'absorption UV/Vis. Cet appareil donne l'absorption $A(\lambda)$ de la molécule à une longueur d'onde donnée suivant l'équation I.1 où I_λ^0 désigne l'intensité lumineuse incidente et I_λ l'intensité lumineuse transmise.

$$\text{Équation I.1 : } A(\lambda) = \log\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right)$$

La capacité d'une molécule à absorber une longueur d'onde est décrite par la loi de Beer-Lambert (équation I.2) où $\varepsilon(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire exprimé en $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, l la longueur du chemin optique du faisceau lumineux en cm, c la concentration de la solution en M. Cette loi montre la linéarité de l'absorbance de l'échantillon, cependant à haute concentration ou à basse solubilité des phénomènes d'interactions intermoléculaires comme l'agrégation peuvent subvenir influençant la valeur d'absorbance mesurée.

$$\text{Équation I.2 : } A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc$$

Il est également commun de trouver une autre grandeur que $\varepsilon(\lambda)$ pour décrire la capacité d'absorption d'une molécule, il s'agit de section efficace d'absorption $\sigma(\lambda)$ en cm^2 . Elle décrit de manière probabiliste l'absorption de la lumière par la molécule. Elle peut être obtenue à partir du coefficient d'extinction molaire (équation I.3) avec N_A la constante d'Avogadro en mol^{-1} .

$$\text{Équation I.3 : } \sigma(\lambda) = \frac{2303\varepsilon(\lambda)}{N_A}$$

Une fois une molécule excitée, il existe de nombreuses voies d'excitations possibles (Figure I.3). Toutes ces voies sont en compétition. Ce qui va déterminer la ou les voies de désexcitation sont le temps de vie à l'état excité, la nature des transitions électroniques, de même que l'environnement

de la molécule. La compréhension de la désexcitation d'une molécule apporte de nombreuses informations aussi bien sur la molécule elle-même que sur son environnement.

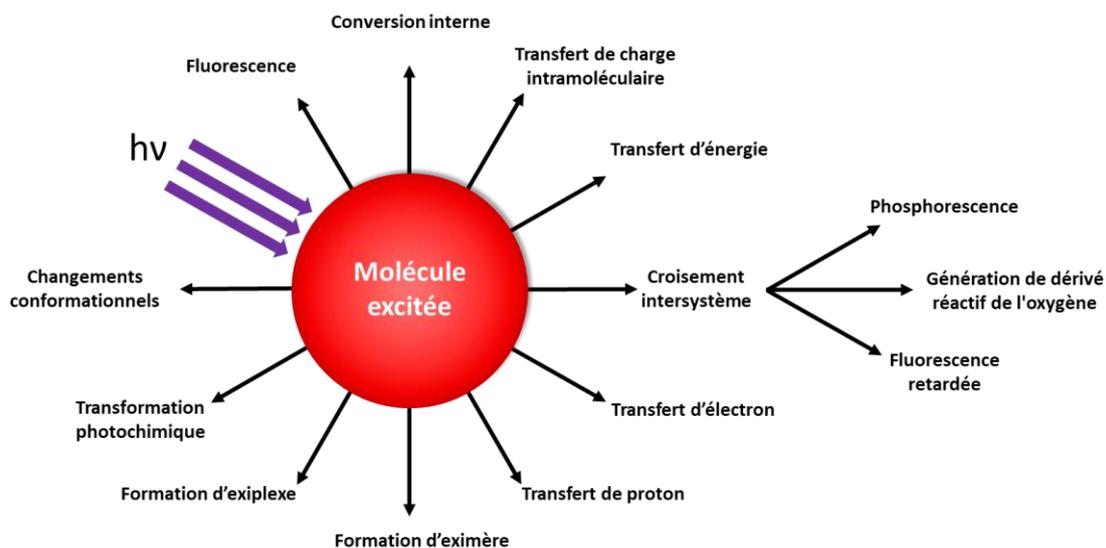


Figure I.3 Voies de désexcitation d'une molécule excitée^[4]

I.1.2. Niveaux d'énergie et transitions

Si une molécule émet un photon après excitation on parle de luminescence. La luminescence regroupe les deux voies de désexcitation radiative, la fluorescence et la phosphorescence. Afin de bien comprendre la différence entre ces deux luminescences, il faut regarder de près toutes les transitions énergétiques qui se passent au sein d'une molécule à l'aide du diagramme de Perrin-Jablonski (figure I.4).^[5] Il est à noter que le lien entre longueur d'onde et énergie est donné par l'équation I.4, avec h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière.

$$\text{Équation I.4 : } \Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

L'état fondamental est appelé S_0 et les états excités S_1 , S_2 , etc, pour les états dits singulet c'est-à-dire pour ceux qui voient leur nombre quantique total de spins égal à 0 ($S = \sum S_i$ avec $S_i = +1/2$ ou $-1/2$) et leur multiplicité égale à 1 ($M = 2S + 1$). Si en revanche 2 électrons non appariés ont un spin parallèle ($\uparrow\uparrow$ ou $\downarrow\downarrow$) le nombre quantique de spins est égal à 1 et la multiplicité à 3, on se trouve alors dans un état triplet T, on note l'état fondamental T_0 et les états excités T_1 , T_2 , etc. La fluorescence décrit la désexcitation radiative de deux états de même multiplicité ($S_n \rightarrow S_{n-1}$ ou $T_n \rightarrow T_{n-1}$) tandis que la phosphorescence celle de deux états de multiplicité différente ($T_n \rightarrow S_{n-1}$ ou $S_n \rightarrow T_{n-1}$). Pour la suite de la description du diagramme de Perrin-Jablonski, on se placera dans le cas d'une molécule à l'état singulet qui est l'état prédominant des fluorophores organiques.

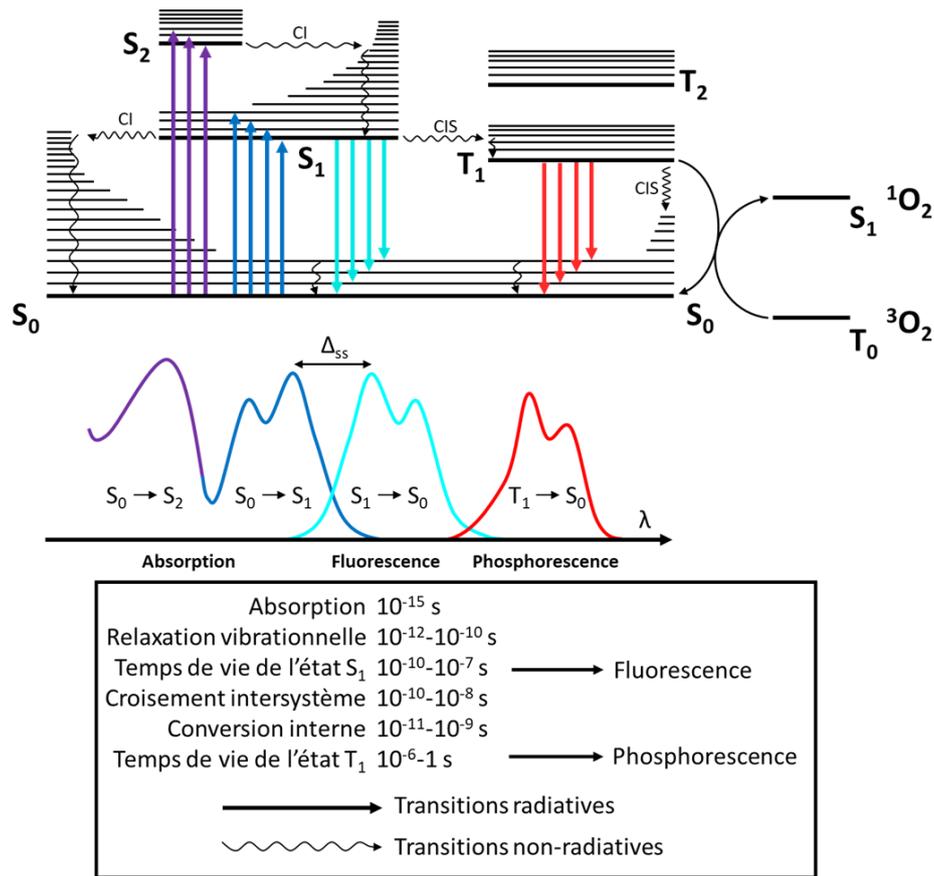


Figure I.4 Diagramme de Perrin-Jablonski adapté^[4]

Absorption

En premier lieu, l'absorption d'un photon porte un électron de la S_0 vers la S_1 ou la S_2 . Ce processus est très rapide, de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s). N'importe lequel des états vibrationnels de ces niveaux d'énergies peut être peuplé menant à plusieurs longueurs d'onde d'absorption et non à une unique raie.

Relaxation vibrationnelle

Au sein de la S_1 et la S_2 une relaxation vibrationnelle se produit, c'est-à-dire une perte d'énergie due notamment aux collisions de la molécule avec les molécules du solvant, menant l'électron au niveau 0 des états vibrationnels de la S_1 ou la S_2 , cette relaxation prend de 10^{-12} à 10^{-10} s. La S_2 étant proche en énergie de la S_1 la conversion interne peut mener à la relaxation vers la S_1 , ce même processus peut mener à la S_0 mais est moins probable, car la différence énergétique en la S_0 et la S_1 est plus grande. La conversion interne prend en moyenne entre 10^{-11} à 10^{-9} s.

Fluorescence

Une fois l'état vibrationnel 0 de la S_1 peuplé, la molécule retourne dans la S_0 via la libération d'un photon, c'est la fluorescence. Peu importe lequel des états énergétiques et vibrationnels a été

peuplé, l'émission du photon se fera depuis l'état excité de plus basse énergie, c'est la loi de Kasha.^[6] Le temps entre l'absorption et l'émission est appelé temps de vie de l'état S_1 et dure entre 10^{-10} à 10^{-7} s pour une molécule organique. L'ordre de grandeur de ce processus étant le même que la conversion interne, elles sont toutes les deux en compétitions. En général, les différences énergétiques des états vibrationnels des niveaux S_0 et S_1 sont les mêmes, c'est pourquoi le spectre d'émission est le miroir du spectre d'absorption (figure I.5).

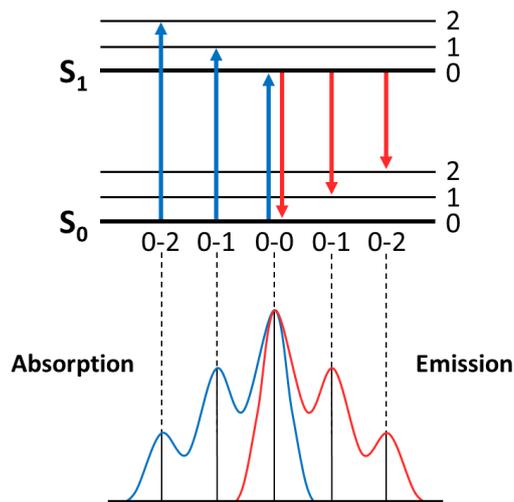


Figure I.5 Illustration des bandes vibrationnelles des niveaux S_0 et S_1 ^[4]

Cependant, il a été décrit de manière empirique qu'il y a un décalage entre le maximum d'absorption et celui d'émission, c'est le déplacement de Stokes Δ_{SS} qui s'exprime en cm^{-1} et s'obtient avec l'équation I.5.

$$\text{Équation I.5 : } \Delta_{SS} = \frac{1}{\lambda_{abs}^{max}} - \frac{1}{\lambda_{em}^{max}}$$

Cette différence est explicable par la perte d'énergie du niveau S_1 causé par la conversion interne rendant la transition $S_1 \rightarrow S_0$ plus faible en énergie que la transition $S_0 \rightarrow S_1$.

La caractérisation de la fluorescence s'effectue avec un spectrofluoromètre, cet appareil permet d'exciter l'échantillon à une longueur d'onde choisie, et détecte le signal lumineux résultant à différentes longueurs d'onde. L'obtention de deux paramètres, le temps de vie de l'état excité et le rendement quantique de fluorescence sont primordiaux pour décrire le phénomène de fluorescence. Le temps de vie τ décrit le temps moyen passé par la molécule au sein des états excités. Le dépeuplement de ces états se fait de manière exponentielle et suit l'équation I.6 avec $I_f(t)$ l'intensité lumineuse au temps t et I_f^0 l'intensité à $t = 0$.

$$\text{Équation I.6 : } I_f(t) = I_f^0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_f représente la proportion des molécules excitées qui se désexcitent par fluorescence. Il est exprimé par un rapport entre la constante de vitesse de désexcitation radiative k_r et la somme des constantes de vitesse de désexcitation non radiative k_{nr} et radiative suivant l'équation I.7.

$$\text{Équation I.7 : } \phi_f = \frac{k_r}{k_{nr} + k_r}$$

Expérimentalement, il est déterminé en comparant les intensités de fluorescence du composé et d'une référence pour laquelle le rendement quantique de fluorescence est connu (Équation I.8). DO représente la densité optique, c'est-à-dire l'absorption à la longueur d'onde d'excitation.

$$\text{Équation I.8 : } \phi_F = \phi_{ref} \times \frac{I_f^{composé} DO_{référence}}{I_f^{référence} DO_{composé}}$$

Phosphorescence

La molécule étant dans l'état S_1 peut également passer par un croisement intersystème et voir son spin changer menant à un état triplet. Ce changement de spin est en principe interdit mais le couplage entre le moment magnétique de l'orbitale et celui du spin peut être assez élevé pour le rendre possible. Ce processus est peu probable mais dure de 10^{-10} à 10^{-8} s le rendant compétitif avec la fluorescence. L'ajout d'atome lourd augmente le couplage spin-orbitale et donc l'apparition d'un état triplet. En effet, cette probabilité est proportionnelle à Z^4 avec Z le numéro atomique. La désexcitation de cet état triplet T_1 vers l'état fondamental S_0 peut se faire soit de manière non radiative via la conversion interne ou l'annihilation triplet-triplet, soit radiative, c'est la phosphorescence. Toutefois, ces transitions nécessitent encore une fois une inversion de spin de l'électron accompagné cette fois d'une libération d'énergie, c'est pourquoi le délai de ce processus est long, il dure entre 10^{-6} à 1s pour une molécule organique.

Oxygène singulet

Il est à noter que la molécule de dioxygène est plus stable dans l'état triplet que dans l'état singulet. En effet, la configuration électronique de l'oxygène est $1s^2 2s^2 2p^4$, ainsi, la construction des orbitales moléculaires mène en suivant les règles de remplissage électronique à deux électrons non appariés de même spin et donc à un état triplet (Figure I.6).

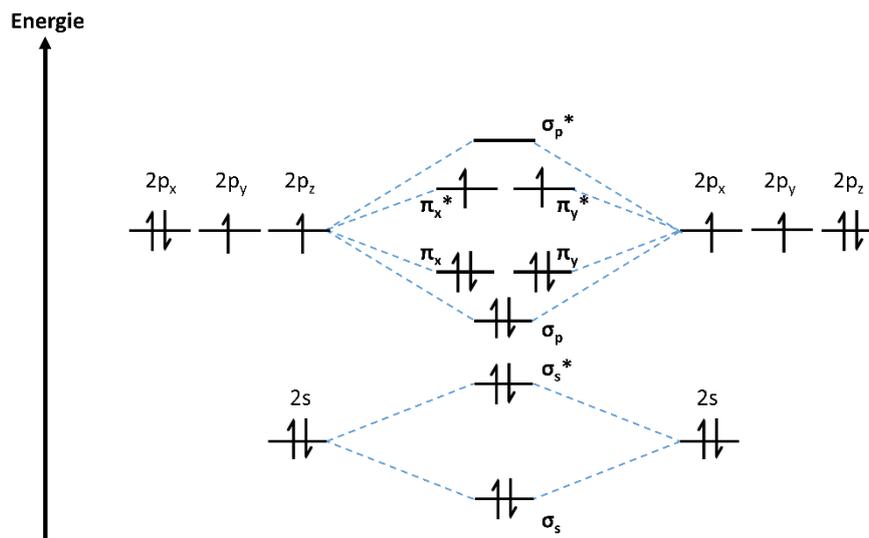


Figure I.6 Diagramme des orbitales moléculaires du dioxygène

Il en résulte qu'un transfert d'énergie entre la T_1 d'une molécule et la T_0 du dioxygène peut avoir lieu, car leur multiplicité est identique. Ce transfert permet à la molécule de rejoindre son niveau S_0 , tandis que le dioxygène passe alors à sa S_1 . Le dioxygène devient alors de la même multiplicité que la molécule à son état fondamental, augmentant grandement les chances d'oxydation de cette dernière sur une de ses insaturations. C'est la cause première de ce qu'on appelle le photo-blanchiment, c'est-à-dire que la molécule n'est plus absorbante et émissive dans le visible après irradiation.

Lien entre conjugaison et couleur

Le lien entre la longueur d'onde et son domaine de radiation est illustré figure I.7.

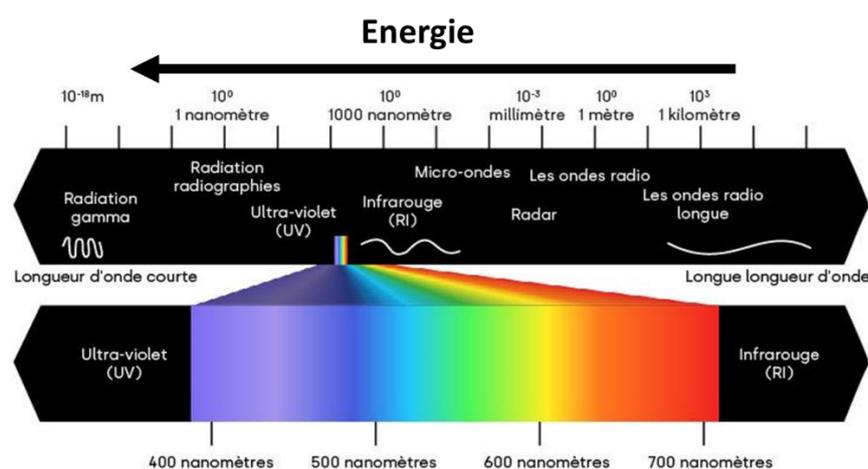


Figure I.7 Gamme de longueurs d'onde. Tiré du site <https://lenalighting.fr/base-de-connaissances/1949-spectre-de-la-lumiere-visible-longueur-d-onde-de-la-lumiere> (consulté le 08/12/2022)

Pour qu'une molécule absorbe et émette dans le visible, il est nécessaire que la différence d'énergie entre la plus haute orbitale peuplée (HOMO) et la plus basse vacante (LUMO) soit dans la bonne gamme énergétique. L'absorption d'une liaison C-C se trouve dans l'UV lointain, 135 nm pour l'éthane. Afin de diminuer l'écart énergétique et donc augmenter la longueur d'onde d'absorption (pour qu'elle atteigne le domaine visible), il est nécessaire d'avoir des liaisons C=C conjuguées. Pour en comprendre la raison, il faut se pencher sur les différents états d'hybridations du carbone. Les atomes de carbones impliqués dans une conjugaison sont d'hybridation sp^2 , ainsi, les orbitales atomiques 2s, 2px, 2py vont donner lieu à trois orbitales moléculaires σ en se recouvrant coaxialement. Quant à elles, les orbitales atomiques 2pz sont orthogonales aux autres orbitales atomiques et se recouvrent latéralement entre elles. De nouvelles orbitales moléculaires vont être ainsi obtenues, des liantes π et d'anti-liantes π^* . Ces interactions ont pour effet de rigidifier le squelette moléculaire, de rendre tous les atomes de carbones coplanaires, de délocaliser les électrons le long de ce qui est appelé le système π , ou système conjugué, mais également de diminuer l'écart d'énergie HOMO-LUMO. Le butadiène est le plus petit système conjugué et absorbe à 214 nm, soit 80 nm de plus que l'éthane. Plus le système π est élargi plus l'écart entre la HOMO et la LUMO sera faible, et par conséquent, plus grande sera la longueur d'onde correspondante à cette transition (Figure I.8). Si le système devient assez étendu, alors les transitions prendront place dans le domaine du visible, aussi bien pour l'absorption que l'émission. À noter que si le système devient trop conjugué, les molécules passent alors dans le domaine de l'infrarouge. La présence de cycle aromatique et d'hétéroatome impacte fortement le système π et donc les propriétés d'absorption et d'émission. En effet, les cycles aromatiques rigidifient les structures moléculaires et permettent une meilleure délocalisation des électrons. Les hétéroatomes, quant à eux, sont riches en électrons influençant la répartition des électrons au sein du système conjugué.

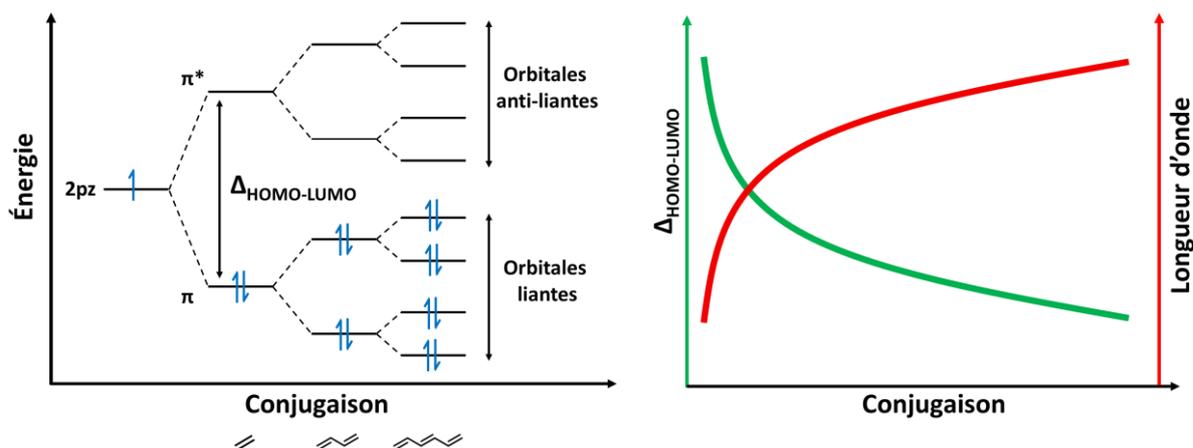


Figure I.8 Diagramme énergétique d'un système conjugué et son lien avec longueur d'onde

Spectre d'excitation

Toutes les longueurs d'onde absorbées par une molécule fluorescente ne mènent pas nécessairement à la même émission de photons. Afin de connaître quelles sont les transitions responsables d'une émission, il faut effectuer un spectre d'excitation. Pour ce faire, il faut relever l'intensité lumineuse d'une des longueurs d'onde d'émission et exciter le fluorophore avec les longueurs d'onde qu'il absorbe. Si le spectre d'absorption et d'excitation se superpose parfaitement alors toutes les transitions sont radiatives de la même manière, si ce n'est pas le cas, certaines transitions absorbantes peuvent être le fruit d'agrégation et mènent à d'autres voies de désexcitations.

I.2. Sondes fluorescentes

I.2.1. Fluorophores organiques

L'utilisation des fluorophores est courante en biologie moléculaire, car la détection des signaux de fluorescence est très aisée, en temps réel et avec une bonne résolution spatio-temporelle. Certains acides aminés comme la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine sont fluorescents dans l'UV, permettant l'étude de nombreuses protéines, que ce soit dans leur structure primaire, secondaire ainsi que leur environnement. De plus, certaines coenzymes comme NADH sont émissives, élargissant la compréhension des systèmes biologiques sans nécessiter d'ajout de molécules extérieures comme marqueurs fluorescents.

Afin d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes cellulaires, de nombreux fluorophores organiques ont été synthétisés. Dans la figure I.9, quelques fluorophores couramment utilisés sont présentés en fonction de leur brillance et de leur longueur d'onde d'absorption maximale. La brillance décrit la manière d'une molécule à émettre de la lumière sous irradiation, elle est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire, sa capacité à absorber les photons et du rendement quantique de fluorescence, sa capacité à émettre des photons par fluorescence (équation I.9).

$$\text{Équation I.9 : } B(\lambda) = \varepsilon(\lambda)\phi_f$$

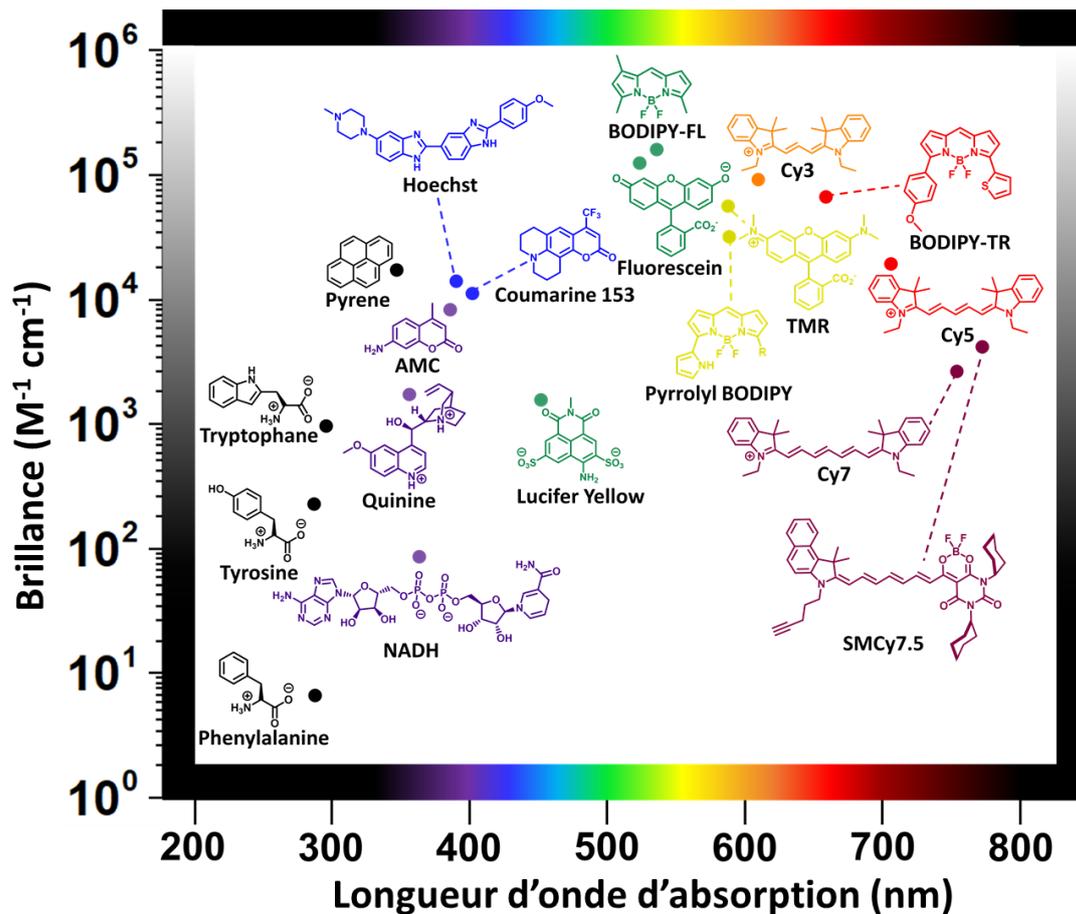


Figure I.9 Présentation de quelques fluorophores en fonction de leur longueur d'onde d'absorption et de leur brillance (adapté des travaux de Luke Lavis)^[7]

I.2.2. Paramètres des sondes fluorescentes

Lorsqu'un chimiste synthétise une molécule dans l'optique d'en faire une sonde fluorescente, il doit tenir compte de nombreux paramètres. Ces paramètres sont résumés figure I.10.

Polarité

Tout d'abord il est nécessaire que la molécule atteigne la cible biologique, par exemple si la sonde cible une organelle il faut s'assurer que le fluorophore soit capable de traverser la membrane plasmique et qu'elle ne soit pas détruite en cours de route. Il est possible de modifier des propriétés de la molécule comme sa polarité, sa lipophilicité ainsi que sa charge globale pour moduler ce paramètre.

Brillance

Ensuite, les molécules peuvent interférer avec les mécanismes biologiques, il est alors crucial d'utiliser un minimum de molécule. Toutefois, moins il y a de molécules, moins il y aura de signal de fluorescence. C'est pourquoi une forte brillance de la molécule est nécessaire.

Une forte brillance apporte un autre bénéfice, celui d'améliorer le rapport signal sur bruit, en effet une cellule présente une autofluorescence, si le fluorophore est très brillant ce rapport sera grandement amélioré et l'objet observé avec plus grande précision.



Figure I.10 Schéma des paramètres à prendre en compte lors de l'élaboration d'une sonde fluorescente.

Sélectivité

Une sonde peut être utilisée pour l'observation d'une organelle comme la mitochondrie^[8] ou la membrane plasmique,^[9] il existe de nombreux groupes ciblant ces organites (figure I.11). Une bonne sélectivité est cruciale, en effet, si une partie de la sonde reste dans le cytoplasme et non sur la cible le ratio signal sur bruit s'en trouve diminué.

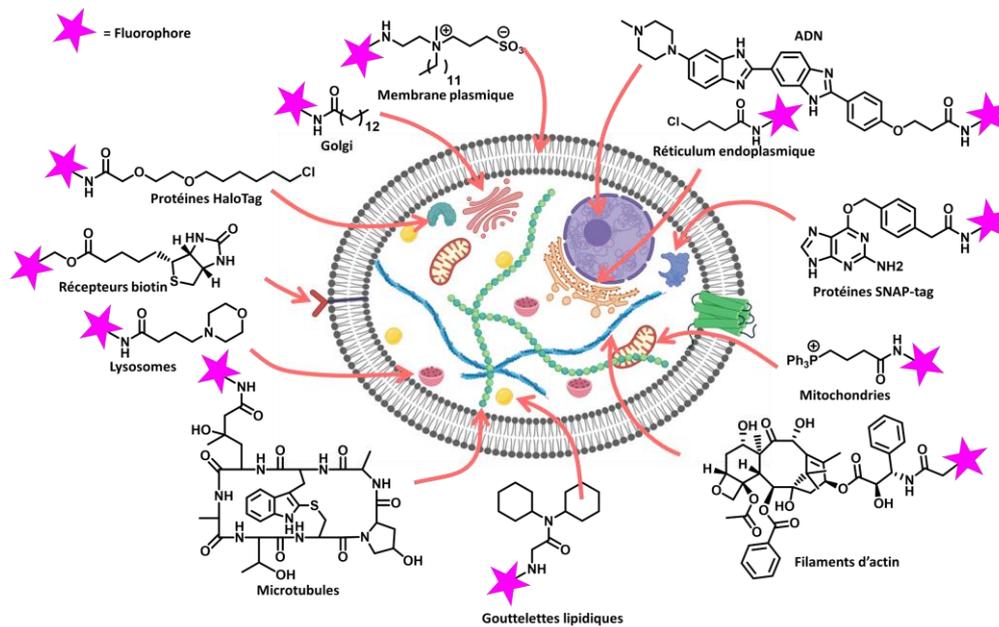


Figure I.11 Présentation de plusieurs groupes ciblant différents organites

La mitochondrie peut être ciblée à l'aide du groupe triphenylphosphonium, en effet, il s'agit d'un cation lipophile lui permettant de traverser les membranes plasmiques. La molécule sur lequel est présent le triphenylphosphonium doit être lipophile. Cette lipophilicité retiendra cette partie à l'intérieur de la membrane des mitochondries, en particulier sur la membrane interne. La membrane des mitochondries possède un potentiel énergétique supérieur aux autres membranes cellulaires permettant cette spécificité.^[10]

La morpholine est utilisée pour cibler les lysosomes. Les lysosomes sont des organelles qui servent à digérer des protéines. Ils fonctionnent à l'aide d'enzymes qui sont actives à pH acide. La forme basique de la morpholine peut aisément traverser la membrane des lysosomes, puis elle se retrouve en conditions acide entraînant sa protonation. Une fois l'ammonium généré, il se retrouve piégé à l'intérieur des lysosomes, car ce cation ne peut plus traverser la membrane.^[11,12]

La membrane plasmique d'une cellule est composée d'une bicouche présentant une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Le groupe ciblant la membrane plasmique est ainsi composé d'un zwitterion ayant une forte affinité avec les têtes hydrophiles et d'une chaîne aliphatique apolaire ayant une forte affinité avec les queues hydrophobes. De plus, les sondes présentant ce groupe en tendance à s'agréger dans l'eau ce qui les empêche d'être fluorescentes. L'incorporation au sein de la membrane plasmique dissocie les fluorophores les rendant fluorescents. Cet effet permet de n'avoir pas besoin de rincer l'échantillon, car seules sondes présentes sur la membrane plasmique seront fluorescentes.^[13]

Les récepteurs membranaires peuvent également être ciblés par l'ajout de la molécule les ciblant, par exemple avec l'utilisation d'un groupement biotine pour les récepteurs de biotines. Ces récepteurs sont d'ailleurs surexprimés sur les cellules cancéreuses permettant de discriminer les cellules cancéreuses d'autres cellules saines.^[14]

Les filaments d'actine sont des polymères composés de la protéine d'actine comme monomère. La phalloïdine est une drogue présente dans des champignons toxiques comme l'amanite phalloïde.^[15] Cette drogue se fixe aux protéines d'actine, et particulièrement à celles impliquées dans un filament. L'introduction d'une phalloïdine avec un fluorophore a pour effet de cibler spécifiquement les filaments d'actine. Cependant, la liaison de la phalloïdine avec l'actine a pour effet de diminuer la polymérisation de l'actine d'un facteur 20. Cet effet entraîne un dysfonctionnement du rôle de ces filaments qui sont entre autres les mouvements intracellulaires et le mouvement des organites engendrant une forte toxicité de ce groupement ciblant. Ainsi, les filaments d'actines sont souvent marqués au sein de cellules fixées.^[16]

De la même manière que pour les filaments d'actine, les microtubules sont ciblés à l'aide d'une drogue qui leur est spécifique, le paclitaxel. Cette molécule engendre également un dysfonctionnement du cytosquelette et est donc toxique.^[17]

Le réticulum endoplasmique peut être ciblé par une chaîne aliphatique contenant un atome de chlore. En effet, dans le RE sont présent des pompes à chlorure permettant les échanges d'ions Ca^{2+} . Ces pompes présentent une affinité avec les atomes chlore entraînant ce ciblage.^[18]

Le ciblage de l'appareil de Golgi s'obtient à l'aide d'un dérivé de l'acide myristique. En effet la conjugaison d'une amine est d'un acide gras se produit au sein de l'appareil du Golgi via la N-palmitoylation ou la N-myristoylation. Ainsi une molécule présentant une amide lipophile s'accumulera dans l'appareil de Golgi.^[19]

L'ADN est lui ciblé par le colorant Hoechst 33258. Cette molécule a la propriété de se fixer aux doubles hélices de l'ADN en particulier celles riches en adénine et en thymine. Cette fixation à deux effets importants pour la microscopie de fluorescence, premièrement, le Hoechst s'accumule au sein de l'ADN, secondement, la molécule devient rigide augmentant son rendement quantique de fluorescence dans le bleu. Ainsi sa conjugaison à un fluorophore entraînera le ciblage de l'ADN mais entraînera également une fluorescence bleue de l'ADN. Dans le cas de cellules eucaryotes, c'est le noyau où se trouve majoritairement l'ADN qui est ciblé.^[20]

Les gouttelettes lipidiques sont des organelles grasses nécessitant un groupement gras pour leur ciblage. Cependant, une chaîne aliphatique restera bloquée au sein de la membrane plasmique. Ainsi, l'utilisation d'un groupe gras et encombré comme le cyclohexyl permet le marquage spécifique des gouttelettes lipidiques.^[21]

Les protéines peuvent également être ciblées à l'aide d'une étape de transfection incorporant une protéine pouvant réagir de manière covalente à un ligand. La protéine HaloTag peut réagir avec un haloalkane à l'aide de l'acide aspartique assisté par une asparagine et un tryptophane. La protéine SNAPtag réagit avec un benzyl lié à une guanine via une cystéine (Figure I.12).^[22,23]

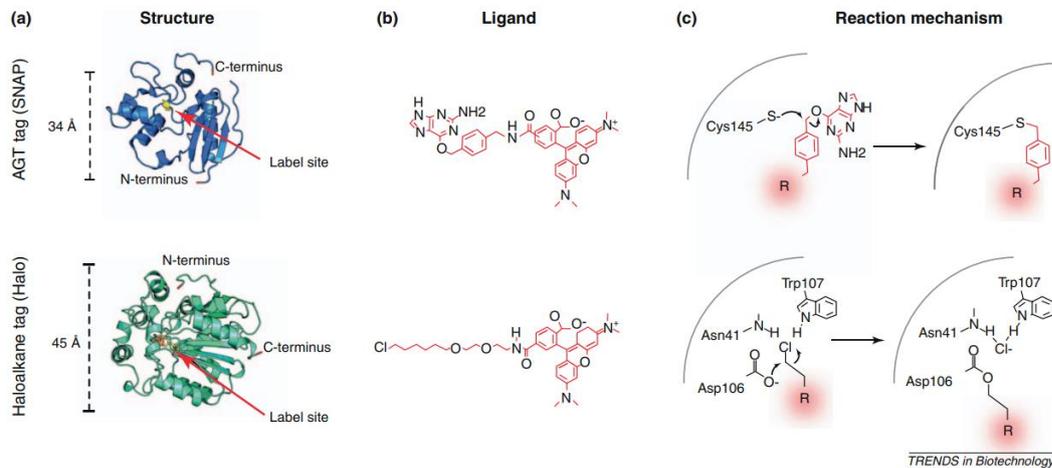


Figure I.12 a) Structure des protéines HaloTag et SNAPtag, b) structure des ligands liés à une TMR, c) mécanisme de liaison entre les ligands et les protéines.^[22,23]

Stabilité

Ensuite, l'observation d'un organite peut être faite dans des temps longs pour observer une dynamique par exemple, il est alors nécessaire que la sonde soit chimiquement stable, c'est-à-dire vis-à-vis des autres molécules présentes dans le milieu mais également photostable, c'est-à-dire sous irradiation lumineuse prolongée.

Toxicité

L'irradiation d'un fluorophore peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS peuvent entraîner un stress oxydant délétère pour la cellule et à l'origine de nombreuses pathologies comme le diabète ou des maladies cardiovasculaires.^[24] De plus, le fluorophore peut interférer avec des fonctions cellulaires entraînant un dysfonctionnement de la cellule, voire sa mort. C'est pourquoi il est nécessaire d'être attentif à la cytotoxicité de la sonde ainsi qu'à sa photo-toxicité.

Longueur d'onde d'excitation et d'émission

Pour comprendre l'interaction entre plusieurs organites, il est courant d'utiliser plusieurs sondes à la fois. Afin de correctement les différencier, il faut que les sondes possèdent différentes longueurs d'émission et d'excitation pour limiter le recouvrement spectral. De plus, plus l'irradiation est proche des UV, plus le rayonnement est toxique. De même pour l'observation au travers des tissus biologiques la sonde doit émettre entre 650 et 900 nm pour se trouver dans ce

qui est appelé la fenêtre optique thérapeutique (Figure I.13). En effet, à cause de l'absorption de l'hémoglobine et des molécules d'eau, le signal de fluorescence est absorbé et n'atteint pas l'objectif de la caméra.^[25] Il est possible de moduler ces longueurs d'onde en jouant sur la conjugaison de la molécule.

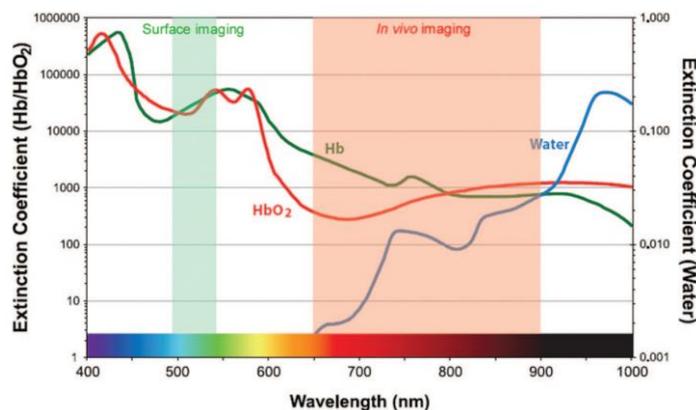


Figure I.13 Coefficient d'extinction de l'eau et de l'hémoglobine en fonction de longueur d'onde

Sensible à un paramètre

Enfin, la sonde peut être conçue pour reporter des variations de pH,^[26] de polarité,^[27] de viscosité,^[28] etc, ou encore à des stimuli extérieurs comme la lumière,^[29] des forces mécaniques^[30] etc. C'est perturbation entraînent des changements dans le spectre d'émission des sondes : certaines voient leur émission grandement augmenter (sondes fluorogènes),^[31] d'autres changent leur longueur d'onde d'émission maximum (sondes ratiométriques)^[32] ou voient leur temps de vie à l'état excité changer (Figure I.14).^[33]

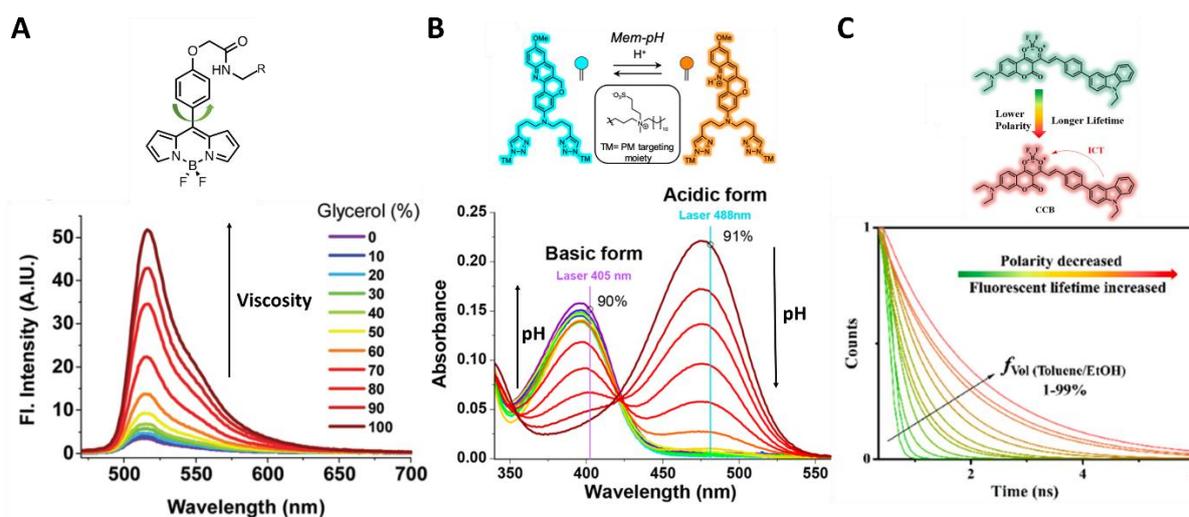


Figure I.14 Exemple de sonde changeant leurs propriétés d'émission. A) Sonde fluorogène sensible à la viscosité, B) sonde ratiométrique sensible au pH, C) sonde pour la microscopie de temps vies sensible à la polarité.^[31-33]

Tous ces paramètres seront pris en compte lors de la réalisation de sondes fluorescentes au cours de ces travaux de thèse.

I.3. Microscopie de fluorescence

I.3.1. Microscopie conventionnelle

Les deux méthodes de microscopie de fluorescence les plus couramment utilisées sont la microscopie de champ large et la microscopie confocale à balayage laser (Figure I.15). Leurs fonctionnements sont très semblables. Commençons par le microscope champ large.

Tout d'abord un rayon incident provenant soit d'une lampe soit d'un laser passe au travers d'un filtre d'excitation afin de ne garder qu'une unique raie spectrale (quelques nm). Le faisceau traverse ensuite un extenseur de faisceau avant d'atteindre un miroir dichroïque qui réfléchira le rayon au travers d'un objectif puis vers l'échantillon à observer. Les fluorophores sont alors excités et émettent leurs photons dans toutes les directions, une partie retransverse l'objectif et est envoyée vers le miroir dichroïque qui ne laisse passer que certaines longueurs d'onde et qui réfléchit la diffusion de la source lumineuse. Le rayon est finalement filtré par un filtre d'émission et atteint enfin le détecteur.

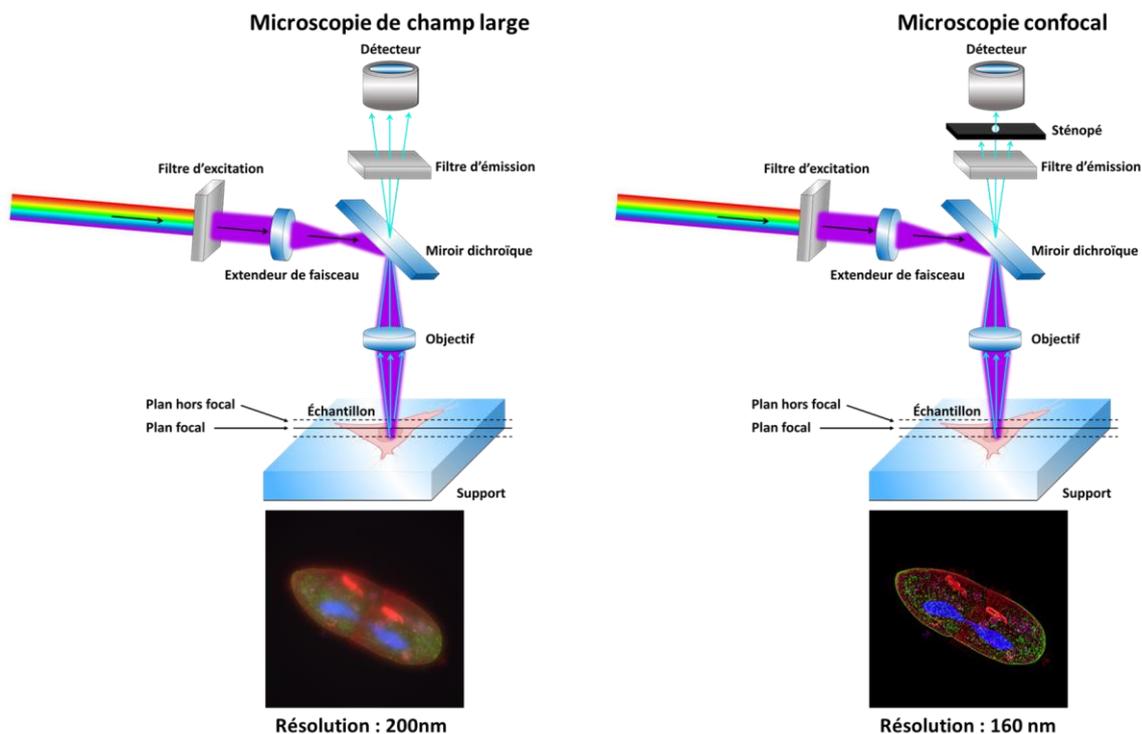


Figure I.15 Schéma de fonctionnement d'un microscope champ large et confocal à balayage laser

Toutefois, les signaux lumineux de plusieurs plans focaux sont récoltés rendant l'image floue. C'est pourquoi le microscope confocal par scan laser a été mis au point. Après le filtre d'émission se

trouve un sténopé, il a pour but de ne garder que les rayons venant de manière axiale et donc d'un seul plan focal. Cependant, l'image s'en retrouve très rétrécie, car uniquement de la taille de ce sténopé. Il est alors nécessaire de varier sa position pour obtenir toute l'image. Il y a un gain de résolution spatial mais une perte de résolution temporelle. La résolution latérale d'un microscope champ large est de 200 nm contre 160 nm pour un confocal et de 500 nm pour la résolution axiale pour les deux.

I.3.2. Microscopie de super résolution

En raison du caractère ondulatoire de la lumière, la résolution des microscopes de fluorescence est limitée à ce qui est appelé la barrière de diffraction. Elle a été observée par le physicien Ernst Abbe à la fin du XIXe siècle.^[34] Cette loi décrit que l'image d'un point observé au microscope est en fait une tache circulaire appelée fonction d'étalement du point (PSF en anglais) qui masque les informations autour du point. Il est alors impossible de différencier deux points ayant leur PSF se recouvrant et donc d'obtenir une résolution inférieure à 160 nm.

Pour pallier cette limite, trois chercheurs ont mis au point deux techniques de microscopie avec une résolution inférieure à la barrière de diffraction. Les deux techniques reposent sur la même idée : obtenir le signal d'un seul fluorophore sans le signal de ses voisins. La première est celle de Stefan Hell qui a eu l'idée d'utiliser un laser de déplétion en plus du laser d'excitation.^[35] Le laser de déplétion sert à partiellement éteindre les fluorophores à l'état excité, en effet si une molécule à l'état excité rencontre un photon avec une énergie correspondante à une de ses énergies de désexcitation radiative alors il retourna à son état fondamental avec l'émission d'un photon de même énergie, c'est l'émission stimulée, le principe de fonctionnement d'un laser.^[36] Ce laser de déplétion possède une forme d'anneau (aussi appelé donut) permettant aux fluorophores du milieu de rester allumés, le signal obtenu aura alors une PSF réduite permettant une meilleure résolution. Il reste alors à scanner tout l'échantillon de cette manière pour obtenir toute l'image. Cette technique s'appelle STED (STimulated-Emission-Depletion). L'autre technique qui sera plus discutée dans ce manuscrit est la méthode SMLM (Single-Molecule Localization Microscopy). Son concept a été montré par William Moerner qui a observé le signal de fluorescence d'une molécule unique au sein d'un matériau dense,^[37] ce concept a ensuite été mis au point par Eric Betzig avec une protéine fluorescente.^[38] Cette technique repose sur le caractère commutable d'un fluorophore. En effet si un fluorophore sous certaines conditions passe d'un état non émissif (ou état noir) à un état émissif (ou état allumé), on obtient non plus un halo lumineux mais plusieurs PSF s'alternant dans le temps (Figure I.16). Il est alors possible de précisément localiser la source de l'émetteur (le fluorophore) en supposant qu'il est au centre de la PSF. La somme de toutes ces positions obtenues dans le temps donne ensuite une image reconstruite avec une résolution pouvant atteindre 10 nm. Ces deux techniques ont été récompensées par un prix Nobel de chimie

en 2014. Depuis, de très nombreuses méthodes de super résolution ont vu le jour (PAINT^[39], STORM,^[40] dSTORM,^[41] MINIFLUX,^[42] etc) reposant toutes sur l'une ou l'autre de ces deux principes.

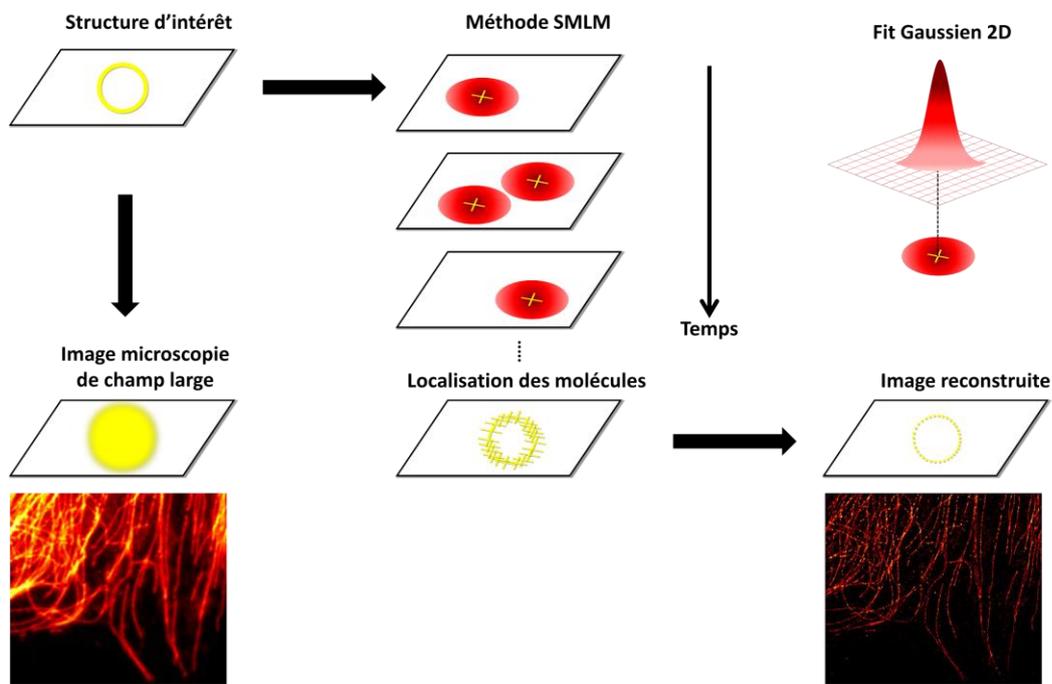


Figure I.16 *Principe de la méthode SMLM*

I.4. Sondes photo-modulables

Parmi les sondes fluorescentes, certaines sont appelées photo-modulables. Il s'agit de molécules capables de changer leurs propriétés photophysiques sous l'action d'une irradiation lumineuse. Parmi ces sondes, trois grandes familles peuvent être distinguées : les sondes photo-activables,^[43] les sondes photo-convertibles et les sondes photo-commutables (Figure I.17).^[44] Les sondes photo-activables se caractérisent par leur capacité à augmenter leur intensité de fluorescence sous l'effet d'une photo-irradiation. Les sondes photo-convertibles, quant à elle, sont capables de changer leur longueur d'onde d'émission de façon irréversible sous photo-irradiation. Enfin, les sondes photo-commutables se caractérisent par le changement réversible de leurs propriétés spectrales (passage d'un état éteint à un état allumé, changement de longueur d'onde d'émission).

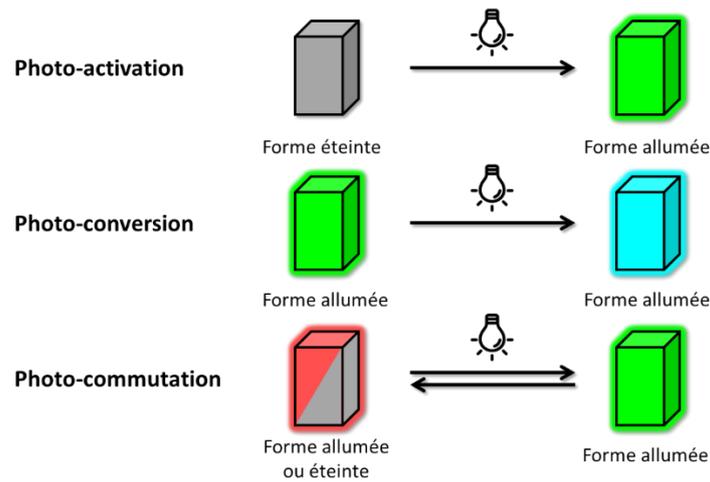


Figure I.17 Différence entre les sondes photo-modulables

Ces propriétés sont des outils importants pour la bioimagerie, car elles permettent de suivre sans ambiguïté des cellules, des organites ou des molécules sur un large champ spatio-temporel. En effet, il est difficile de distinguer une biomolécule parmi d'autres et donc de la suivre. Cependant, si cette biomolécule peut être manuellement changée de couleur il devient alors aisé de suivre ses déplacements par rapport aux autres. De plus, ces mécanismes permettent d'utiliser des méthodes de super-résolution comme le PALM ou le STORM.^[45]

Depuis la découverte en 2002 des protéines photo-activables (paGFP)^[46] de nombreuses modifications de ces protéines photo-modulables, que ce soit dans leurs longueurs d'onde d'émission ou dans leurs mécanismes de conversions, ont vu le jour.^[47]

La protéine GFP repose sur une structure en tonneau résultant de onze brins β . À l'intérieur de ce tonneau se trouve le fluorophore (Figure I.18).^[48]

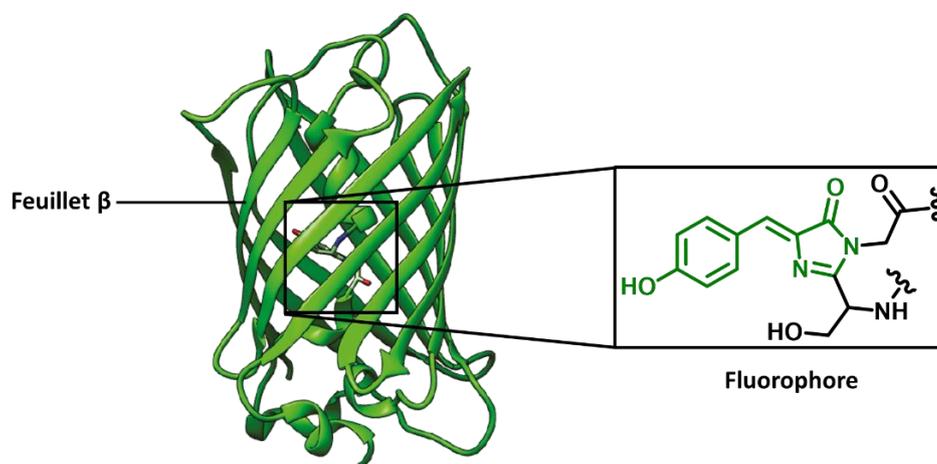


Figure I.18 Schéma de la protéine GFP^[48]

Les protéines photo-modulables présentent des structures similaires, mais des modifications à la fois sur le fluorophore et sur la protéine elle-même confèrent ces propriétés (Figure I.19).^[49] La protéine paGFP est photo-activable qui présente un acide glutamique en position 222 (Glu222) stabilisant la forme protonée du fluorophore qui s'en trouve peu émissif. Sous l'action d'un rayonnement à 405 nm, l'acide glutamique est décarboxylé permettant au fluorophore de se déprotonner et d'être fluorescent.^[50] La protéine EosFP est photo-convertible et voit sous l'action d'un rayonnement à 405 nm son fluorophore se réarranger assisté par l'acide glutamique 212 (Glu212) et étendre sa conjugaison entraînant un effet bathochrome.^[51] La protéine Dronpa est photo-commutable. Son fluorophore est le même que celui de la GFP, mais, sous l'effet d'un rayonnement à 560 nm, il se protone et s'isomérisise le rendant peu fluorescent. Puis, avec une excitation à 440 nm, le fluorophore retourne à sa forme émissive.^[52]

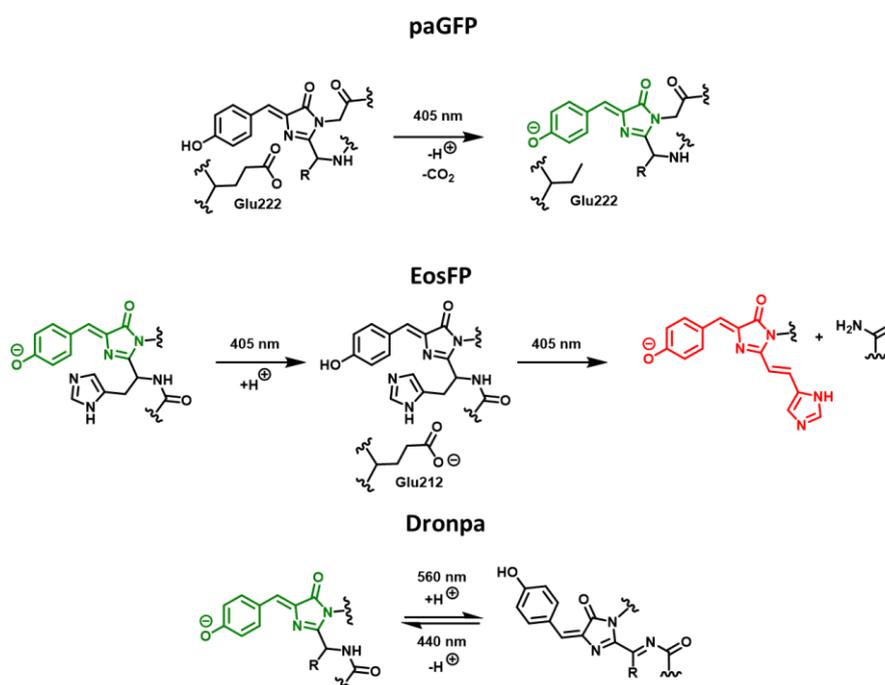


Figure I.19 Exemple de protéines photo-modulables et leurs mécanismes

Bien que les protéines fluorescentes soient des outils importants, elles possèdent certaines limitations dans lesquelles les plus petites molécules peuvent s'inscrire comme un outil complémentaire. En effet, les récentes avancées en microscopie nécessitent d'utiliser des sondes avec un fort « budget photonique ». Le budget photonique est égal au nombre de fluorophores multiplié par le nombre de photons émis par chacun d'eux avant le photo-blanchiment.^[53] Plus le budget photonique est important, plus le nombre d'informations récoltable au sein du composé biologique est important. En effet, les méthodes de microscopie de super résolution nécessitent une grande quantité de photons, car cette quantité est directement liée à la précision de localisation.^[54] Les fluorophores organiques sont plus brillants et plus photo-stables que les

protéines fluorescentes augmentant considérablement le budget photonique. De plus une étape de transfection est nécessaire afin d'utiliser des protéines fluorescentes, amenant à des problèmes d'homogénéités de marquage de l'échantillon lié à l'hétérogénéité de l'efficacité de transfection des cellules. De plus, cette étape reste relativement toxique pour les cellules et chronophage comparé à l'utilisation de « petites » sondes moléculaires. Enfin certaines de ces protéines peuvent induire de par leur taille des modifications dans le comportement de la cible étudiée.^[55]

En 1998, une nouvelle technologie a été développée permettant de lier un fluorophore à une protéine. Elle repose sur l'utilisation d'une fluorescéine possédant deux atomes d'arsenic pouvant se lier à aux cystéines d'une protéine exprimée via une étape de transfection.^[56] Depuis, de nombreuses autres technologies ont vu le jour, élargissant les applications ainsi que le nombre de fluorophores utilisables.^[57] Grâce à ces technologies, les « petites » molécules peuvent être utilisées pour marquer des protéines alliant la spécificité des protéines fluorescentes et les propriétés spectrales des fluorophores organiques.

Bien que les protéines fluorescentes photo-modulables soient largement décrites, leurs analogues « petites » molécules restent relativement rare. Nous allons ici passer en revue ce qui a été fait concernant les sondes photo-convertibles et photo-commutables.

Sera considéré comme photo-convertibles et photo-commutables : molécules fluorescentes dont la forme initiale et le ou les photo-produits émettant dans le visible (400 – 800 nm).

Cyanines

Les cyanines sont des fluorophores présentant une charge positive délocalisée le long d'une chaîne polyméthines délimitée par deux atomes d'azote à chaque extrémité. Cette famille de fluorophore possède des brillances élevées grâce à d'excellents coefficients d'extinction molaire (jusqu'à $250\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et de bons rendements quantiques de fluorescence dans les solvants organiques et environnements apolaires.^[58] Ces cyanines sont couramment utilisées en imagerie de fluorescence comme l'indocyanine green (ICG) émettant dans le proche infrarouge ^[59] AF647 en microscopie STORM^[60] ou PKMO en microscopie STED (Figure I.20).^[61]

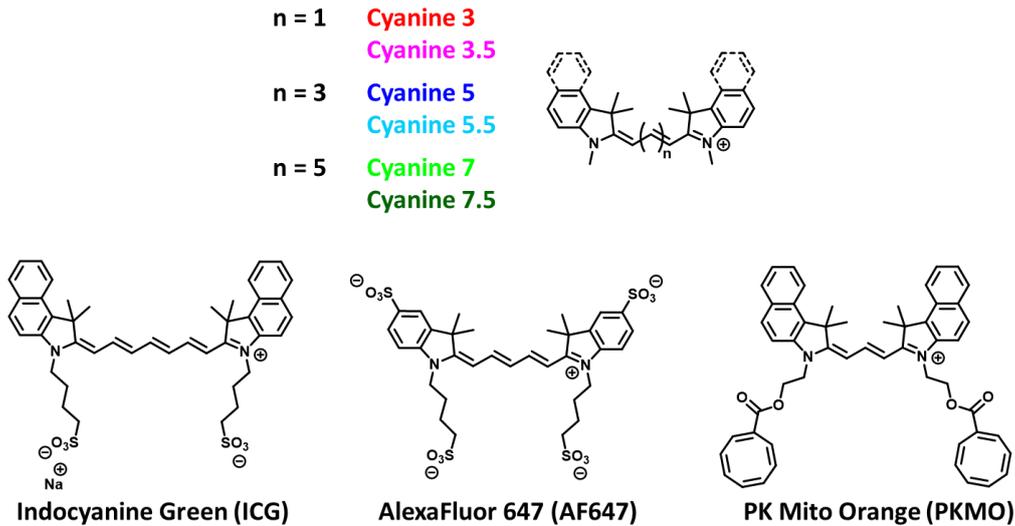


Figure I.20 Structure des cyanines avec l'exemple de ICG, AF647 et PKMO

Les cyanines montrent des propriétés de photo-conversions. Carlson *et coll.* ont observé que la cyanine 7 DiR photo-convertissait d'une émission à 780 nm à 670 nm après une irradiation prolongée à 632 nm. En utilisant cette photo-conversion, ils ont pu discriminer la prolifération ou la migration de cellule T (Figure I.21).^[62] DiR a également été testé sur des sphéroïdes et a permis l'étude des proliférations de ces derniers.^[63]

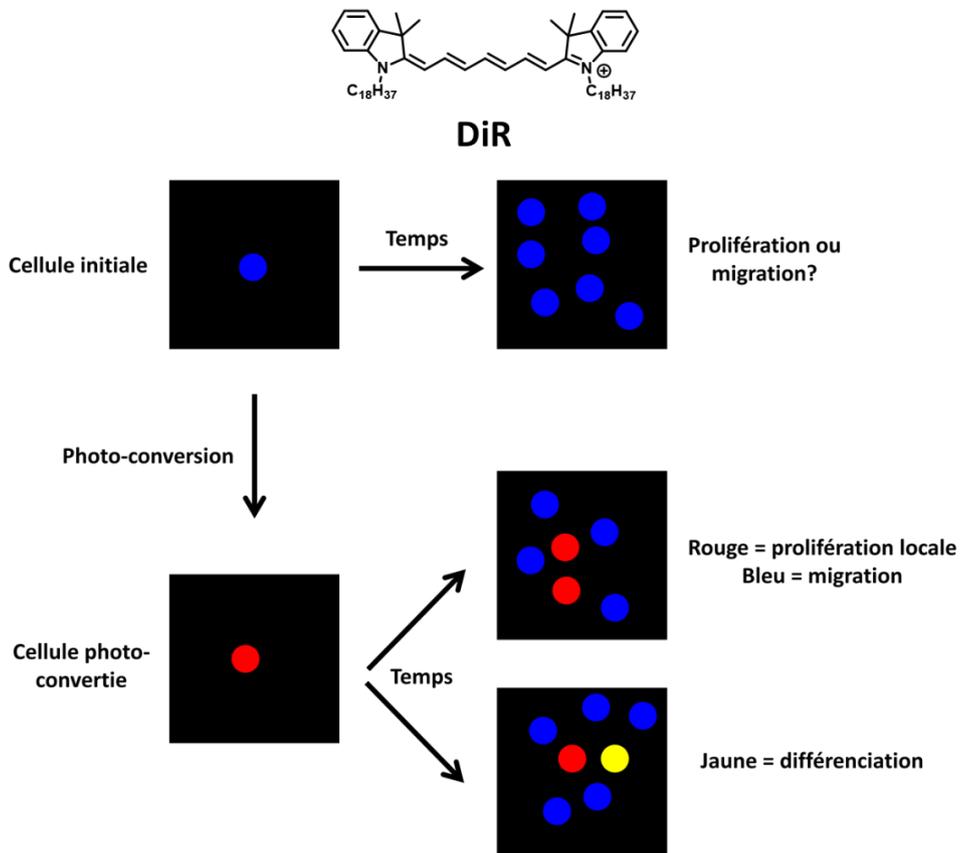


Figure I.21 Schéma montrant la méthode de suivi d'une cellule^[62]

À la suite de cette étude, Kwok *et coll.* ont eu une approche de photo-conversion de manière empirique en irradiant de nombreuses cyanines. Les auteurs ont ainsi étudié lesquelles de ces cyanines présentaient des propriétés de photo-conversions et avec quel rendement de brillance. Une d'elles, SYTO62 a montré un bon rendement de conversion et a pu être testée dans des cellules RAW 264.7. Au cours de leurs travaux les auteurs ont également montré que la conversion des cyanines était dû à la troncation du pont éthylénique causé par la génération d'oxygène singulet (Figure I.22). Cette troncation implique la diminution du système π et mène donc une hypsochromie des spectres d'excitation et d'émission. De plus la forme convertie possède des propriétés semblables aux Cy3 appuyant cette hypothèse.^[64]

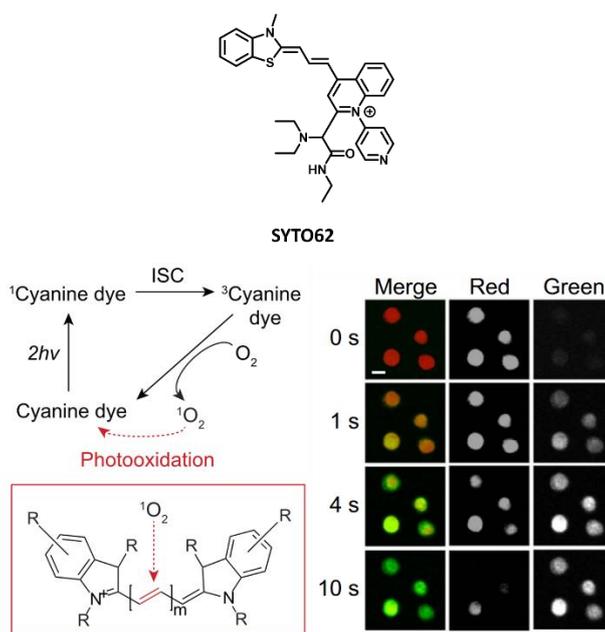


Figure I.22 Mécanisme du changement de couleur des cyanines et leurs applications en imagerie cellulaire^[64]

Ce mécanisme de photo-troncation a été plus profondément étudié par Cho *et coll.* D'après eux, l'excitation d'une Cy5 engendre la génération d'oxygène singulet via un croisement intersystème entraînant une rupture oxydative du pont diéthylénique. Un de ces photo-produits se réarrange via une réaction de retro-aldolisation ou via une décarbonylation en alcène. Un aldéhyde et une base de Fischer sont alors présent et réagissent ensemble suivi d'une condensation afin de créer une Cy3 (Figure I.23).^[65]

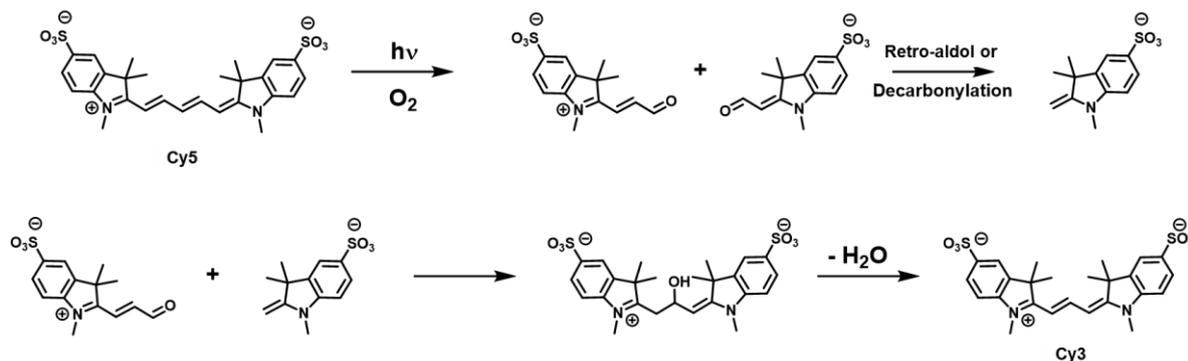


Figure I.23 Mécanisme de phototruncation d'une Cy5 en Cy3^[65]

AelxaFluor 647 étant une Cy5, elle présente cette propriété de photo-conversion, les auteurs l'ont alors utilisé afin de suivre des protéines EGFR et ont obtenu les coefficients de diffusions dans des cellules HeLa (figure I.24).

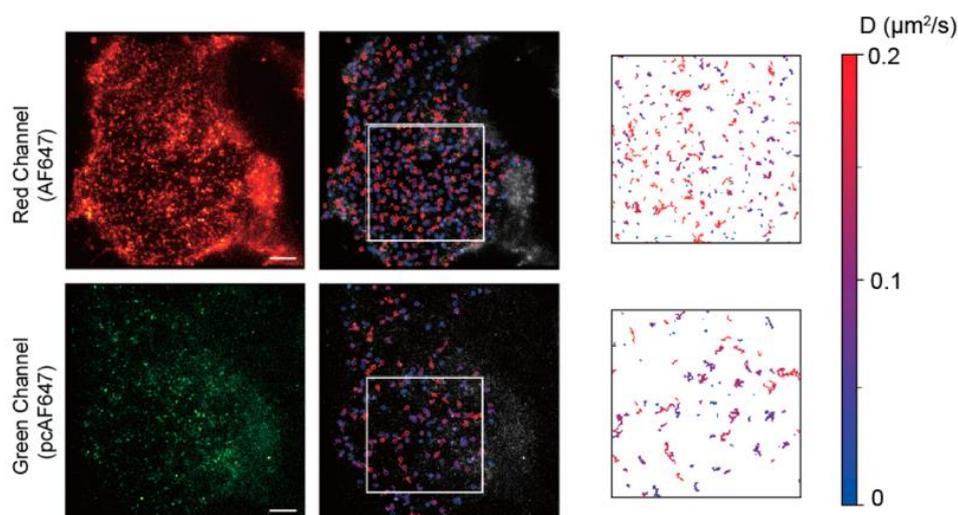


Figure I.24 Photon-conversion d'AF647 permettant l'obtention de coefficients de diffusion de la protéine EGFR. Échelle = $5 \mu\text{m}$ ^[65]

Un autre mécanisme a été proposé par Matikonda *et coll.* Les auteurs suggèrent que l'attaque de l'oxygène singulet sur une Cy5 entraîne un intermédiaire peroxy. Ensuite, la présence d'eau amène à l'intermédiaire hydroperoxyethanol qui se réarrange via une attaque intramoléculaire de l'énamine vinylique. Ce dernier intermédiaire se réarrange en Cy3 et libérant une molécule d'hydroperoxyethanol (Figure I.25).^[66]

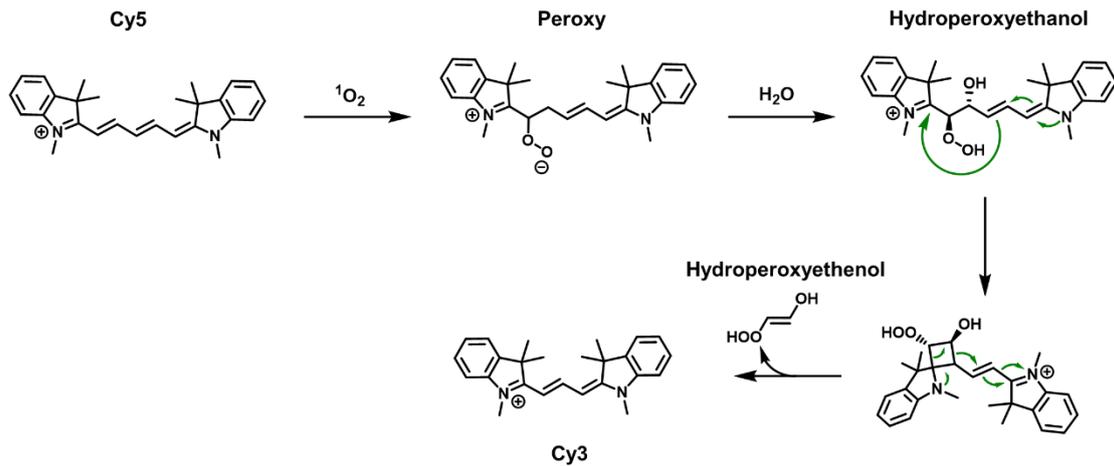


Figure I.25 Mécanisme de phototroncation proposé par Matikonda et coll.^[66]

Après avoir montré la photo-conversion des Cy7 en Cy5 et Cy5 en Cy3, les auteurs ont avantageusement utilisé cette propriété pour effectuer des images microscopiques en utilisant la méthode SMLM. En effet, en utilisant une Cy7 et en considérant uniquement le canal de la cyanine 5, les formes Cy7 et Cy3 sont les états éteints et la Cy5 l'état allumé, on a alors un système OFF/ON/OFF suffisant pour la détection de molécule unique. Dans la figure I.26, il est montré les canaux Cy7 et Cy5 à trois temps différents (t1-3) de cellules COS7 dans lesquelles les microtubules ont été marqués par une Cy7 ainsi que la reconstruction obtenue sur un autre échantillon. Le canal Cy5 est celui qui donne la meilleure résolution. Ils montrent alors que les molécules de photo-convertibles sont utilisables en microscopie SMLM, en particulier avec la méthode *PhotoActivated Localization Microscopy* (PALM).

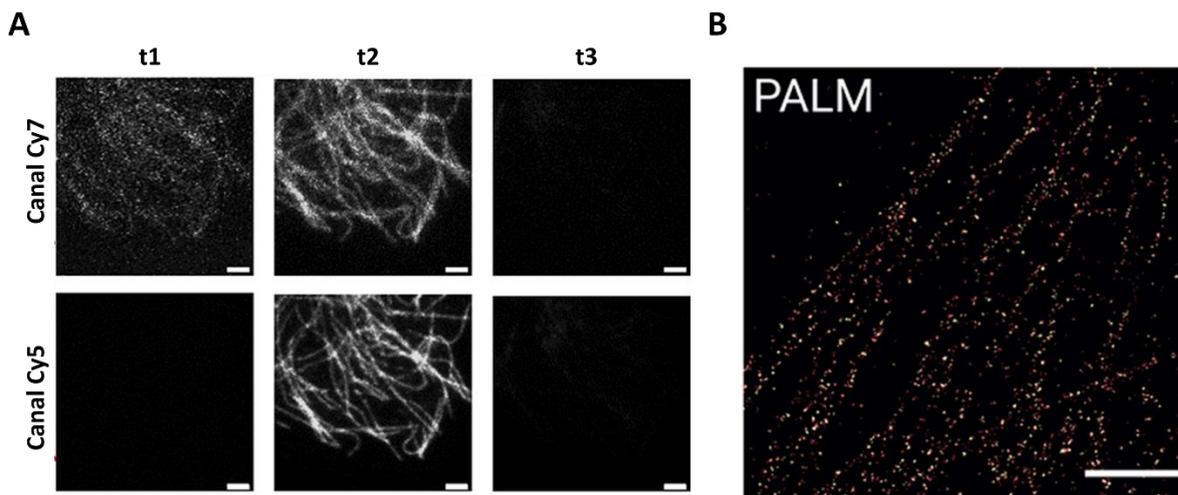


Figure I.26 Photo-conversion d'une Cy7 sur les microtubules de cellules COS7. A) canaux des Cy7 et Cy5 à trois temps différents, B) image reconstruite des microtubules. Échelle = $2 \mu m$ ^[66]

De plus ces observations mettent en avant que AF647, le fluorophore le plus utilisé en microscopie de molécule unique^[60] est également sujet à ces conversions. Cela entraîne la présence d'artefacts dans les canaux de plus basses longueurs d'onde. Helmerich et *coll.* mettent alors en garde l'interprétation de résultats SMLM multi couleurs utilisant AF647.^[67]

Après ces premiers travaux, Fukushima *et coll.* ont étudié l'influence de la fonctionnalisation sur le pont éthylénique. Par exemple, DiR, une Cy7 non fonctionnalisée présente un rendement de conversion de 1,3%. L'ajout d'un groupe méthoxy en position 3' augmente le rendement de conversion à 10,2%. Cette augmentation de rendement a permis une photo-conversion *in vivo* sur un modèle murin (Figure I.27).^[68]

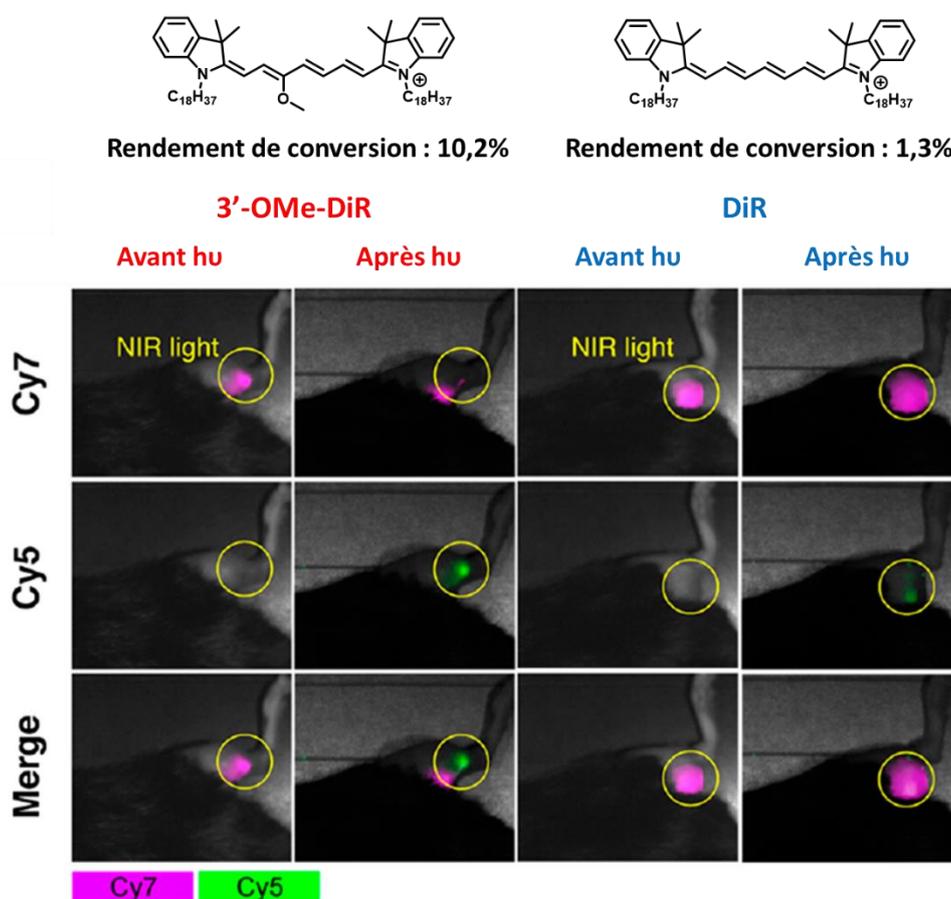


Figure I.27 Comparaison entre la photo-conversion de DiR et 3'-OMe-DiR dans des souris^[68]

Bien que le mécanisme nécessite de l'oxygène pour produire de l'oxygène singulet, il a été montré que ces conversions fonctionnent également en condition hypoxie, c'est-à-dire à une faible concentration en oxygène.^[69]

Dixanthilidènes

Les dixanthilidènes possèdent des propriétés de photo-conversion. Ces propriétés ont été décrites pour la première fois en 2015 dans l'équipe de Chenoweth. Une fois excitées, ces molécules sont

sujettes à une électrocyclisation suivie d'une oxydation contraignant ainsi la structure et permettant une meilleure délocalisation des électrons et donc à un effet bathochrome (Figure I.28).^[29]

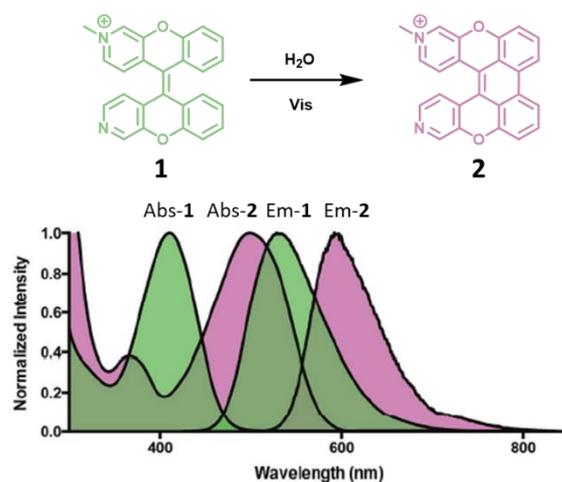


Figure I.28 Spectre d'absorption et d'émission avant et après photo-conversion des dixanthilidènes^[29]

Cette photo-conversion est efficace et présente 64% de rendement chimique. Les formes converties et non converties ciblent les lysosomes et permettent l'observation de ces derniers avec la possibilité de convertir de façon séquentielle les cellules avec un contrôle spatio-temporel précis (Figure I.29).

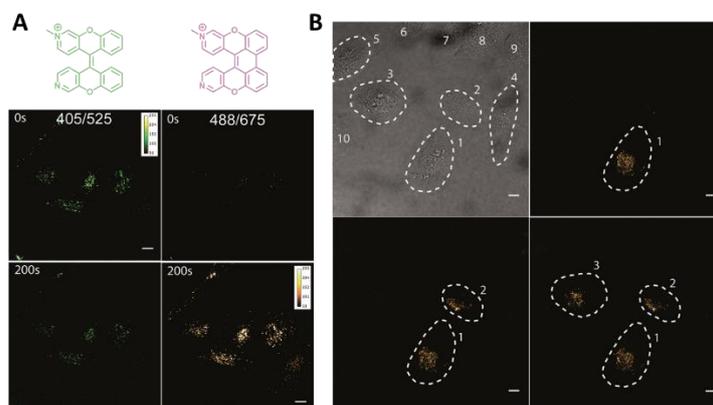


Figure I.29 **A)** Irradiation de cellules HeLa, diminution dans le canal 405/525 et augmentation dans le canal 488/675 après irradiation. **B)** Conversions séquentielles de cellules. Échelle = 10 μm ^[29]

Le changement de position des atomes d'azote dans ces structures entraîne cette fois un marquage mitochondrial sans pour autant changer les propriétés spectrales. Tran et coll.^[70] ont alors effectué la photo-conversion des mitochondries dans des cellules HeLa (Figure I.30).

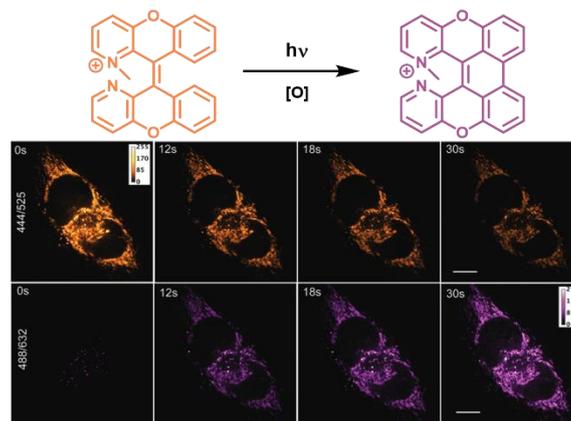


Figure I.30 Conversion des mitochondries au sein de cellules HeLa. Échelle = 10 μm ^[70]

Pour conclure sur les dixanthilidènes, une version clickable a été mise au point par Jun *et coll.* La sonde a été liée à la protéine α -Synuclein, une protéine présente dans les neurones et qui aurait un lien avec la maladie de Parkinson^[71], préalablement fonctionnalisée par un alcyne par une chimie click permettant ainsi son suivi le long d'un neurone pendant 3 heures (Figure I.31).^[72]

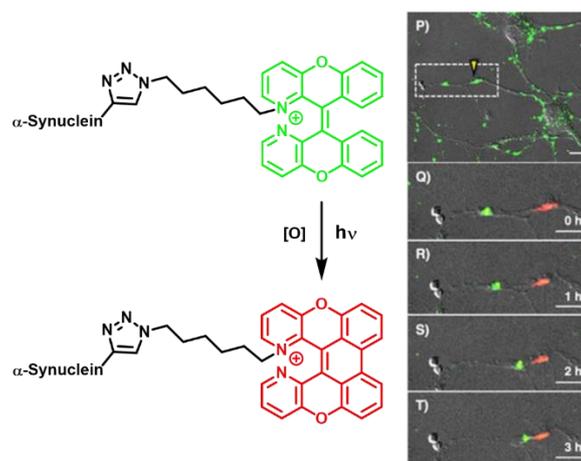


Figure I.31 Photoconversion de dixanthilidène sur l' α -synuclein et son suivi au sein d'un neurone^[72]

Rhodamines

Les rhodamines sont des xanthenes chargés positivement qui possèdent une bonne stabilité chimique ainsi qu'une bonne brillance grâce à d'importants coefficients d'extinction molaire et de rendement quantique de fluorescence.^[58] Leurs propriétés spectrales peuvent, entre autres, être modulées en remplaçant l'atome d'oxygène du xanthène (Figure I.32).^[73] Elles présentent des applications en imagerie de fluorescence variées comme sonde pH,^[74] de métaux,^[75,76] mais aussi en microscopie de super résolution.^[77]

Figure I.32 Propriétés spectrales de plusieurs rhodamines^[73]

L'utilisation d'un groupe bromoacétamide sur la rhodamine B lui confère des propriétés de photo-conversion en milieu acide (Figure I.33).^[78] Lan *et coll.* décrivent le mécanisme. Tout d'abord, le spirocycle de **R-Br** s'ouvre en milieu acide en molécule **R-a** émettant dans le rouge et sous irradiation UV la rupture homolytique de la liaison C-Br laisse place à une cyclisation radicalaire amenant à une nouvelle molécule **R-O** émettant dans le proche infrarouge. Comme la génération de **R-a** nécessite des conditions acides, ce sont dans les lysosomes que cette conversion prend place.

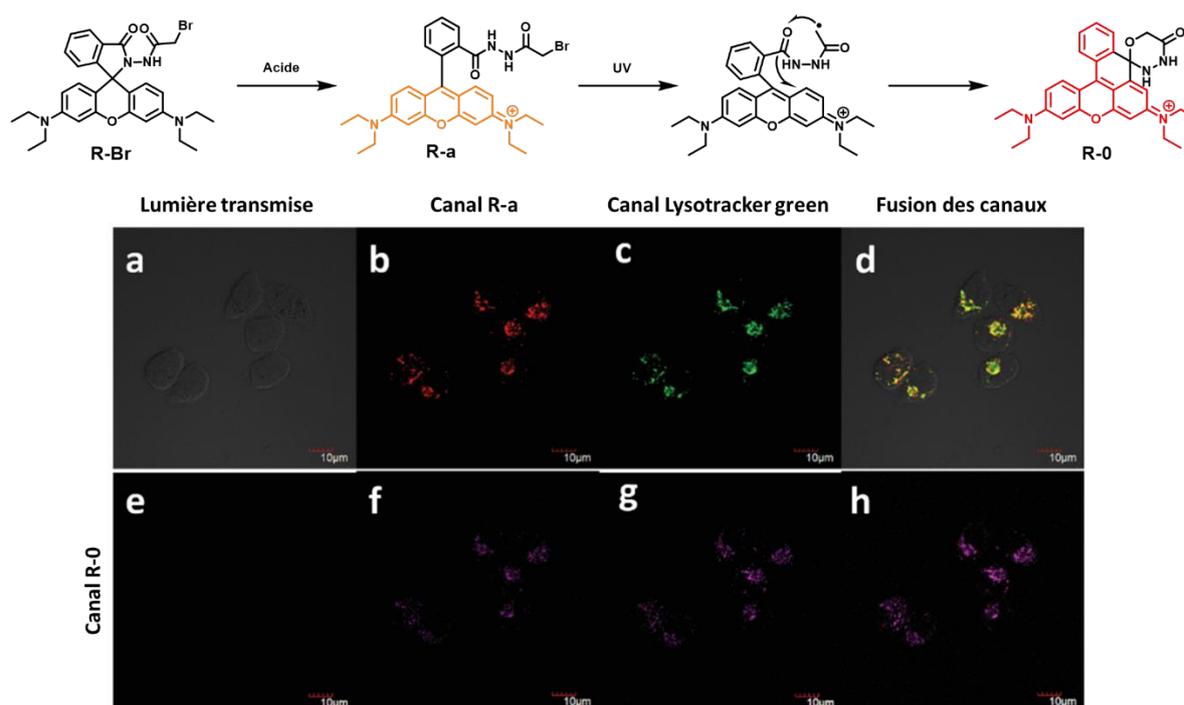


Figure I.33 Microscopie de cellule HeLa avec 5 μM de **R-Br** et 0,5 μM de lysotracker green. a) lumière transmise, b) canal R-a, c) canal LysoTracker green, d) fusion b et c, e-h) canal **R-O** entre 1-5 min sous irradiation à 290 nm^[78]

Dihydroalkaloïde

La photo-conversion peut également être utilisée comme plateforme thérapeutique. Ling *et coll.* ont développé un dihydroalkaloïde photo-convertible. L'idée était de contrôler le moment où cette

molécule est générée pour des applications médicales (Figure I.34). Le précurseur est fluorescent et émet dans le vert, et sous irradiation à 405 nm le précurseur est sujet à une déhydrogénation oxydative entraînant la génération de l'espèce bioactive ainsi qu'une augmentation de la conjugaison et donc d'un déplacement bathochrome. Les auteurs ont alors pu observer cet effet en microscopie et ont noté la disparition de la forme verte au profit de la forme rouge qui pénètre le noyau et entraîne la mort cellulaire.^[79]

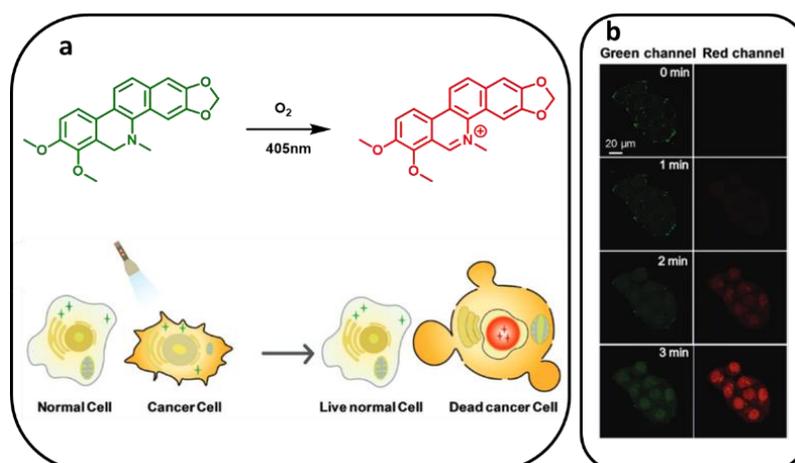


Figure I.34 a) Schéma de la photo-conversion vers un dihydroalkaloïde et son application, b) Irradiation de cellules HeLa à 405 nm au cours du temps.^[79]

Système FRET

Un des problèmes rencontrés avec l'utilisation de sondes photo-convertibles est que le changement de couleur s'opère même si la sonde n'a pas atteint sa cible biologique ou n'a pas réagi avec l'analyte recherchée. Pour pallier cet inconvénient, Lin *et coll.* ont eu l'idée d'utiliser une sécurité empêchant la photo-conversion prématurée. Pour cela, les auteurs ont conçu une sonde chimio-activable par un environnement réducteur et sous irradiation (Figure I.35).^[80]

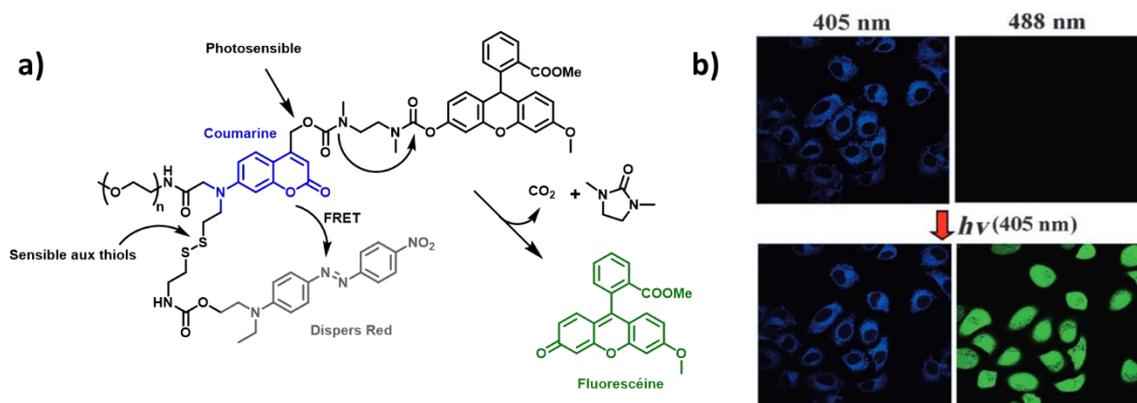


Figure I.35 a) mécanisme de photo-conversion, b) microscopie de cellules Hela avant et après irradiation a 405nm^[80]

Au départ la coumarine n'est pas fluorescente, car elle transmet son énergie au Dispers red, un colorant non émissif, via un mécanisme de FRET. Si des thiols sont présents, le pont disulfure se rompt éloignant l'accepteur et permet à la coumarine d'émettre. Ainsi la fluorescence bleue est observée uniquement aux endroits de forte concentration en thiols. Ensuite l'illumination prolongée de la coumarine finit par libérer la fluorescéine qui émet dans le vert. Ce système permet alors d'une part la détection de thiols puis la photo-conversion permettant un meilleur contrôle spatio-temporel de la détection.

Système photo-commutable

Une molécule largement utilisée pour ces propriétés de photo-commutation est le spiropyrane, une molécule non fluorescente mais qui sous irradiation UV devient une merocyanine émettant dans le rouge. La merocyanine peut ensuite redevenir un spiropyrane à l'aide de lumière visible (Figure I.36).^[81]

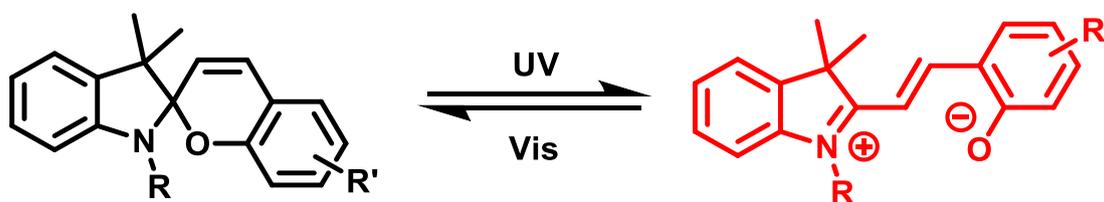


Figure I.36 Équilibre entre spiropyrane et merocyanine

Ce système étant réversible, il s'agit de photo-commutation ou « photo-switch », où la forme spiropyrane n'est pas émissive. Afin d'obtenir un système photo-commutable émissif bicolore, il est nécessaire de coupler ce fluorophore commutable avec un autre fluorophore afin d'obtenir un système FRET. La merocyanine est couramment utilisée en tant qu'accepteur de FRET couplé avec un naphthalimide comme donneur. Ainsi l'excitation du naphthalimide lié au spiropyrane mène à une émission verte mais une fois le spiropyrane transformé en merocyanine l'émission sera rouge causé par le transfert d'énergie (Figure I.37).

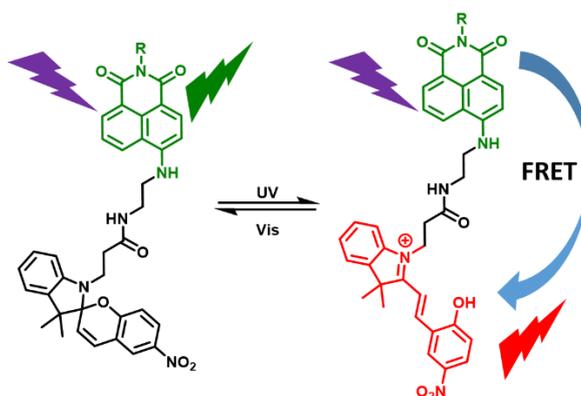


Figure I.37 Système photo-commutable composé de spiropyrane et naphthalimide

Un premier exemple se trouve dans le travail de *Fu et coll.* dans lequel ils ont lié ce système à un saccharide capable de cibler la protéine HSA. Une fois la protéine marquée le signal de fluorescence est grandement augmenté et peut être alterné entre le rouge et le vert à l'aide d'irradiation UV et visible successive (Figure I.38). Un autre exemple de ce mécanisme est présent dans le travail de *Fu et coll.*^[82] au sein de cellules 264.7.^[83]

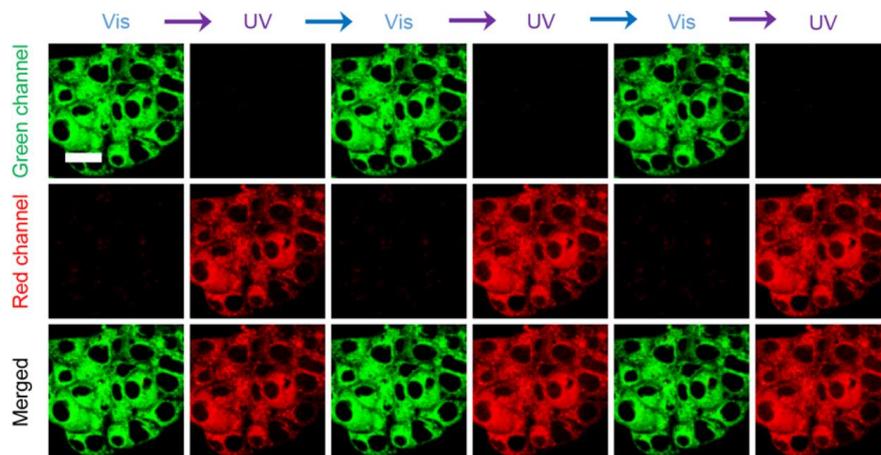


Figure I.38 *Imagerie de fluorescence dans des cellules Hep-G2 avec alternance d'irradiation UV/Vis. Échelle = 100 μm* ^[83]

La forme merocyanine présente un site sensible aux molécules SO_2 et SO_3^{2-} permettant la création d'un système dit « double-check ». Il s'agit de système de détection d'organe dans lesquels la réaction avec la cible ne se fait que si l'expérimentateur active la sonde *in situ*. Le système initial émet grâce à la naphthalimide et émet donc dans le vert, ensuite sous irradiation UV le système FRET se crée et une fluorescence rouge apparaît. Ensuite, les molécules SO_2 et SO_3^{2-} peuvent réagir sur la merocyanine rompant sa conjugaison et donc le FRET donnant lieu au retour de la fluorescence verte. Ainsi, en présence de SO_2 et SO_3^{2-} le signal apparu dans le rouge disparaît au profit d'une émission verte (Figure I.39).^[84,85]



Figure I.39 *Schéma du mécanisme de détection de SO_2 utilisant un système « double check »*

À l'aide de ce système, *Zhang et coll.* ont décrit que l'augmentation de température augmente la concentration de SO_2 au sein des lysosomes. L'utilisation de formaldéhyde, connu comme

inhibiteur de bisulfite, montre que le ratio rouge/vert est faible confirmant cette méthode de détection (Figure I.40).^[84] Un système similaire a été utilisé *in vivo* au sein de modèle murin par Zhang *et coll.*^[86] de même que pour la présence de SO₂ proche des protéines HSA au sein des cellules Hep-G2.^[87]

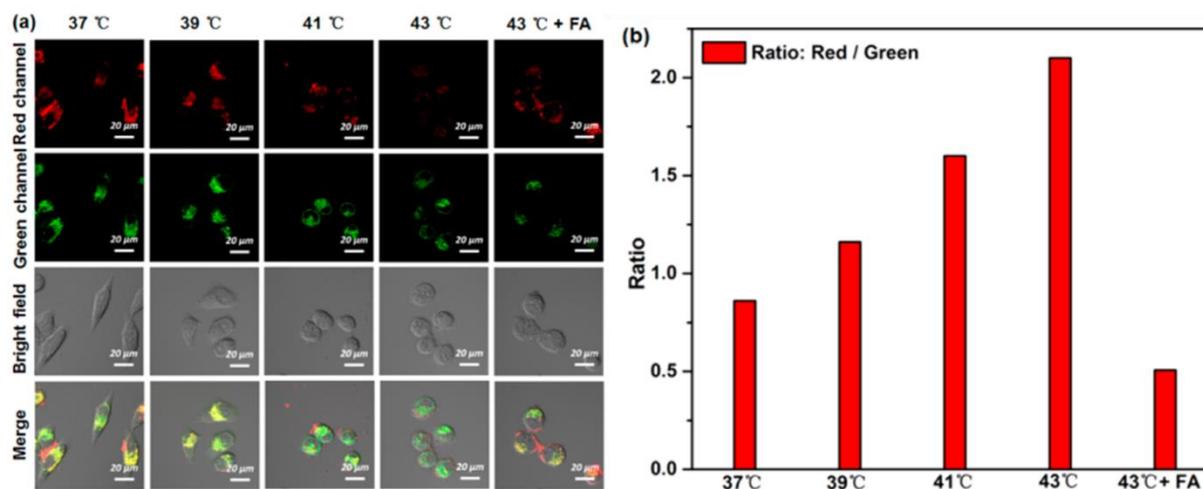


Figure I.40 a) Image confocal de cellules HeLa après irradiation UV, b) ratio entre la forme rouge et verte en fonction de la température.

Enfin l'alternance entre l'émission rouge et verte peut entraîner des clignotements contrôlés permettant alors l'utilisation de microscopie de super-résolution. Chai *et coll.* ont mis en évidence la robustesse de ce système en ciblant une protéine de HSA au sein de cellules WI-38 et SKOV-3 passant d'une résolution de 1 μm à 80 nm.^[88]

BODIPYs

Quelques exemples de BODIPYs ayant des propriétés de photo-conversion ont été décrits. Zhang *et coll.* ont décrit un BODIPY sur lequel ils ont ajouté un groupement indolenine lié à un ortho-nitrobenzyl. Sous l'effet d'une irradiation à 350 nm absorbée par l'ortho-nitrobenzyl, ce dernier est expulsé et permet à l'indolenine de se conjuguer avec le reste du BODIPY entraînant un effet bathochrome (Figure I.41). Le BODIPY converti est peu photo-stable et photo-blanchit rapidement constituant ainsi un système OFF/ON/OFF. Par conséquent, dans leurs travaux les auteurs montrent que l'utilisation de ce BODIPY permet d'effectuer de la microscopie de super résolution sur des lysosomes et d'obtenir leurs trajectoires avec une résolution spatiale de 15 nm.

[89]

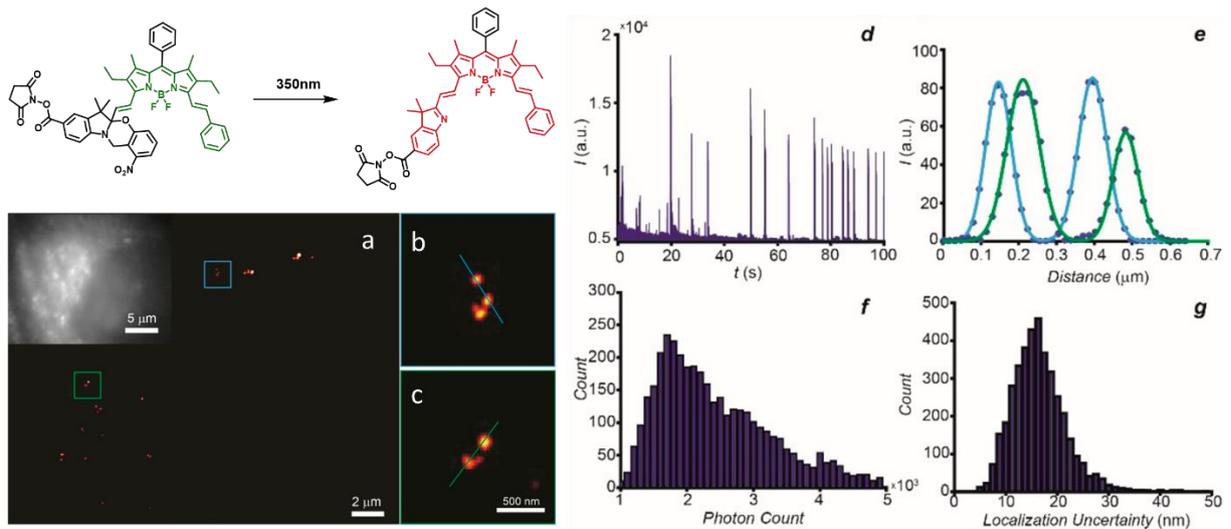


Figure I.41 a) Épifluorescence (insert) et microscopie de super résolution des lysosomes de cellule COS-7, b-c) zoom des zones encadrées, d) représentation des clignotements d'une molécule après photo-activation, e) intensité de fluorescence le long des lignes sur les zooms b et c, f) nombre de photons après photo-activation, g) incertitude de localisation.^[89]

Ensuite, Gong *et coll.* ont synthétisé un dimère de BODIPY séparé par un pont sulfoxyde. Ce dimère possède une absorption maximale à 490 nm et émet à 590 nm. Sous irradiation à 532 nm le pont sulfoxyde subit une réaction d'extrusion de soufre entraînant un nouveau dimère de BODIPYs qui se trouvent mieux conjugués entre eux. Cette photo-conversion engendre un effet bathochrome de 105 nm en absorption et 145 nm en émission. Les auteurs ont alors ajouté des groupements morpholine sur le dimère afin d'obtenir un marquage lysosomal et pu effectuer des photo-conversions *in cellulo* (Figure I.42).^[90]

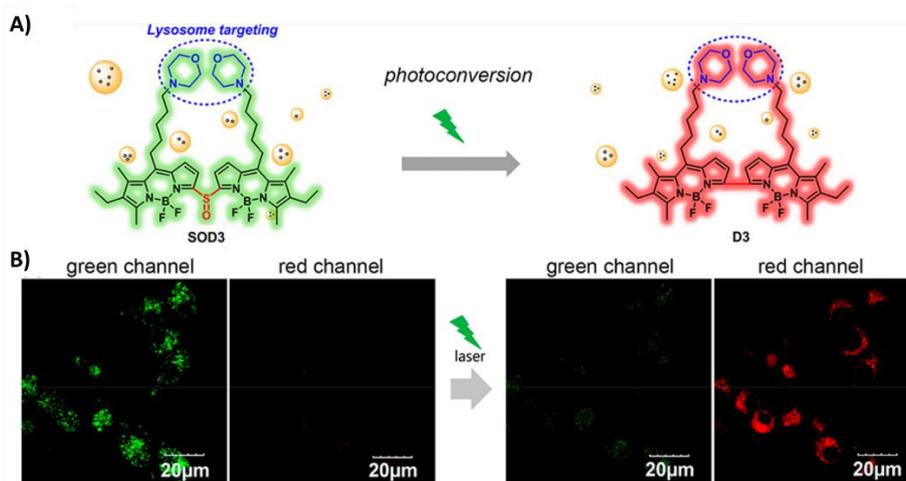


Figure I.42 Schéma de la photo-conversion du dimère de BODIPYs, B) Images confocal du marquage lysosomal de cellules RAW264.7 avant et après irradiation laser^[90]

En 2007, Freundt *et coll.* publient une lettre à l'éditeur afin de mettre en garde les lecteurs quant à l'utilisation d'une sonde lysosomale commerciale et bien connue, LysoTracker Red. Dans cette lettre les auteurs montrent que le LysoTracker Red présente des propriétés de photo-conversion menant à une nouvelle espèce aux propriétés spectrales semblables au LysoTracker Green (Figure I.43).^[91]

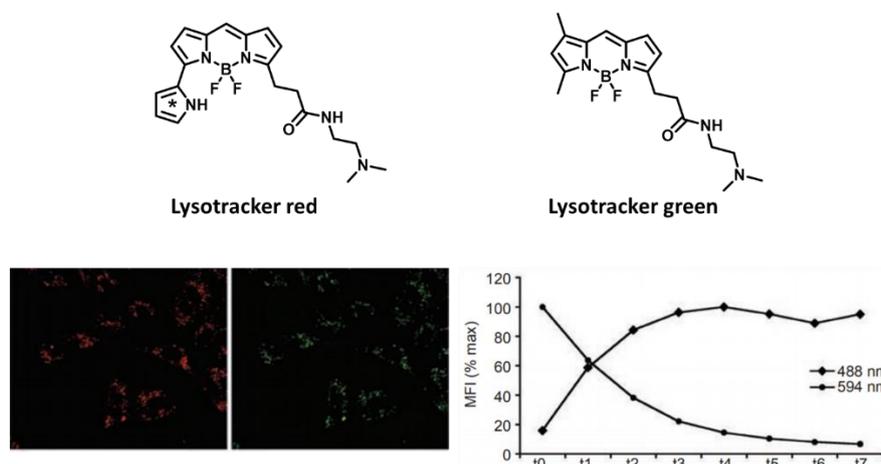


Figure I.43 Conversion du lysoTracker red^[91]

La différence entre le LysoTracker Red et Green étant la présence d'un pyrrole en position α du BODIPY, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une réduction ou une tautomérie survenait au niveau du pyrrole amenant une déaromatation de ce dernier. En effet, le pyrrole étant aromatique et conjugué au BODIPY, la déaromatation entraînerait un effet hypsochrome et le passage de la couleur rouge au vert. Les auteurs mettent alors en garde les lecteurs sur l'utilisation du LysoTracker Red pour des études de colocalisation, notamment lorsque celui-ci est employé avec des protéines fusionnées à la eGFP émettant dans le même canal que le photo-produit du LysoTracker Red.

I.5. Contexte de la thèse

Bien qu'elles aient des propriétés intéressantes, les molécules présentées précédemment peuvent souffrir de certains inconvénients comme : la faible brillance des formes converties et non converties, de faibles rendements de conversion, l'utilisation de rayonnements UV cytotoxiques, une sensibilité à certains constituants cellulaires. De plus, beaucoup des mécanismes qui régissent ces phénomènes de photo-conversion ne sont pas applicables à d'autres familles de fluorophores empêchant ainsi de facilement varier les propriétés spectrales des sondes photo-convertibles.

L'observation faite sur le LysoTracker red a particulièrement retenu l'attention du Dr Mayeul Collot, en effet, Freundt et coll. suggèrent dans cette publication que le pyrrole puisse être responsable de la conversion observée. Le pyrrole étant une molécule aromatique, sa conjugaison

avec un fluorophore entraîne une bathochromie, ensuite, s'il se déaromatise sous l'effet d'une photoirradiation une hypochromie doit avoir lieu.

Afin de confirmer cette hypothèse, Mayeul Collot a synthétisé deux pyrrolloBODIPYs semblables au LysoTracker Red, ciblant la membrane plasmique et les mitochondries (Figure I.44). Il a alors pu constater que ces sondes photo-convertissaient efficacement *in cellulo* en utilisant un microscope confocal. Ensuite, avec l'aide de la Dr Lydia Danglot, il a pu tester ces sondes en microscopie de super résolution sur des neurones et obtenu des résultats très encourageants.

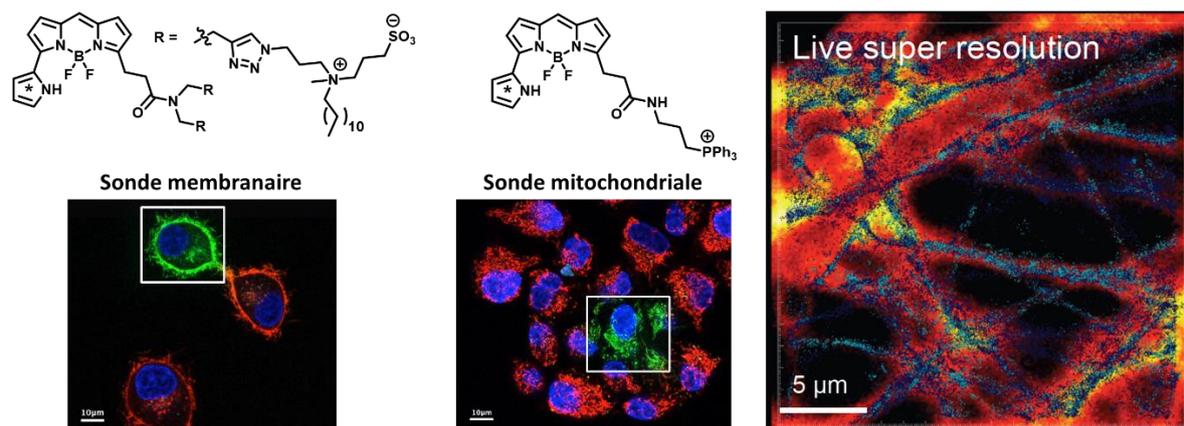


Figure I.44 Photoconversion au sein de la membrane et des mitochondries de cellules KB

Ces résultats préliminaires ont mené à une ANR JCJC en 2019 intitulé *Dual-Color Photoswitchable Fluorescent Probes For Advanced Bioimaging*.

Le projet se découpe en trois parties :

- La synthèse de nouvelles sondes photo-convertibles à partir de différentes familles de fluorophore comme les BODIPYs en incorporant le pyrrole ainsi que des groupements ciblant différentes organelles. D'autres groupements que le pyrrole pourront être utilisés afin de comprendre si cette propriété est unique à cet hétérocycle.
- L'étude des molécules synthétisées du point de vue de leurs propriétés de photo-conversion. Cette étude devra mener à la compréhension du mécanisme de photo-conversion.
- L'utilisation en microscopie de fluorescence conventionnelle et de super-résolution sur différentes organelles ainsi qu'avec différentes couleurs pour étendre les applications de ces nouveaux photo-convertisseurs.

Chapitre II. Coumarines photo-convertibles

II.1. Famille des coumarines

La famille des coumarines (Figure II.1) est une famille de fluorophores très largement utilisée pour ses propriétés de fluorescence. Elles présentent de bons rendements quantiques de fluorescence ainsi qu'un large déplacement de Stokes intéressant pour des applications en bioimagerie.^[92] On trouve ces molécules dans de nombreuses applications telles que les colorants laser,^[93] les cellules solaires photovoltaïques,^[94] les sondes fluorescentes^[95] et même la chimie médicinale.^[96]

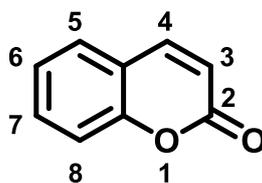


Figure II.1 Structure moléculaire et numérotation de la coumarine

Ces molécules sont aisément synthétisables en grande quantité, la coumarine fut d'ailleurs l'une des premières synthèses d'aromatiques, obtenue par William Perkin en 1868.^[97] C'est également un composé que l'on peut trouver dans de nombreuses plantes telles que la fève tonka, l'aspérule odorante ou bien la flouve odorante ; elle est aussi responsable de l'odeur du foin coupé.

La possibilité d'obtenir ces molécules en grande quantité en fait des candidats de choix pour notre étude de photo-conversion, car de nombreux analogues peuvent être obtenus à faibles coûts. De plus, l'étude sur une autre famille que celle des BODIPYs permet de déterminer si le pyrrole peut conférer des propriétés de photo-conversion à d'autres fluorophores. Ensuite, les coumarines possèdent de nombreux avantages pour des études biologiques comme leur faible masse molaire, une faible toxicité et de nombreuses voies de fonctionnalisation permettant la modulation des propriétés physico-chimiques.

La molécule de coumarine non fonctionnalisée absorbe et émet dans l'UV. Afin d'obtenir une coumarine émettant dans le visible, il est courant d'ajouter un groupement amine en position 7, amenant à une absorption à 374 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $30\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$,^[98] ainsi qu'à une émission à 460 nm, puis d'étendre l'aromaticité en position 3 ou 4.

La 7-diéthylaminocoumarine est obtenue à partir du 4-diéthylaminosalicylaldehyde et de l'acide de Meldrum via une condensation de Knoevenagel à l'aide de la pipéridine puis d'une cyclisation intramoléculaire amenant à l'acide 7-diéthylaminocoumarine-3-carboxylique. Ce dernier est

ensuite décarboxylé à l'aide d'un reflux de $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (17%) avec un rendement global de 64% (Figure II.2).

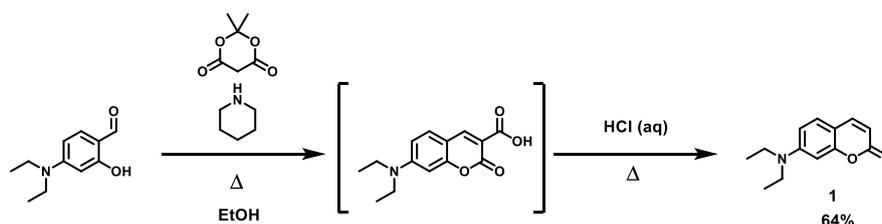


Figure II.2 Synthèse de la 7-diéthylaminocoumarine

II.2. Choix de l'aromatique

L'incorporation de différents cycles aromatiques a été décidée afin de déterminer ceux qui conféraient des propriétés de photo-conversion et de vérifier si le pyrrole engendre toujours cette propriété. Les premiers candidats sélectionnés ont été des analogues du pyrrole, le thiophène et le furane, dans lesquels seul l'hétéroatome diffère. Ensuite, un groupement anisole a également été choisi comme modèle d'aromatique donneur d'électrons. Comme le pyrrole présente un proton pouvant être impliqué dans une liaison hydrogène et peut donc se comporter différemment que le furane, le thiophène et l'anisole, le pyrrole choisit a été le N-méthylpyrrole. Ces différents groupements seront introduits sous forme de styryls à l'aide de la réaction de Wittig.

II.2.1. Synthèse

La 7-diéthylaminocoumarine a été formylée à l'aide d'une réaction de Vilsmeier-Haack avec un rendement de 79% (Figure II.3).

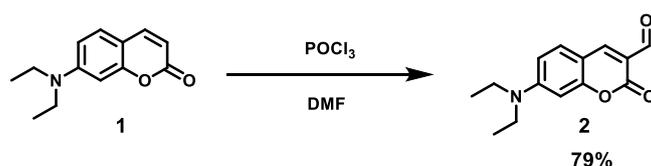


Figure II.3 Synthèse de la coumarine formylée

Les phosphoniums du thiophène et de l'anisole ont été obtenus commercialement, tandis que celui du furane a été synthétisé à partir du furfural qui a subi une réduction avec NaBH_4 puis a été mis en présence de bromure de triphénylphosphonium (HBrPPh_3) pour être obtenu avec un rendement de 63%. Malheureusement, en suivant le même protocole, la version pyrrole a été obtenue avec un très faible rendement. En effet, le pyrrole est très sensible en milieu acide ce qui a provoqué beaucoup de dégradation du composé réduit, donnant lieu à un rendement de 7% (Figure II.4).

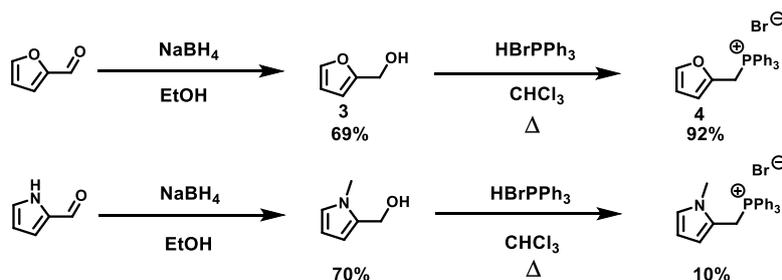
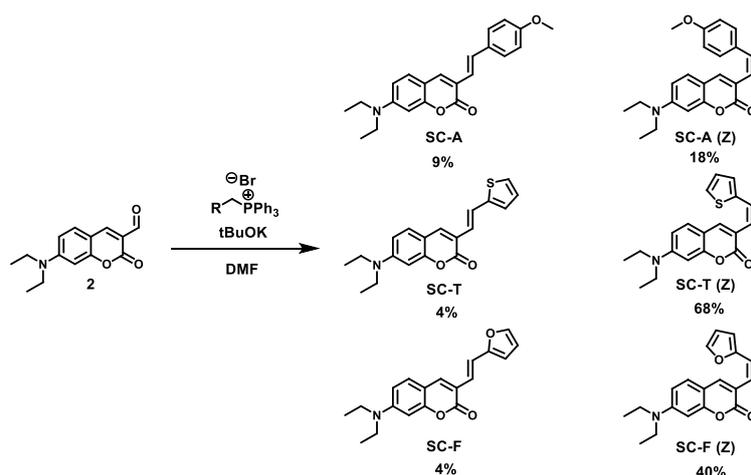
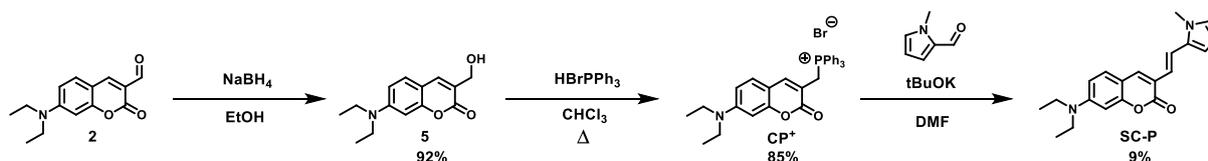


Figure II.4 Synthèse des dérivés phosphoniums du furane et du pyrrole

Une fois les phosphoniums obtenus, ils ont été engagés dans des réactions de Wittig afin de donner **SC-F** (StyrylCoumarine-Furan), **SC-T** (StyrylCoumarine-Tiophène) et **SC-A** (StyrylCoumarine-Anisole). Les isomères Z et E ont été obtenus et séparés (Figure II.5). La réaction de Wittig passe par un intermédiaire ylure qui, selon sa stabilité, définit la stéréosélectivité.^[99] Les isomères Z sont les produits majoritairement obtenus indiquant que les ylures intermédiaires sont non stabilisés même s'ils sont conjugués avec un aromatique. En effet, les aromatiques utilisés sont riches en électrons ne permettant pas de suffisamment stabiliser l'ylure.

Figure II.5 Voies de synthèse des coumarines **SC-A**, **SC-T** et **SC-F**

Pour la version pyrrole, la réaction de Wittig a été abordée différemment, tout d'abord la coumarine formylée a été réduite par NaBH_4 puis transformée en sel de phosphonium à l'aide de HBrPPh_3 et enfin engagée avec le 1-Méthylpyrrole-2-carbaldéhyde pour donner **SC-P** (StyrylCoumarine-Pyrrole) (Figure II.6).

Figure II.6 Synthèse de **SC-P**

Si ces molécules photo-convertissent, l'espèce obtenue doit posséder des propriétés spectrales semblables à une coumarine vinylée **SC-V** (StyrylCoumarine-Vinyl), car la conjugaison doit être rompue au niveau de l'aromatique introduit. Il a ainsi été décidé de synthétiser ce modèle à partir de la coumarine formylée et du bromure de Méthyltriphenylphosphonium via une réaction de Wittig (Figure II.7).

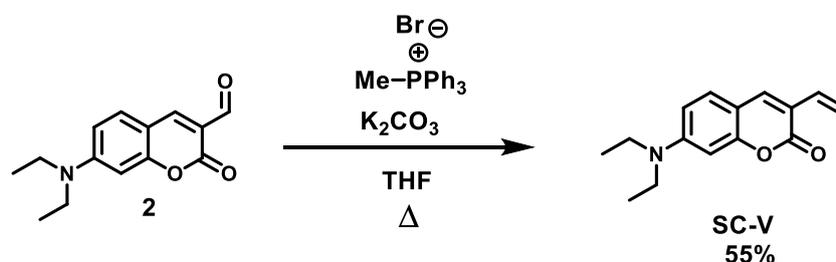


Figure II.7 Synthèse de **SC-V**

Tous les composés synthétisés ont été caractérisés par ^1H RMN, ^{13}C RMN et spectroscopie de masse.

II.2.2. Caractérisations spectroscopiques

Absorption et émission

Les propriétés photo-physiques de toutes ces coumarines ont été évaluées dans le toluène, l'acétate d'éthyle, le DMSO et le méthanol (Figure II.8) afin d'observer une possible solvatochromie. Seuls les isomères E sont présentés, car leurs analogues Z photo-convertissaient en isomères E rendant l'étude plus compliquée.

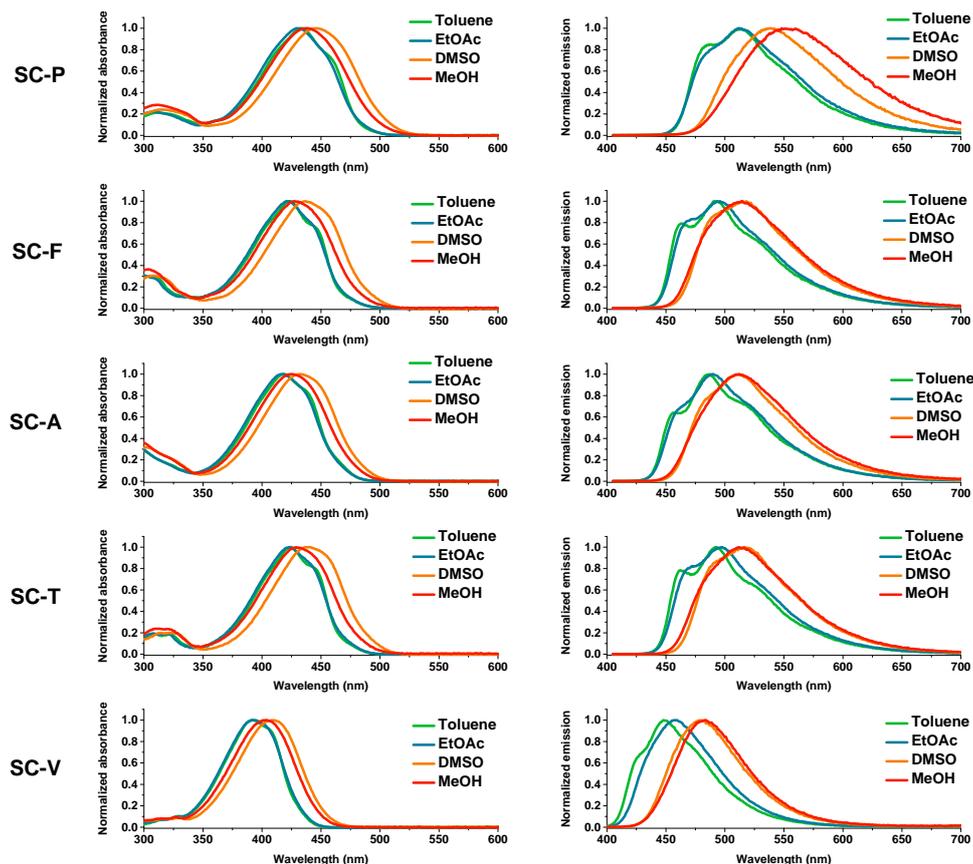


Figure II.8 Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) normalisés des **SCs** dans différents solvants à 5 μM . Les spectres d'émission ont été obtenus avec une excitation à 400 nm pour **SC-P**, **SC-F**, **SC-A**, **SC-T** et à 370 nm pour **SC-V**

Les propriétés d'absorption et d'émission ont été résumées dans le tableau II.1. Ces coumarines présentent de fortes brillances, entre 24 000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour **SC-P** dans le MeOH et 43 900 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour **SC-P** dans le DMSO. **SC-F**, **SC-T** et **SC-A** montrent toutes les trois des propriétés semblables, 425 nm d'absorption maximale et 500 nm d'émission maximale tandis que **SC-P** présente une absorption maximale à 440 nm et une émission maximale à 530 nm suggérant un effet bathochrome supérieur avec le pyrrole qu'avec les autres aromatiques. **SC-V**, quant à elle, est deux fois moins brillante et présente une absorption maximale à 400 nm et une émission maximale à 467 nm dénotant l'effet de la conjugaison des cycles aromatiques avec le cœur coumarine. Tous ces composés montrent une légère solvatochromie d'environ 15 nm entre le EtOAc et le DMSO dans leurs spectres d'absorption mais également d'émission (35 nm entre le toluène et le MeOH).

SC-P	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_F (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	434	56 200	511	75	42 100
EtOAc	430	55 600	512	68	37 800
DMSO	445	51 000	539	86	43 900
MeOH	438	49 000	551	49	24 000
SC-F	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_F (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	423	49 400	491	74	36 500
EtOAc	421	46 800	496	72	33 700
DMSO	437	45 000	518	88	39 600
MeOH	428	40 000	514	72	28 800
SC-T	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_F (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	425	54 400	492	64	34 800
EtOAc	423	51 800	497	62	32 100
DMSO	439	47 400	517	87	41 200
MeOH	429	46 400	512	65	30 200
SC-A	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_F (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	418	44 800	487	80	35 800
EtOAc	418	43 700	490	77	33 600
DMSO	432	44 780	512	89	39 900
MeOH	425	41 960	512	77	32 300
SC-V	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_F (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	392	30 300	448	82	24 800
EtOAc	393	27 600	457	79	21 800
DMSO	410	29 800	480	87	25 900
MeOH	403	24 500	483	79	19 400

Tableau II.1 Propriétés photo-physiques des SCs, $B = \epsilon \times \phi_F$

Photo-conversion

Des solutions de ces coumarines à 5 μM dans le MeOH ont ensuite été irradiées à l'aide d'un laser à 488 nm avec une irradiance de 33,3 $mW.cm^{-2}$ dans une cuvette de 45 μL , afin que la totalité de l'échantillon soit soumise au rayonnement. Des spectres d'émission acquis à 405 nm et 488 nm ont été relevés au cours du temps. Tout d'abord, avec **SC-P** (Figure II.9).

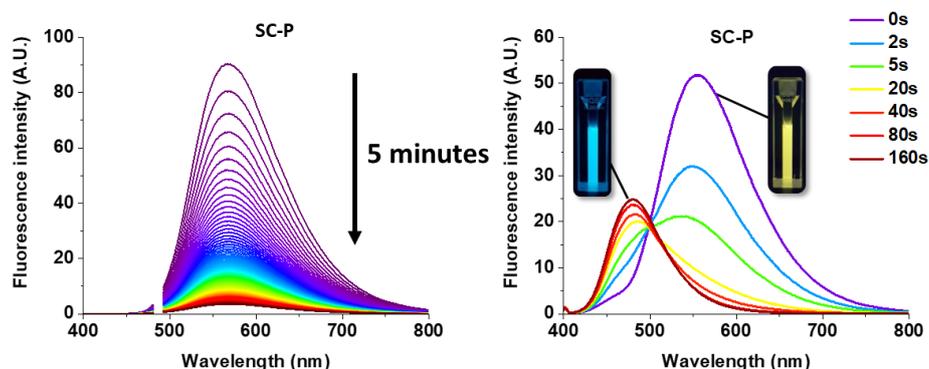


Figure II.9 Spectres d'émission de **SC-P** (5 μM) avec excitation à 488 nm (gauche) et 405 nm (droite) au cours du temps sous irradiation à 488 nm (33 $mW.cm^{-2}$). Les images incrustées sont des photos de cuvettes contenant les solutions de **SC-P** prises sous lampe UV (365 nm) avant et après conversion.

Ces spectres d'émission montrent la diminution de la fluorescence à 551 nm et une augmentation à 483 nm semblable à **SC-V**, dénotant ainsi le phénomène de photo-conversion. La même expérience a ensuite été conduite avec **SC-F** (Figure II.10).

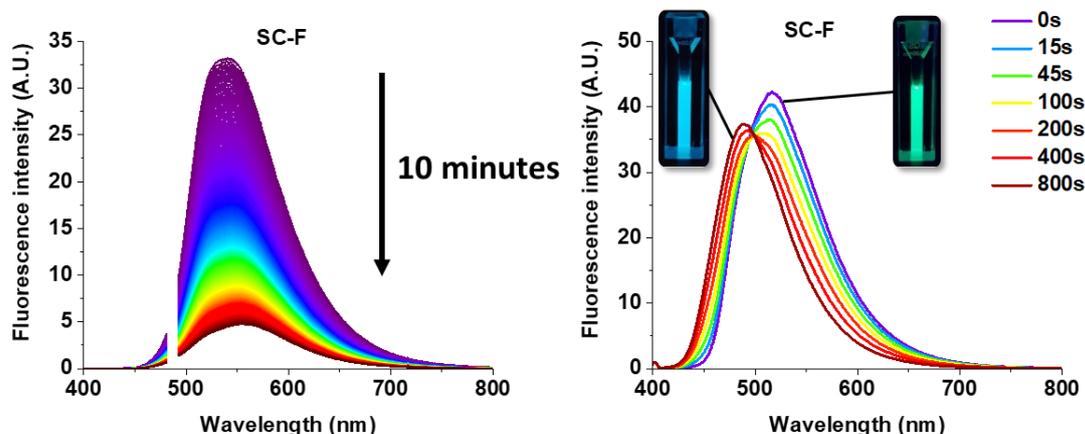


Figure II.10 Spectres d'émission de **SC-F** ($5 \mu\text{M}$) avec excitation à 488 nm (gauche) et 405 nm (droite) au cours du temps sous irradiation à 488 nm ($33\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les images incrustées sont des cuvettes sous lampe UV (365 nm) de **SC-F** avant et après conversion.

De façon inattendue, **SC-F** présente également une propriété de photo-conversion avec une diminution de sa fluorescence à 514 nm et une augmentation de son émission à 486 nm semblable à celle de **SC-V**. Enfin, **SC-T** et **SC-A** ont été irradiées dans les mêmes conditions (Figure II.11).

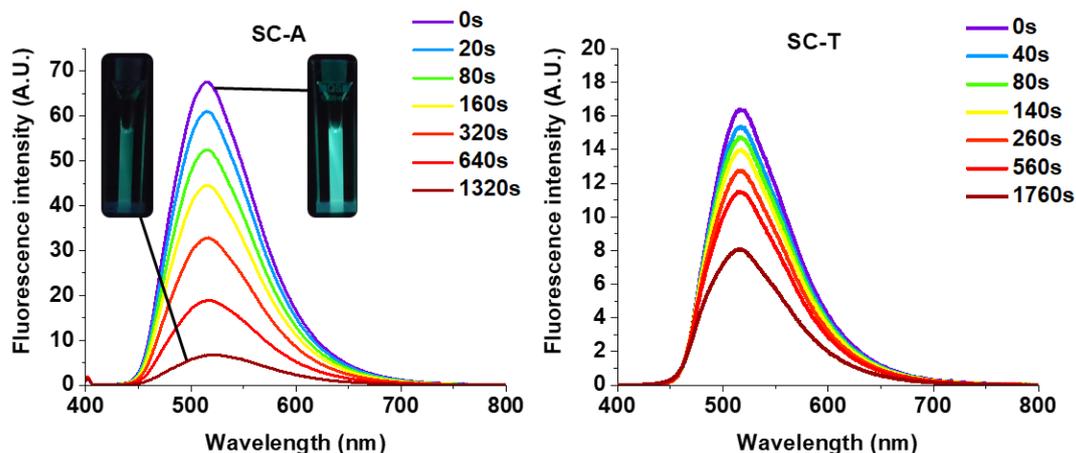


Figure II.11 Spectres d'émission de **SC-A** ($5 \mu\text{M}$) (gauche) et **SC-T** ($5 \mu\text{M}$) (droite) avec excitation à 405 nm au cours du temps sous irradiation à 488 nm ($33\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les images incrustées sont des cuvettes sous lampe UV (365 nm) de **SC-A** avant et après irradiation.

Contrairement à **SC-P** et **SC-F** qui présentent une propriété de photo-conversion, **SC-T** et **SC-A** ne présentent pas de caractère photo-convertible mais montrent plutôt un photo-blanchiment sans variation de longueurs d'onde maximale d'émission au cours du temps. Cette première étude

indique que tous les cycles aromatiques n'engendrent pas à des propriétés photo-conversion mais que le furane et le pyrrole possèdent une réactivité différente amenant à cette caractéristique. Afin de caractériser les photo-produits de **SC-P** et **SC-F**, respectivement **cSC-P** et **cSC-F**, des analyses HPLC avant et après conversion ont été faites (Figure II.12).

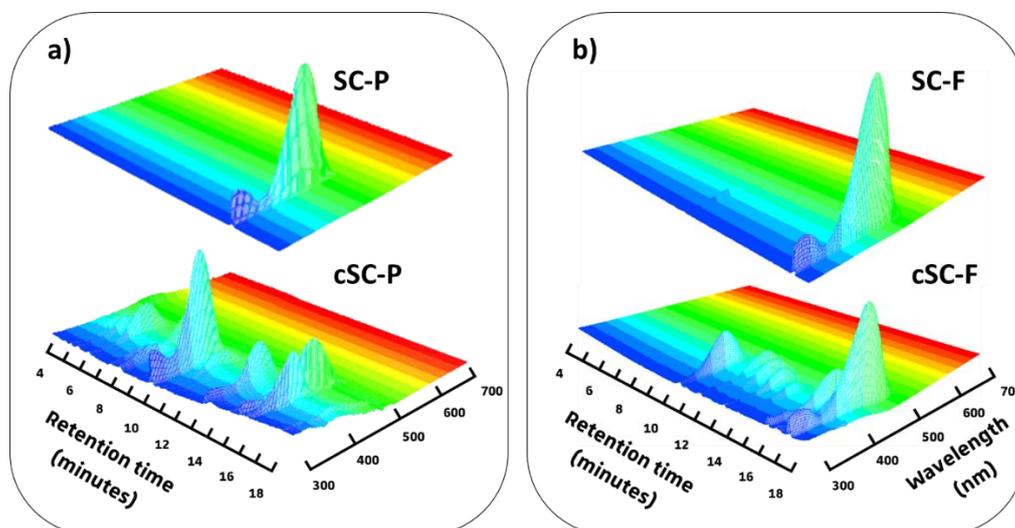


Figure II.12 Analyses 3D HPLC-UV-Visible de **SC-P** et **SC-F** avant (haut) et après conversion (bas)

Ces analyses HPLC montrent la disparition du produit de départ avec l'apparition de nombreux photo-produits. Ces photo-produits présentent, pour la plupart, des spectres d'absorption semblables à celui du modèle **SC-V**. De plus, les spectres d'excitation des molécules converties concordent également avec le spectre d'excitation de **SC-V**, renforçant l'hypothèse d'un changement de structure uniquement au niveau du furane pour **cSC-F** et du pyrrole pour **cSC-P** (Figure II.13).

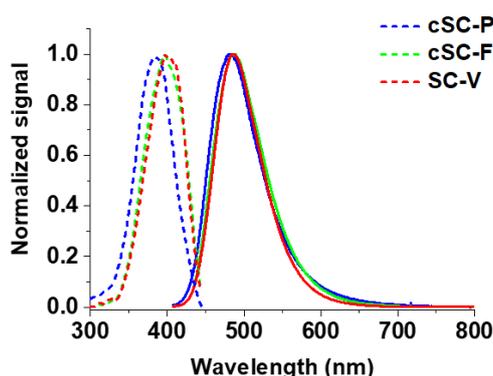


Figure II.13 Spectre d'excitation en trait pointillé (émission à 450 nm) et d'émission en trait plein (excitation à 405 nm) de **cSC-P**, **cSC-F** et **SC-V**.

SC-P et **SC-F** montrent toutes deux des propriétés de photo-conversion ; toutefois, cette photo-conversion nécessite une étude approfondie. Il est essentiel d'obtenir avec précision des

informations sur leur vitesse de conversion, rendement de conversion, stabilité, etc. À partir des expériences de photo-conversion effectuées (Figure II.14), il est possible d'obtenir ces informations.

Sous irradiation, deux types de photo-produits peuvent être obtenus : des molécules émissives semblables spectralement à **SC-V**, et des molécules non émissives résultant d'un photo-blanchiment. La première voie est décrite par deux valeurs, le rendement quantique de photo-conversion (φ_{Pc}), c'est-à-dire le ratio entre les photo-produits émissifs et les molécules excitées, et le rendement chimique de conversion (η), c'est-à-dire le ratio entre la quantité de photo-produits émissifs après irradiation et la quantité de molécules avant irradiation. La seconde voie est décrite par le rendement quantique de photo-blanchiment (φ_{Bi}), c'est-à-dire le ratio entre les photo-produits non émissifs et les molécules excitées. La grandeur caractérisant ces deux voies simultanément est le rendement quantique de photo-transformation (φ_{Pt}), elle est en fait la somme de φ_{Pc} et φ_{Bi} et dénote de la photo-sensibilité globale des molécules. Dans le cas de molécules non photo-convertibles φ_{Pt} est égale à φ_{Bi} (Figure II.14).

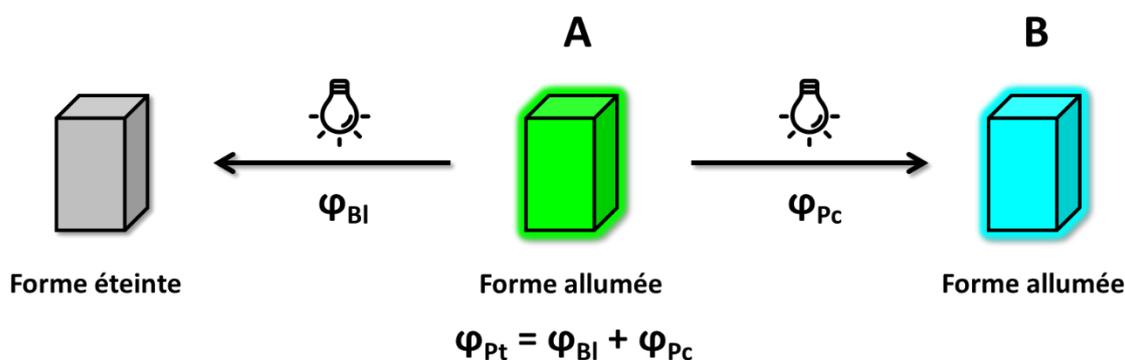


Figure II.14 Schéma de photo-conversion d'un fluorophore

Les expériences de photo-conversion sont effectuées à haute dilution (5 μM ou moins) afin de 1) éviter des effets d'écran, c'est-à-dire que l'excitation laser ne soit pas homogène dans l'échantillon à cause d'une trop forte absorbance des molécules présentes dans les premiers millimètres de la cuvette et 2) éviter des réactions intermoléculaires. Les expériences sont également effectuées dans de faibles volumes (45 μL), afin que l'entièreté de l'échantillon subisse la même excitation. Ces deux contraintes amènent à des quantités de matière trop faibles pour effectuer des analyses quantitatives comme la RMN. De plus, la multitude de photo-produits rend une éventuelle purification très compliquée, amenant l'obtention du rendement chimique impossible dans ces conditions. Pour pallier ce problème, il a été imaginé d'utiliser la similarité des propriétés photo-physiques entre les photo-produits émissifs et le modèle **SC-V** et de comparer les spectres d'émission avant et après conversion pour obtenir ce rendement. Le détail de cette méthode est

décrit dans le Chapitre V. Ce procédé amène, d'une certaine manière, à un rendement des propriétés spectrales, c'est-à-dire de supposer que si la molécule obtenue est **SC-V** alors le rendement chimique est de 10% si l'intensité de fluorescence est dix fois plus faible que ne l'aurait été **SC-V** dans ces conditions d'excitation.

Le rendement quantique de photo-transformation est un facteur clef à obtenir, car s'il est trop élevé la simple observation de la molécule en microscopie conduira à sa photo-transformation. Au contraire, s'il est trop faible, la photo-transformation nécessitera une forte irradiation pouvant lourdement endommager les cellules. Le rendement chimique, quant à lui, rendra compte de la quantité de formes converties produites et donc de l'augmentation de fluorescence dans le canal des photo-produits émissifs. Enfin, le rendement quantique de photo-blanchiment de la forme convertie donnera une idée de la durée pendant laquelle la molécule convertie pourra être observée avant son photo-blanchiment. Les valeurs obtenues pour les différentes molécules sont présentées dans le tableau II.2.

Composé	Φ_{Pt} (%)	Φ_{Pc} (%)	Φ_{Bl} (%)	η (%)
SC-P	$2 \pm 0.4 \cdot 10^{-1}$	$6.0 \pm 1 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \pm 0.3 \cdot 10^{-1}$	30 ± 1
SC-F	$1.17 \pm 0.03 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \pm 0.1 \cdot 10^{-2}$	$8 \pm 4 \cdot 10^{-4}$	97 ± 9
SC-A	$2 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	N/A	$2 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	N/A
SC-T	$3.0 \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$	N/A	$3.0 \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$	N/A
SC-V	$4 \pm 2 \cdot 10^{-3}$	N/A	$4 \pm 2 \cdot 10^{-3}$	N/A
cSC-P	$1.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$	N/A	$1.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$	N/A
cSC-F	$1.7 \pm 0.3 \cdot 10^{-3}$	N/A	$1.7 \pm 0.3 \cdot 10^{-3}$	N/A

Tableau II.2 Propriétés photo-physiques de conversion des **SCs** obtenues dans le MeOH

Le rendement quantique de photo-transformation de **SC-P** est du même ordre de grandeur que celui des équivalents protéines comme mKikGR ($7,5 \cdot 10^{-10}\%$)^[100], rendant cette molécule utilisable au même titre que ces protéines. **SC-F**, quant à elle, possède un φ_{Pt} 10 fois plus faible que celui de **SC-P**, dénotant une plus forte stabilité du furane que du pyrrole vis-à-vis de la photo-transformation. Il est à noter que les molécules converties (**cSCs**), ainsi que celles ne présentant pas de propriétés de conversion (**SC-A**, **SC-T**), possèdent des rendements quantiques de photo-transformation semblables entre eux et plus faibles que ceux convertissant. Cela indique que la présence du pyrrole et du furane augmente la réactivité de la molécule vis-à-vis de l'irradiation laser. Les formes converties émissives **cSC-P** et **cSC-F** sont toutes les deux plus stables que le modèle **SC-V** permettant une observation prolongée de ces nouvelles formes avant photo-blanchiment. Les rendements chimiques de conversion sont très élevés par rapport à ceux décrits dans la littérature,^[67] en particulier pour **SC-F** qui semble être quantitatif malgré de nombreux photo-produits. Cela implique, soit que les photo-produits sont tous émissifs comme **SC-V**, soit

que certains ne sont pas émissifs et d'autres présentent une forte brillance. D'un point de vue des propriétés de photo-conversion, **SC-F** montre de meilleurs résultats que **SC-P**, toutefois, un paramètre important est la valeur du déplacement hypsochrome de cette conversion. Sur la figure II.10, les spectres d'émission de **SC-F** et **cSC-F** se recouvrent fortement, ce qui peut être délétère en microscopie de fluorescence. C'est pourquoi **SC-P** sera choisi pour la suite des études spectroscopiques et en imagerie cellulaire, malgré son plus faible rendement chimique de photo-conversion.

II.3. Mécanisme DPIC

Après avoir déterminé les constantes photo-physiques caractérisant la photo-conversion de **SC-P** et de **SC-F**, le mécanisme régissant cette photo-conversion doit être élucidé.

Masse des photo-produits

Contrairement au thiophène et à l'anisole, le furane et le pyrrole sont connus pour réagir avec l'oxygène singulet. Il est alors possible que l'oxygène singulet généré via la désexcitation de l'état triplet du fluorophore par l'oxygène triplet de **SC-P** et **SC-F** entraîne l'oxydation du furane et du pyrrole respectivement. Cette oxydation peut survenir via une réaction de Diels-Alder ou via une cyclo-addition 2+2 générant plusieurs produits (Figure II.15).^[101]

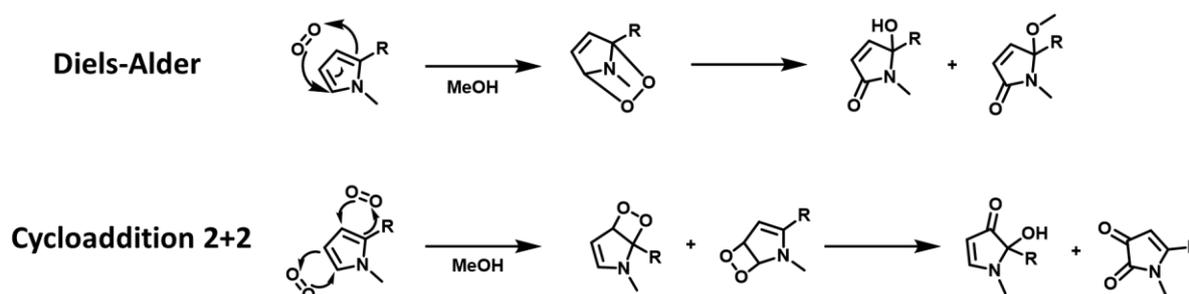


Figure II.15 Mécanisme d'oxydation du pyrrole via une réaction de Diels-Alder ou via une cycloaddition 2+2

Cette oxydation entraînerait une rupture de la conjugaison entre les aromatiques sensibles à l'oxygène singulet (pyrrole et furane) et le cœur coumarine. L'analyse des échantillons convertis en analyse HRMS suggère effectivement ce mécanisme. Dans la figure II.16 sont répertoriées les masses observées ainsi que des structures proposées en accord avec la littérature des formes oxydées du furane et pyrrole. ^[102,103]

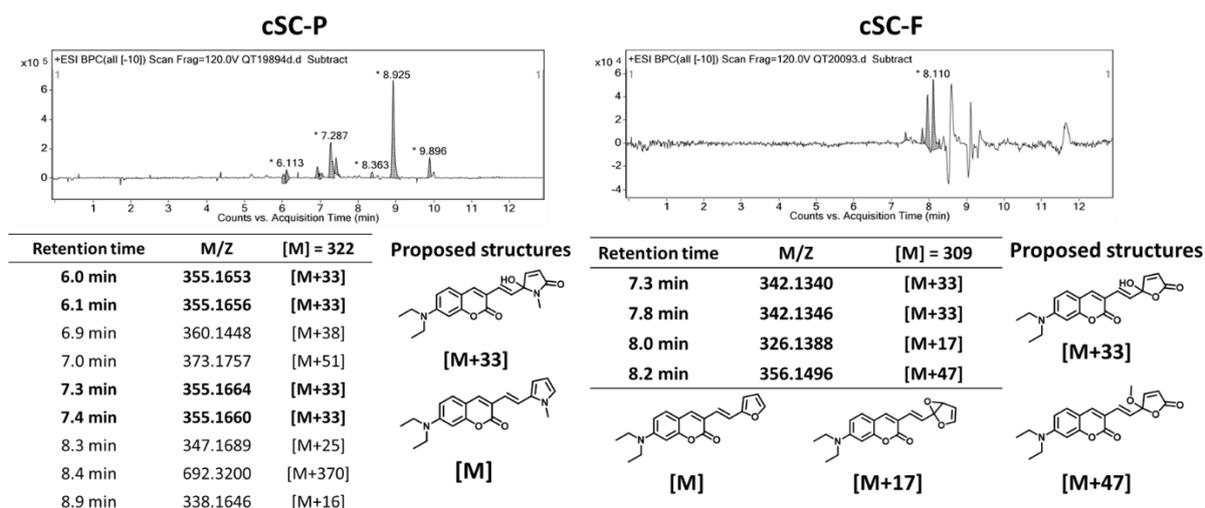


Figure II.16 Analyses HRMS de **cSC-P** et **cSC-F** avec propositions de structure selon la masse des pics

Toutefois, il n'est pas exclu que de telles variations de masse soient également présentes pour **SC-A** et **SC-T** après irradiation. Ces deux composés ont été également analysés en HRMS (Figure II.17).

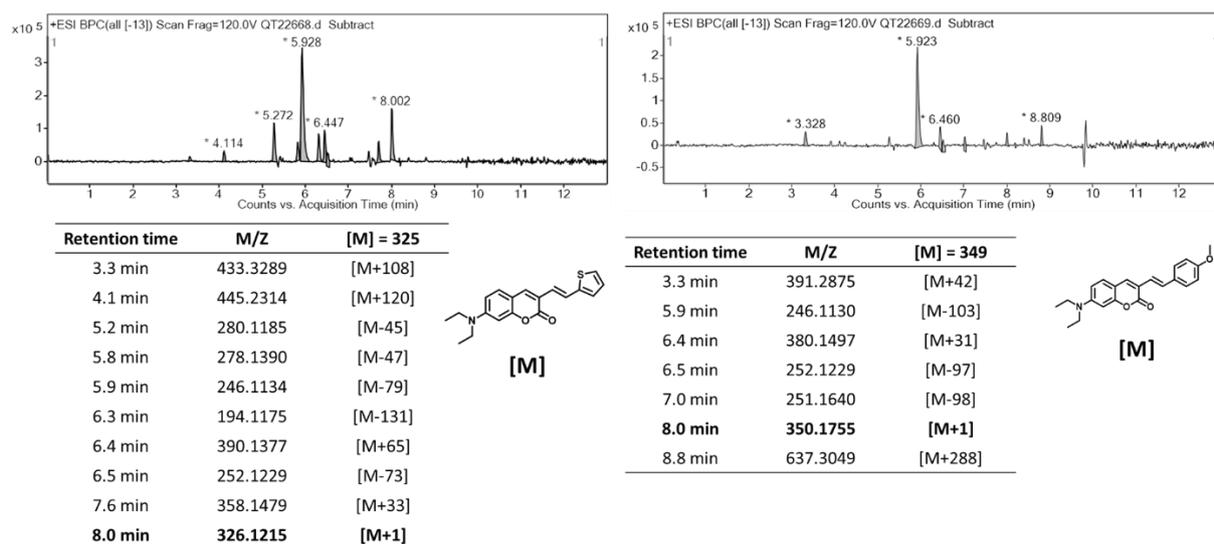


Figure II.17 Analyses HRMS de **cSC-T** et **cSC-A** avec la masse des pics

Les photo-produits obtenus montrent également des oxydations avec des masses correspondant à $[M+nO_2]$ mais aussi des masses plus faibles indiquant des destructions des molécules. De plus, les photo-produits ne montrent pas une absorption et une émission semblables à **SC-V** suggérant que ces oxydations et ruptures de liaisons se trouvent sur le cœur coumarine et non sur le thiophène ou l'anisole.

Influence de l'oxygène

Les analyses HRMS suggèrent l'oxydation par l'oxygène singulet mais d'autres espèces d'oxygène réactives existent et pourraient mener au même résultat. En effet, comme décrit dans

l'introduction, l'oxygène singlet peut être généré à partir de l'état triplet T_1 d'un fluorophore et de l'oxygène triplet. Cependant, à partir de l'oxygène triplet un transfert d'électrons peut être possible et entraîne la production de radical superoxyde. À partir de ce radical superoxyde, de nombreuses autres espèces réactives de l'oxygène peuvent apparaître, en particulier en milieu protique (Figure II.18).^[104]

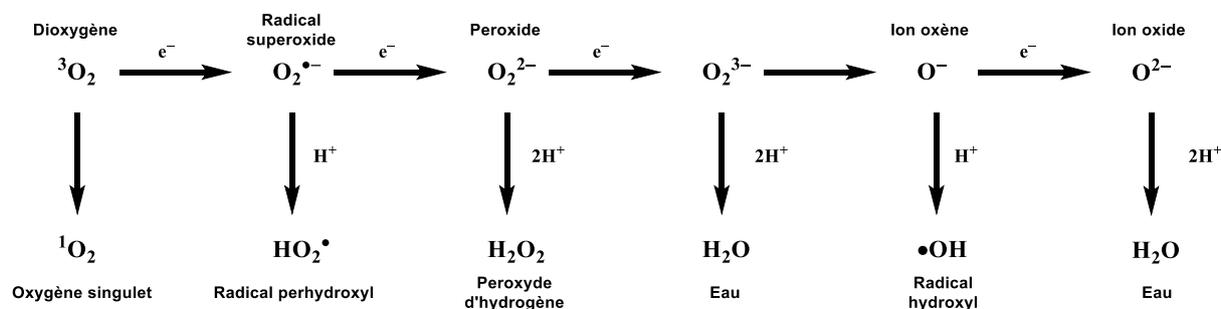


Figure II.18 Génération d'espèces réactives de l'oxygène

Tout d'abord, afin de confirmer l'implication de l'oxygène dans le mécanisme, la photo-conversion a été effectuée en cuvette dans du MeOH dégazé au préalable par de l'argon (Figure II.19).

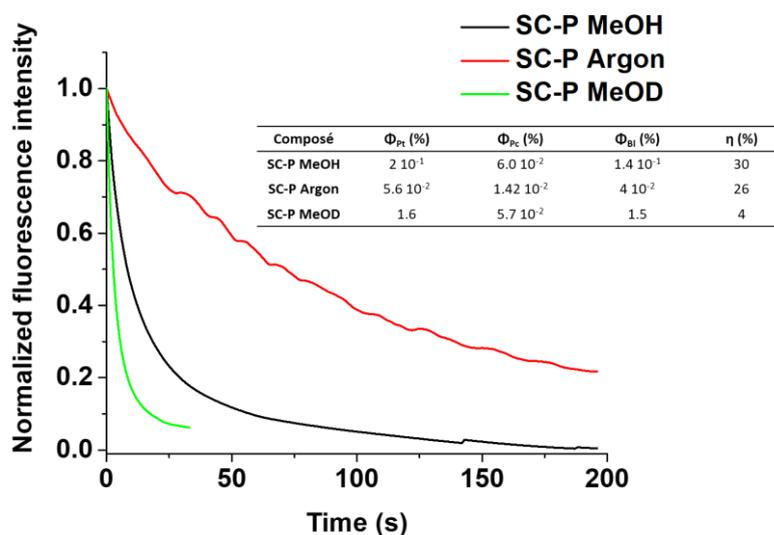


Figure II.19 Photo-conversion de SC-P dans différentes conditions et leurs constantes de photo-conversion associées

Le rendement quantique de photo-transformation (Φ_{Pt}) de l'expérience sous argon a été divisé par quatre par rapport à celui correspondant à l'expérience non dégazée. Un point intéressant est que le rendement quantique de photo-conversion (Φ_{Pc}) a également été divisé par quatre, impliquant que le rendement chimique de la réaction reste inchangé. Cette observation dénote que l'oxygène est seul responsable du mécanisme, car si d'autres agents étaient impliqués, la diminution de la quantité d'oxygène devrait favoriser d'autres mécanismes qui ont peu de chance d'amener

également à une hypsochromie. Ensuite, l'expérience a été menée dans le MeOD, celui-ci augmente d'un facteur 20 le temps de vie de l'oxygène singulet par rapport au MeOH, et augmente donc les chances qu'il oxyde le pyrrole une fois généré.^[105] Dans ce solvant deutéré, **SC-P** photo-convertit dix fois plus vite indiquant bien l'influence de l'oxygène singulet, mais présente cette fois un rendement chimique de 4% au lieu de 30% obtenu dans le MeOH. Cette diminution peut s'expliquer par le fait que l'oxygène singulet diffuse plus longtemps dans le milieu que dans le MeOH et peut réagir avec **cSC-P** et conduire à son blanchiment.

Tous les fluorophores peuvent présenter un croisement intersystème pouvant conduire à la génération d'oxygène singulet. Toutefois, tous n'en génèrent pas dans les mêmes quantités. Afin de déterminer le rendement quantique de génération d'oxygène singulet (ϕ_Δ), il est courant d'utiliser le 1,3-Diphénylisobenzofuran (DPBF).^[106] Le DPBF est un benzofuran très sensible aux diénophiles qui s'oxyde en o-dibenzoylbenzene (ODB) en particulier en présence d'oxygène singulet (Figure II.20).^[107]

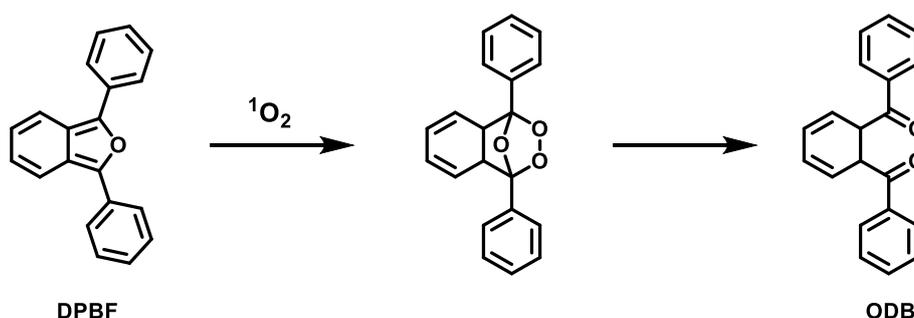


Figure II.20 Mécanisme d'oxydation du DPBF

Le DPBF absorbe à 400 nm tandis que le ODB absorbe uniquement dans l'UV, ainsi, le suivi de l'absorbance à 400 nm permet de suivre la concentration en DPBF au cours du temps et donc d'évaluer la quantité d'oxygène singulet présent. Afin de déterminer le rendement quantique de génération d'oxygène singulet de **SC-P**, elle a été mélangée avec le DPBF et mise sous irradiation laser. Les spectres d'absorption et d'émission ont été relevés au cours du temps (Figure II.21).

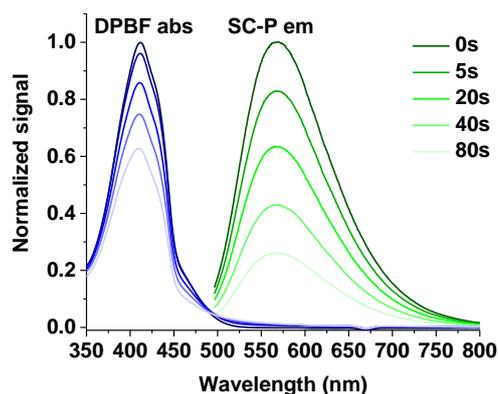


Figure II.21 Spectres d'absorption et d'émission (excitation à 480 nm) de **SC-P** ($5\mu\text{M}$) avec du **DPBF** ($100\mu\text{M}$) au cours du temps sous irradiation à 488 nm

Au cours de l'irradiation laser, l'absorbance à 400 nm diminue indiquant que le DPBF est consommé suggérant la présence d'oxygène singulet. Le rendement quantique de génération d'oxygène singulet n'a néanmoins pu être déterminé, en effet, l'intensité de fluorescence due à **SC-P** diminue également dénotant de sa photo-transformation. Cette diminution de fluorescence montre qu'il y a une compétition entre l'oxydation du DPBF et de **SC-P** et rend alors l'obtention de ce rendement quantique impossible dans ces conditions.

Autres espèces réactives de l'oxygène

Le pyrrole est connu pour être oxydé par d'autres espèces que l'oxygène singulet.^[103] Dans l'optique de connaître quelles sont les espèces réactives de l'oxygène amenant à une conversion, plusieurs conditions générant ces espèces ont été testées sur **SC-P** (Figure II.22). L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) a été généré par une irradiation à 638 nm de l'aluminium phthalocyanine pendant 10s. Le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a été obtenu par la dissolution dans l'eau de KO_2 , l'ion hypochlorite (OCl^-) par la dissolution de NaOCl , et enfin le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) par la dissolution de FeSO_4 avec H_2O_2 . Deux expériences contrôles ont également été réalisées, une positive avec l'irradiation de **SC-P** à 488 nm ($h\nu$), et une négative où **SC-P** est laissé dans l'obscurité (Dark).

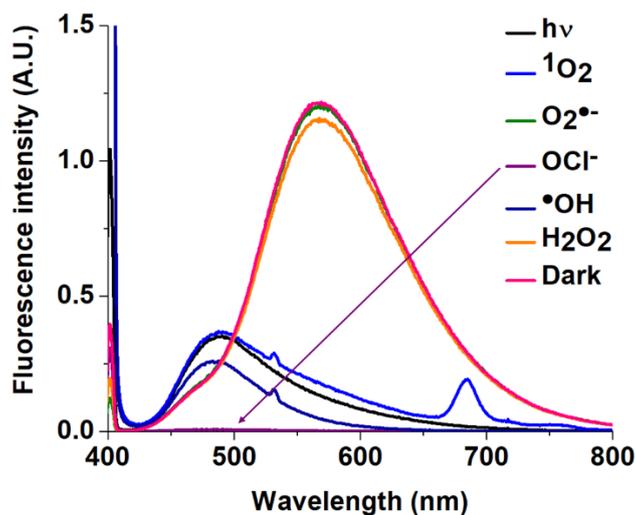


Figure II.22 Spectre d'émission de **SC-P** en présence de différentes espèces réactives de l'oxygène ainsi que sous irradiation et dans le noir

Ces résultats montrent que seuls l'irradiation de **SC-P**, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles entraînent une conversion. La question se pose alors de savoir si **SC-P** génère des radicaux hydroxyles pouvant être responsables de la photo-conversion. Afin d'observer la présence de radicaux hydroxyles, l'utilisation de l'hydroxyphenyl fluorescéine (HPF) est nécessaire, en effet, cette fluorescéine est fonctionnalisée avec un phényle empêchant la présence du phénolate permettant la fluorescence. La présence de radicaux hydroxyles libère la fluorescéine du phényle entraînant une augmentation de fluorescence d'un facteur 700 (Figure II.23).^[108]

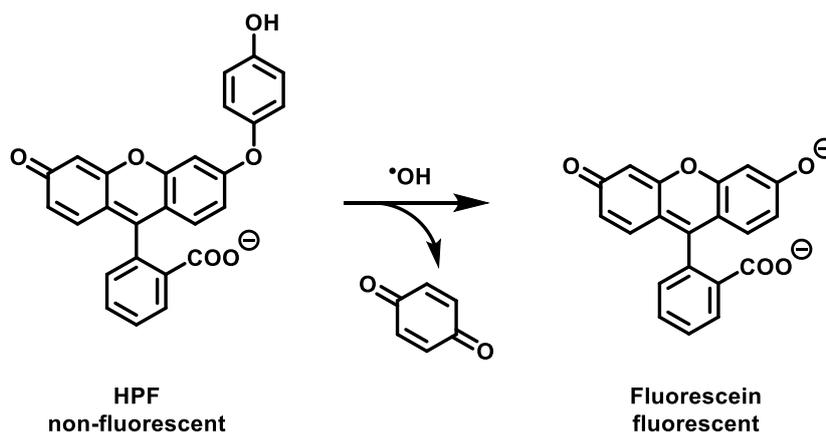


Figure II.23 Fonctionnement de la sonde à radicaux hydroxyles HPF

SC-P a donc été mis en présence de HPF et irradié. HPF a également été irradiée seule afin de vérifier si son excitation ne libérait pas également la fluorescéine (Figure II.24).

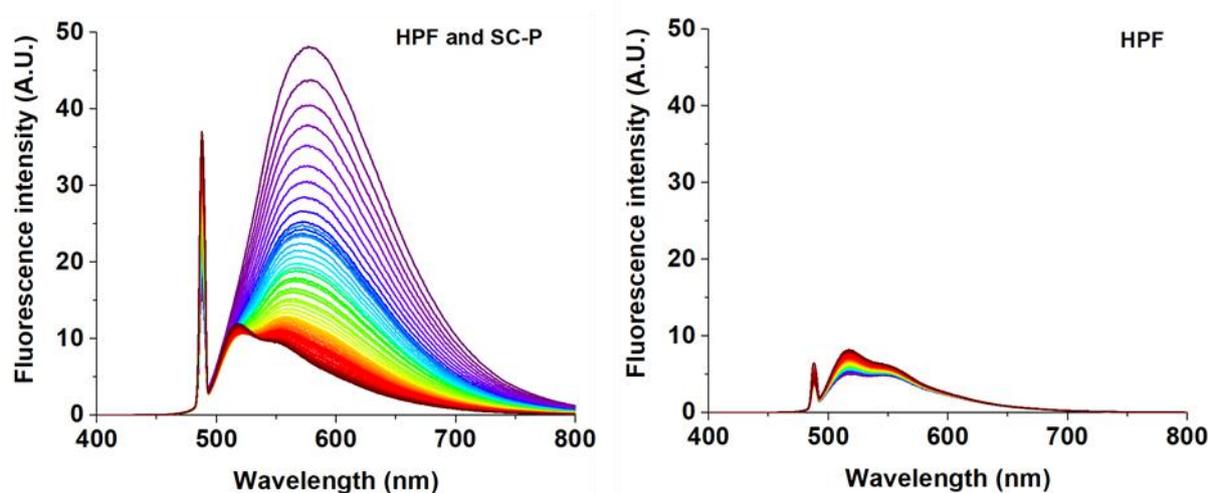


Figure II.24 Spectre d'émission de HPF en présence (gauche) et en absence (droite) de SC-P sous irradiation à 488 nm

Le signal de fluorescence de HPF en présence et en absence de **SC-P** n'a pas sensiblement augmenté au cours de l'irradiation suggérant que ni HPF ni **SC-P** ne génère des radicaux hydroxyles.

Ces résultats montrent que **SC-P** réagit avec $\cdot\text{OH}$ mais n'en génère pas ; seul l'oxygène singlet est responsable de la conversion.

DPIC

Tous ces contrôles permettent de dresser avec précision le mécanisme à l'origine de ces photoconversions observées avec **SC-P** et **SC-F** (Figure II.25).

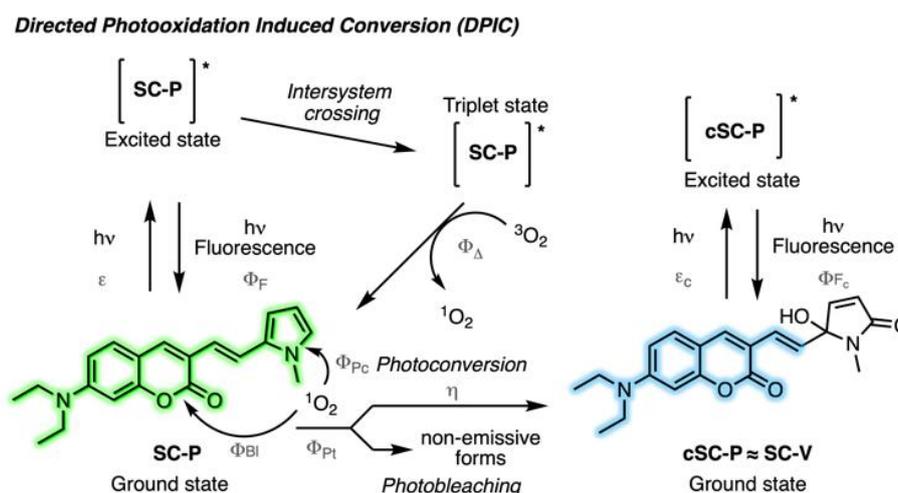


Figure II.25 Mécanisme du DPIC

Tout d'abord, le fluorophore absorbe un photon (caractérisé par ϵ) et entre dans son état excité. À partir de cet état, il peut 1) se désexciter de manière non radiative, 2) se désexciter avec

émission d'un photon via la fluorescence (ϕ_F), 3) passer par un croisement intersystème amenant la molécule dans un état triplet. La molécule peut revenir à l'état singulet fondamental par un transfert d'énergie vers l'oxygène triplet, l'excitant sous forme d'oxygène singulet (ϕ_Δ). Une fois cet oxygène singulet présent, il peut réagir avec le fluorophore et entraîner soit sa destruction via une oxydation sur le cœur aromatique, c'est le photo-blanchiment (ϕ_{BI}), soit l'oxydation du groupement aromatique sensible à l'oxygène singulet, dans notre cas le pyrrole, amenant à une rupture partielle du système conjugué et donc à une hypsochromie, c'est la photo-conversion (ϕ_{PC}). La molécule, une fois convertie, est alors un nouveau fluorophore pouvant à son tour absorber (ϵ_c) et émettre des photons (ϕ_{Fc}). Ce nouveau mécanisme de photo-conversion a été appelé : Conversion induite par photo-oxydation dirigée (en Anglais : **DPIC**, pour *Directed Photo-oxydation Induced Conversion*), et repose sur la conjugaison d'un fluorophore avec une entité aromatique réactive à l'oxygène singulet (en Anglais : **ASORM**, pour *Aromatic Singlet Oxygen Reactiv Moeity*). Il est donc important d'obtenir toutes ces valeurs, afin de comprendre de quelle manière les modifications structurelles influencent ce mécanisme et sur quelles étapes.

II.4. Microscopie

Afin de démontrer ses potentielles applications en bioimagerie, **SC-P** a été engagée dans des expériences d'imagerie cellulaires (Figure II.26). Les cellules ont tout d'abord été marquées par MBCy5.5, une sonde bien connue au laboratoire permettant un marquage de la membrane plasmique. Ensuite, **SC-P** (1 μ M) a été incubée une heure avant d'être lavée. Trois canaux de microscopie ont été utilisés, un premier avec un laser 638 nm pour l'observation de MBCy5.5 (gris) sur la membrane, un deuxième utilisant un laser 488 nm pour **SC-P** (jaune) et un dernier avec un laser 405 nm pour **cSC-P** (cyan).

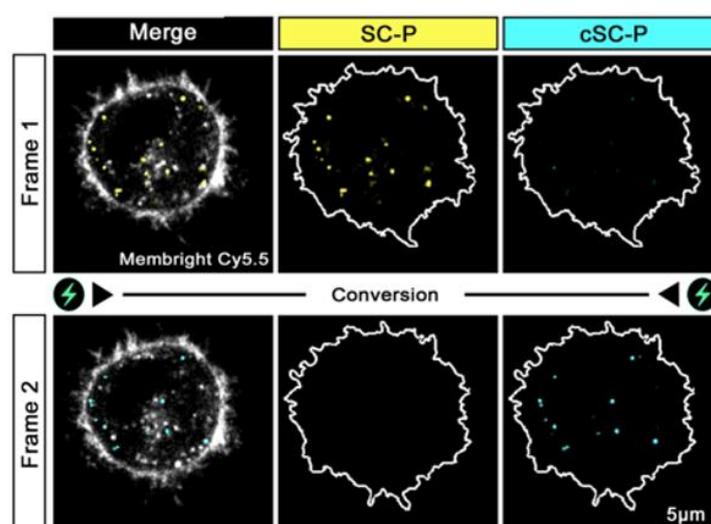


Figure II.26 Cellules *HeLa* marquées par MBCy5.5 et **SC-P** (1 μ M) avant (Frame 1) et après (Frame 2) conversion

Les premières images montrent la présence de **SC-P** à l'intérieur de la cellule sans présence de **cSC-P**, mettant en lumière à la fois la pénétration de la sonde au sein des cellules et le fait que cette internalisation n'engendre pas de conversion. Ensuite, l'irradiation de l'échantillon à forte puissance du laser à 488 nm par l'application de scans successifs en microscopie confocal utilisant un scan laser amène à la photo-conversion. En effet, après la forte irradiation (entre l'image 1 et 2), l'intensité diminue fortement dans le canal de **SC-P** en passant de 2,5 à 0,3 tandis que dans le canal de **cSC-P** il y a une augmentation de l'intensité qui passe de 0,15 à 0,30 (Figure II.27).

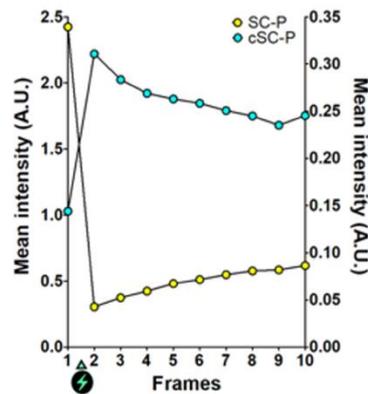


Figure II.27 Intensité de fluorescence dans les canaux **SC-P** et **cSC-P** au cours du temps

Ensuite, afin de montrer que la photo-conversion peut être sélective, trois cellules ont été observées simultanément, seule deux d'entre elles ont été irradiées fortement (Figure II.28). Seules les deux cellules irradiées présentent une photo-conversion significative démontrant ainsi un bon contrôle spatio-temporel de cette dernière.

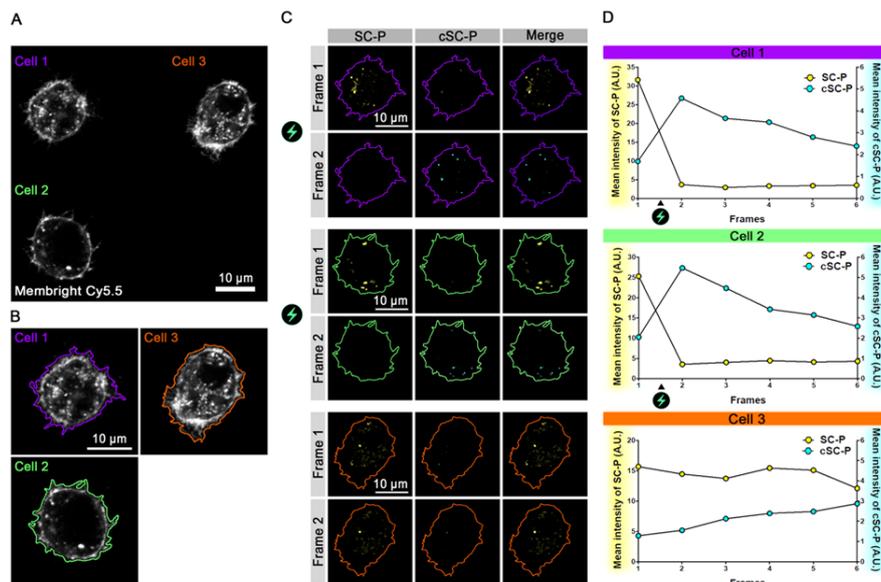


Figure II.28 a) Marquage par MBCy5.5 de trois cellules HeLa, b) Zone d'intérêt sélectionnée sur les cellules, c) Résultats de la photo-conversion montrée sur les deux premières images, d) Intensité de fluorescence relevée sur les trois cellules au cours du temps

Il est maintenant important de connaître dans quels endroits de la cellule cette sonde se dirige naturellement. Au vu de la forme des zones fluorescentes (sphériques et brillantes), il a été supposé que cette sonde cible les gouttelettes lipidiques. Afin de confirmer cette hypothèse, un co-marquage utilisant SMCy5.5, une sonde spécifique aux gouttelettes lipidiques, a été effectué (Figure II.29).^[21] Les fausses couleurs attribuées aux sondes sont les suivantes : **SC-P** jaune, **cSC-P** cyan, SMCy5.5 magenta. Ce marquage confirme l'hypothèse d'un marquage de gouttelettes lipidiques pour **SC-P** avec un taux d'association de 83%. De plus, la forme convertie **cSC-P** conserve ce marquage avec cette fois un taux d'association de 94%.

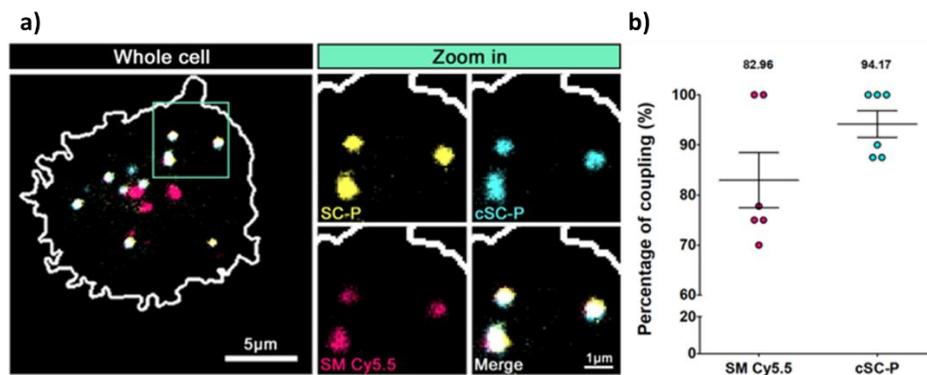


Figure II.29 Colocalisation de SC-P par un marquage des gouttelettes lipidiques. a) Co-marquage de SC-P, cSC-P avec SMCy5.5, b) taux d'association de SMCy5.5 et cSC-P avec SC-P sur six cellules indépendantes.

Enfin, comme le mécanisme DPIC requiert un fluorophore générant de l'oxygène singulet, il faut s'assurer que **SC-P** ne présente pas une photo-toxicité ainsi qu'une cytotoxicité. Un test MTT a été réalisé dans cette optique. Ce test consiste à déterminer la viabilité cellulaire sous différentes conditions. Les conditions testées sont la présence de **SC-P** sans irradiation et avec irradiation ainsi que l'irradiation d'une autre sonde des gouttelettes lipidiques, le BDP493. Ces conditions sont comparées à un contrôle positif, dans lequel il n'y a ni fluorophore ni irradiation lumineuse, ainsi qu'un contrôle négatif dans lequel du triton (détergeant cytotoxique) à 0.1% est ajouté. Pour effectuer l'irradiation, la LED d'un microscope a été utilisée avec un objectif 5x afin d'illuminer l'entièreté du puits. La conversion de **SC-P** dans ces conditions a été confirmée à l'aide d'un spectre d'émission effectué avec un lecteur de plaque avant et après l'irradiation, cette expérience montre de plus que **SC-P** ne convertit pas en l'absence de lumière dénotant l'absence d'oxygène singulet dans les gouttelettes lipidiques. Les résultats sont présentés figure II.30. Ce test montre que **SC-P** n'est ni cytotoxique (SC-P Dark) ni photo-toxique (SC-P Light), de plus, il montre que l'irradiation du BDP493 est plus toxique que ne l'est celle de **SC-P**.

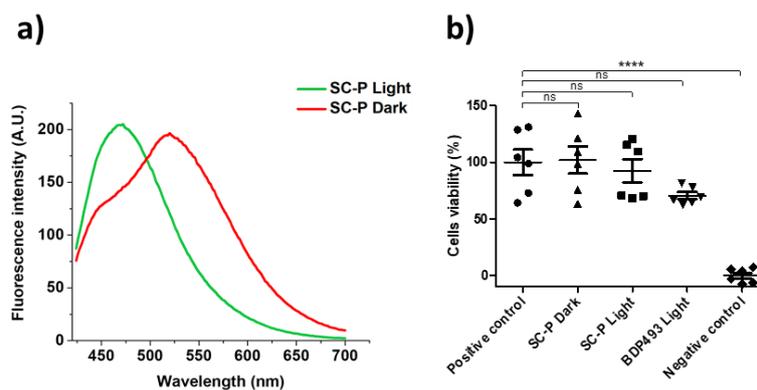


Figure II.30 Détermination de la cytotoxicité et photo-toxicité de **SC-P**. a) Spectre d'émission avec ou sans irradiation préalable dans les puits, b) Viabilité cellulaire en fonction des différentes conditions

II.5. N-alkylation du pyrrole

Après que le mécanisme de photo-conversion DPIC a été explicité et que deux fluorophores photo-convertibles ont été synthétisés, il a été décidé d'apporter des modifications sur le pyrrole afin d'observer les effets sur les propriétés de photo-conversion. L'azote porté par le pyrrole permet l'incorporation de différents groupements (Figure II.31). Tout d'abord, le pyrrole le plus simple portant un atome d'hydrogène (**SCP-H**) servira de référence. Ensuite, l'utilisation de groupements méthyl (**SCP-Me**), benzyl (**SCP-Bn**) et orthophénylbenzyl (**SC-OPB**), pour modifier la gêne stérique, ont été sélectionnés. Enfin, ont été choisis des groupements phényl (**SC-Ph**) afin de modifier les effets électroniques et des groupes électroattracteurs, tosyl (**SC-Tosyl**) et carbamate de tertbutyl (**SC-Boc**). Le travail de synthèse a été effectué en partie à l'aide d'une stagiaire en master 2, Mme Ophélie Dal Pra.

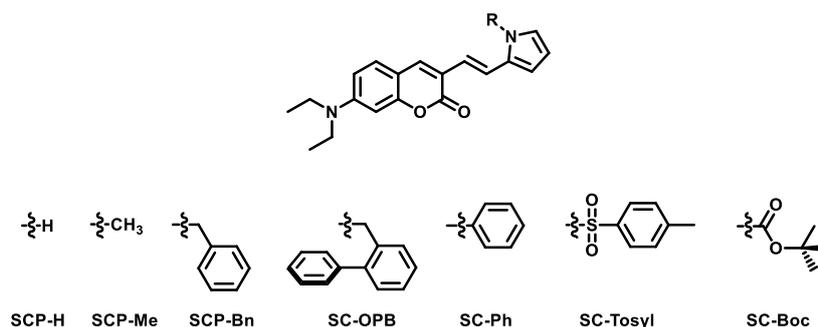


Figure II.31 Structures des différentes **SCPs** synthétisées

II.5.2. Synthèse

Comme précédemment, ces coumarines ont été synthétisées par une réaction de Wittig entre le sel de phosphonium **CP⁺** et des pyrrolocarboxaldehydes, **SCP-H**, quant à elle, a été obtenu par réaction du sel de phosphonium du pyrrole sur la coumarine formylée (Figure II.32). Les

rendements obtenus sont faibles, car les purifications étaient très compliquées, d'une part à cause de la présence d'isomères Z et E, et d'autre part à cause de la présence de nombreux produits de dégradation présents à cause de l'instabilité du pyrrole. Comme les isomères Z présentent des propriétés de photo-isomérisation, seuls les isomères E ont été isolés.

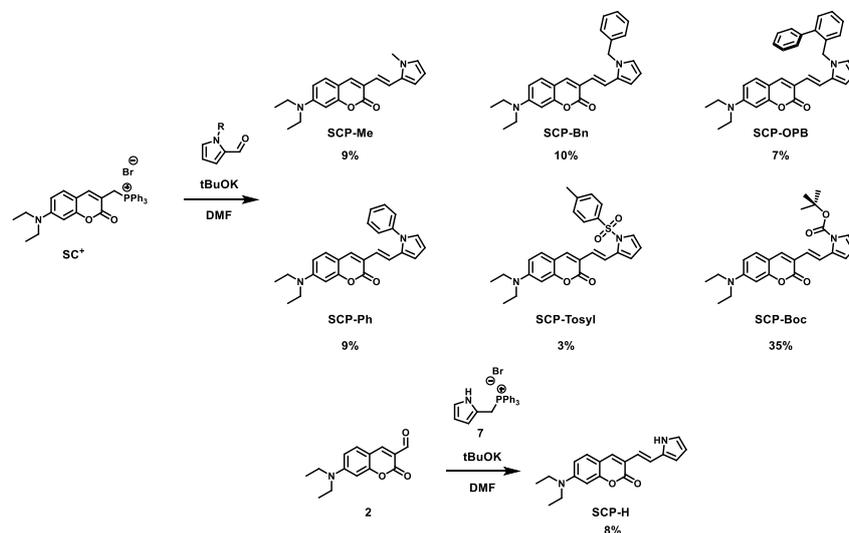


Figure II.32 Synthèse des différents **SCPs**

Tous les composés synthétisés ont été caractérisés par ¹H RMN, ¹³C RMN et spectroscopie de masse.

II.5.3. Caractérisation spectroscopique

Absorption et émission

Les propriétés d'absorption et d'émission de ces coumarines ont été obtenues dans différents solvants (Figure II.33) et sont résumées dans le tableau II.3.

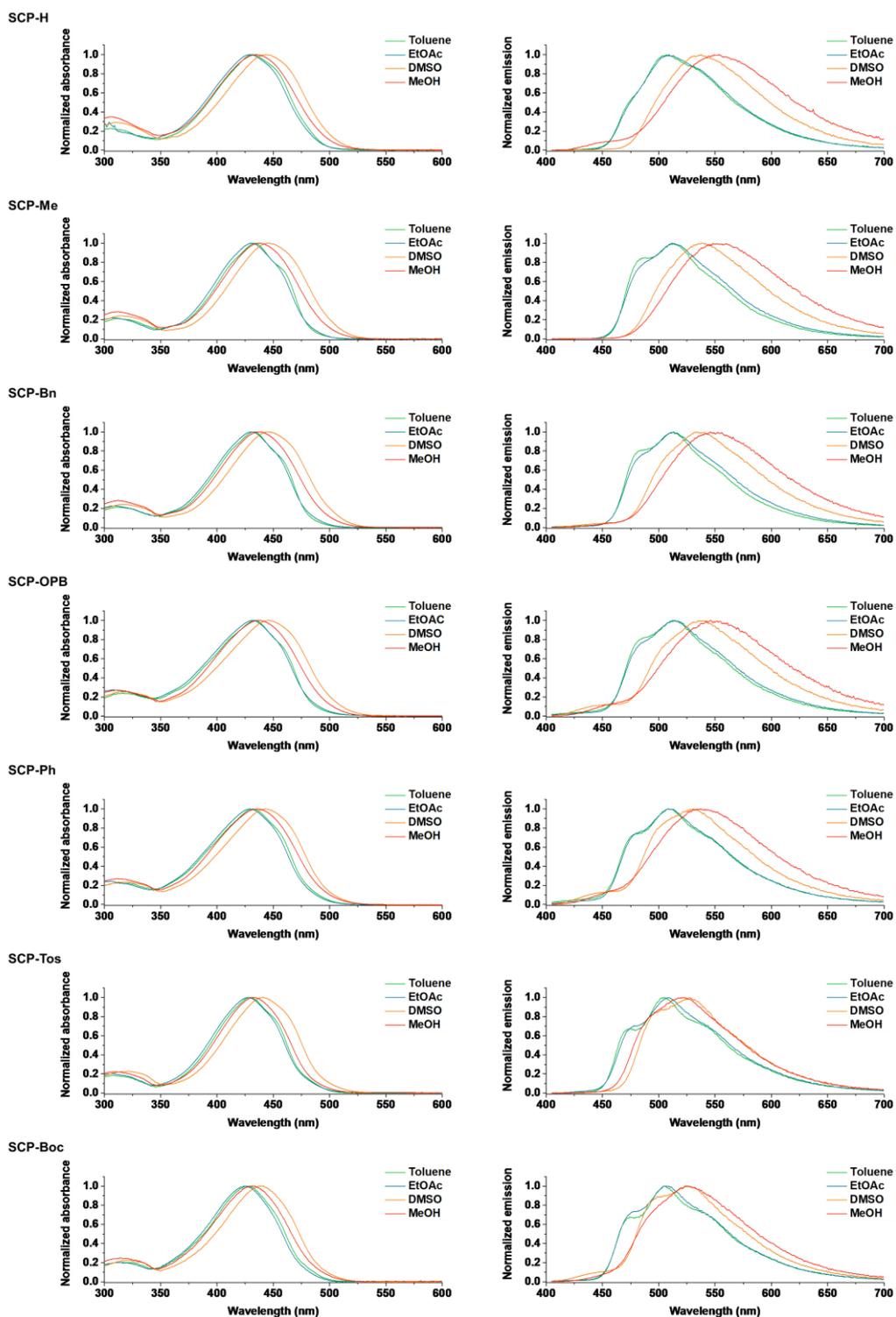


Figure II.33 Spectres d'absorption et d'émission des *SCPs*

SCP-Me	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	434	56 200	511	75	42 100
EtOAc	430	55 600	512	68	37 800
DMSO	445	51 000	539	86	43 900
MeOH	438	49 000	551	49	24 000

SCP-Bn	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	433	46 600	513	75	35 000
EtOAc	431	45 000	513	69	30 800
DMSO	446	41 600	534	81	33 700
MeOH	437	39 000	552	55	21 600

SCP-OPB	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	434	28 400	512	74	21 100
EtOAc	431	28 800	514	62	17 900
DMSO	446	28 000	537	70	19 500
MeOH	436	25 400	546	44	11 100

SCP-Ph	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	432	35 000	509	71	24 700
EtOAc	429	32 200	509	60	19 400
DMSO	443	33 600	531	75	25 300
MeOH	436	31 000	537	49	15 300

SCP-Tosyl	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	429	42 100	505	66	27 800
EtOAc	428	43 400	508	44	19 100
DMSO	441	41 300	527	48	19 800
MeOH	432	42 300	522	56	23 700

SCP-Boc	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	427	43 800	507	68	29 800
EtOAc	427	45 600	507	62	28 300
DMSO	440	46 000	526	78	35 900
MeOH	431	42 100	524	57	24 000

SCP-H	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Toluène	432	37 200	507	77	28 600
EtOAc	429	35 400	509	72	25 500
DMSO	443	33 600	538	93	31 200
MeOH	434	32 000	554	47	15 000

Tableau II.3 Propriétés d'absorption et d'émission des SCPs

Toutes ces coumarines possèdent des rendements quantiques de fluorescence élevés (de 44 à 93%) ainsi que de bons coefficients d'extinction molaire (de 25 400 à 55 600 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), amenant des brillances jusqu'à 43 900 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour **SCP-Me** dans le DMSO. La méthylation du pyrrole (**SCP-Me**) entraîne une augmentation de la brillance comparée à **SCP-H** grâce à des coefficients d'extinction molaire plus importants. L'encombrement du pyrrole, quant à lui, n'engendre pas une augmentation significative, voire diminue la brillance avec le groupe orthophénylbenzyl (**SCP-OPB**), sûrement dû aux possibles rotations et encombrements de ces groupes entraînant une diminution du coefficient d'extinction molaire. La N-arylation (**SCP-Ph**) n'entraîne pas non plus d'amélioration des propriétés de brillance, indiquant que l'aryle ne contribue pas au système aromatique. L'introduction de groupements électroattracteurs (**SCP-Boc** et **SCP-Tos**) améliore la brillance de la même manière que la méthylation.

En ce qui concerne la solvatochromie (Tableau II.4), elle est la plus importante pour **SCP-H**. L'introduction de groupes encombrants ainsi que de l'aryle la diminue, jusqu'à deux fois pour **SCP-Ph**. La fonction N-diméthyl du cœur coumarine est donneuse, ainsi l'incorporation de groupes électroattracteurs à l'opposé devrait créer un système « push-pull » sensible à la polarité du solvant. Cependant, les groupes électroattracteurs (**SCP-Boc** et **SCP-Tos**) montrent une solvatochromie plus faible que **SCP-H**, indiquant une diminution des moments dipolaires de ces coumarines suggérant que ces groupes ne participent pas au caractère « push-pull » des coumarines et donc à la conjugaison de la coumarine.

Dye	Solvatochromisme (nm)
SCP-H	47
SCP-ME	40
SCP-Bn	39
SCP-OPB	34
SCP-Ph	28
SCP-Tosyl	17
SCP-Boc	17
SC-V	35

Tableau II.4 Solvatochromie des **SCPs** entre toluène et MeOH

Photo-conversion

Toutes ces coumarines ont été soumises à des irradiations laser à 488 nm et à une puissance de 33.3 mW.cm⁻², afin d'observer de potentielles photo-conversions. Les spectres d'émission observés à l'aide d'un laser 405 nm sont montrés figure II.34. De plus, les spectres d'excitation et d'émission obtenus à la fin des irradiations sont présentés figure II.34 h). Toutes ces coumarines présentent des propriétés de photo-conversion. Toutefois, au vu des spectres, des différences sont observables. Tout d'abord, certaines convertissent beaucoup plus vite que les autres, suggérant des variations des propriétés de photo-transformation. Ensuite, certaines coumarines présentent une émission plus intense après la conversion, indiquant un meilleur rendement chimique de conversion.

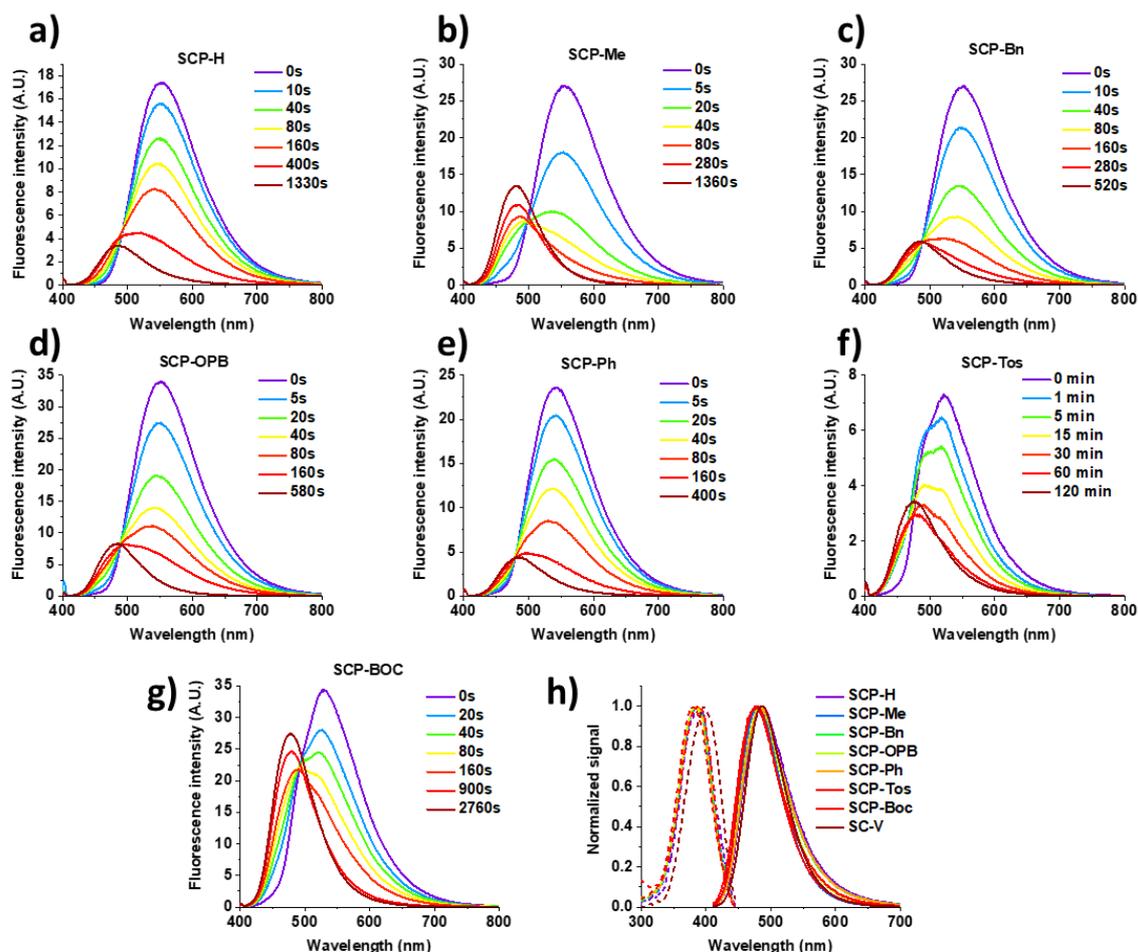


Figure II.34 a-g) Spectres d'émission des **SCPs** à 405 nm (excitation sous irradiation à 488 nm dans le MeOH), h) Spectres d'excitation (émission à 450 nm) et d'émission (excitation à 405 nm) des **SCPs** après conversion avec le modèle **SC-V**

Ces photo-conversions ont donc été caractérisées plus précisément en obtenant les différents rendements quantiques ainsi que les rendements chimiques (Tableau II.5).

SCP	$\lambda_{em\ converted}(nm)$	$\Delta \lambda_{em}(nm)$	$\Phi_{P_t}(\%)$	$\Phi_{P_c}(\%)$	$\Phi_{B_l}(\%)$	$\eta(\%)$
SCP-H	488	53	$5 \pm 3 \cdot 10^{-2}$	$9 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$4 \pm 2 \cdot 10^{-2}$	18 ± 1
SCP-Me	483	68	$2 \pm 0.4 \cdot 10^{-1}$	$6.0 \pm 1 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \pm 0.3 \cdot 10^{-1}$	30 ± 1
SCP-Bn	488	64	$1.4 \pm 0.1 \cdot 10^{-1}$	$2.7 \pm 0.3 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \pm 0.1 \cdot 10^{-1}$	19.4 ± 0.8
SCP-OPB	484	62	$1.7 \pm 0.4 \cdot 10^{-1}$	$2.7 \pm 0.5 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \pm 0.3 \cdot 10^{-1}$	16.0 ± 0.4
SCP-Ph	481	56	$1.4 \pm 0.3 \cdot 10^{-1}$	$3.1 \pm 0.7 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-1}$	22.8 ± 0.6
SCP-Tos	473	49	$4.1 \pm 0.7 \cdot 10^{-2}$	$2.4 \pm 0.4 \cdot 10^{-3}$	$3.8 \pm 0.7 \cdot 10^{-2}$	6.0 ± 0.2
SCP-Boc	477	47	$5.2 \pm 0.5 \cdot 10^{-2}$	$3.3 \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$	$1.9 \pm 0.2 \cdot 10^{-2}$	63.2 ± 0.6
SC-V	N/A	N/A	$4 \pm 2 \cdot 10^{-3}$	N/A	N/A	N/A

Tableau II.5 Propriétés de photo-conversion des **SCPs**

Afin de rendre les interprétations d'efficacité de photo-conversion plus claires, les rendements quantiques de photo-conversion ainsi que les rendements chimiques ont été représentés sous forme de graphique (Figure II.35).

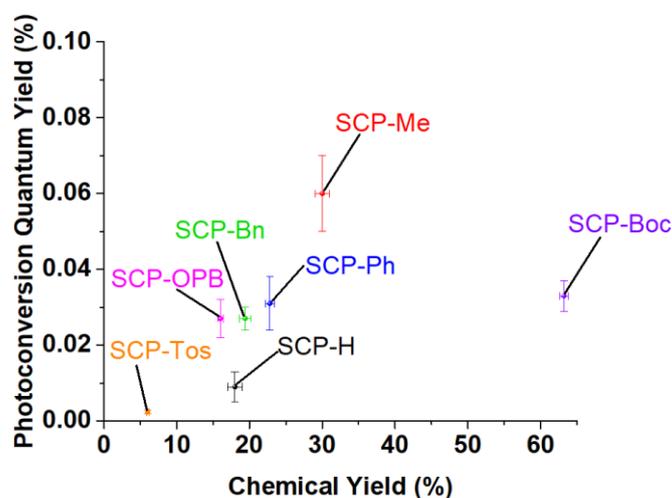


Figure II.35 Rendements quantiques de photo-conversion et rendements chimiques des **SCPs**

Ces résultats montrent que la fonctionnalisation du pyrrole impacte fortement les propriétés de photo-conversion. Le rendement quantique de photo-conversion peut être perçu comme la vitesse à laquelle l'oxydation sur le pyrrole survient. Le rendement chimique, quant à lui, décrit la proportion d'oxydation sur le pyrrole par rapport à celle sur le cœur coumarine.

Les coumarines **SCP-Ph**, **SCP-Bn** et **SCP-OPB** voient leur rendement quantique de photo-conversion augmenter d'un facteur trois par rapport à **SCP-H** sans pour autant changer significativement le rendement chimique de conversion. La méthylation du pyrrole avec **SCP-Me** implique une forte augmentation du rendement quantique de photo-conversion d'un facteur six ainsi qu'un rendement chimique doublé. **SCP-Tos**, quant à lui, présente une photo-conversion bien moins efficace avec une vitesse quatre fois plus faible et un rendement chimique trois fois plus faible que **SCP-H**. Enfin, **SCP-Boc** possède les meilleures propriétés de photo-conversion avec un rendement quantique de photo-conversion du même ordre que ceux de **SCP-Ph**, **SCP-Bn** et **SCP-OPB** mais avec un rendement chimique très élevé de 63%, c'est-à-dire, trois fois plus élevé que **SCP-H** et deux fois plus important que **SCP-Me**, qui a déjà montré son application en imagerie cellulaire.

Les propriétés de photo-conversion sont régies par trois mécanismes indépendants. Tout d'abord, la quantité d'oxygène singulet généré, puis la sensibilité du cœur coumarine et enfin, celle du pyrrole. Ces composés étant trop instables par rapport au DPBF, l'obtention du rendement quantique de génération d'oxygène singulet (ϕ_{Δ}) est impossible, rendant la compréhension exacte de l'influence des groupements compliquée. En effet, une molécule convertissant plus rapidement

peut être le fruit d'une plus importante génération d'oxygène singulet, d'une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'oxygène singulet ou bien des deux. Ces expériences permettent donc uniquement d'observer de manière empirique l'influence de ces groupements sur la vitesse de conversion. Cependant, le rendement chimique donne accès à la stabilité des pyrroles par rapport au cœur coumarine et permet de dresser un ordre de réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet selon la N-fonctionnalisation : **Boc** > **Me** > **Ph** > **Bn** > **H** > **OPB** > **Tos**. L'oxygène singulet ayant un caractère électrophile,^[109] c'est la répartition des orbitales de la LUMO qui régit si l'oxydation se situera sur le pyrrole ou sur le cœur coumarine. Des calculs DFT pourraient permettre une meilleure compréhension de la répartition des orbitales et donc de l'ordre de réactivité de ces N-fonctionnalisations et seront effectués par la suite.

II.5.4. Microscopie

Au vu des propriétés de photo-conversion observées sur **SCP-Boc**, en particulier son rendement chimique de photo-conversion, il a été décidé de la comparer en imagerie cellulaire avec **SCP-Me** sur des cellules Hela dans les mêmes conditions expérimentales (Figure II.36 et II.37).

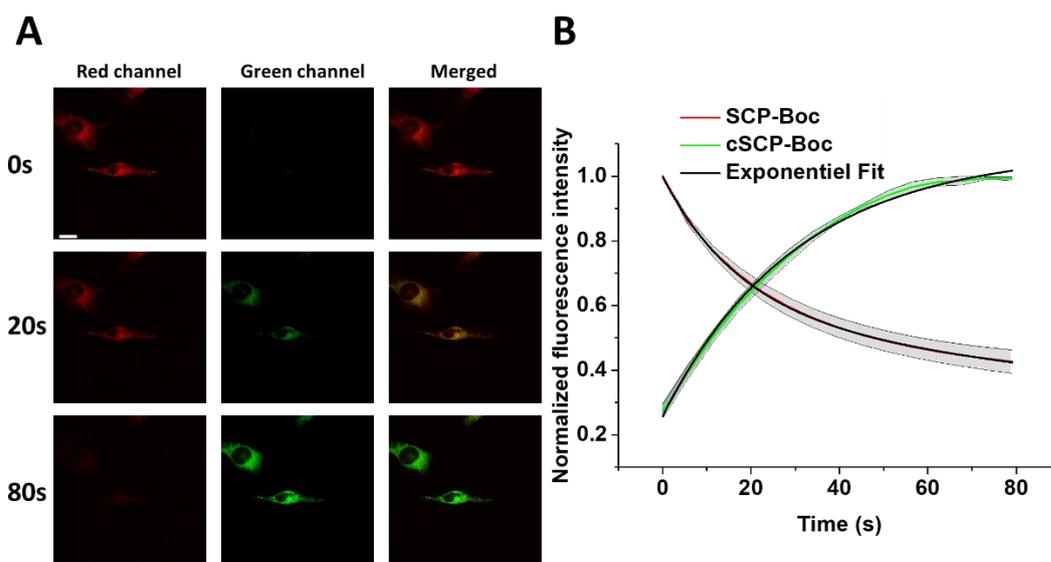


Figure II.36 a) Photo-conversion de **SCP-Boc** (1 μ M) au sein de cellules Hela, b) Signaux moyens de fluorescence des cellules des deux canaux d'observation obtenus sur trois échantillons différents. Échelle : 20 μ m

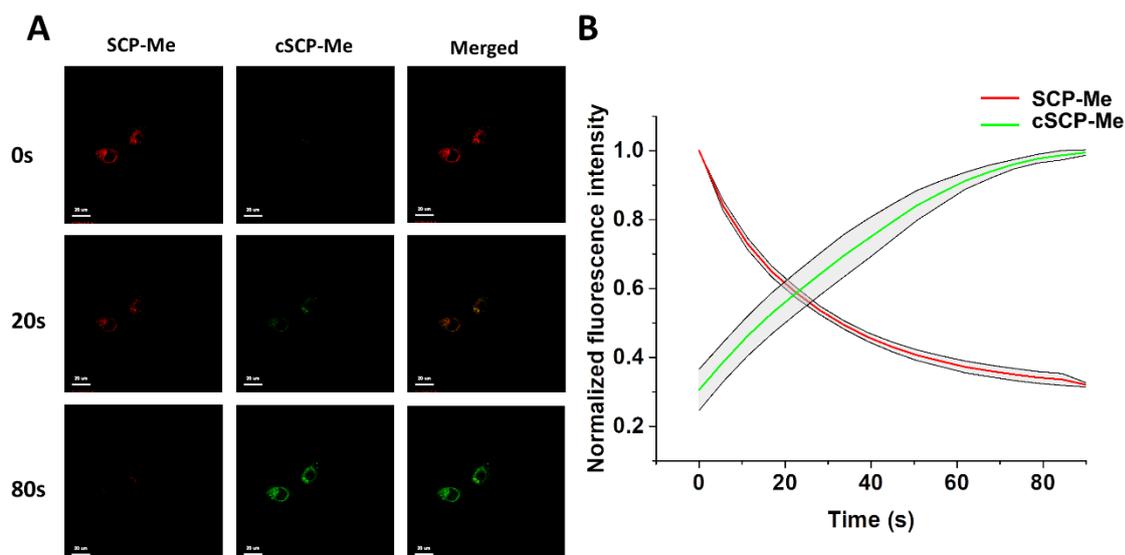


Figure II.37 a) Photo-conversion de **SCP-Me** ($1 \mu\text{M}$) au sein de cellules *HeLa*, b) Signaux moyens de fluorescence des cellules des deux canaux d'observation obtenus sur trois échantillons différents. Échelle : $20 \mu\text{m}$

De la même manière que **SCP-Me**, **SCP-Boc** présente une photo-conversion au sein des cellules. Cependant, contrairement aux analyses spectroscopiques effectuées dans le méthanol, les vitesses de conversion observées en microscopie ainsi que l'augmentation de fluorescence dans le canal converti sont les mêmes. Cette différence entre les expériences en cuvette et celles réalisées au sein des cellules peut s'expliquer par une différence de marquage de ces deux sondes. En effet, **SCP-Me** se trouve dans les gouttelettes lipidiques, tandis que **SCP-Boc** semble distribué dans le cytoplasme. Cette différence de région change deux paramètres clés : le temps de vie de l'oxygène singulet, car il change selon le domaine où il est produit, influençant le rendement quantique de photo-transformation,^[110] et la brillance des fluorophores, qui est supérieure dans les environnements gras comme les gouttelettes lipidiques que dans les environnements aqueux comme le cytoplasme, modifiant le rapport entre la brillance de la forme de départ et celle d'arrivée et donc le rendement chimique observé. Ainsi, la comparaison entre ces deux sondes au sein des cellules ne permet pas de conclure sur le fait que les observations obtenues en spectroscopie s'appliquent *in cellulo*. Cependant, **SCP-Boc** montre une utilisation en photo-conversion, de même que **SCP-Me** mais dans un environnement différent, élargissant les applications de telles sondes.

II.6. Conclusion coumarines photo-convertibles

Au cours de ce premier chapitre expérimental, le mécanisme régissant la photo-conversion a été élucidé et explicité à l'aide la comparaison de quatre cycles aromatiques que sont le pyrrole, le furane, le thiophène et l'anisole. Il a été montré que la photo-conversion de **SC-P** et **SC-F** était le fruit de l'oxydation partielle du fluorophore, engendré par la présence d'un ASORM, c'est-à-dire, un aromatique sensible à l'oxygène singulet, entraînant une hypsochromie. Ce mécanisme a ensuite pu être caractérisé, d'une part par l'observation des photo-produits obtenus, et d'autre part par l'obtention des constantes photo-physiques décrivant la conversion, amenant à un nouveau mécanisme de photo-conversion, le DPIC. Le fluorophore **SC-P** a pu être utilisé en tant que sonde des gouttelettes lipidiques et a permis l'obtention des coefficients de diffusion de ces dernières. Ensuite, la modulation des propriétés de photo-conversion a été permise par différentes fonctionnalisations du pyrrole et a engendré un photo-convertisseur **SCP-Boc** aux propriétés de photo-conversion améliorées. Ces coumarines restent néanmoins améliorables par l'ajout de groupements ciblant, plus spécifique des organelles ou des protéines.

Chapitre III. BODIPYs

Après ces premières études explicitant l'implication du pyrrole dans la photo-conversion, il a été décidé d'appliquer les mêmes analyses aux dérivés du lysotracker red obtenus dans les études préliminaires.

III.1. Famille des BODIPYs

Les BODIPYs sont des molécules couramment utilisées du fait de leurs très bonnes propriétés d'absorption et d'émission.^[111] Ils trouvent des applications dans des domaines variés comme la photovoltaïque organique,^[112] les colorants laser,^[113] le marquage biologique^[114] ou encore comme plateforme pour la thérapie photodynamique.^[115]

L'appellation BODIPY fait référence au nom IUPAC 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène, plus couramment appelé **Borondipyrrométhène**. Son obtention a eu lieu par hasard par les chimistes Treibs et Kreuzer en 1968, qui cherchaient à acyler des pyrroles à l'aide d'acide de Lewis avec, entre autres, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.^[116] Le BODIPY peut, d'une certaine manière, être considéré comme une cyanine 1 fortement rigidifiée à l'aide de l'atome de bore, ce qui lui confère un fort rendement quantique de fluorescence et une forte absorption. Il est parfois appelé « petite sœur des porphyrines », référence aux porphyrines composées de deux dipyrrométhènes. Cette ressemblance lui doit d'ailleurs sa numérotation la plus utilisée, en remplaçant respectivement les positions 3 et 5, 2 et 6, 1 et 7 par les positions α , β et γ , de même que pour la position 8 devenant la position meso (Figure III.1).

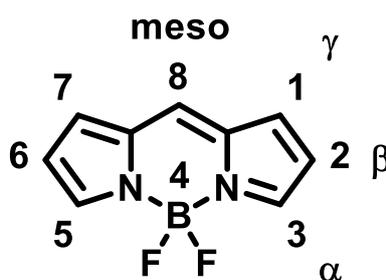


Figure III.1 Structure et numérotation du BODIPY

Il existe de nombreuses voies de synthèse des BODIPYs, les plus courantes étant la condensation de deux unités pyrroles sur un chlorure d'acyle ou bien sur un aldéhyde, nécessitant pour cette dernière une étape d'oxydation. Les dipyrrométhènes ainsi obtenus sont ensuite complexés par le bore à l'aide de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Les BODIPYs obtenus de cette manière sont symétriques (Figure III.2).^[111]

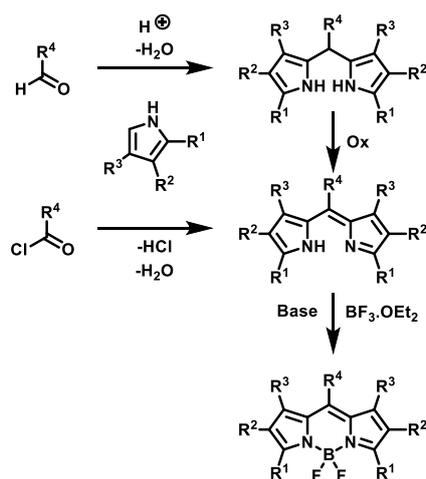
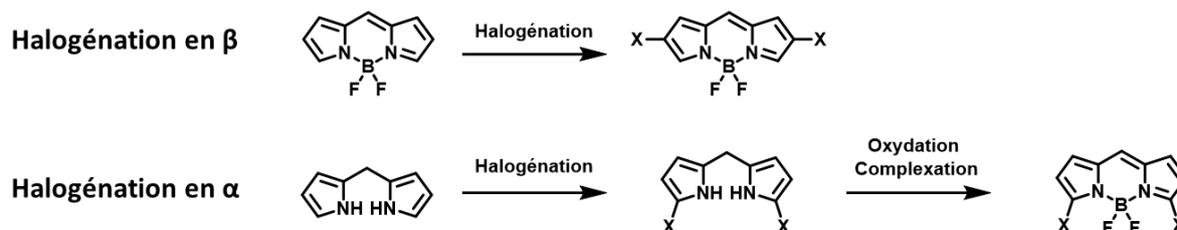


Figure III.2 Synthèse de BODIPYs symétriques

Cette voie de synthèse permet la fonctionnalisation du BODIPY en amont, dépendant de la manière avec laquelle le pyrrole est fonctionnalisé pour les positions α , β et γ . De même, la position meso sera déterminée en fonction de l'aldéhyde ou du chlorure d'acyle utilisé. Ensuite, de nombreuses voies de post-fonctionnalisation sont également possibles. Tout d'abord, la position β permet des substitutions électrophiles introduisant des électrophiles comme le brome et l'iode. Cet ajout d'halogène permet ensuite des réactions de couplage palado-catalysées telles que les réactions de Stille et de Suzuki. Par contre, dans le cas où l'ajout d'halogène est souhaité en position α , l'halogénéation doit avoir lieu sur le dipyrrométhane obtenu par la condensation d'un pyrrole sur un aldéhyde (Figure III.3).^[111]

Figure III.3 Halogénéation du BODIPY en position α et β

Si des méthyles se trouvent en position α , des réactions de Knoevenagel sont possibles, afin d'étendre la conjugaison et donc de moduler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission du BODIPY. En effet, les protons présents sur les méthyles sont suffisamment acides pour permettre une condensation. Le mécanisme de cette condensation de Knoevenagel a été proposé par Gräf et coll. (Figure III.4). D'après eux, la première étape consiste en l'attaque nucléophile de la pipéridine sur l'aldéhyde pour former l'hémi-aminal. Ensuite, une seconde pipéridine peut s'ajouter et former l'aminal qui serait en équilibre avec un intermédiaire iminium. Le méthyl alpha du BODIPY est acide et peut être déprotoné lui permettant de se condenser sur les intermédiaires aldéhyde activé pour former un β -amino qui sera ensuite éliminé pour donner le styrylBODIPY. Contrairement

aux réactions de Knoevenagel classiques, celles sur les BODIPYs nécessitent des aldéhydes riches en électrons pour obtenir de bons rendements. Ceci s'explique par l'intermédiaire iminium qui est plus réactif à l'aide de groupements donneurs. L'élimination de la dernière étape permet une excellente stéréospécificité et l'obtention de l'isomère E uniquement. Cependant, cette réaction mène à des composés mono- et bis-styryls, rendant l'obtention du composé monostyryl compliquée à cause d'une purification délicate. Il est à noter que les méthyls en position γ ne sont pas sujets à ce genre de condensation, tandis que le méthyl en position meso peut, lui, réagir.^[117]

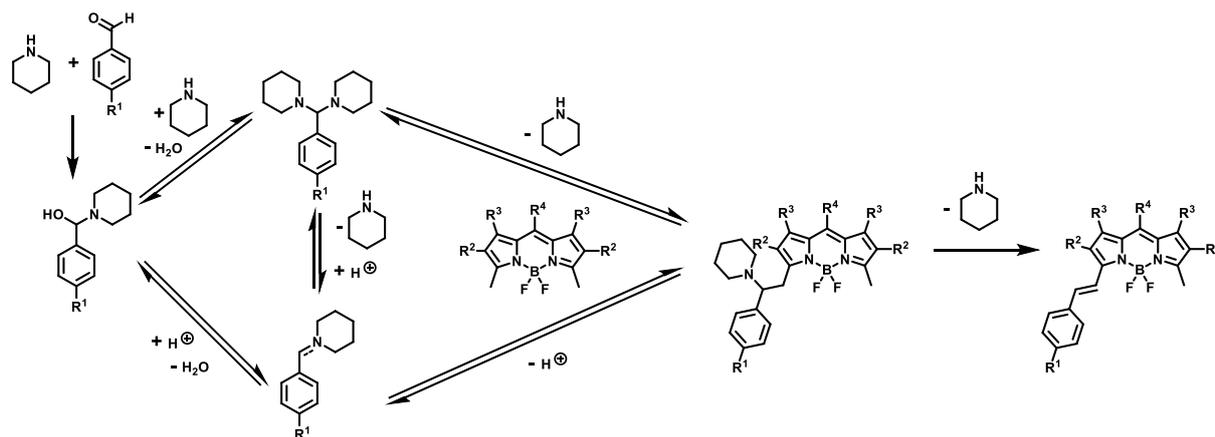


Figure III.4 Mécanisme de la réaction de Knoevenagel sur des BODIPYs proposé par Gräf et coll.

Les atomes de fluor présents sur l'atome de bore peuvent être substitués via l'utilisation d'organolithiens, d'organomagnésiens ou encore de très fortes bases comme des alcoolates (Figure III.5). Ces substitutions peuvent permettre l'obtention de BODIPYs hydrosolubles,^[118] de moduler les propriétés liées aux transferts de charge^[119] ou bien d'augmenter la génération d'oxygène singulet.^[120]

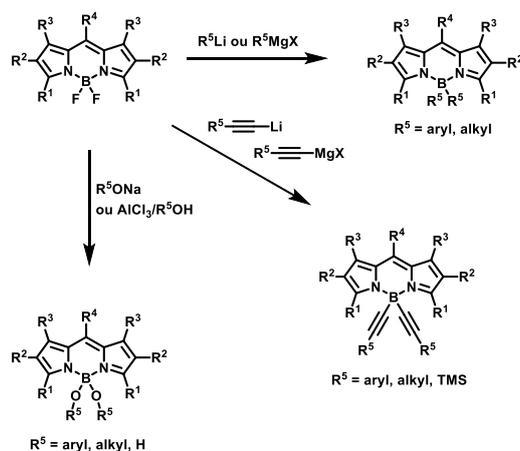


Figure III.5 Méthodes de fonctionnalisation de l'atome de bore

III.2. PyrroloBODIPYs

Suite aux résultats préliminaires obtenus sur des pyrroloBODIPYs dérivés du lysotracker red, il a été décidé de continuer l'étude sur les pyrroloBODIPYs. Deux pyrroloBODIPYs commerciaux existe, le **BODIPY 576** et le **BODIPY 650**, présentant tous deux un ester NHS permettant des couplages utiles pour l'ajout de groupements ciblant. De plus, le **BODIPY R6G** sur lequel est présent un phényle en α à la place du pyrrole a été utilisé comme contre-exemple pour valider l'implication du pyrrole dans la photo-conversion (Figure III.6).

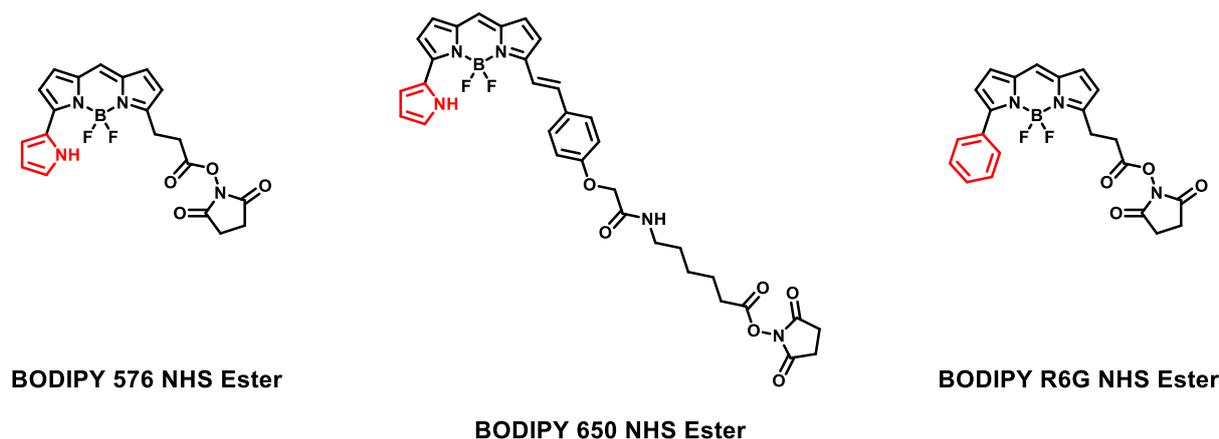


Figure III.6 *BODIPYs sélectionnés pour l'étude de photo-conversion*

III.2.2. Synthèse

Ces BODIPYs NHS ont subi des modifications afin de créer des sondes ciblant différentes organelles. Tout d'abord, le **BODIPY R6G NHS** a été couplé avec une amine portant un groupement triphénylphosphonium pour sa propriété à cibler des mitochondries, donnant le **BODIPY R6G Mito** (Figure III.7).^[10]

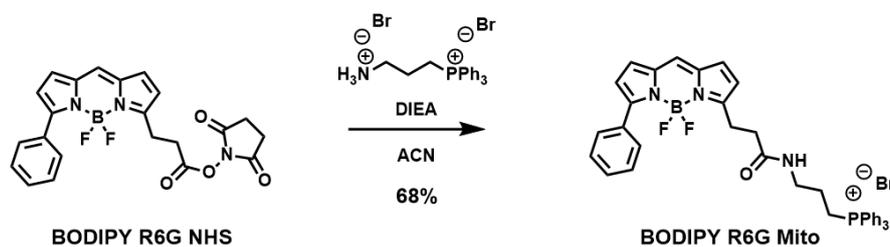
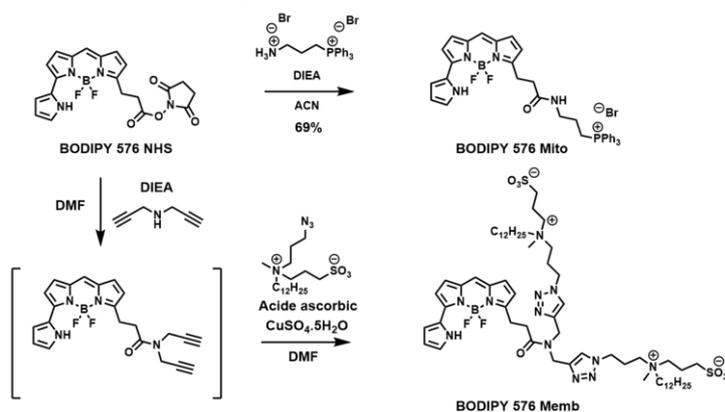
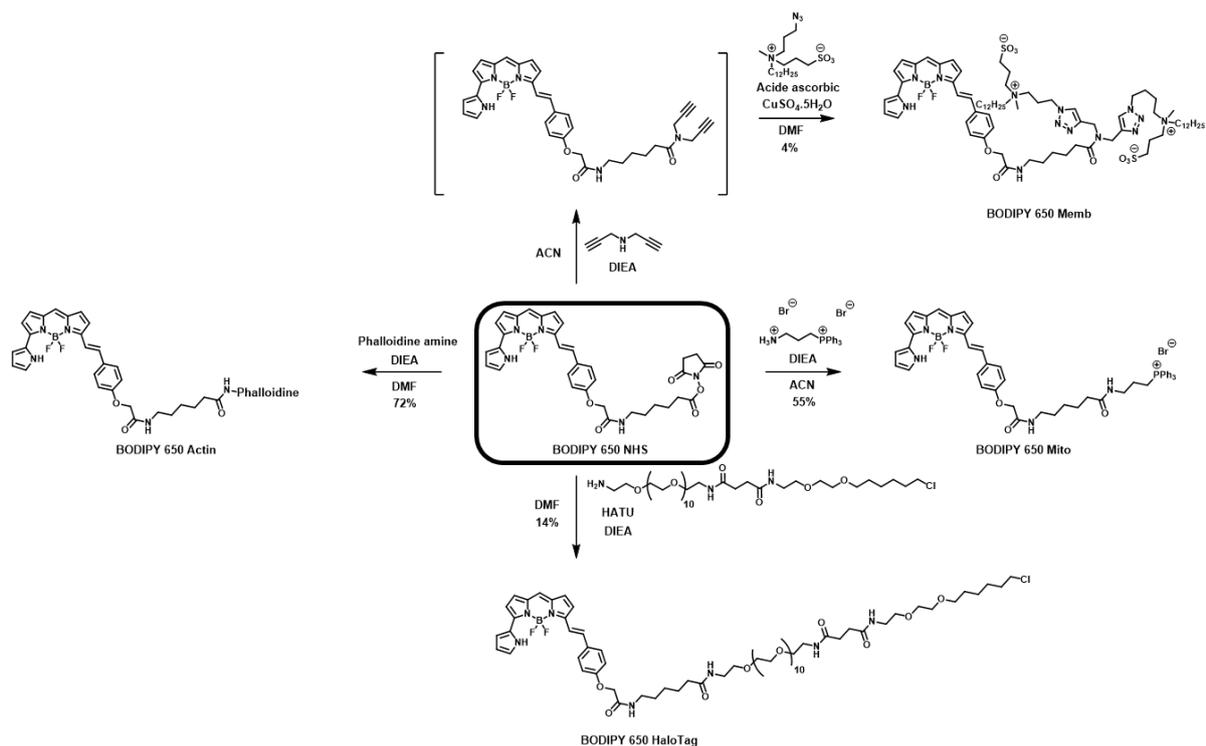


Figure III.7 *Synthèse du BODIPY R6G Mito*

Le **BODIPY 576 NHS** a également été couplé à une amine portant un triphénylphosphonium pour donner **BODIPY 576 Mito**. Une version membranaire du BODIPY 576, **BODIPY 576 Memb**, a également été synthétisé en deux étapes par l'ajout de deux groupements amphiphiles bien connus au laboratoire pour cibler la membrane plasmique,^[9] et qui sont composés d'une chaîne aliphatique et d'un zwitterion (Figure III.8).

Figure III.8 Synthèse de **BODIPY 576 Mito** et **BODIPY 576 Memb**

Enfin, le **BODIPY 650 NHS** a été fonctionnalisé pour donner quatre sondes : **BODIPY 650 Mito**, une sonde mitochondriale, **BODIPY 650 Memb** une sonde membranaire, **BODIPY 650 Actin** qui a été couplé à la phalloïdine, une drogue ciblant les filaments d'actine,^[16] et enfin le **BODIPY 650 HaloTag** une sonde pouvant cibler des protéines à l'aide de la technologie HaloTag® (Figure III.9).

Figure III.9 Synthèse des **BODIPYs 650 Mito**, **650 Memb**, **650 Actin** et **650 HaloTag**

Tous les composés synthétisés ont été caractérisés par ¹H RMN, ¹³C RMN et spectroscopie de masse.

III.2.3. Caractérisation spectroscopique

Ces BODIPYS étant commerciaux, leurs propriétés d'absorbance et d'émission sont directement fournies par les sites fournisseurs (Tableau III.1 et figure III.10) et montrent des brillances élevées (de 53 000 pour **BODIPY 650** à 67 000 pour le **BODIPY R6G**).

Dye	$\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$	$\epsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\phi_f(\%)$
BODIPY 576	576	83 000	590	70
BODIPY 650	650	102 000	663	52
BODIPY R6G	530	70 000	548	96

Tableau III.1 Propriétés spectrales des **BODIPYS** sélectionnés pour l'étude de photo-conversion

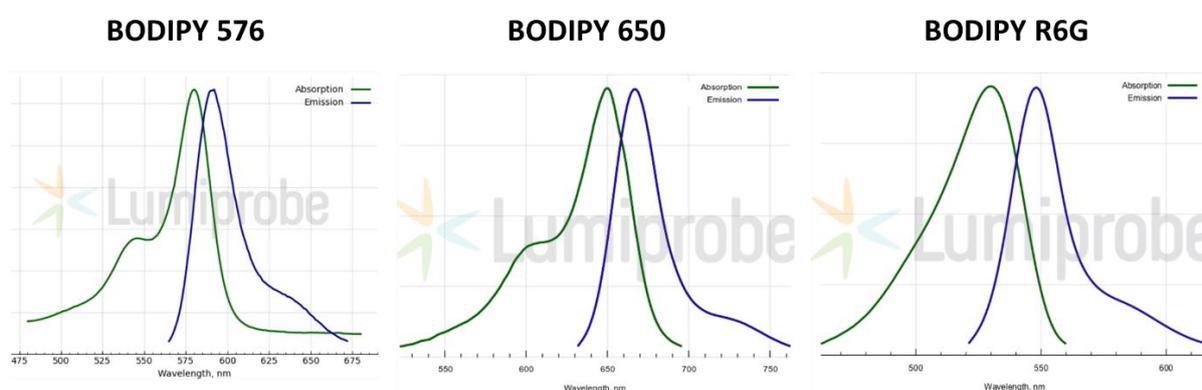
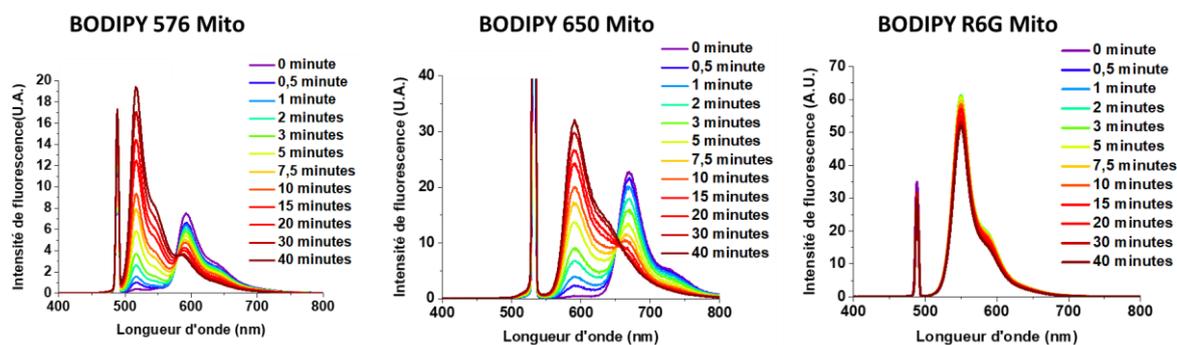


Figure III.10 Spectres d'absorption et d'émission des **BODIPYS**

Les versions mitochondriales de ces BODIPYS ont été soumises à des irradiations laser dans des solutions de MeOH à 1 μM afin d'observer leurs capacités à photo-converter. Pour ces expériences, seuls cinq lasers différents sont disponibles, 405 nm, 488 nm, 532 nm, 638 nm et 730 nm. Ainsi, les **BODIPYS 576** et **R6G** ont été irradiés avec un laser à 532 nm et le **BODIPY 650** avec un laser à 638 nm. Les spectres d'émission acquis lors de cette expérience ont, quant à eux, été réalisés à l'aide d'un laser 488 nm pour les **BODIPYS 576** et **R6G**, et un laser 532 nm pour le **BODIPY 650**. Ce changement de laser entre l'irradiation des fluorophores et l'acquisition des spectres d'émission a été décidé afin de ne pas photo-blanchir la forme convertie au cours de l'irradiation. Les résultats sont présentés figure III.11.

Figure III.11 Photo-conversion des **BODIPYs 576, 650 et R6G**

Ces irradiations montrent que seuls les **BODIPYs** possédant un pyrrole photo-convertissent, renforçant ainsi le mécanisme DPIC proposé précédemment et étendant l'application du mécanisme DPIC à différentes familles de fluorophores. Le **BODIPY 576** présente une hypsochromie de 73 nm, tandis que le **BODIPY 650** une hypsochromie de 71 nm. Les **BODIPY 576** et **BODIPY 650** ont ensuite été plus profondément caractérisés, afin d'obtenir leurs rendements quantiques de photo-transformation et leurs rendements chimiques. Ils sont bien plus stables que les coumarines, ainsi que le DPBF (sonde d'oxygène singlet), permettant cette fois l'obtention du rendement quantique de génération d'oxygène singlet, crucial pour une compréhension précise de leurs propriétés (Tableau III.2). En effet, connaissant la quantité d'oxygène singlet généré, deux nouveaux paramètres sont introduits : la sensibilité du **BODIPY** ($S_{\Delta\text{Bod}}$) et celle de l'ASORM ($S_{\Delta\text{ASORM}}$) vis-à-vis de l'oxygène singlet, avec S pour sensibilité et Δ pour l'état Δ de l'oxygène. Ces paramètres décrivent le ratio entre la propension du cœur BODIPY, ou de l'ASORM, à réagir avec l'oxygène singlet formé. Ils sont obtenus en faisant le rapport entre φ_{BI} et φ_{Δ} pour $S_{\Delta\text{Bod}}$, et entre φ_{PC} et φ_{Δ} pour $S_{\Delta\text{ASORM}}$.

Fluorophore	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm) convertie	φ_{f} (%)	φ_{PC} (%)	φ_{pc} (%)	φ_{BI} (%)	η (%)	φ_{Δ} (%)	$S_{\Delta\text{Bod}}$ (%)	$S_{\Delta\text{ASORM}}$ (%)
BODIPY 576	576	83 000	517	70	$3,1 \pm 0,5 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \pm 0,4 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-4}$	$8,6 \pm 0,5$	1,4	0,022	0,002
BODIPY 650	650	102 000	591	52	$3,57 \pm 0,08 \cdot 10^{-4}$	$9,8 \pm 0,8 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	33 ± 4	1,3	0,020	0,007
BODIPY R6G	530	70 000	N/A	96	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	N/A	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	N/A	0,8	0,014	N/A

Tableau III.2 Propriétés de photo-conversion des **BODIPYs**

Pour les mêmes raisons que dans l'étude sur les coumarines, des modèles de photo-produits ont été choisis en fonction de la longueur d'onde d'émission et d'excitation observées après conversion ainsi que la ressemblance des molécules avec les potentiels photo-produits (Figure III.12). Pour le **BODIPY 576**, il s'agit du **BODIPY FI** et pour le **BODIPY 650** il s'agit du **BODIPY 576**.

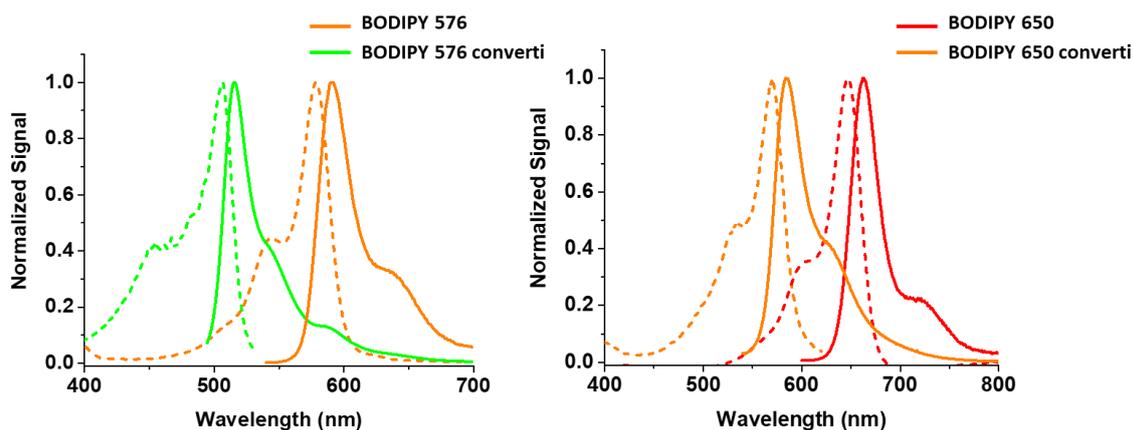


Figure III.12 Spectres d'émission (trait plein) et d'excitation (trait pointillé) des **BODIPYs 576 et 650** avant et après irradiation laser

Les rendements quantiques de génération d'oxygène singulet sont du même ordre de grandeur que ceux décrits pour d'autres sondes fluorescentes, par exemple, la fluorescéine possède un rendement quantique de génération d'oxygène singulet de 1% à pH 6.^[121] À titre de comparaison, les sondes utilisées pour des applications de thérapie photodynamique, c'est-à-dire celles toxiques à cause de la génération d'oxygène singulet, présentent des rendements quantiques de génération d'oxygène singulet supérieur à 50%.^[122] Ainsi, les trois BODIPYs étudiés ne sont pas plus toxiques que ne le serait d'autres sondes fluorescentes à cause de leur génération d'oxygène singulet.

Les rendements quantiques de photo-transformation indiquent que les deux BODIPYs se photo-transforment à la même vitesse ($3,1$ et $3,6 \cdot 10^{-4}$) et environ 1 000 fois plus lentement que ne le faisaient les coumarines. Il est compliqué de trouver une explication à cette différence entre les BODIPYs et les coumarines, car pour ces dernières, les rendements quantiques de génération d'oxygène singulet ainsi que leur sensibilité à l'oxygène singulet n'ont pas pu être obtenues. Cependant, comme le test de viabilité cellulaire effectué sur **SC-P** indique qu'elle n'est pas phototoxique, donc qu'elle produit peu d'oxygène singulet, du moins, que peu diffuse jusqu'à engendrer un dommage cellulaire, il est vraisemblable que les coumarines soient très sensibles à l'oxygène singulet. Peut-être que des analyses de voltamétrie cyclique permettront d'obtenir les potentiels Red/Ox de ces sondes et de pouvoir les comparer aux potentiels Red/Ox de l'oxygène singulet afin d'obtenir une explication à ces différences de réactivité globale vis-à-vis de l'oxygène singulet.

Le **BODIPY 650** présente un rendement chimique de conversion 4 fois supérieur à celui du **BODIPY 576**. Cette différence de rendement chimique indique que le pyrrole est plus sensible par rapport au cœur BODIPY pour le **BODIPY 650**. Cette sensibilité est confirmée par les S_{Δ} qui sont proches pour le cœur BODIPY ($S_{\Delta\text{Bod}}$), mais présente un facteur 3,5 fois supérieur pour le pyrrole du **BODIPY 650** ($S_{\Delta\text{ASROM}}$). Il est ainsi vraisemblable que les orbitales moléculaires de la LUMO

soient davantage situées sur le pyrrole pour le **BODIPY 650** que pour le **BODIPY 576**. Des calculs DFT seront effectués afin de confirmer cette hypothèse.

Il est intéressant de noter que l'introduction du pyrrole entraîne une augmentation de la sensibilité du cœur BODIPY ($S_{\Delta\text{Bod}} = 0,021\%$) par rapport à l'introduction d'un aryle présent sur le **BODIPY R6G** ($S_{\Delta\text{Bod}} = 0,014\%$).

Des analyses de masse ont été réalisées sur les **BODIPYs 576 Mito** (Figure III.13) et **650 Mito** (Figure III.14) après leur irradiation laser.

Le pic à 6,69 minutes pour le BODIPY 576 Mito est le reste du produit de départ, confirmé par la masse (631) ainsi que le spectre d'absorption ($\lambda_{\text{max}} = 576 \text{ nm}$) tandis que le pic à 5,58 minutes est sa forme photo-convertie. En effet, la masse correspond à la structure oxydée, de plus, le spectre d'absorption présente un maximum d'absorption à 515 nm semblable à un BODIPY non fonctionnalisé et corroborant le spectre d'excitation des formes photo-converties.

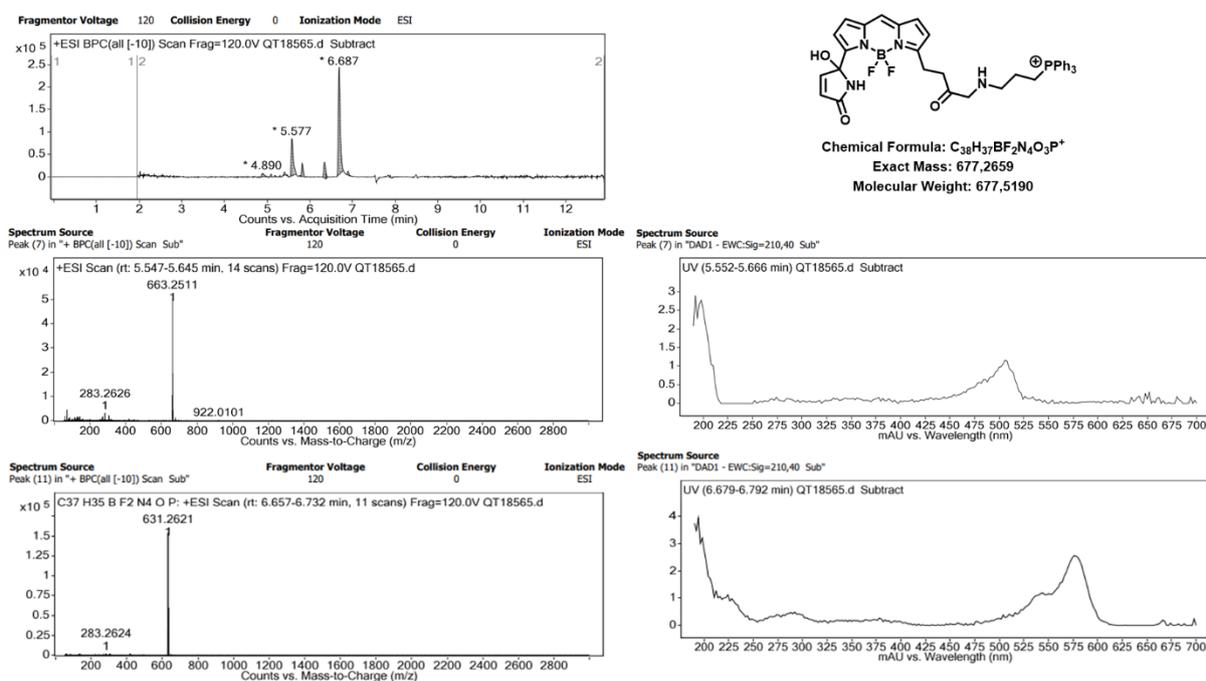


Figure III.13 Analyses HRMS du **BODIPY 576 Mito** après irradiation laser

Le pic majoritaire à 5,71 minutes possède une masse de 595 dénotant une troncation de la molécule. D'après le spectre d'absorption qui ne montre pas d'absorbance dans le visible, cette troncation a eu lieu sur le cœur BODIPY et est donc le résultat du photo-blanchiment. Ensuite le pic à 6,20 minutes correspond à la masse du **BODIPY 650 Mito** oxydé sur le pyrrole, confirmé par le spectre d'absorbance avec un maximum d'absorption à 570 nm cohérent avec le spectre d'excitation des formes photo-converties.

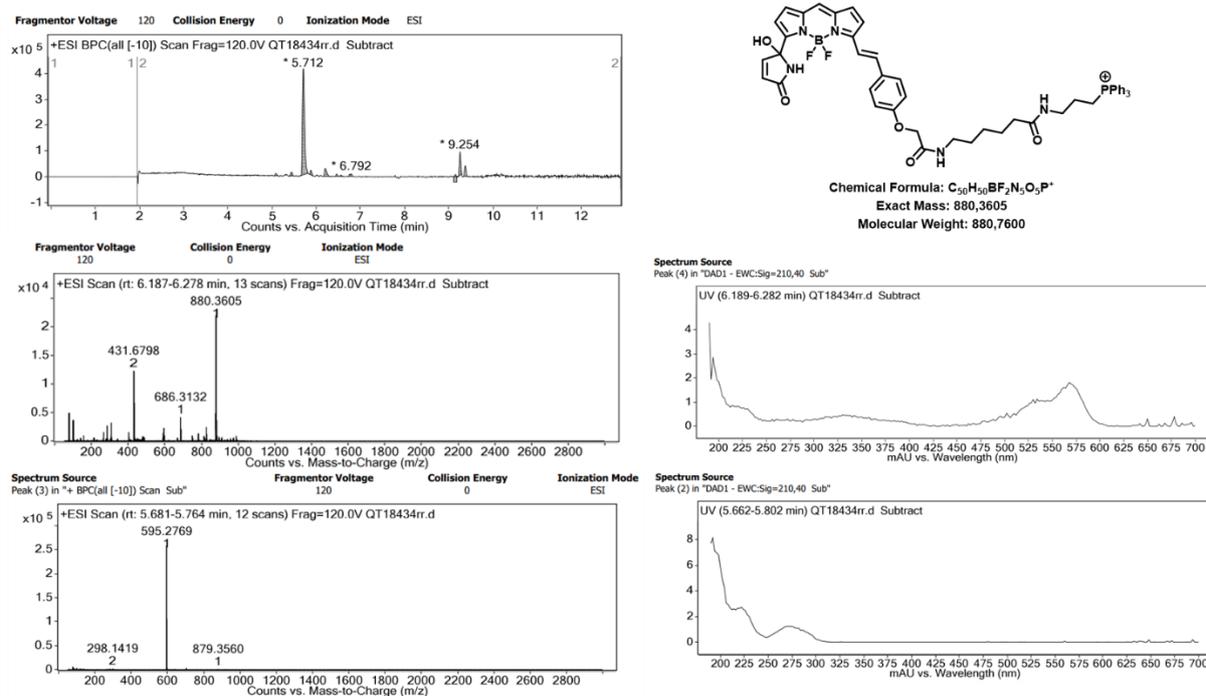


Figure III.14 Analyses HRMS du **BODIPY 650 Mito** après irradiation laser

Ces analyses HRMS valident l'hypothèse de l'oxydation du pyrrole entraînant un effet hypsochrome ce qui renforce le mécanisme DPIC.

III.2.4. Microscopie

Les **BODIPYs 650** et **576** ont ensuite pu être testés en imagerie cellulaire avec un microscope confocal. En premier lieu, les ciblage mitochondriaux et membranaires de ces deux sondes ont été vérifiés.

Colocalisation

Afin de confirmer le ciblage des mitochondries et de la membrane plasmique au sein de cellules HeLa, un comarquage a été effectué avec mitotracker et un Membright respectivement : le **BODIPY 576 Mito** a été colocalisé avec le Mitotracker Deep Red (Figure III.15), le **BODIPY 576 Memb** avec le Membright 640 (Figure III.16), le **BODIPY 650 Mito** avec le Mitotracker green (Figure III.17) et le **BODIPY 650 Memb** avec Membright 488 (Figure III.17). Une fois les images obtenues, les coefficients de Pearson ont été obtenus à l'aide du plugin JACoP,^[123] et donnent 0,800 pour le **BODIPY 576 Mito**, 0,884 pour le **BODIPY 576 Memb**, 0,873 pour le **BODIPY 650 Mito** et 0,842 pour le **BODIPY 650 Memb**. Ces coefficients de Pearson valident le ciblage des mitochondries et de la membrane plasmique.

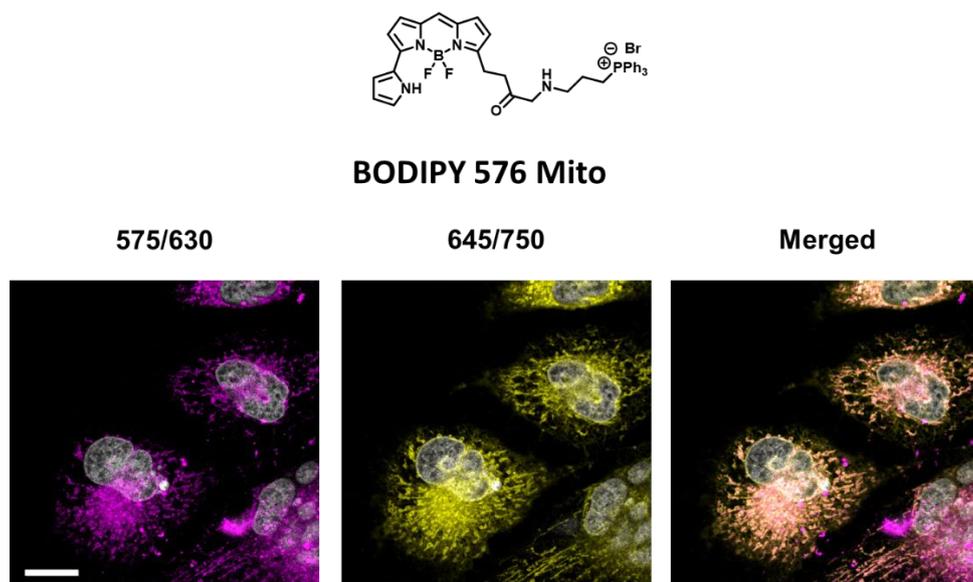


Figure III.15 Colocalisation du **BODIPY 576 Mito** avec le Mitotracker far-red. Échelle: 20 μm

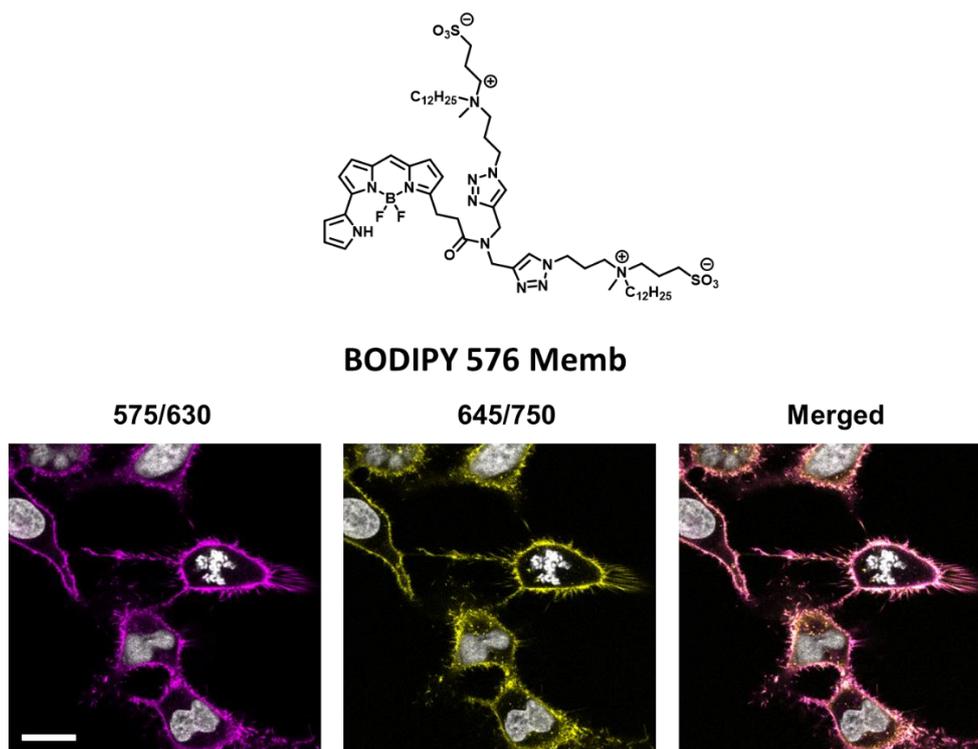


Figure III.16 Colocalisation du **BODIPY 576 Mito** avec le MBCy5. Échelle : 20 μm

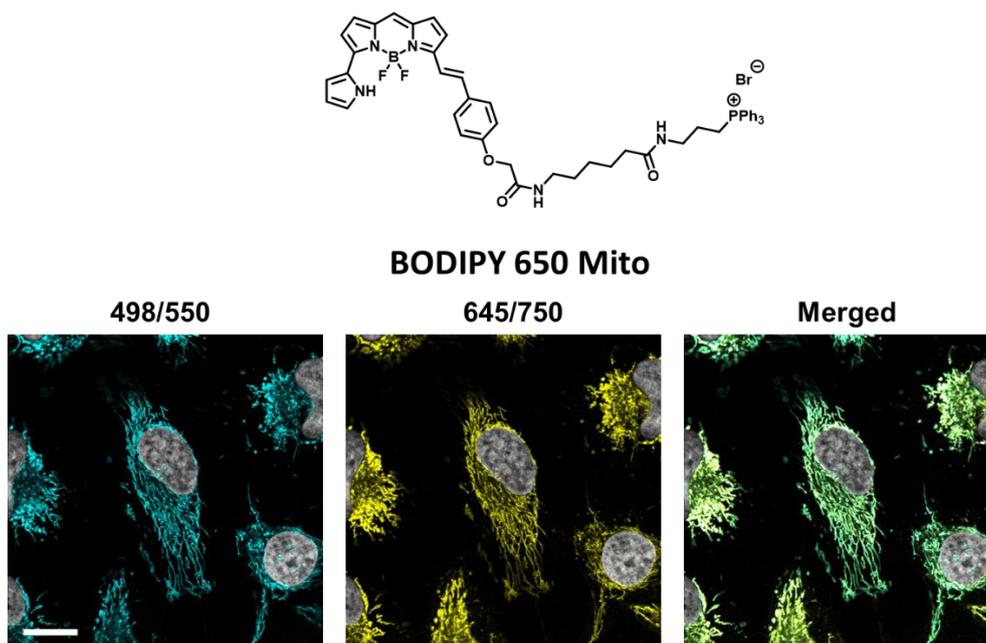


Figure III.17 Colocalisation du **BODIPY 650 Mito** avec le Mitotracker green. Échelle : 20 μm

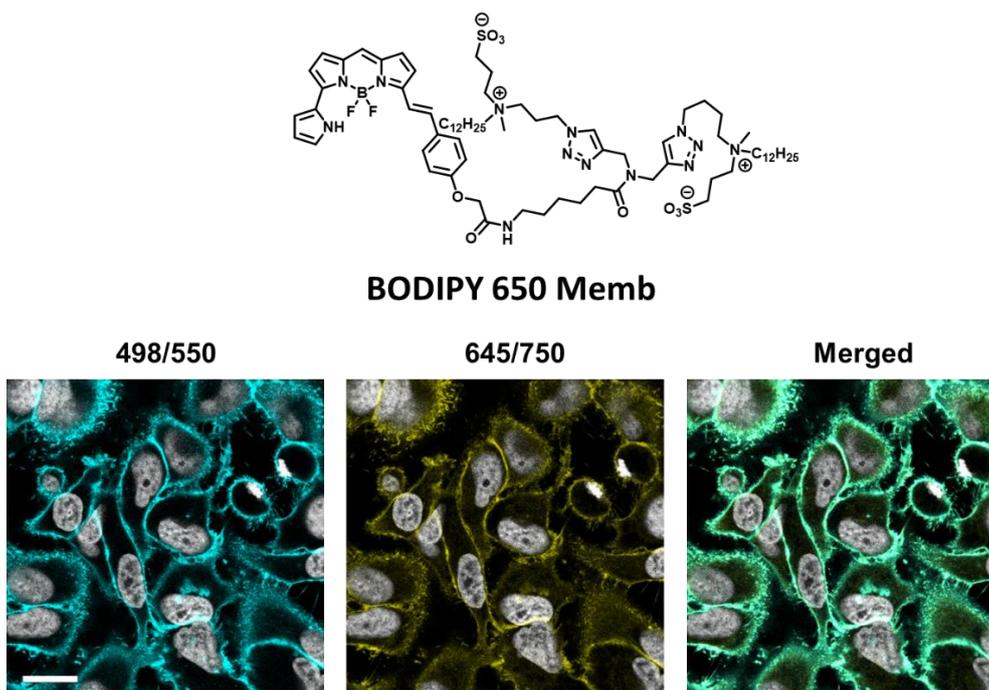


Figure III.18 Colocalisation du **BODIPY 650 Memb** avec le MB488. Échelle : 20 μm

Photo-conversion

Les propriétés de photo-conversion de ces BODIPYs ont ensuite pu être observées *in cellulo* sur des échantillons vivants. Les résultats de ces photo-conversions pour le **BODIPY 576** sont présentés figure III.19 pour le marquage mitochondrial et figure III.20 pour le marquage membranaire.

Le temps nécessaire à la photo-conversion et par conséquent son efficacité est difficilement discutable, en effet, celui-ci dépend de nombreux paramètres rendant les comparaisons compliquées. En premier lieu, il dépend de la puissance du laser utilisé en $W.cm^{-2}$. Cette puissance est variable en fonction de la taille de la zone d'intérêt dans laquelle l'irradiation a lieu. De plus, le mécanisme régissant la photo-conversion se base sur la génération de l'oxygène singulet. Ainsi, la concentration locale du fluorophore a un fort impact sur la probabilité que l'oxygène singulet oxyde le pyrrole. En effet, compte tenu du temps de vie de l'oxygène singulet, une faible concentration en fluorophore entraîne que seul l'oxygène singulet généré par une molécule entraînera une conversion de celle-ci, tandis qu'une forte concentration en sonde entraînera l'oxydation des molécules voisines. Cette concentration dépend fortement de l'organelle ciblée, ainsi que de la quantité de sonde mise dans l'échantillon. De plus, le temps de vie de l'oxygène singulet est variable en fonction de son environnement. Une étude cinétique plus approfondie devrait être envisagée, afin de conclure sur les variations de cinétique de photo-conversion du fluorophore entre différentes organelles.

Cependant, l'augmentation du signal de fluorescence obtenu dans le canal de la forme convertie est, elle, indicative. Elle montre que la photo-conversion est plus efficace dans les mitochondries où le signal augmente d'un facteur 10, contre un facteur 2 au sein de la membrane plasmique.

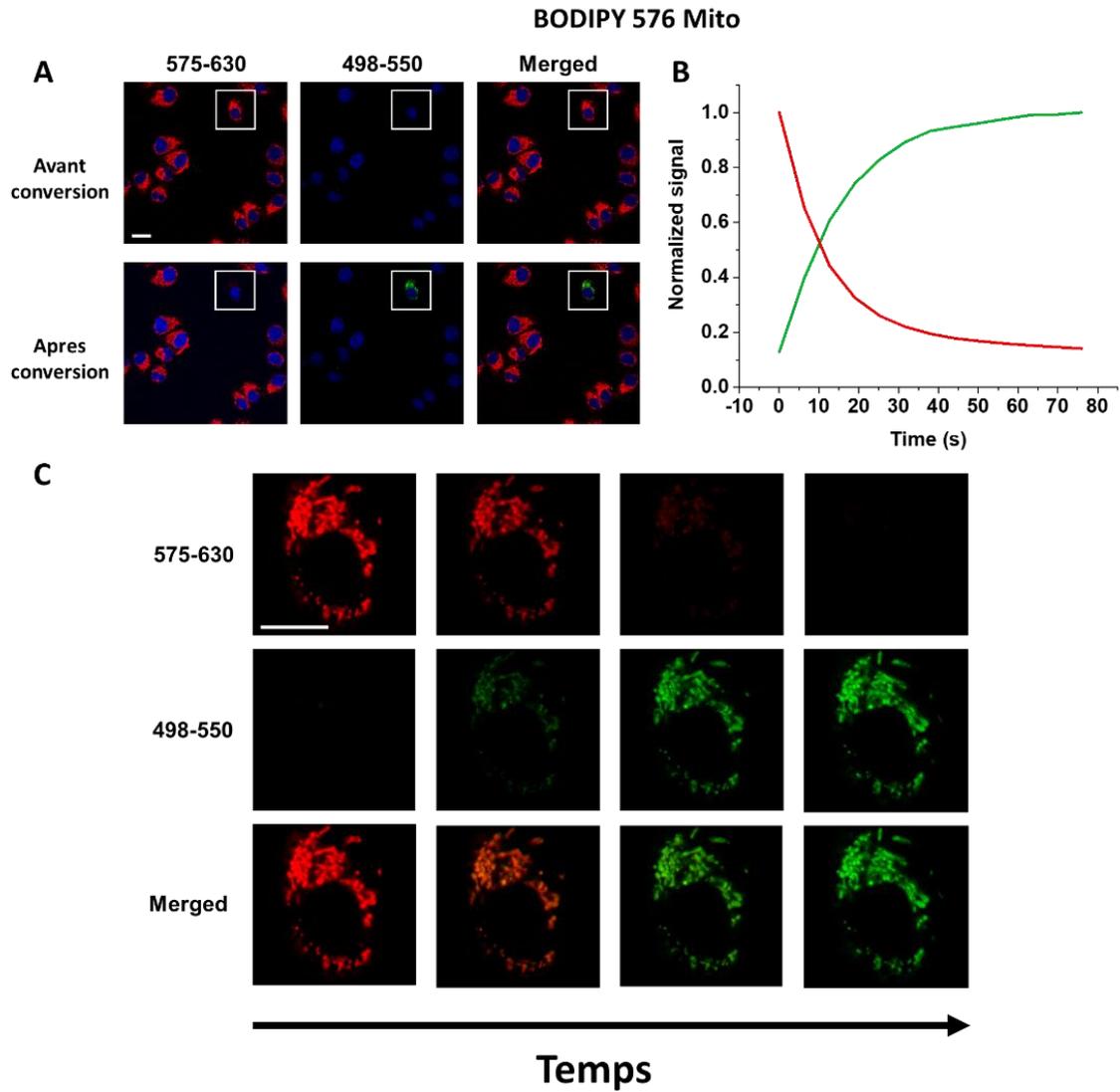


Figure III.19 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 576 Mito**, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images au cours du temps Échelle : 20 μm

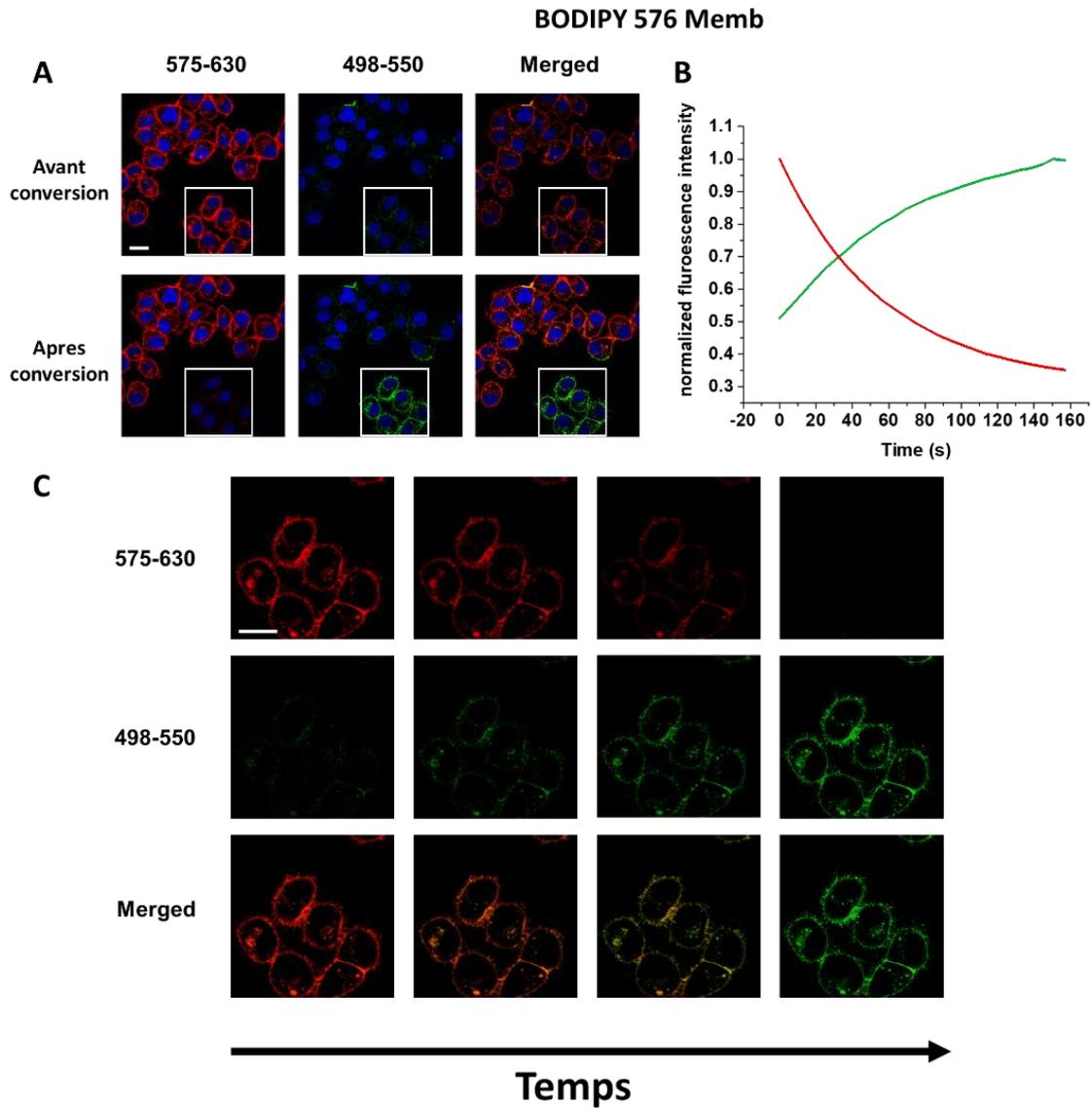


Figure III.20 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 576 Memb**, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images au cours du temps. Échelle : 20 μm

En ce qui concerne le **BODIPY 650**, cette même tendance se confirme. En effet, l'augmentation de fluorescence au sein du canal converti augmente d'un facteur 10 pour le marquage mitochondrial (Figure III.21) contre un facteur 2 pour le marquage membranaire (Figure III.22).

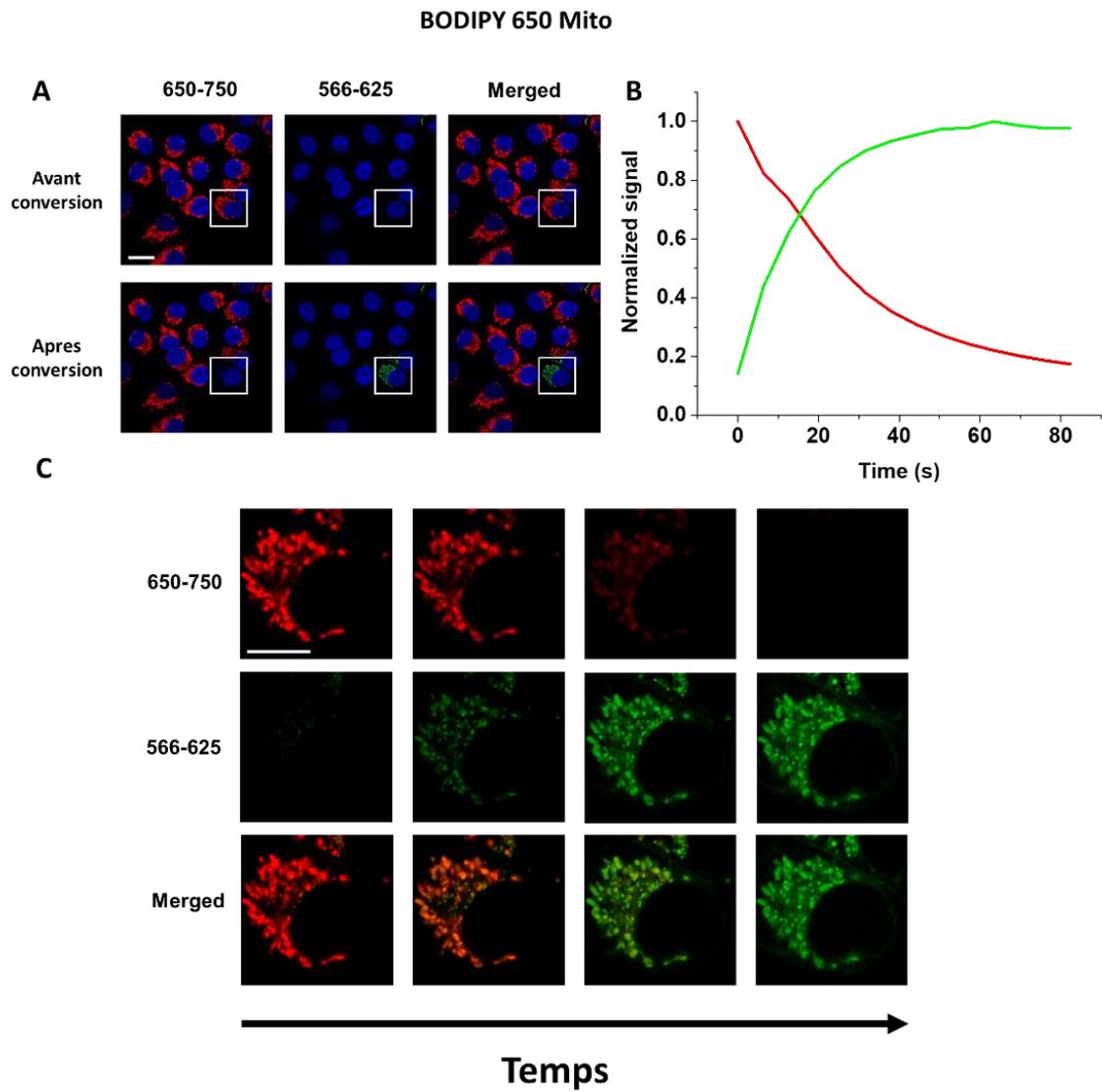


Figure III.21 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 Mito**, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images au cours du temps Échelle : 20 μ m

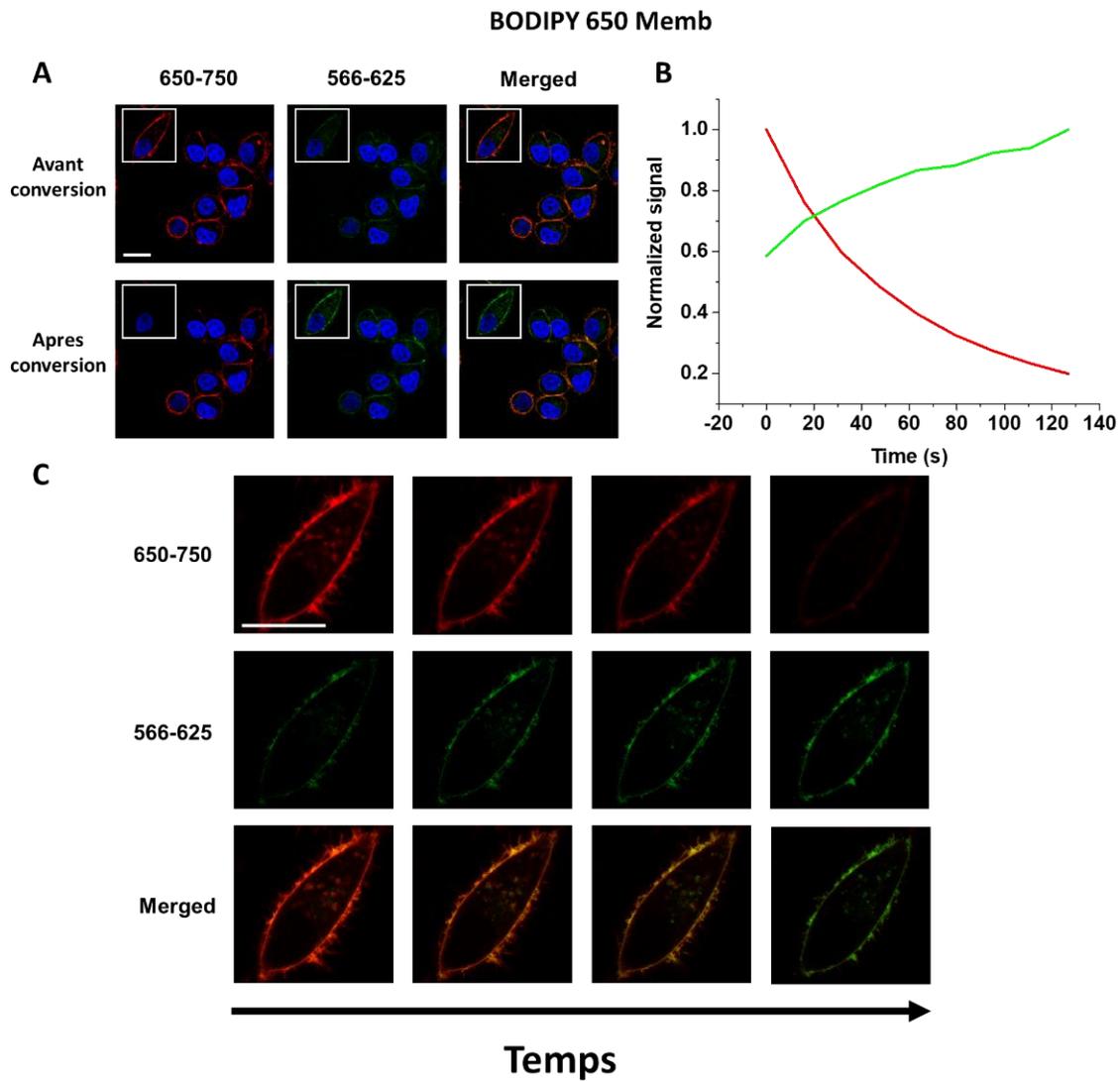


Figure III.22 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 Memb**, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images au cours du temps Échelle : 20 μ m

Le **BODIPY 650** a également pu être testé dans sa version ciblant les filaments d'actine (Figure III.23). Il s'agit cette fois-ci de cellules fixées, car la phalloïdine, permettant le ciblage, présente une importante toxicité due à l'inhibition de la dépolymérisation de l'actine. La photo-conversion est efficace sur les filaments d'actine, avec une augmentation de fluorescence d'un facteur 3.

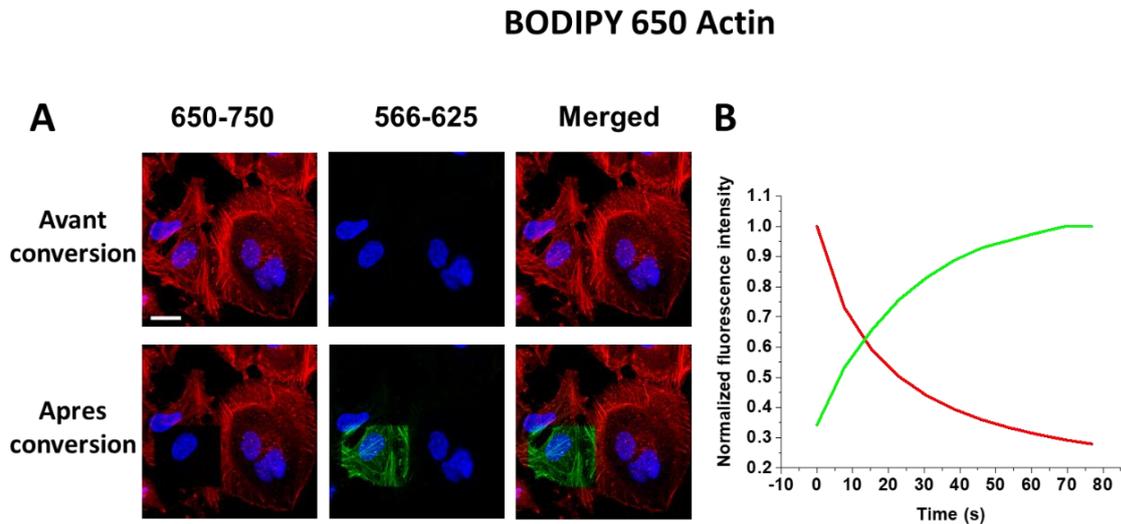


Figure III.23 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 Actin**, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images au cours du temps Échelle : 20 μm

Le **BODIPY 650** existant également en version HaloTag, celui-ci a été testé avec différentes transfections permettant l'expression de protéines marquées Halo sur des cellules KB avec un ciblage de l'actine (Figure III.24) via le peptide LifeAct, de la chromatine (Figure III.25) via la protéine H2B, de l'appareil de Golgi (Figure III.26) via la protéine human beta-1,4-galactosyltransferase, du feuillet interne de la membrane plasmique (Figure III.27), et des microtubules (Figure III.28) via la protéine MAP4. Les plasmides utilisés ont été fournis gratuitement par le Pr Arnaud Gautier.

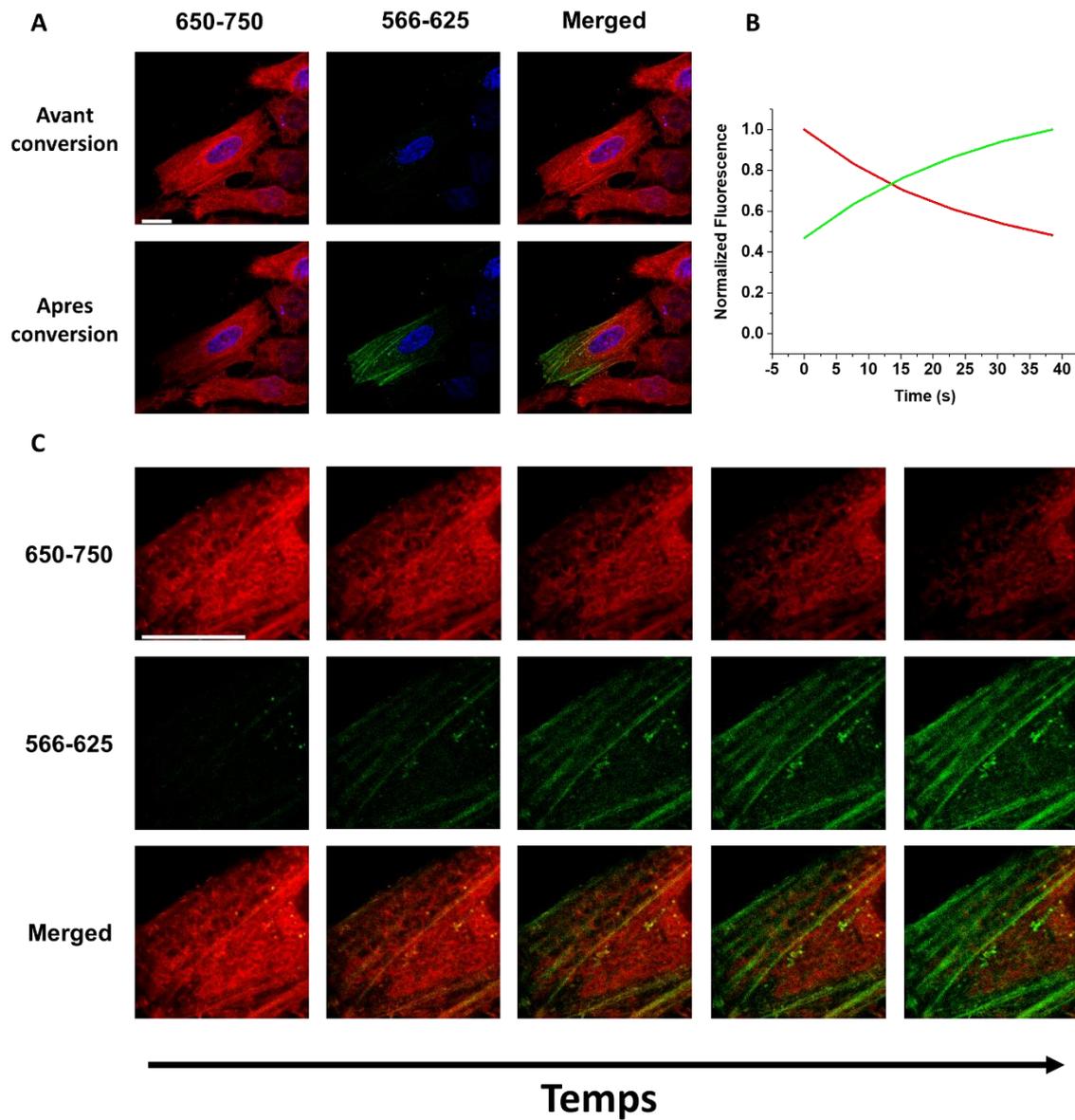


Figure III.24 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 HaloTag** lié sur les filaments d'actine via la protéine LifeAct, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images des deux canaux au cours du temps. Échelle : 20 μm

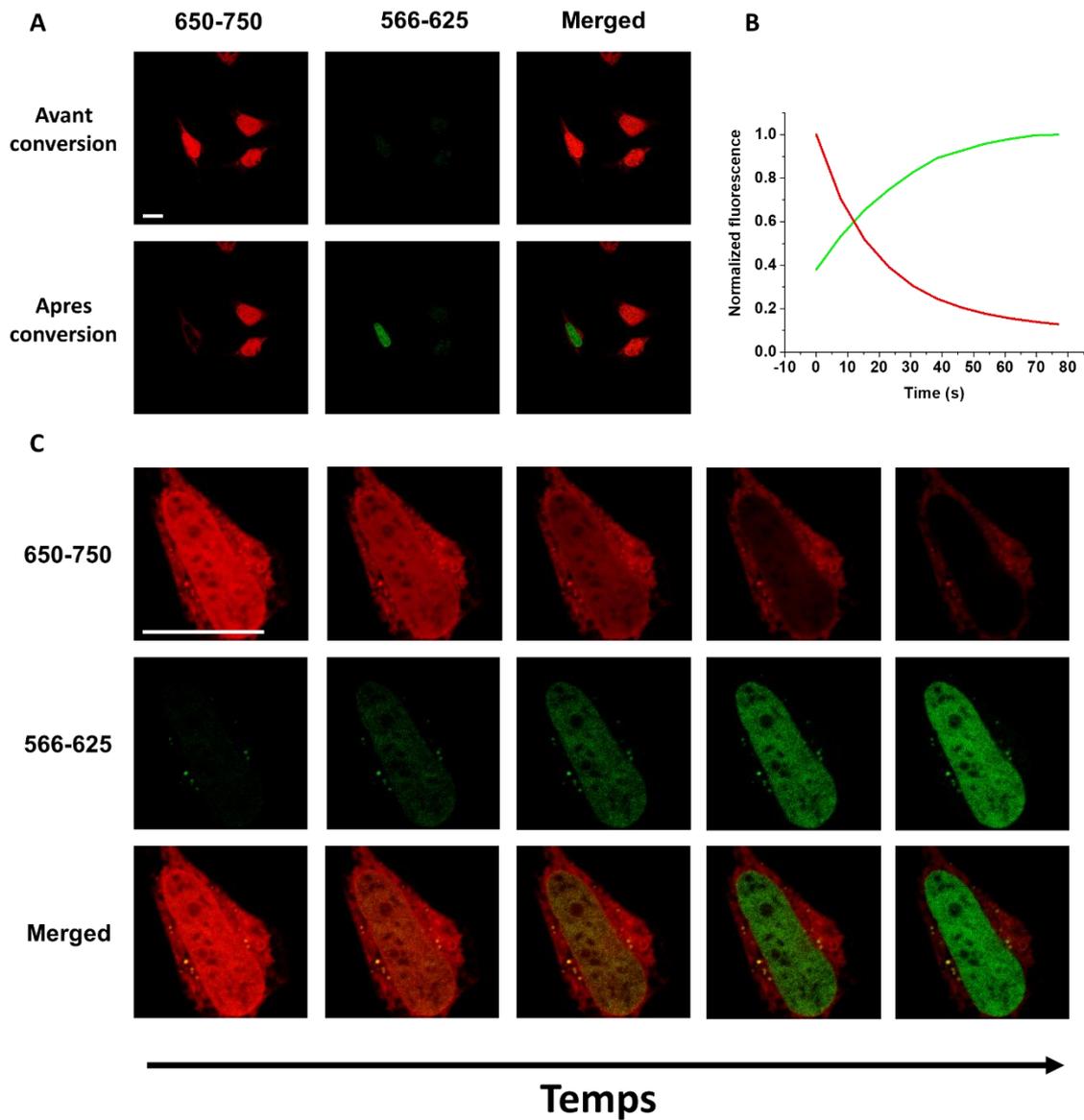


Figure III.25 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 HaloTag** lié sur la chromatine via la protéine H2B, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images des deux canaux au cours du temps. Échelle : 20 μ m

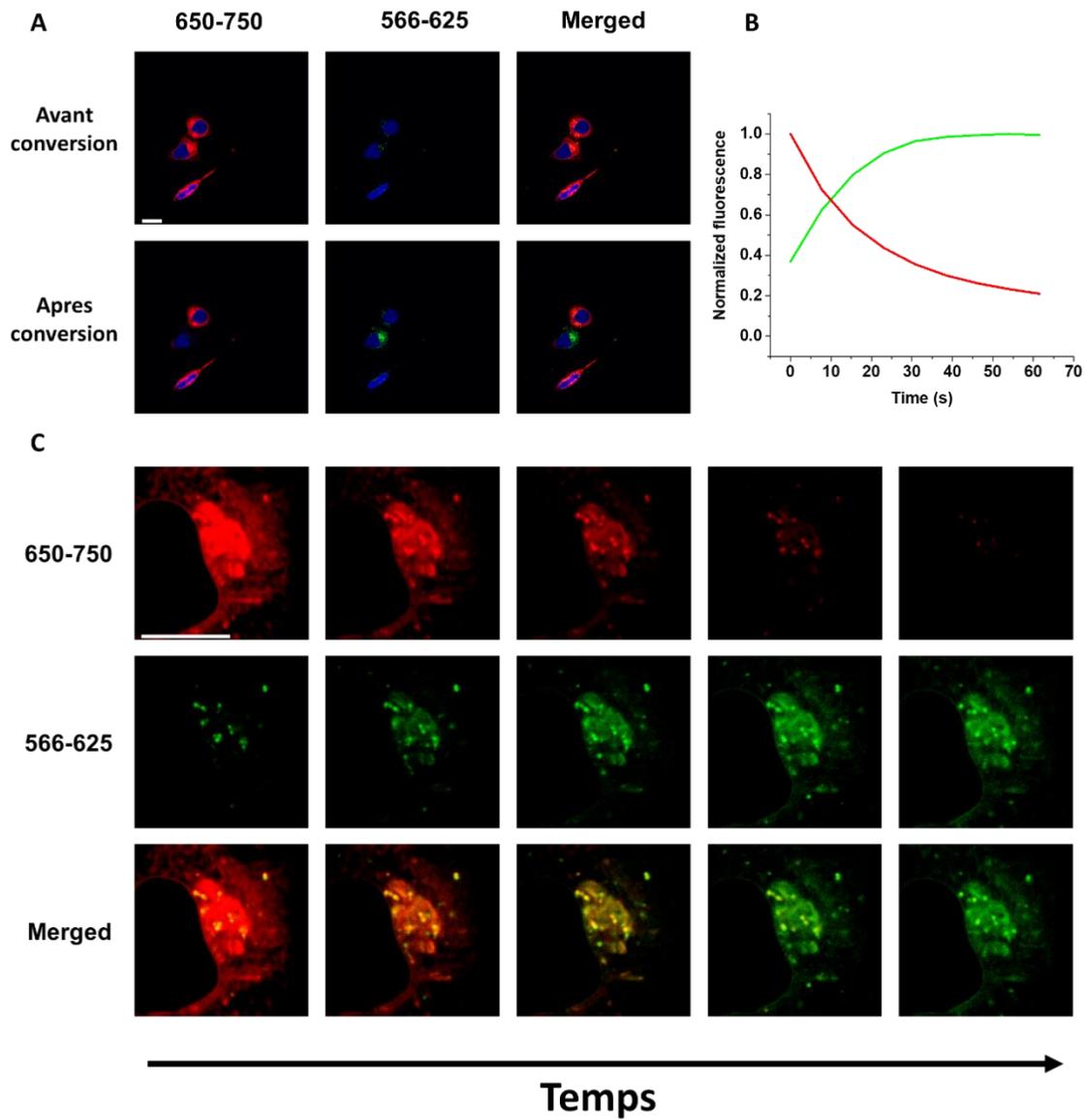


Figure III.26 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 HaloTag** lié sur les protéines human beta-1,4- galactosyltransferase de l'appareil de Golgi, Échelle : 20 μm B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images des deux canaux au cours du temps, Échelle : 10 μm

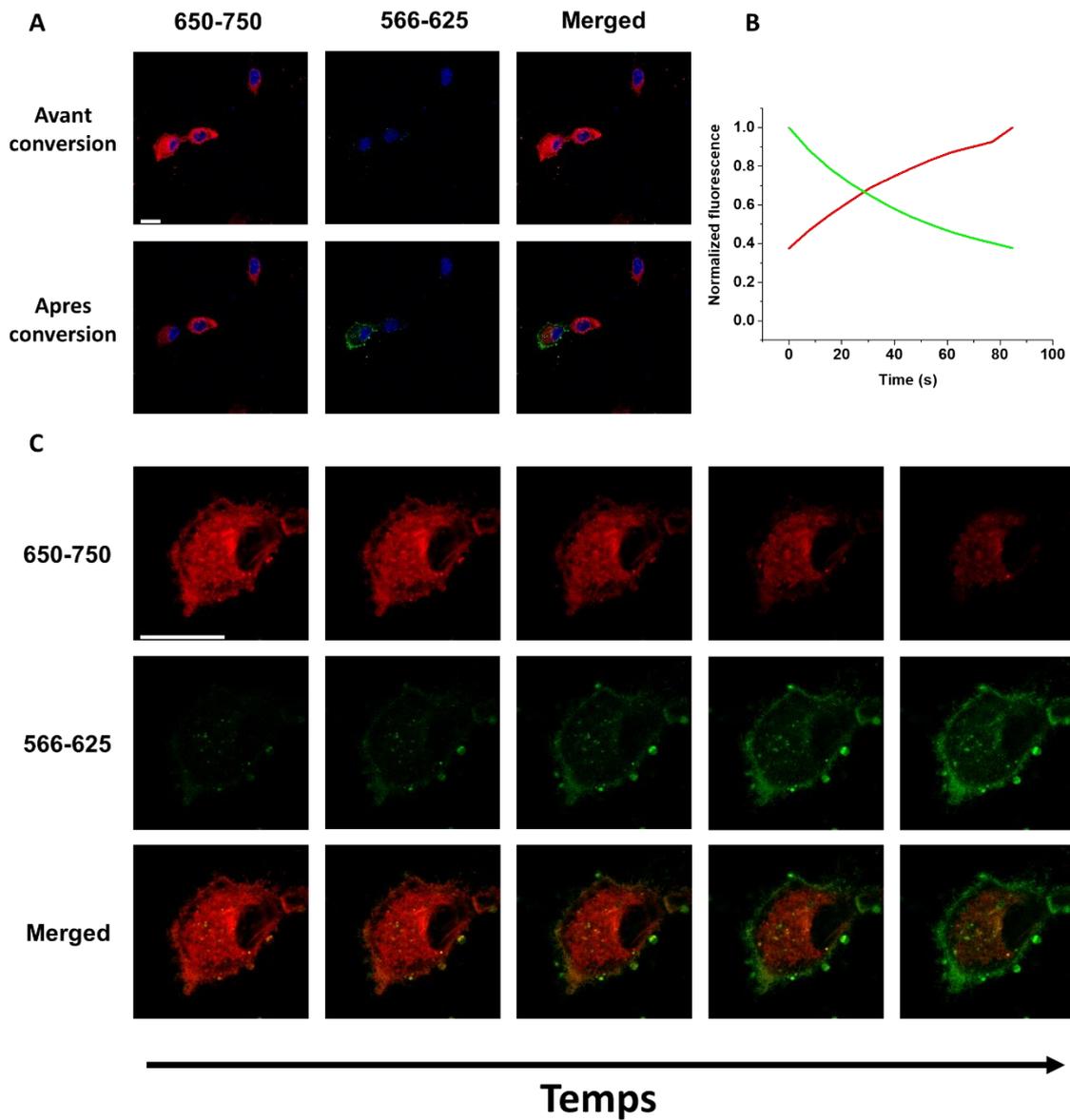


Figure III.27 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 HaloTag** lié sur les feuillettes internes de la membrane plasmique, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images des deux canaux au cours du temps. Échelle : 20 μm

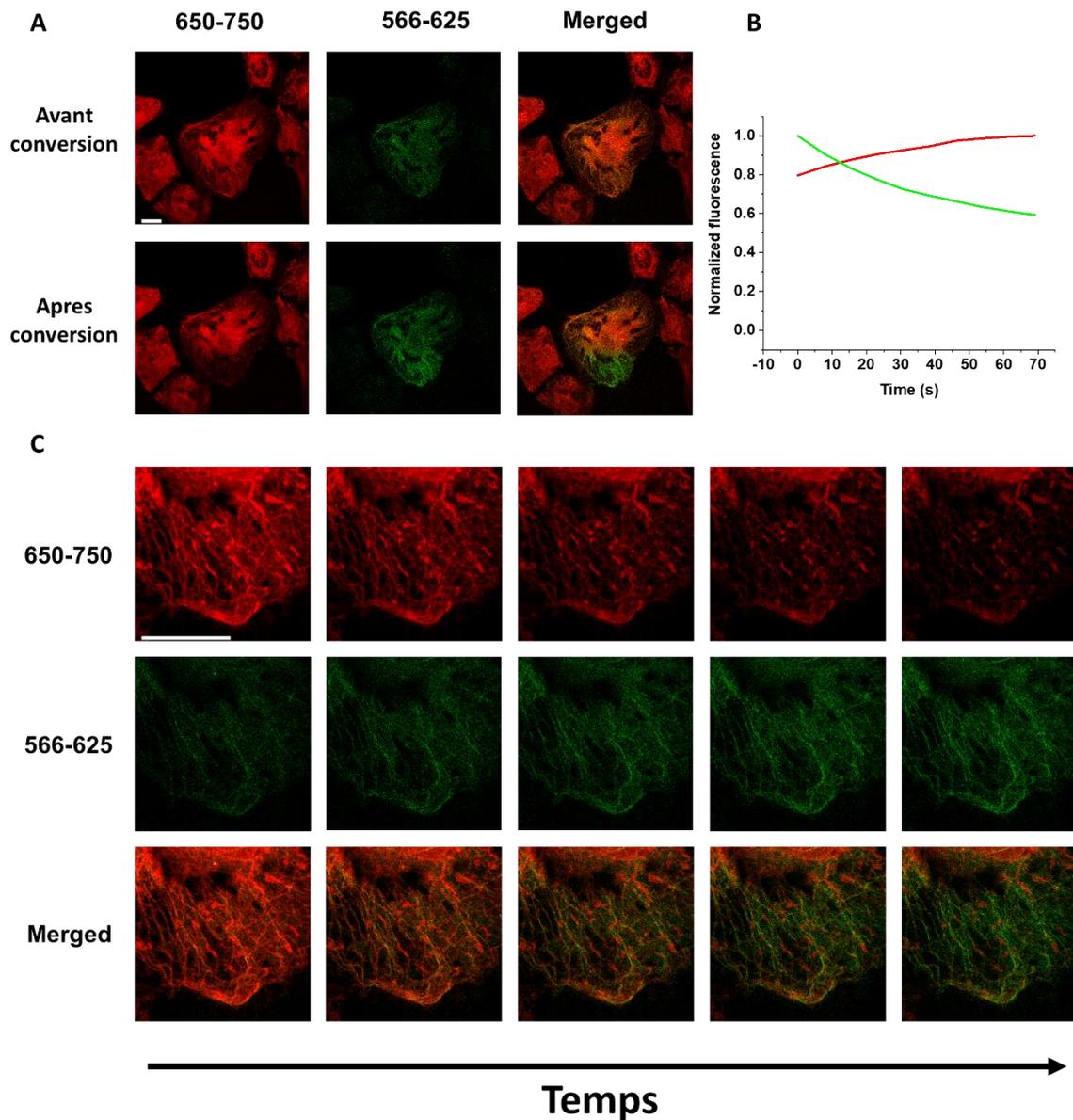


Figure III.28 A) Images obtenues avant et après conversion du **BODIPY 650 HaloTag** lié sur les microtubules via les protéines MAP4, B) Signal des canaux au cours du temps, C) Images des deux canaux au cours du temps. Échelle : 20 μm .

Toutes ces photo-conversions obtenues sur des protéines montrent que le choix de la protéine ciblée influence le résultat. En effet, l'augmentation de fluorescence observée est d'un facteur 2,5 pour la chromatine, l'appareil de Golgi et les feuillettes internes de la membrane plasmique. Tandis que pour les microtubules et l'actine, il y a une augmentation d'un facteur 1,25 et 2 respectivement.

La méthode de transfection repose sur l'incorporation d'ADN codant pour une protéine au sein d'une cellule. Cette méthode permet d'augmenter le nombre d'une protéine cible présente dans les cellules, d'en incorporer de nouvelles ou encore d'incorporer des existantes présentant des

modifications comme l'ajout de la protéine HaloTag. Une fois l'ADN inséré, il est transcrit en ARN, puis cet ARN est traduit en protéine. Si la protéine possède des acides aminés hydrophobes, l'ajout de ces acides aminés se passe dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Une fois synthétisée, la protéine peut être stockée dans le RE un certain temps avant d'être adressée là où elle trouvera sa fonction. Dans toutes ces expériences de photo-conversion des fluorophores liés à des protéines exprimées via une étape de transfection, il semble que les protéines se trouvent à leurs places attendues mais également dans le RE. De plus, seuls les fluorophores liés aux protéines adressées voient leur fluorescence changer. Cette observation est en particulier appuyée par le marquage des feuillettes internes de la membrane plasmique et de la chromatine. Toutefois, il n'est pas impossible que cette observation soit liée à un marquage non spécifique du fluorophore qui marquerait le RE ; la réalisation d'une expérience utilisant une sonde spécifique du RE comme le ER Tracker green pourrait aider à la compréhension du phénomène observé. Si cette observation s'avère exacte, le **BODIPY 650** pourrait être utilisé comme sonde protéique, permettant de discriminer les protéines adressées et celles en cours de synthèse/stockées dans le RE, et peut être même d'étudier des maladies liées au stress du RE.^[124] Lors de ces travaux de thèse, cette voie n'a pas pu être explorée davantage, mais pourrait être poursuivie dans la suite du projet.

III.2.5. Microscopie de super résolution

Comme présenté au cours de l'introduction, plusieurs méthodes de microscopie de super-résolution reposent sur l'utilisation de fluorophores qui peuvent passer par différents états de fluorescence, comme une alternance d'états allumés et éteints, ou entre plusieurs états allumés de différentes couleurs.^[125] Plusieurs exemples montrent que les BODIPYS peuvent trouver des applications dans ce domaine, comme des BODIPYS photo-activables,^[126] mais aussi des BODIPYS photo-convertibles.^[90] Des résultats préliminaires encourageants avaient également été obtenus sur le **BODIPY 576 Memb** avant ces travaux de thèse (Figure III.29).

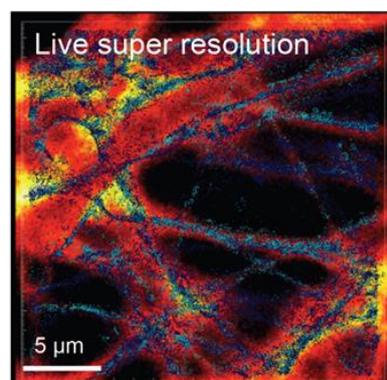


Figure III.29 *Microscopie de super-résolution sur la membrane de cellules neuronales à l'aide du **BODIPY 576 Memb***

Au cours des études de photo-conversion, le **BODIPY 650** a présenté de meilleures propriétés de photo-conversion avec un rendement chimique de conversion de 33% contre 9% pour le **BODIPY 576**. C'est donc ce BODIPY qui sera utilisé pour de l'imagerie de super-résolution. Ces expériences ont été menées par Victor Breton et Lydia Danglot, des collaborateurs travaillant à l'IPNP (Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris). Le **BODIPY 650 Memb** a pu être testé sur la membrane plasmique de cellules neuronales (Figure III.30).

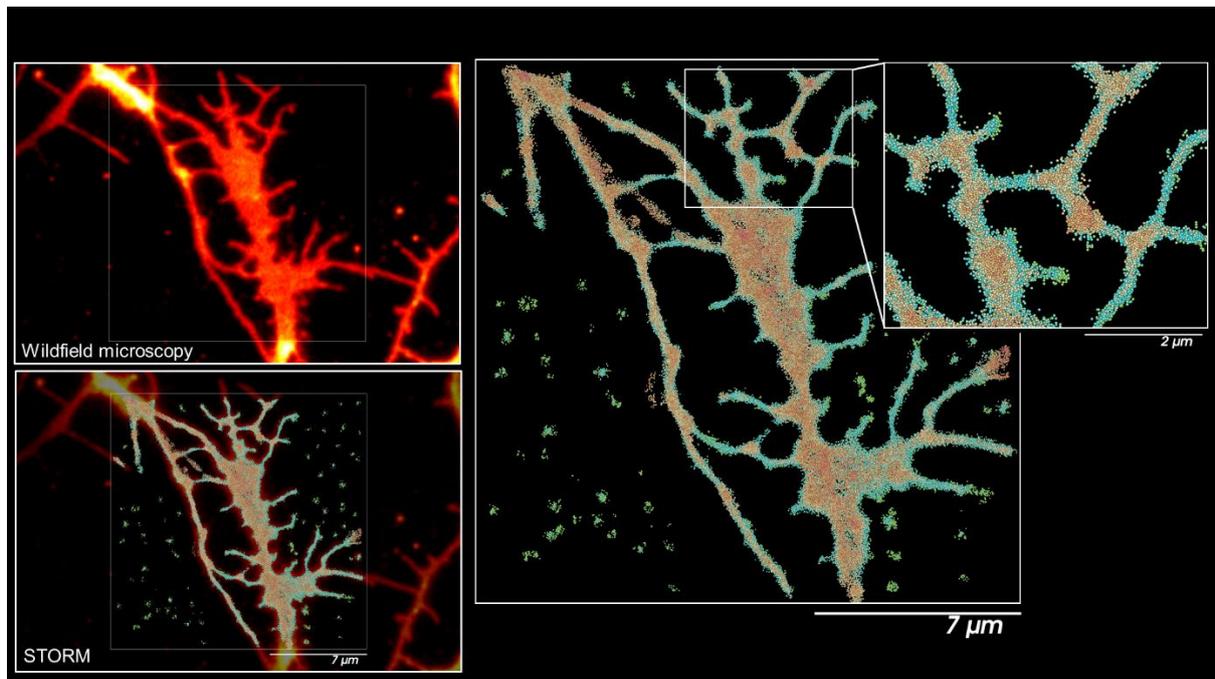


Figure III.30 *Image champ large et reconstruite de la membrane plasmique de cellules neuronales*

Ces images montrent une nette amélioration de la résolution. En effet, près de 250 000 localisations ont pu être détectées en 3 minutes permettant une résolution de 20 nm, c'est-à-dire 10 fois inférieure à la barrière de diffraction.

Le **BODIPY 650 Mito** a ensuite pu être testé cette fois sur des mitochondries de cellules neuronales (Figure III.31).

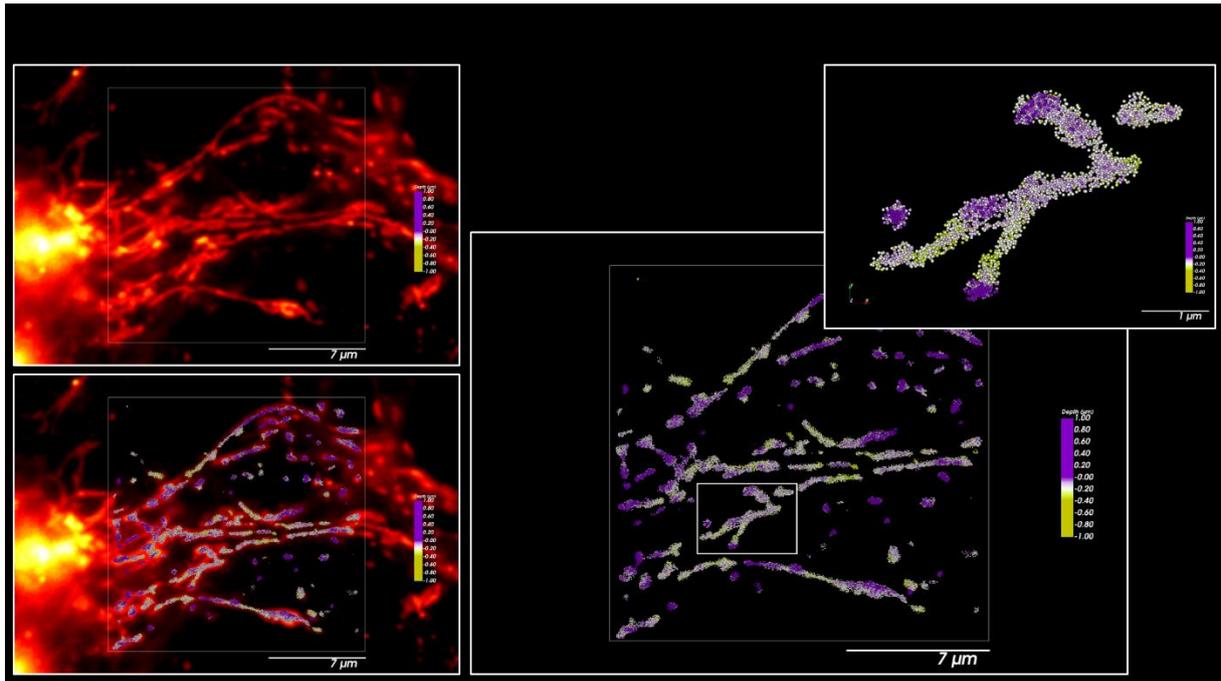


Figure III.31 *Image champ large et reconstruite des mitochondries de cellules neuronales*

Sur les mitochondries, la résolution est de 33 nm avec 65 000 localisations détectées en 15 minutes. Une différence surprenante existe entre l'imagerie sur la membrane plasmique et celle sur les mitochondries avec le **BODIPY 650**. En effet, les clignotements observés avec le fluorophore sont obtenus avec un laser 560 nm pour la membrane plasmique et 633 nm pour les mitochondries. Cette observation montre que, dans le cas des mitochondries, c'est l'espèce non convertie qui clignote, tandis que sur les mitochondries, ce sont les photo-produits.

Il est important de noter qu'aucun tampon n'a été utilisé pour réaliser ces expériences. Des tampons sont couramment utilisés en microscopie de super résolution. Ces tampons servent à piéger l'oxygène singulet généré à cause de la forte irradiation nécessaire à cette méthode de microscopie. Ils sont également utilisés pour obtenir le clignotement des molécules, comme les tampons comportant des thiols, par exemple le β -mercaptoethanol (β me) pour AF647.^[127] L'inconvénient de ces tampons est qu'ils peuvent être fortement toxiques nécessitant alors des cellules fixées, ou alors ils peuvent être peu toxiques mais les cellules ne sont pas dans des conditions physiologiques pouvant interférer avec les mécanismes cellulaires. L'utilisation du **BODIPY 650** peut permettre des applications de microscopie de super résolution en milieux physiologique.

III.2.6. DPIS

Des études supplémentaires ont été effectuées, afin de comprendre pourquoi ces BODIPYS présentent des propriétés de clignotement. Pour ce faire, de la spectroscopie de molécules uniques a été mise en place. Une nouvelle variante du **BODIPY 650** a alors été synthétisée (Figure

III.32). Il s'agit d'un **BODIPY 650** sur lequel a été ajoutée une chaîne PEG20 biotinylée, afin d'améliorer la solubilité dans l'eau et d'immobiliser la sonde sur une surface

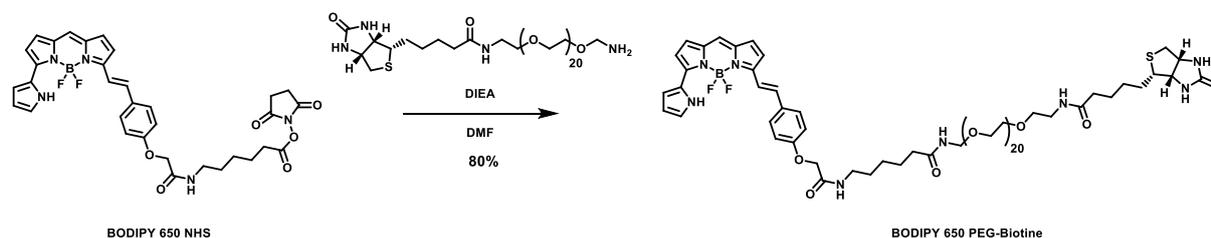


Figure III.32 Synthèse du **BODIPY 650 PEG-Biotine**

À l'aide de ce **BODIPY 650 PEG-Biotin**, de la microscopie de molécules uniques a pu être effectuée dans l'eau. Le protocole est décrit dans le chapitre V. Les molécules uniques ont été observées à l'aide d'un microscope champ large et d'un miroir dichroïque séparant le signal de fluorescence du **BODIPY 650** de ses photo-produits. Ce miroir dichroïque permet d'observer en temps réel le signal de fluorescence de deux couleurs à la même position. Dans le cas de microscopie de molécules uniques, il a été possible d'observer si les molécules émettaient dans le proche infrarouge ou dans le rouge pour chaque molécule, à l'aide d'un laser à 560 nm (Figure III.33). Ce laser a été choisi, car il permet d'exciter à la fois le **BODIPY 650** et ses photo-produits. Même si le **BODIPY 650** est peu excité à 560 nm, le signal est détectable.

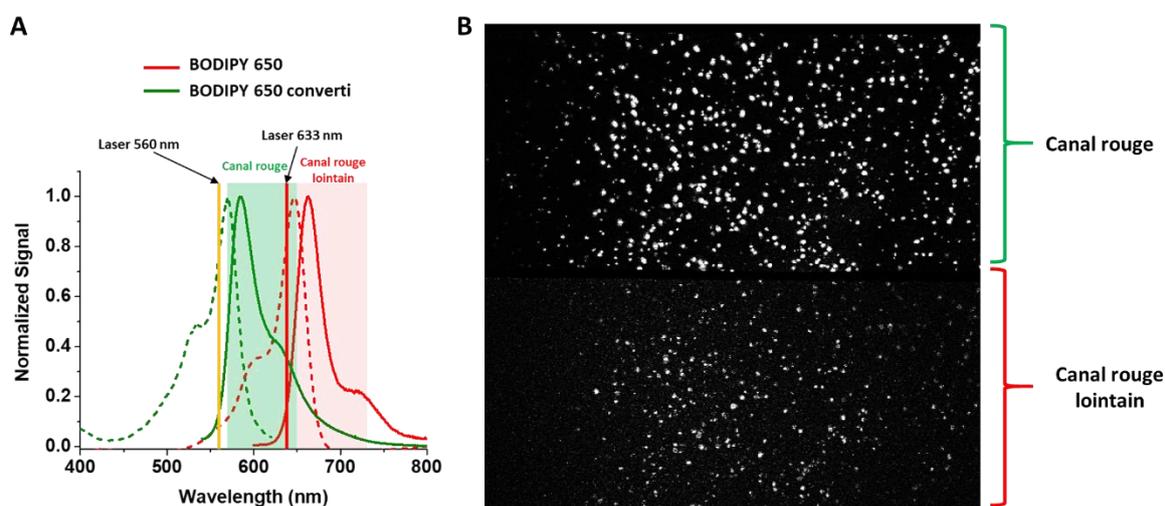


Figure III.33 A) Spectres d'émission (trait plein) et d'excitation (trait pointillé) du **BODIPY 650** avec canaux d'observation et excitation laser, B) Image de microscopie de molécules uniques.

Après que les images ont été obtenues, les positions des fluorophores ont été déterminées et les intensités de fluorescence au cours du temps des deux canaux ont pu être tracées pour chaque molécule. Dans la figure III.34 sont présentés les signaux de deux formes de deux molécules au cours du temps.

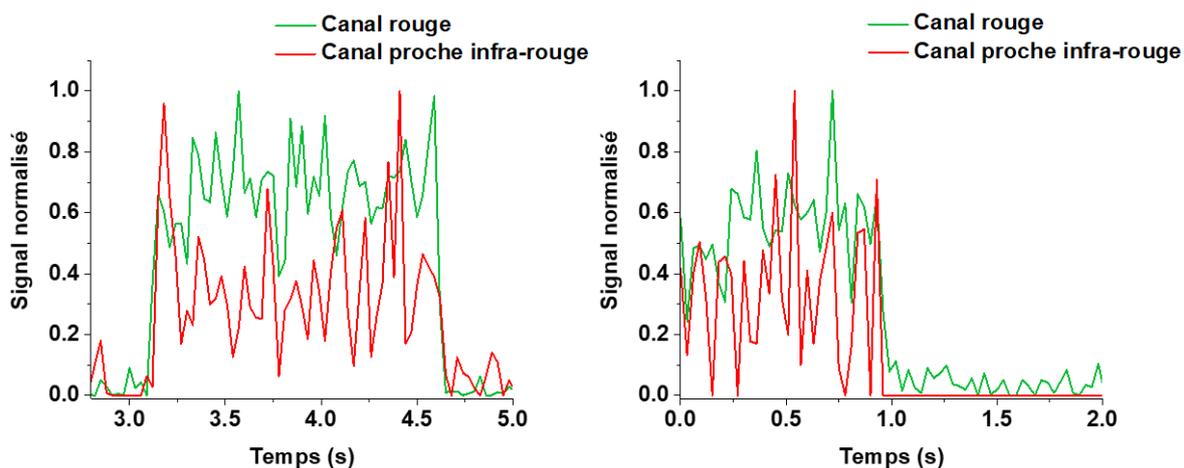


Figure III.34 *Signal de fluorescence de deux molécules au cours du temps dans le canal rouge et proche-infrarouge.*

Ces résultats sont surprenants. En effet, d'après le mécanisme DPIC que nous avons proposé, faisant intervenir une transition irréversible, le signal devrait être uniquement dans le canal rouge lointain, puis uniquement dans le canal rouge suite à la photo-conversion. Or, une coexistence des deux canaux est observée. De plus, il n'y a pas de corrélation évidente entre les intensités. En effet, parfois les intensités suivent les mêmes variations, et d'autre fois elles semblent anti-corrélées. Ces variations indiquent que la coexistence observée n'est pas due à un recouvrement spectral mais plutôt à des espèces transitoires. Cependant, il n'est pas possible qu'une molécule émette en même temps des photons de longueurs d'onde différentes. Étant donné que le temps d'exposition de la caméra était de 30 ms, il est probable qu'une rapide alternance entre des espèces de fluorescences différentes se produise en un laps de temps inférieur à 30 ms.

Étant donné que le mécanisme de photo-conversion repose sur l'oxydation du pyrrole par l'oxygène singulet, il est possible que cette oxydation soit d'une certaine manière réversible sur des temps courts. Dans la littérature, il est décrit que la cycloaddition de l'oxygène singulet avec un diène est réversible.^[128,129] L'endopéroxyde obtenu peut, soit se réarranger et libérer le dioxygène, soit définitivement oxyder le pyrrole. Ainsi, si l'endopéroxyde est présent sur le cœur BODIPY, l'espèce transitoire est non émissive ; s'il est sur le pyrrole, l'espèce transitoire est rouge. De plus, une fois le pyrrole oxydé, cet endopéroxyde peut se former sur le cœur BODIPY des photo-produits et engendrer une nouvelle espèce noire transitoire. Cet équilibre entre toutes ces espèces a mené à l'hypothèse d'un nouveau mécanisme, la commutation induite par photo-oxydation dirigée (en anglais : DPIS pour *Directed Photo-Induced switching*)(Figure III.35).

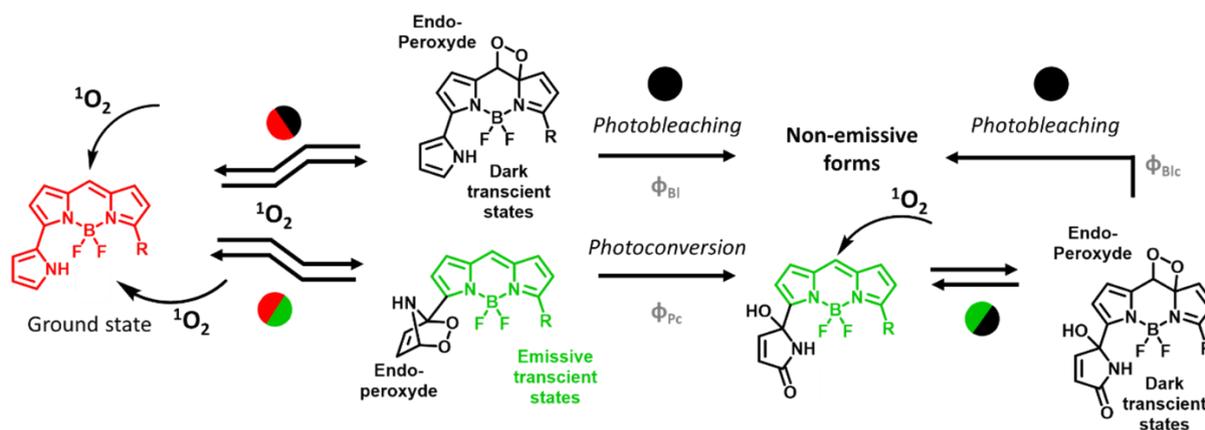


Figure III.35 Mécanisme DPIS, les cercles indiquent qu'elles forment sont en équilibre pour chaque transition

Le mécanisme DPIS est en réalité une variante du mécanisme DPIC observé sur des temps courts à l'échelle de la molécule unique où l'addition réversible de l'oxygène singulet formant un endopéroxyde transitoire est pris en compte.

Les molécules qui présentent des propriétés de clignotement sont largement utilisées en microscopie de super-résolution, car elles permettent des techniques telles que le STORM. Toutefois, les mécanismes menant à des états noirs ne sont pas toujours compris. Pour les cyanines comme **AF647**, il est décrit qu'il s'agit d'un intermédiaire dû à l'attaque du thiol, c'est pourquoi l'utilisation d'un tampon avec du MEA est nécessaire.^[130] Pour certaines rhodamines c'est un radical stabilisé sur la molécule.^[131] Pour les oxazines comme ATTO655 c'est une forme réduite par le MEA qui peut ensuite être oxydé par l'oxygène suite à une irradiation à 405 nm.^[132] Mais de nombreuses molécules sont connues pour posséder des états noirs sans pour autant en comprendre les raisons comme les BODIPYs et les fluorescéines.^[133] Au cours de cette thèse, l'hypothèse est faite qu'un fluorophore peut avoir des états noirs à cause de ces intermédiaires endopéroxydes. D'une certaine manière, le mécanisme n'est pas si différent que pour **AF647**, car l'oxygène et le soufre possèdent des propriétés semblables. Cependant, la liaison C-S est peu stable (272 kJ.mol⁻¹) et peut-être rompue par l'utilisation d'un laser à 405 nm, tandis que la liaison C-O est plus stable (360 kJ.mol⁻¹) et ne peut être rompue de cette manière. Cependant, son intermédiaire endopéroxyde venant de l'addition du dioxygène est, lui, réversible. Cette réversibilité entraîne un clignotement spontané. Cette attaque du dioxygène est responsable du photo-blanchiment des fluorophores. Ainsi, le clignotement dure peu de temps, c'est pour cette raison que les tampons utilisés en STORM comportent des pièges à oxygène. Dans le cas des fluorophores possédant un ASORM, l'hypothèse est faite que cet intermédiaire endopéroxyde a davantage lieu sur l'ASORM et entraîne un clignotement de la même émission que les photo-produits de photo-conversion.

Afin de caractériser les propriétés de clignotement du **BODIPY 650**, des statistiques sur les molécules effectuées en microscopie de molécules uniques du **BODIPY 650 PEG-Biotine** ont été faites. Ces statistiques permettent d'obtenir le nombre de photons émis par clignotement, le nombre de photons total avant le photo-blanchiment, le nombre de cycles de clignotement, le temps pendant lequel le fluorophore clignote, la précision de localisation du fluorophore, ainsi que le rapport cyclique, qui décrit le temps que passe le fluorophore dans sa forme allumée divisé par le temps dans sa forme éteinte. Ensuite, l'algorithme utilisé permet de savoir sur combien de molécules sont effectuées les statistiques. De plus, certaines molécules ne sont pas prises en compte dans ces statistiques, car, soit elles ne sont pas assez émissives, soit elles ne présentent pas de propriétés de clignotement, car elles photo-blanchissent directement. Ainsi, le pourcentage de molécules retirées des analyses est également obtenu.

Chacune de ces propriétés donne des informations sur la précision qui sera obtenue en imagerie super-résolue. Plus le nombre de photons par cycle est important, meilleur sera la détection par la caméra et donc la précision de la localisation. Plus le nombre de cycles est important, plus chaque molécule contribuera à la reconstruction de l'image. La microscopie SLM repose sur le principe de détection d'une molécule unique ; une molécule émissive doit ainsi être entourée de molécules éteintes afin de localiser avec précision ce point. Le rapport cyclique dénote cette tendance : s'il est élevé, une molécule se retrouvera rarement isolée, tandis que s'il est faible la localisation sera aisée. Cependant, s'il est trop faible, la détection de chaque molécule prendra du temps et la résolution temporelle s'en retrouvera diminuée. Ainsi, le rapport cyclique doit être ni trop élevé ni trop faible pour obtenir une bonne image, mais il faut également prendre en compte le nombre de fluorophores utilisés, ainsi que la densité dans la zone voulant être observée. Idéalement, le rapport cyclique doit être aux alentours de 0.05, ainsi, seulement 5 % des fluorophores sont dans un état allumé. Les résultats sont présentés tableau III.3.

Nombre de photons	Total de photons	Nombre de cycles	Localisation (nm)	Temps de clignotement(s)	Rapport cyclique	Molécules éliminées (%)	Molécules analysées
901 ± 550	8954 ± 1100	12.7 ± 3.8	12.0 ± 0.4	7.0 ± 0.4	0.15 ± 0.02	20 ± 3	107 ± 38

Tableau III.3 Propriétés de clignotement du **BODIPY 650** attaché à la neutravidine

Afin de tirer des conclusions de ces résultats, il faut les comparer avec ceux présents dans la littérature. Dans le tableau III.4 sont présentés les mêmes propriétés de clignotement pour **Cy3B** et **AF568**, deux fluorophores nécessitant le même laser d'excitation que le **BODIPY 650**, soit 560 nm.^[133]

Fluorophore		Photons	Switching Cycles	Total Photons	Localization Precision (nm)	Photoswitching Time (s)	Duty Cycle
Cy3B	low Φ	169 \pm 26	9.2 \pm 1.6	1,535 \pm 116	26.6 \pm 0.8	50 \pm 2	0.0348 \pm 0.0099
	mid Φ	288 \pm 12	6.5 \pm 0.9	1,871 \pm 190	25.1 \pm 0.1	45 \pm 17	0.0286 \pm 0.0048
	high Φ	515 \pm 50	4.5 \pm 0.8	2,265 \pm 229	22.2 \pm 0.4	21 \pm 9	0.0311 \pm 0.0172
AlexaFluor568	low Φ	206 \pm 34	15.2 \pm 1.9	3,126 \pm 670	27.0 \pm 0.6	85 \pm 18	0.0338 \pm 0.0008
	mid Φ	389 \pm 97	10.1 \pm 2.4	3,796 \pm 368	25.0 \pm 0.3	60 \pm 12	0.0324 \pm 0.0027
	high Φ	739 \pm 124	7.5 \pm 1.4	5,438 \pm 854	22.7 \pm 1.0	55 \pm 9	0.0324 \pm 0.0113

Tableau III.4 Propriétés de clignotement de **Cy3B** et **AF568**

Les propriétés de clignotement dépendent de la puissance du laser utilisé. Dans le cas du **BODIPY 650**, la puissance utilisée était de 0.6 kW.cm⁻². Cette puissance est semblable au laser pour les exemples *high ϕ* présenté dans le tableau III.4 (0.49 kW.cm⁻²). Ainsi, le **BODIPY 650** présente un nombre de photons plus important entraînant une meilleure précision de localisation. Le nombre de cycles de clignotements est également meilleur. Cependant, le temps de clignotement est plus faible et le rapport cyclique est trois fois plus important. Toutefois, les acquisitions ne sont pas exactement effectuées dans les mêmes conditions. En effet, pour le **BODIPY 650**, aucun tampon n'est utilisé, ainsi le fluorophore photo-blanchit beaucoup plus rapidement. De plus, le clignotement de **Cy3B** repose sur l'addition d'un thiol et celui de **AF568** sur la stabilisation d'un radical entraînant des états éteints plus long que l'endopéroxyde du **BODIPY 650** et donc un rapport cyclique plus faible. Ces résultats montrent tout de même que les propriétés de clignotement du **BODIPY 650** sont très bonnes et expliquent les bons résultats obtenus en microscopie SMLM. De plus, bien que le nombre de cycles et le rapport cyclique ne soient pas optimaux, l'acquisition peut être effectuée sur des échantillons vivants, car elle ne nécessite pas de tampon, ainsi même si la résolution est légèrement plus faible, car l'objet se déplace, l'expérience permet d'obtenir des informations dans des conditions physiologiques.

Les propriétés de clignotement ont également été obtenues en utilisant le **BODIPY 650 Mito** dans un film polymère composé de PMMA. L'objectif était de confirmer l'influence de l'oxygène sur les propriétés de clignotement. En effet, la quantité d'oxygène singulet générée dans un film PMMA est plus faible que dans l'eau.^[134] Les résultats sont présentés tableau III.5.

Nombre de photons	Total de photons	Nombre de cycles	Localisation (nm)	Temps de clignotement (s)	Rapport cyclique
2623 \pm 571	29458 \pm 2223	13 \pm 2	11.8 \pm 0.2	63 \pm 10	0.14 \pm 0.03

Tableau III.5 Propriétés de clignotement du **BODIPY 650** dans un film PMMA à 1 μ m

Toutes les valeurs obtenues ne sont pas comparables, car pour l'expérience dans le film PMMA, le laser était à 2 kW.cm⁻² et le temps d'intégration de 100 ms contre 30 ms avec le **BODIPY 650 PEG-Biotine**. Cette différence s'explique par le fort bruit de fond présent avec le film PMMA qui a nécessité une augmentation du laser et du temps d'intégration afin d'avoir un signal clair.

Cependant, les informations importantes sont le temps de clignotement, le nombre de cycles et le rapport cyclique. En effet, le rapport cyclique et le nombre de cycles se trouvent inchangés, tandis que le temps de clignotement est presque dix fois supérieur indiquant que le même équilibre entre forme éteinte et allumée est présent mais qu'il est d'une certaine manière « ralenti ». Cette observation indique l'influence de la quantité d'oxygène singulet généré. Cependant, d'autres paramètres peuvent être à l'origine de ces différences, comme la diffusion de l'oxygène singulet.

Il sera difficile de conclure avec certitude sur le rôle de l'intermédiaire endopéroxyde impliqué dans le clignotement, car cette espèce n'est pas isolable sur les BODIPYS synthétisés. Peut-être qu'en synthétisant un fluorophore formant un endopéroxyde bien plus stable, avec un temps de vie de l'ordre de la seconde, il serait possible de comparer le temps éteint du fluorophore avec le temps de vie de cet intermédiaire et définitivement conclure sur le mécanisme DPIS.

III.3. Conclusion BODIPYS

Au cours de ce chapitre, deux BODIPYS photo-convertibles ont été caractérisés et dérivés en versions mitochondriale, membranaire et HaloTag. Ils ont pu être testés en imagerie confocale et permettre une bonne photo-conversion *in cellulo*. De plus le **BODIPY 650** a montré d'excellentes propriétés pour des applications en imagerie de super-résolution sur des échantillons vivants, amenant l'émergence d'un sous mécanisme du DPIC, le DPIS. Ces résultats sont encourageants pour appliquer le DPIC à d'autres fluorophores. Ils indiquent également l'utilisation de ces molécules photo-convertibles en microscopie SMLM, élargissant le nombre de fluorophores photo-convertibles et leurs applications en bioimagerie.

Chapitre IV. StyrylBODIPYs

Suite à ces résultats concluants obtenus à la fois sur les coumarines et les BODIPYs, il a été décidé de développer des BODIPYs conjugués à différents ASORMs afin d'étudier l'influence de ces derniers sur les propriétés de photo-conversions et d'étendre la palette de sondes photo-convertibles. La position α du BODIPY a été choisie, car c'est sur celle-ci que l'effet bathochrome venant de la conjugaison de l'ASORM sera le plus important. Cependant, l'introduction d'un cycle aromatique en position α du BODIPY peut s'avérer compliquée. En effet, comme présenté dans le chapitre III, il est nécessaire d'introduire un halogène dans cette position afin d'effectuer des couplages pallado catalysés. L'étape d'halogénéation doit se faire sur l'intermédiaire dipyrrométhane sinon ce sera la position β qui sera fonctionnalisée. Comme l'objectif est d'introduire un seul ASORM afin de ne pas compliquer l'étude, il est nécessaire de mono halogéner ce dipyrrométhane. Cette étape est sensible, car les positions α sont réactives entraînant de nombreux sous-produits, de plus, la présence d'une double halogénéation est inévitable rendant la purification des composés peu évidente. Enfin, ce dipyrrométhane doit ensuite être oxydé puis complexé au bore entraînant un rendement global faible. C'est pourquoi une approche via des condensations de Knoevenagel a été retenue afin d'obtenir des styrylBODIPYs. Bien que cette approche mène également à des composés mono et bis, l'obtention d'un BODIPY tetraméthyle est plus accessible permettant l'accès à une librairie de potentielles sondes photo-convertibles avec deux étapes de synthèses contre cinq étapes via la voie nécessitant une l'halogénéation (Figure IV.1).

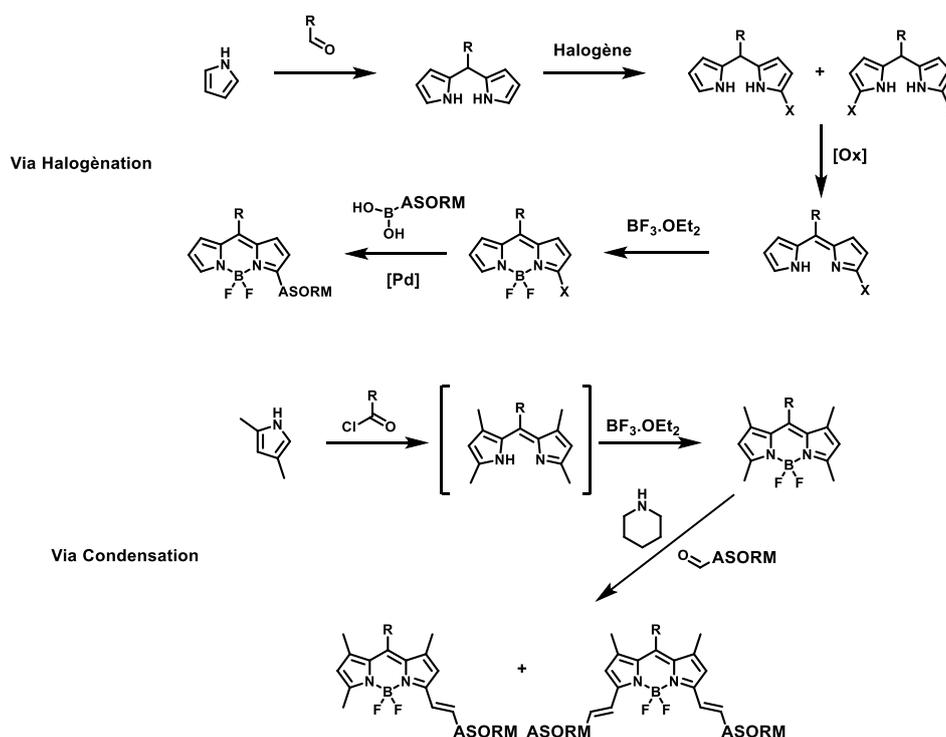
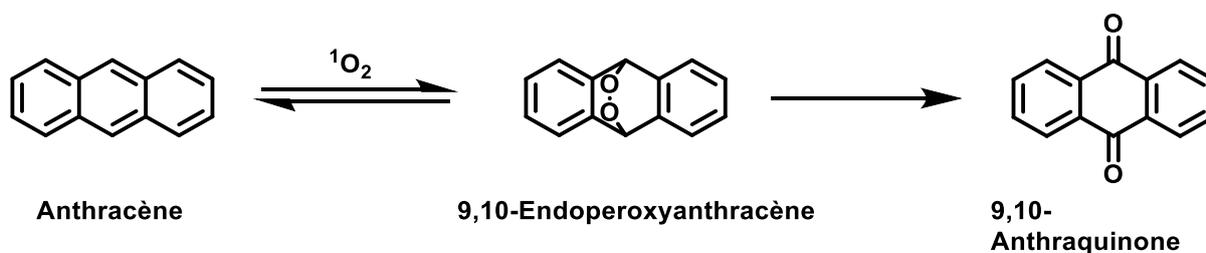


Figure IV.1 *Voies de synthèse possible des nouvelles sondes photo-convertible*

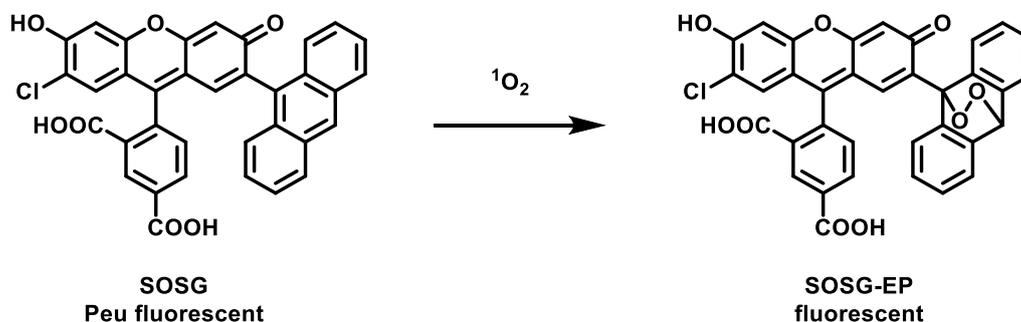
IV.2. Choix des différents ASORMs

L'obtention de ces styrylBODIPYs par la réaction de Knoevenagel requiert l'utilisation de cycles aromatiques possédant une fonction carbonyle. Dans un premier temps il a été choisi de modifier l'ASORM pyrrole. Plusieurs pyrroles ont été sélectionnés comportant différents substituants : des groupes alkyls afin d'observer l'effet de groupements donneurs, une fonction ester pour l'effet électro-attracteur et également un pyrrole qui sera introduit via sa position β . De plus, ces pyrroles étant substitués, il est possible que l'oxydation ne puisse pas se produire et donc que la conversion ne se produise pas.

Ensuite, de nouveaux ASORMs potentiels ont été choisis comme l'anthracène. En effet l'anthracène s'oxyde en présence d'oxygène singulet en formant un intermédiaire endo-peroxyde qui se réarrange en 9,10-Anthraquinone (Figure IV.2).^[135]

Figure IV.2 *Oxydation de l'anthracène par l'oxygène singulet*

L'anthracène est utilisé pour cette propriété comme groupement permettant de détecter l'oxygène singulet sur la sonde SOSG. Cette sonde est composée d'une fluorescéine conjuguée à l'anthracène, elle est initialement non émissive à cause d'un transfert électronique à l'état excité entre l'anthracène et la fluorescéine (SOSG), puis après oxydation de l'anthracène, ce transfert d'énergie est rompu libérant la fluorescence de la sonde (SOSG-EP) (Figure IV.3).^[136]

Figure IV.3 *Fonctionnement de la sonde SOSG*

Les pyridones ont également été choisies, car elles présentent cette même sensibilité à l'oxygène singlet en s'oxydant en hydroxypyridine via un intermédiaire endo-péroxyde (Figure IV.4).^[137]

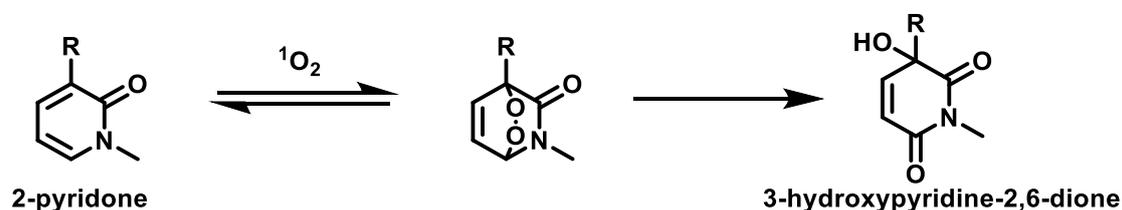


Figure IV.4 Oxydation de la 2-pyridone par l'oxygène singlet

Elles sont également connues pour posséder un intermédiaire endopéroxyde stable jusqu'à 6 heures en faisant donc des candidats intéressants à la fois pour le DPIC mais également le DPIS. En effet les pyridones peuvent relarguer l'oxygène singlet au cours du temps à partir de l'intermédiaire endopéroxyde. Cette propriété a été utilisée pour des applications en PDT à partir de porphyrines (Figure IV.5).^[138]

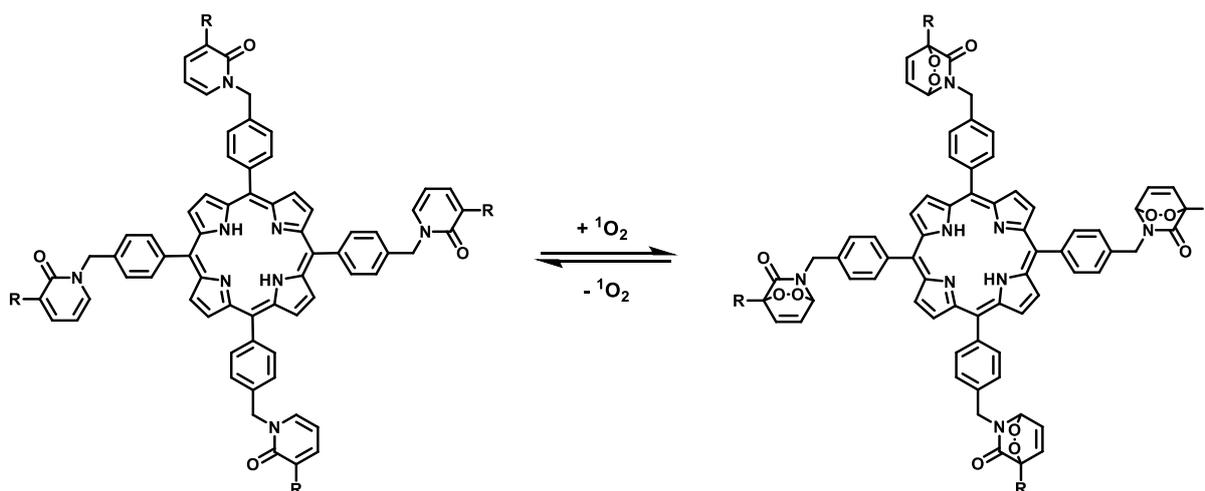


Figure IV.5 Application des intermédiaires endopéroxyde des pyridones en PDT

Ainsi huit potentiels ASORMs ont été sélectionnés pour leur tendance à être oxydés par l'oxygène singlet (Figure IV.6).

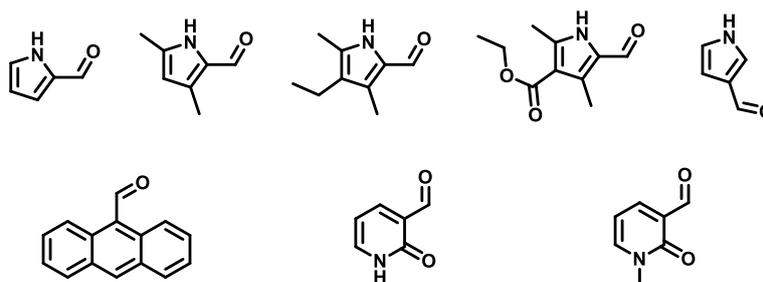


Figure IV.6 Choix des dérivés aldéhydes pouvant servir d'ASORMs

IV.3. Synthèse

En premier lieu, la synthèse d'un BODIPY a été effectuée. Ce BODIPY doit présenter des méthyles en position α pour incorporer les potentiels ASORMs via la condensation de Knoevenagel, ainsi qu'un site fonctionnalisable afin de pouvoir ajouter des groupes ciblands sur les candidats présentant les propriétés de photo-conversion les plus prometteuses. Ce BODIPY a été préparé à partir du 2,4-diméthylpyrrole amenant les méthyles et du 5-chloro-5-oxovalérate de méthyle présentant une fonction ester servant de plateforme fonctionnalisable. Des condensations de Knoevenagel ont ensuite pu être effectuées à partir des différents ASORMs pour donner les **BODIPY-2**, **BODIPY-2,4**, **BODIPY-Crypto**, **BODIPY-3**, **BODIPY-Ester**, **BODIPY-Anthra**, **BODIPY-Pyri** et **BODIPY-MePyri** (Figure IV.7).

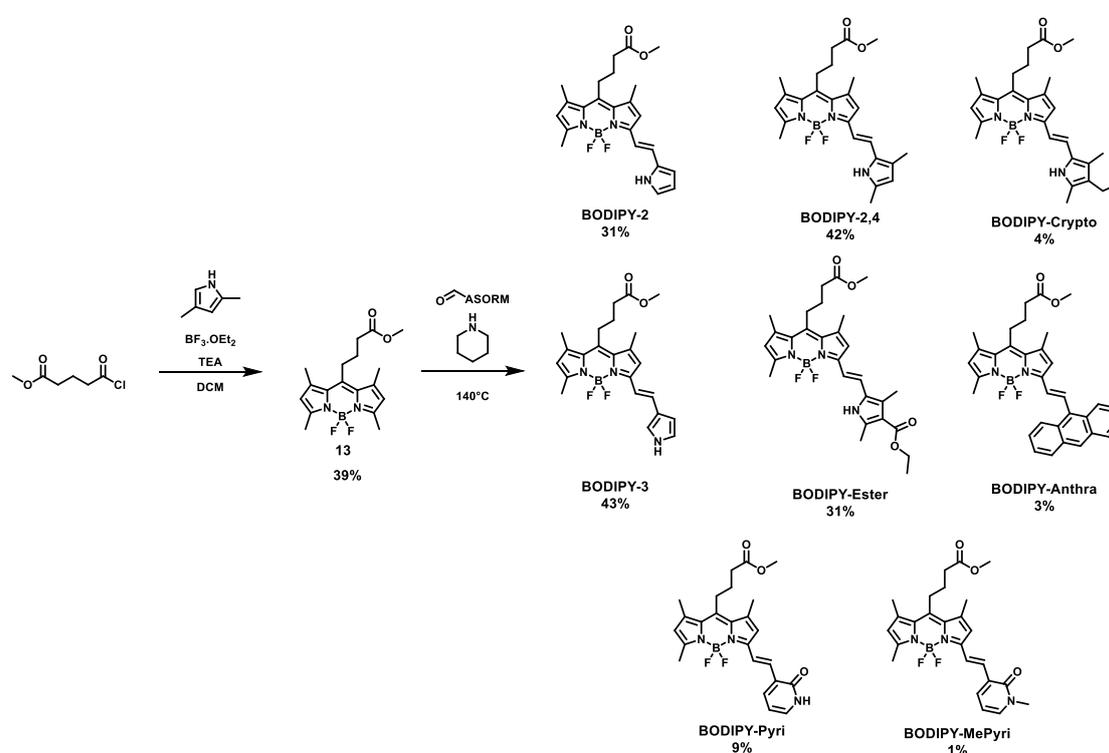


Figure IV.7 Synthèse des Styryl BODIPYs

Les différences entre les rendements s'expliquent par la difficulté de purification de certains de ces produits. En effet, les produits mono-Styryl, bis-Styryl et le produit de départ présentent des éluations semblables rendant la purification par chromatographie sur gel de silice ou HPLC compliquée. Seuls les cœurs de pics ont été gardés pour garantir une pureté importante cruciale pour les analyses spectroscopiques. En effet, le BODIPY de départ ayant des propriétés photophysiques semblables aux potentiels photo-produits, sa présence biaiserait le rendement chimique mesuré par spectroscopie de fluorescence.

Tous les composés synthétisés ont été caractérisés par ^1H RMN, ^{13}C RMN et spectrométrie de masse.

IV.4. Propriétés spectroscopiques

Les propriétés d'absorption et d'émission de ces BODIPYs ont été déterminées dans le toluène, l'acétate d'éthyle, le DMSO et le MeOH afin d'observer de potentielles solvatochromies (Figure IV.8 à IV.15). Les propriétés spectrales sont résumées de la Tableau IV.1.

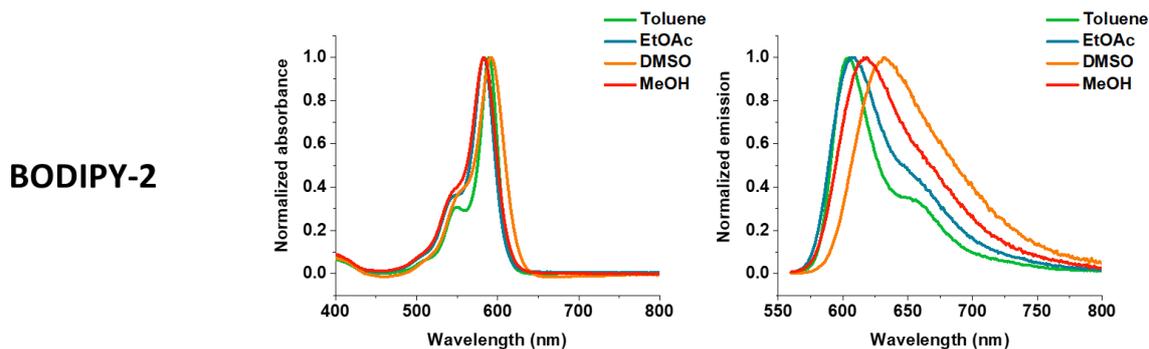


Figure IV.8 Spectre d'absorption et d'émission de **BODIPY-2**

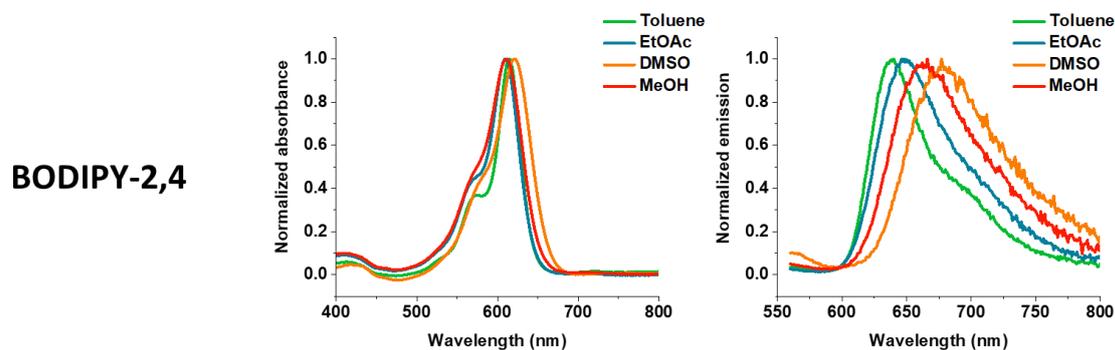


Figure IV.9 Spectre d'absorption et d'émission de **BODIPY-2,4**

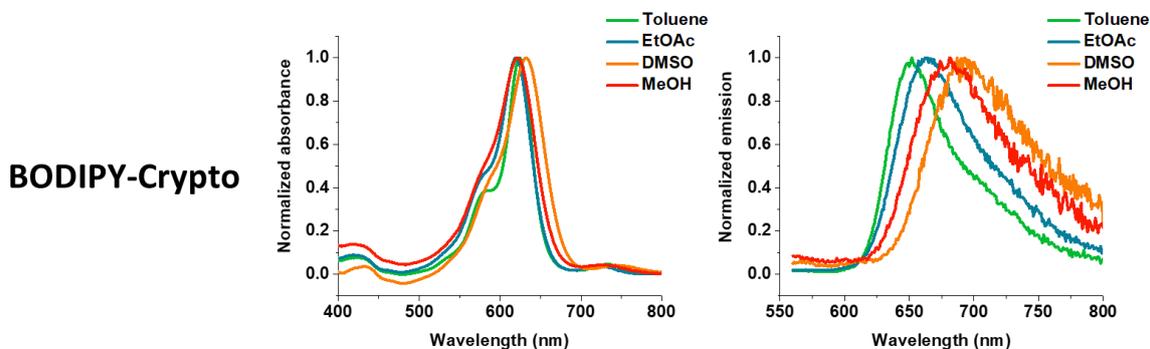
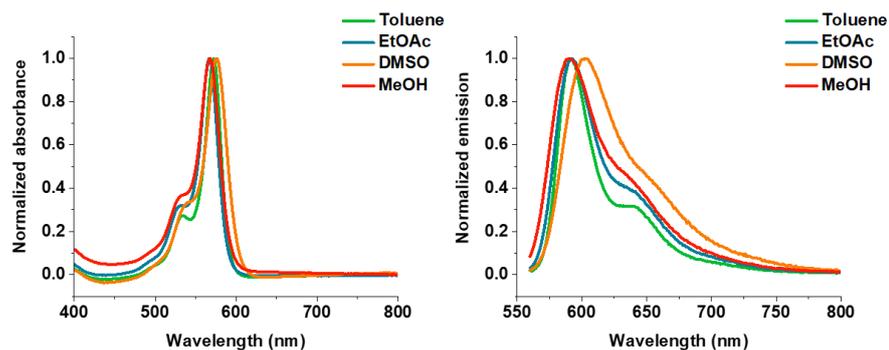
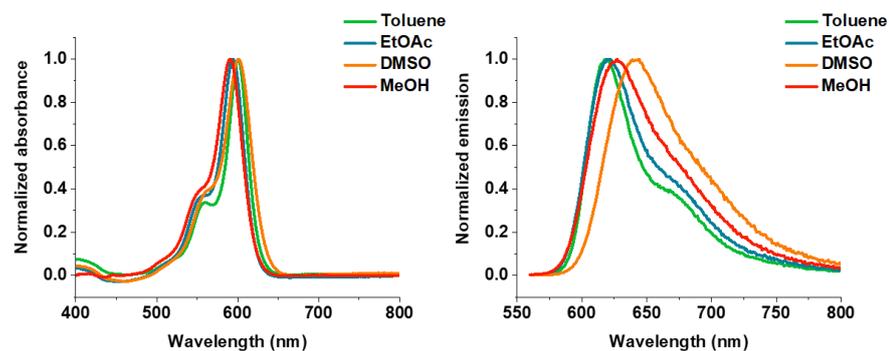
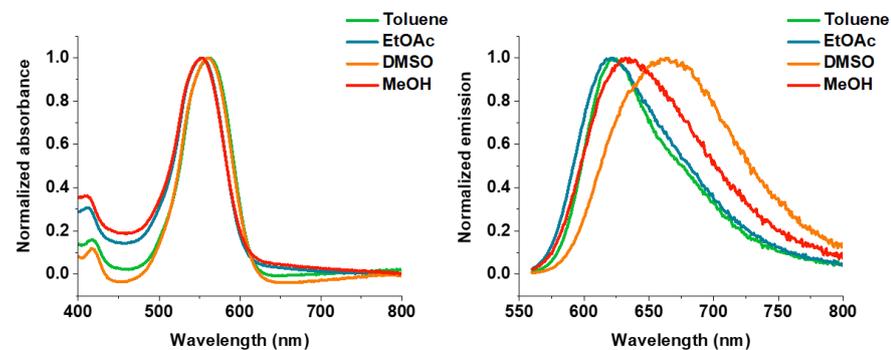
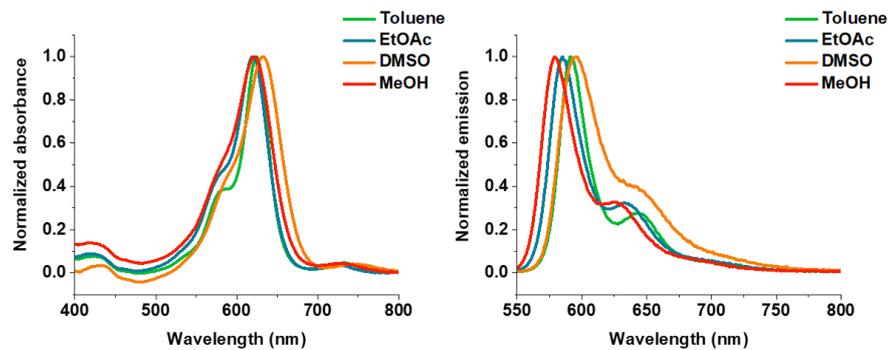
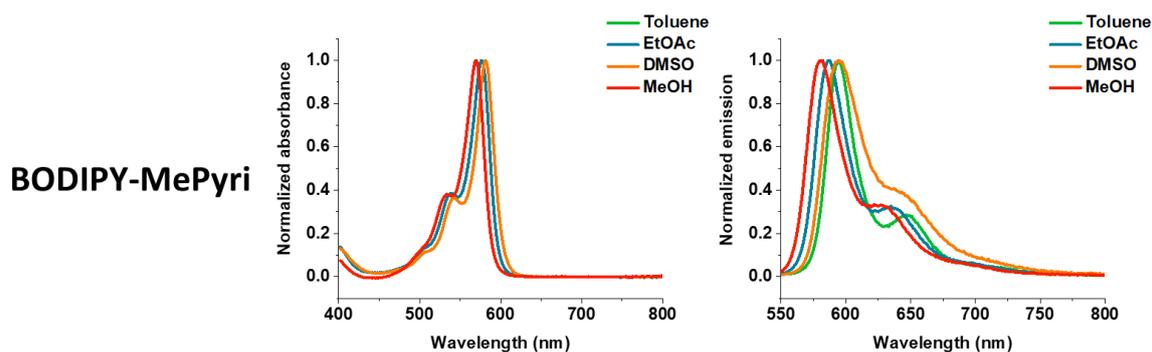


Figure IV.10 Spectre d'absorption et d'émission de **BODIPY-Crypto**

BODIPY-3Figure IV.11 *Spectre d'absorption et d'émission de BODIPY-3***BODIPY-Ester**Figure IV.12 *Spectre d'absorption et d'émission de BODIPY-Ester***BODIPY-Anthra**Figure IV.13 *Spectre d'absorption et d'émission de BODIPY-Anthra***BODIPY-Pyri**Figure IV.14 *Spectre d'absorption et d'émission de BODIPY-Pyri*

Figure IV.15 Spectre d'absorption et d'émission de **BODIPY-MePyri**

BODIPY-2	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	589	124 000	605	91	113 000
EtOAc	583	108 000	607	82	89 000
DMSO	592	104 000	633	79	82 000
MeOH	583	95 000	617	72	68 000

BODIPY-2,4	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	614	111 000	640	78	87000
EtOAc	610	104 000	649	63	66000
DMSO	632	85 000	676	46	39000
MeOH	611	81 000	660	34	28000

BODIPY-Crypto	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	624	103 000	652	73	75 000
EtOAc	620	86 000	662	59	51 000
DMSO	632	85 000	690	36	31 000
MeOH	622	84 000	675	25	21 000

BODIPY-Anthra	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	562	40 000	621	69	28 000
EtOAc	554	44 000	620	56	25 000
DMSO	562	46 000	659	50	23 000
MeOH	553	41 000	639	41	17 000

BODIPY-3	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	572	153 000	584	78	119000
EtOAc	567	141 000	583	63	89000
DMSO	576	126 000	602	46	58000
MeOH	568	109 000	591	34	37000

BODIPY-MePyri	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	585	95 000	594	78	74 000
EtOAc	574	98 000	587	98	96 000
DMSO	579	92 000	595	74	68 000
MeOH	567	85 000	580	100	85 000

BODIPY-Ester	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_f (%)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Toluène	600	134 000	617	92	123 000
EtOAc	594	131 000	619	81	106 000
DMSO	601	116 000	644	79	92 000
MeOH	591	114 000	626	70	80 000

Tableau IV.1 Propriétés spectrales des **BODIPYS**

Ces BODIPYS présentent des déplacements bathochromes par rapport au BODIPY tétraméthyl, entre 60 nm pour le **BODIPY-Anthra** dans le MeOH et 139 nm pour le **BODIPY-2,4** dans le DMSO en absorbance, et entre 75 nm pour le **BODIPY-Pyri** dans le MeOH et 186 nm pour le **BODIPY-Crypto** dans le DMSO en émission. Ces déplacements bathochromes sur ces BODIPYS comparés au BODIPY tétraméthyl confirment la conjugaison entre le cœur BODIPY et le cycle aromatique introduit via la condensation de Knoevenagel. Ces molécules présentent des brillances importantes excepté pour le **BODIPY-Anthra**, entre 21 000 ($M^{-1}.cm^{-1}$) pour le **BODIPY-Crypto** dans le MeOH et 123 000 ($M^{-1}.cm^{-1}$) pour le **BODIPY-Ester** dans le toluène.

L'introduction de pyrrole à partir de sa position 3 engendre une bathochromie moindre (75 nm dans le MeOH en absorbance pour le **BODIPY-3**) que son introduction en position 2 (90 nm pour le **BODIPY-2**). Cette différence concorde avec le fait que la fonctionnalisation du pyrrole en position α délocalise d'avantage les électrons de la même manière que la position α du BODIPY influence davantage les propriétés optiques que les positions β ou γ . Néanmoins, le coefficient

d'extinction molaire du **BODIPY-3** est plus important que le **BODIPY-2** lui conférant une brillance semblable dans les solvants apolaires malgré un rendement quantique de fluorescence plus faible.

Le caractère donneur des alkyls présents dans les **BODIPY-2,4** et **BODIPY-Crypto** enrichit le pyrrole en électron impliquant une bathochromie supérieure de 40 nm par rapport au **BODIPY-2**.

Le **BODIPY-Ester**, quant à lui, est semblable au **BODIPY-2**, car le caractère donneur des méthyls est contrebalancé par l'effet électroattracteur de l'ester.

Les **BODIPY-Pyri** et **BODIPY-MePyri** ont une brillance semblable à celle du **BODIPY-2** dans les solvants apolaires mais voient leurs brillances plus importantes les solvants polaires à cause d'une augmentation du rendement quantique de fluorescence (100% dans le MeOH). La méthylation du lactam diminue la brillance à cause d'une baisse du coefficient d'extinction molaire sans pour autant modifier le rendement quantique de fluorescence.

L'anthracène étant moins dense électroniquement que le pyrrole ou les pyridones, la bathochromie observée sur le **BODIPY-Anthra** est plus faible (60 nm dans le MeOH en absorption), son coefficient d'extinction molaire est également deux fois plus faible que ses homologues à cause d'une possible mauvaise planéité entre l'anthracène et le cœur BODIPY. En effet, d'après la forme de ses spectres d'absorption et d'émission, de nombreux états vibrationnels sont présents.

La polarité des solvants influence le rendement quantique de fluorescence. En effet, plus la polarité du solvant augmente, plus le rendement quantique de fluorescence diminue. Ceci s'explique par le moment dipolaire plus important avec les groupes riches en électrons attachés au cœur BODIPY abaissant l'énergie de l'état excité dans les solvants polaires. Cette observation est confirmée par les déplacements de Stokes supérieurs dans les solvants polaires que dans les solvants apolaires (par exemple 12 nm pour le **BODIPY-3** dans le toluène contre 23 nm dans le MeOH), favorisant ainsi les désexcitations non radiatives. C'est pourquoi cette observation est mitigée dans le cas des **BODIPY-2** et **BODIPY-ester** plus pauvre en électrons, et que le rendement quantique des **BODIPY-Pyri** et **BODIPY-MePyri** est plus important dans les solvants polaires à cause de leur émission plus énergétique.

Photo-conversion

Ces BODIPYs ont ensuite été irradiés avec des lasers. Ils ont tous présenté des propriétés de photo-conversion. Cette observation est en accord avec la littérature qui décrit que les pyrroles encombrés peuvent être sujets à l'oxydation.^[103]

Toutefois contrairement aux PyrroloBODIPYs et aux coumarines, ils ont présenté un premier déplacement hypsochrome, suivi d'un second. En effet, lors de l'irradiation du **BODIPY-2**, la

fluorescence à 620 nm diminue sous irradiation à 532 nm ou à 488 nm dénotant la phototransformation des fluorophores (Figure IV.16). Lors d'une irradiation à 532 nm il est observé une augmentation de fluorescence à 550 nm tandis qu'avec une irradiation à 488 nm une augmentation à 510 nm est observée.

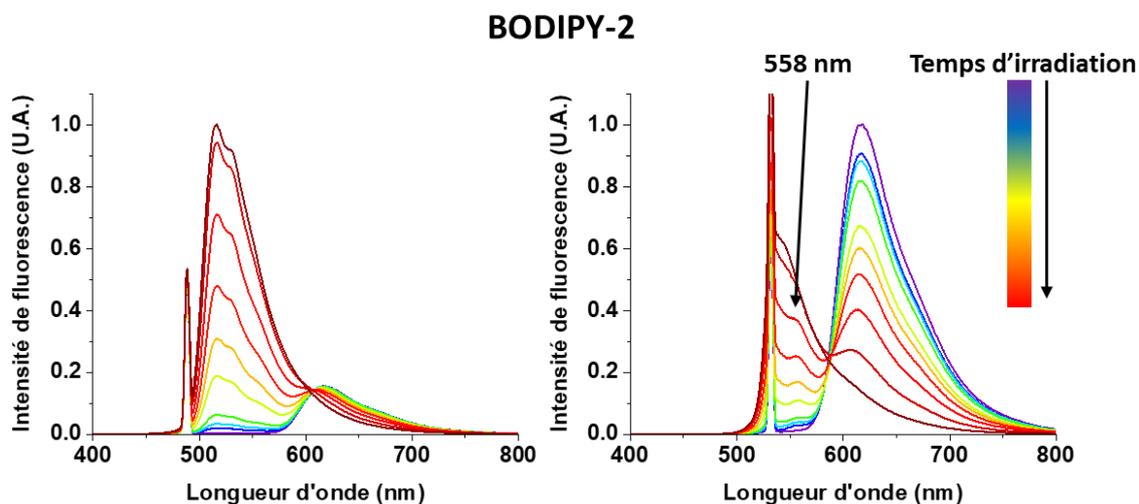


Figure IV.16 Spectre d'émission du **BODIPY-2** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

Les mêmes observations sont présentes sur les autres BODIPYs présentant un pyrrole ou l'anthracène (Figure IV.17 à IV.21). À noter que pour le **BODIPY-Crypto** un laser 638 nm a également été utilisé simultanément afin de mieux observer la fluorescence du produit de départ.

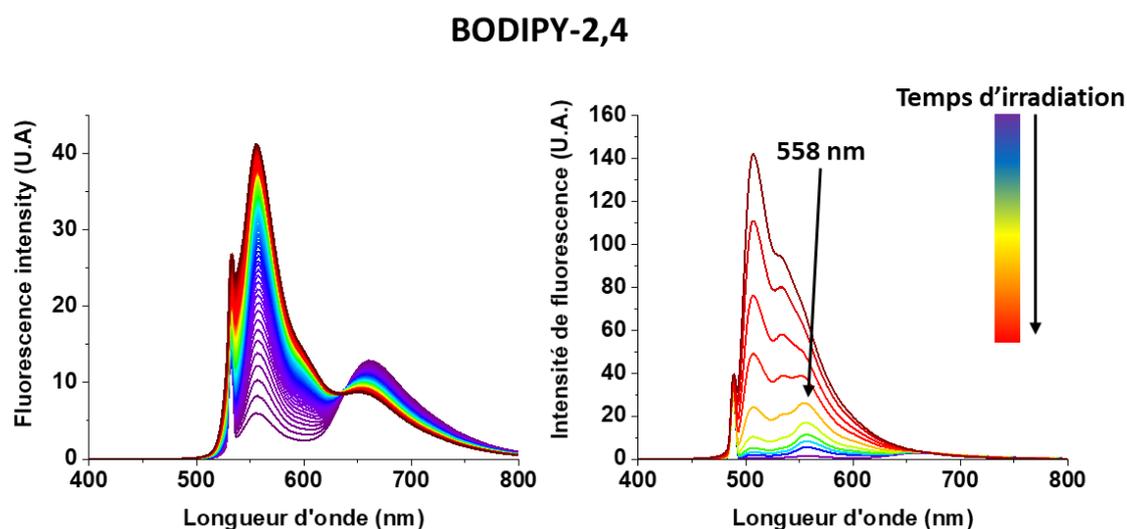


Figure IV.17 Spectre d'émission du **BODIPY-2,4** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

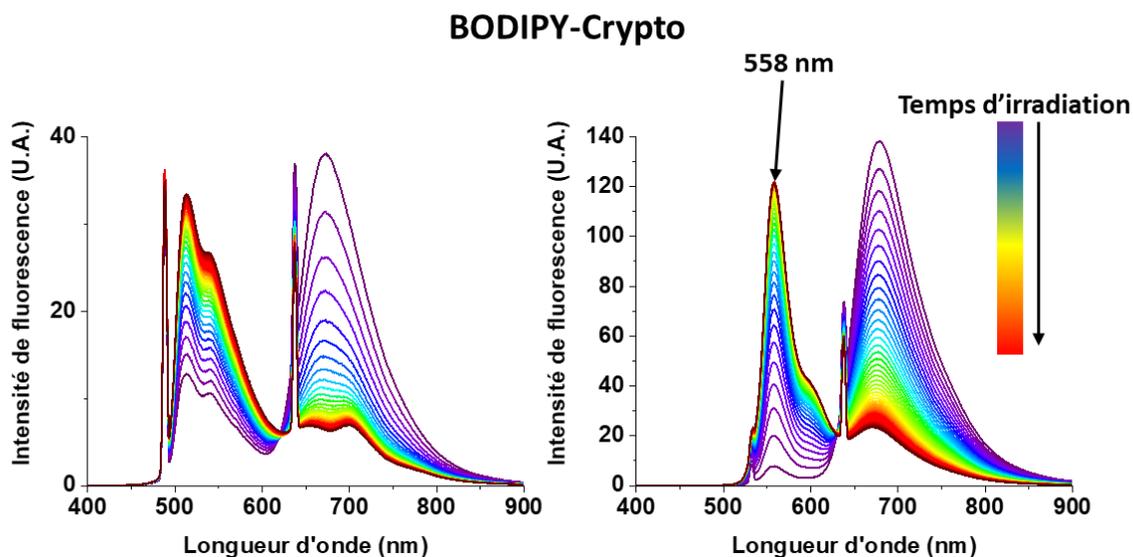


Figure IV.18 Spectre d'émission du **BODIPY-Crypto** au cours du temps sous irradiation à 488 nm et 638 nm (gauche) et à 532 nm et 638 nm (droite)

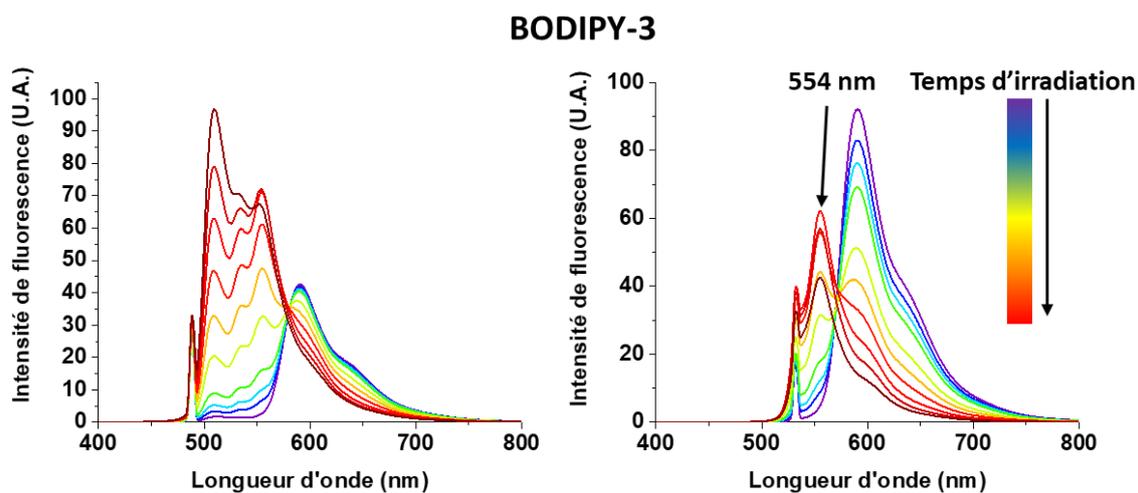


Figure IV.19 Spectre d'émission du **BODIPY-3** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

BODIPY-Ester

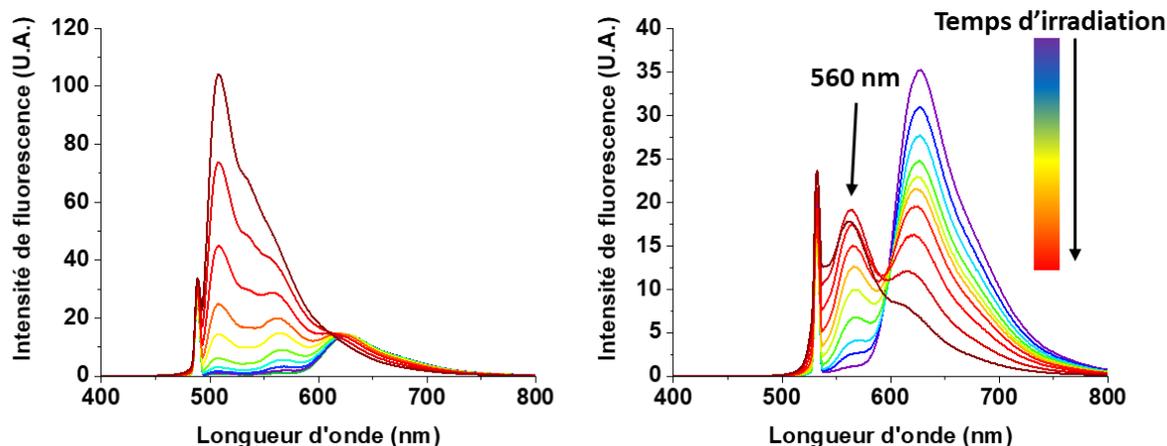


Figure IV.20 Spectre d'émission du **BODIPY-Ester** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

BODIPY-Anthra

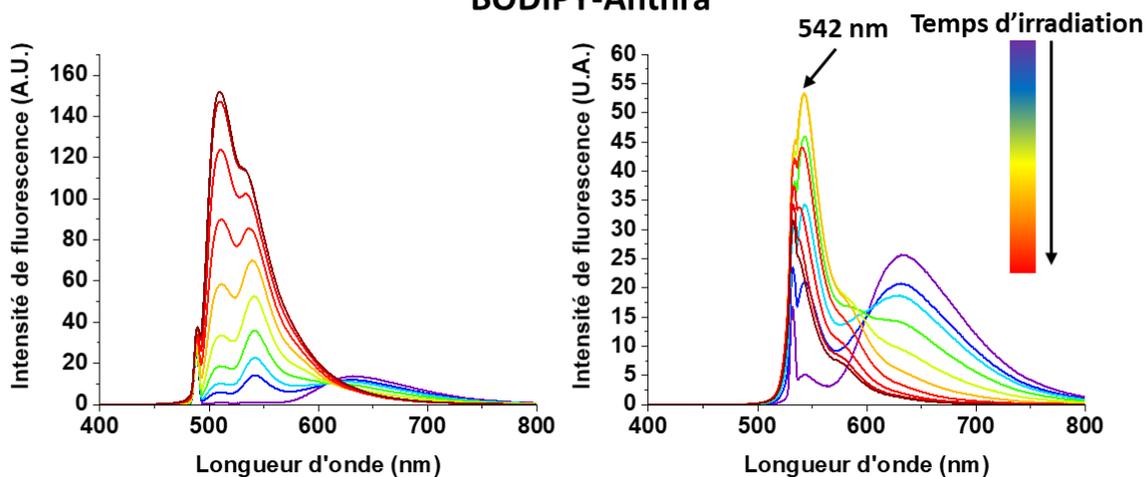


Figure IV.21 Spectre d'émission du **BODIPY-Anthra** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

L'apparition de plusieurs bandes selon le laser utilisé peut être imputée à la génération de photo-produits différents. Il est possible qu'il s'agisse d'oxydations successives. Une première hypsochromie serait due à l'oxydation du pyrrole créant un styrylBODIPY émettant à 550 nm et que ce dernier s'oxyde ensuite au niveau de la double liaison laissant place à un BODIPY non étendu fluorescent comme le BODIPY tétraméthyle (Figure IV.22). En effet, pour chacun des styrylBODIPYs, la même photo-conversion menant à une augmentation de fluorescence vers 550 nm puis une seconde vers 510 nm est observée.

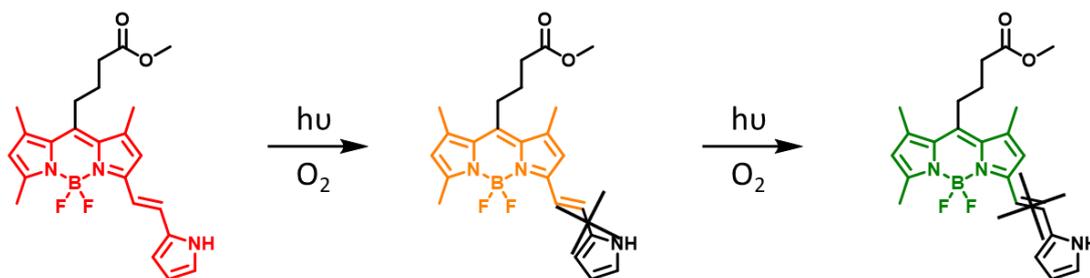


Figure IV.22 Hypothèse des photooxydations successives des styrylBODIPYs

En ce qui concerne les **BODIPY-Pyri** et **BODIPY-MePyri**, seule l'obtention du photo-produit émettant à 510 nm est observée (Figure IV.23 et IV.24).

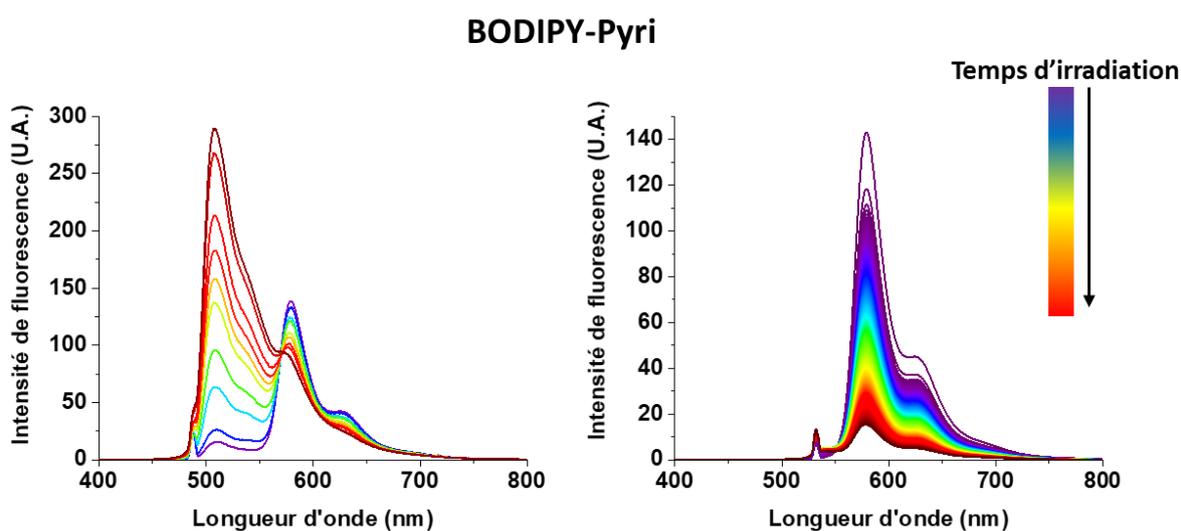


Figure IV.23 Spectre d'émission du **BODIPY-Pyri** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

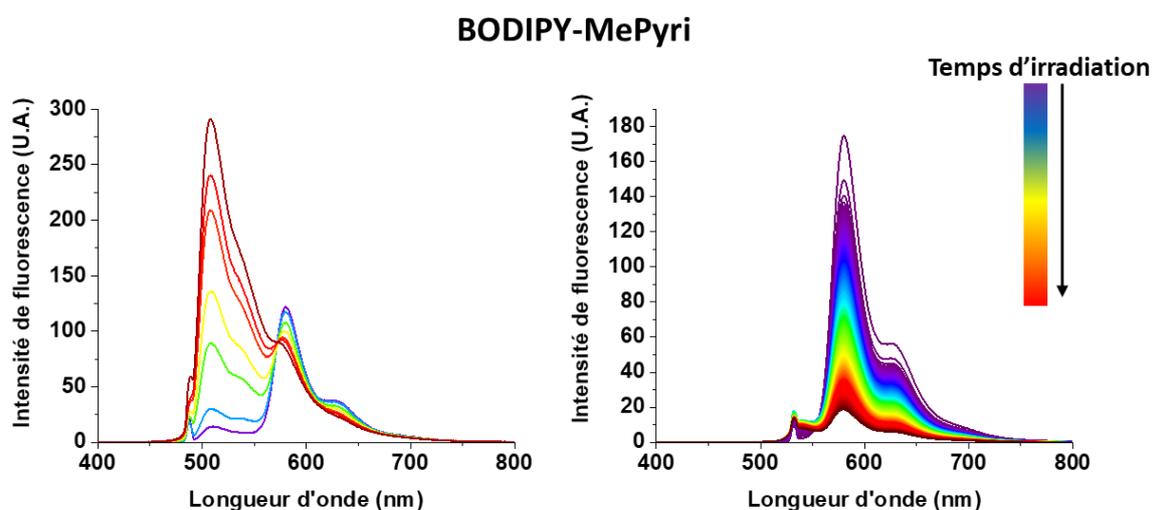


Figure IV.24 Spectre d'émission du **BODIPY-MePyri** au cours du temps sous irradiation à 488 nm (gauche) et à 532 nm (droite)

Ces résultats suggèrent d'une part que les groupes pyrrole et anthracène se comportent comme des ASORMs, et d'autre part que les styrylBODIPYs peuvent s'oxyder au niveau de la double liaison. Afin de confirmer cette théorie, un styrylBODIPY comportant un groupe anisole (non sujet à la photooxydation comme vu au chapitre II sur les coumarines) a également été synthétisé (Figure IV.25) et soumis à une irradiation laser (Figure IV.26).

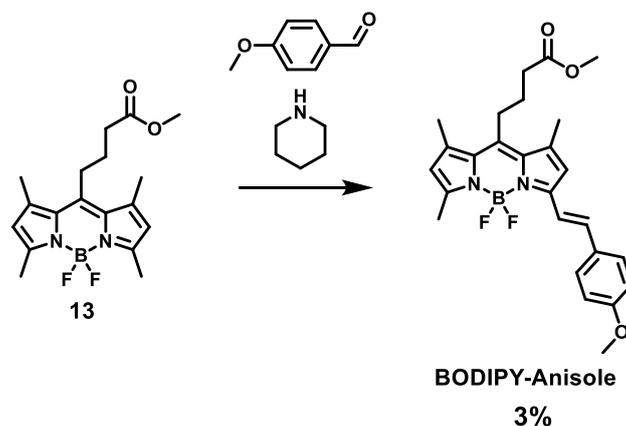


Figure IV.25 Synthèse du **BODIPY-Anisole**

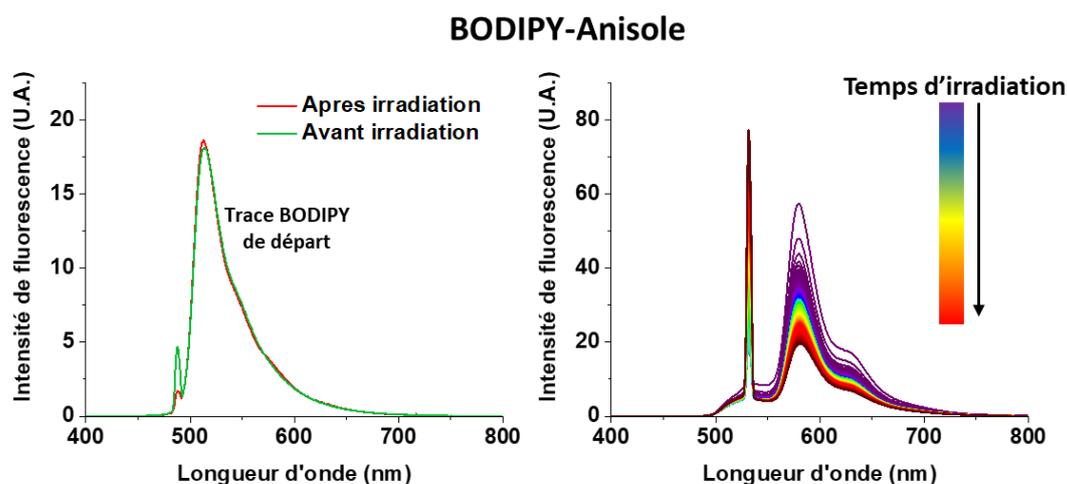


Figure IV.26 Gauche : spectre d'émission de **BODIPY-Anisole** avant et après irradiation (excitation 488 nm). Droite : spectre d'émission au cours du temps sous irradiation à 532 nm

L'émission observée avec une excitation à 488 nm pour le **BODIPY-Anisole** et due aux traces du produit de départ de la réaction de Knoevenagel. En effet, la purification de ce composé s'est révélée compliquée. Malgré une RMN et une analyse HRMS ne montrant pas la présence de cette impureté, elle est quand même détectable en spectroscopie de fluorescence, car la brillance avec une excitation à 488 nm est plus importante pour cette impureté que pour le **BODIPY-Anisole**. Toutefois, après irradiation, il n'y a pas d'augmentation significative de fluorescence à 510 nm malgré le photo-blanchiment dénotant l'absence de photo-conversion de ce composé invalidant

l'hypothèse selon laquelle tous les styrylBODIPYs subiraient une photo-conversion au niveau de la double liaison styryl.

Ces premières expériences permettent de conclure que la double liaison styryl des styrylBODIPYs n'entraîne pas nécessairement de propriétés de photo-conversion. Cependant la présence d'ASORMs peut entraîner une conversion vers 550 nm puis 510 nm via une oxydation du pyrrole ou de l'anthracène puis de la double liaison, tandis que pour les **BODIPY-Pyri** et **BODIPY-MePyri** seule une conversion semble se produire sur la double liaison.

Des analyses supplémentaires comme des analyses de masses sont nécessaires afin de mieux caractériser ces différents mécanismes. De plus la synthèse d'un BODIPY conjugué uniquement à une double liaison pourrait permettre de valider l'hypothèse de cette espèce intermédiaire. Ces expériences n'ont malheureusement pas pu être menées au cours de ces travaux de thèses mais seront effectuées par la suite.

Ensuite ces BODIPYs ont été caractérisés du point de vue de leurs propriétés de photo-conversion. Même si les formes converties n'ont pas totalement été établies, le choix a été fait de considérer que les photo-produits étaient semblables au BODIPY Fl afin d'obtenir une première idée du rendement chimique de photo-conversion et de pouvoir les comparer entre eux. En effet, les lasers couramment utilisés en microscopie dans ces gammes de longueurs d'onde sont ceux à 488 nm adaptés au BODIPY Fl et à 560 nm adaptés aux styrylBODIPYs. Les **BODIPY-2,4** et **BODIPY-Crypto**, quant à eux ont été irradié à 638 nm et les photo-produits à 488 nm. Les résultats sont présentés tableau IV.2 et figure IV.27.

Fluorophore	$\lambda_{em}(nm)$ convertie	$\phi_{pc}(\%)$	$\phi_{tr}(\%)$	$\phi_{BI}(\%)$	$\eta(\%)$	$\phi_{\Delta}(\%)$	$S_{\Delta Bod}(\%)$	$S_{\Delta ASORM}(\%)$
BODIPY-2	558 516	$1.2 \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$	$2.1 \pm 0.7 \cdot 10^{-2}$	$9 \pm 3 \cdot 10^{-3}$	56 ± 2	1.8	0.53	0.67
BODIPY-2,4	558 509	$1.1 \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$	$6.8 \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$	$5.7 \pm 0.3 \cdot 10^{-2}$	16 ± 1	N/A	N/A	N/A
BODIPY-Crypto	558 510	$1.0 \pm 0.3 \cdot 10^{-2}$	$8 \pm 1 \cdot 10^{-2}$	$7 \pm 1 \cdot 10^{-2}$	13 ± 1	N/A	N/A	N/A
BODIPY-3	554 509	$4.9 \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$	$7 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \pm 0.8 \cdot 10^{-3}$	69 ± 5	1.8	0.12	0.27
BODIPY-Ester	560 508	$6 \pm 3 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \pm 0.7 \cdot 10^{-2}$	$9 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	40 ± 2	2.1	0.44	0.29
BODIPY-Anthra	542 510	$3.9 \pm 0.9 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \pm 0.3 \cdot 10^{-1}$	$8 \pm 2 \cdot 10^{-2}$	32 ± 1	7.3	1.12	0.53
BODIPY-Pyri	508	$1.1 \pm 0.6 \cdot 10^{-4}$	$5 \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$4 \pm 2 \cdot 10^{-4}$	18 ± 1	2.8	0.02	0.004
BODIPY-MePyri	507	$1.1 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \pm 0.1 \cdot 10^{-3}$	$9 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	12 ± 1	2.9	0.03	0.004

Tableau IV.2 Propriétés de photo-conversion des StyrylBODIPYs

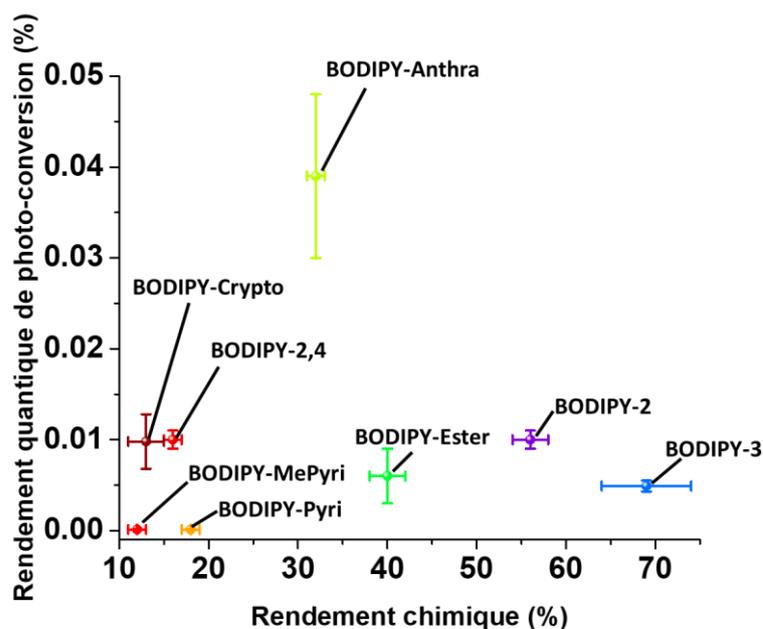


Figure IV.27 Rendements quantiques de photo-conversion et rendements chimiques des StyrylBODIPYs

Le **BODIPY-2** présente un bon rendement chimique (η) de 56% et un rendement quantique de photo-conversion (ϕ_{pc}) de $1,2 \cdot 10^{-2}$ %, plus faible que la coumarine **SC-P** ($6,0 \cdot 10^{-2}$ %). Cependant, comme les BODIPYs possèdent des coefficients d'extinction molaire plus importants que les coumarines, la « vitesse » de photo-conversion sera du même ordre de grandeur et ils pourront donc permettre les mêmes applications.

Le **BODIPY-3** présente un rendement quantique de photo-conversion ($\phi_{pc} = 4,9 \cdot 10^{-3}$ %) plus faible que le **BODIPY-2** ($\phi_{pc} = 1,2 \cdot 10^{-2}$ %) malgré un même rendement quantique de génération d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 1,8$ %) dénotant ainsi une sensibilité vis-à-vis de l'oxygène singulet est 3 fois plus faible ($S_{\Delta Bod} + S_{\Delta ASORM} = 0,39$ % contre 1,2 % pour le **BODIPY-2**). De Plus, son rendement chimique ($\eta = 69$ %) est plus important, car son pyrrole est bien plus sensible à l'oxygène singulet ($S_{\Delta ASORM} = 0,27$ %) que ne l'est le cœur BODIPY ($S_{\Delta Bod} = 0,12$ %).

En ce qui concerne le **BODIPY-Ester**, la sensibilité du cœur BODIPY ($S_{\Delta Bod} = 0,44$ %) est plus faible que pour le **BODIPY-2** ($S_{\Delta Bod} = 0,67$ %), de même que la sensibilité du pyrrole ($S_{\Delta ASORM} = 0,29$ %) entraînant un rendement quantique de photo-transformation ($\phi_{tr} = 1,5 \cdot 10^{-2}$ %) ainsi qu'un rendement chimique ($\eta = 40$ %) inférieur en dépit d'une génération d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 2,1$ %) plus importante.

Le rendement quantique de photo-transformation du **BODIPY-Anthra** ($\phi_{tr} = 1,2 \cdot 10^{-10}$ %) est plus important que les autres à cause à la fois de son important rendement quantique de génération d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 7,3$ %) et de ses sensibilités à l'oxygène singulet ($S_{\Delta Bod} + S_{\Delta ASORM} = 1,65$ %).

Son rendement chimique (η) quant à lui est modéré avec 32% mais validant l'utilisation de l'anthracène en tant qu'ASORM.

Les **BODIPY-2,4** et **BODIPY-Crypto** se sont révélés trop sensibles pour permettre l'obtention du rendement quantique de génération d'oxygène singulet (ϕ_{Δ}). Toutefois, il est possible de conclure que les effets donneurs des alkyles augmentent grandement le rendement quantique de photo-transformation ($\phi_{tr} = 6,8 \cdot 10^{-2}\%$ et $8 \cdot 10^{-2}\%$ respectivement) via une sensibilité accrue du cœur BODIPY à l'oxygène singulet ($S_{\Delta Bod}$). Cette sensibilité doit être supérieure à la somme de celui du **BODIPY-Anthra** ($S_{\Delta Bod}$) et de son ASORM ($S_{\Delta ASORM}$), c'est-à-dire 1.7%, car ce sont les BODIPYs le plus sensible ayant été mesuré. En effet, ces deux BODIPYs se photo-transforment trop vite par rapport au DPBF à cause de leur sensibilité globale à l'oxygène singulet. Au vu de leurs rendements chimiques ($\eta = 13\%$ et 16%), c'est surtout le cœur BODIPY qui subit l'oxydation.

Enfin, les **BODIPY-Pyri** et **BODIPY-MePyri** sont très peu sensibles à l'oxygène singulet ($S_{\Delta Bod} + S_{\Delta ASORM} = 0,024\%$ et $0,034\%$) malgré le fait qu'ils en produisent ($\phi_{\Delta} = 2,8\%$ et $2,9\%$) plus que les autres BODIPYs. Les pyridones semblent pouvoir être utilisées comme ASORM même s'il n'est pas encore clair si ce sont elles qui s'oxydent ou si elles entraînent l'oxydation de la double liaison. Cependant leur rendement chimique faible ($\eta = 18\%$ et 12%) indique que c'est davantage le BODIPY qui s'oxyde que la pyridone.

En triant ces BODIPYs par ordre croissant de leur sensibilité globale à l'oxygène singulet ($S_{\Delta Bod} + S_{\Delta ASORM}$) on obtient : **BODIPY-Pyri** < **BODIPY-MePyri** < **BODIPY-3** < **BODIPY-Ester** < **BODIPY-2** < **BODIPY-Anthra** < **BODIPY-2,4** \approx **BODIPY-Crypto**. Cet ordre est en accord avec le caractère électrophile de l'oxygène singulet^[109], en effet, plus l'ASORM, et donc le BODIPY, est riche en électrons, plus le BODIPY se voit subir une oxydation. Ces résultats montrent qu'une tendance se dessine entre la richesse électronique de l'ASORM et le comportement du fluorophore en photo-conversion permettant de mieux rationaliser le mécanisme DPIC et de potentiellement prévoir les propriétés de nouveaux fluorophores photo-convertibles.

IV.5. Microscopie confocale et de super-résolution

Le rendement quantique de photo-conversion du **BODIPY-2** en fait un candidat de choix pour son application en bioimagerie. Bien que le **BODIPY-3** présente un meilleur rendement chimique de photo-conversion, son hypsochromie est plus faible (82 nm) que celle du **BODIPY-2** (101 nm) entraînant un recouvrement spectral plus important.

Le **BODIPY-2** a ainsi été synthétisé sous forme de sonde mitochondriale (**BODIPY-2 Mito**) et membranaire (**BODIPY-2 Memb**) (Figure IV.28). Ces deux BODIPYs ont été synthétisés à partir du BODIPY tetraméthyle présentant une fonction ester en position meso. Ce dernier a été

saopifié pour obtenir l'acide carboxylique correspondant. Un couplage a été effectué entre l'acide carboxylique et la propargyl amine pour la sonde mitochondriale et la dipropargyl amine pour la sonde membranaire. Des réactions de Knoevenagel ont ensuite été effectuées afin d'obtenir les deux **BODIPY-2** clickables. Enfin le groupe triphenylphosphonium ciblant les mitochondries a été greffé à l'aide d'une chimie click sur le propargyl, de la même manière le groupe ciblant la membrane plasmique a été ajouté sur le dipropargyl.

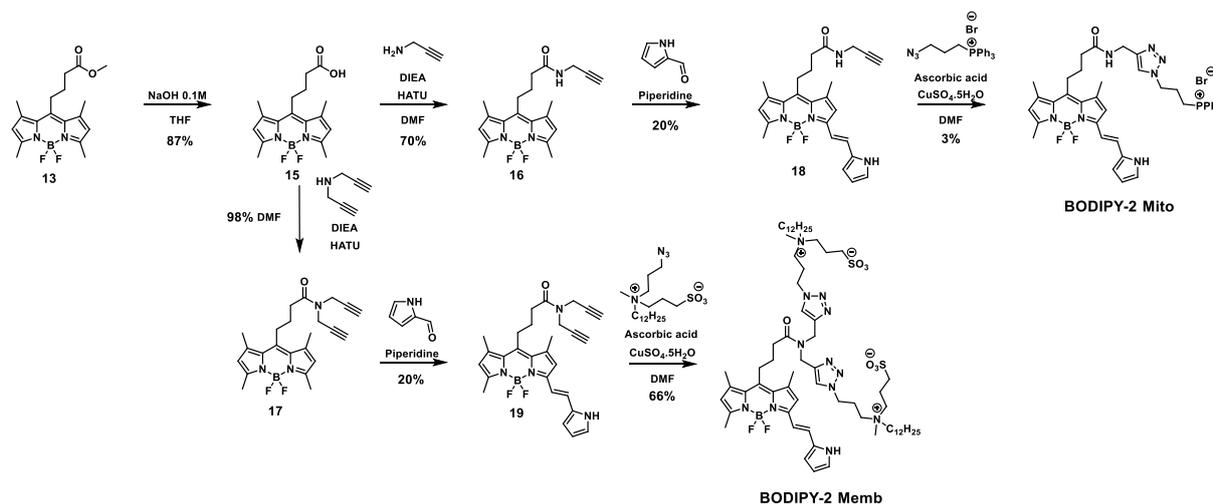


Figure IV.28 Synthèse des **BODIPY-2 Mito** et **BODIPY-2 Memb**

Afin de démontrer ses potentielles applications en bioimagerie, **BODIPY-2 Memb** et **BODIPY-2 Mito** ont été engagés dans des expériences d'imagerie cellulaires (Figure IV.29 et IV.30)

BODIPY-2 Mito

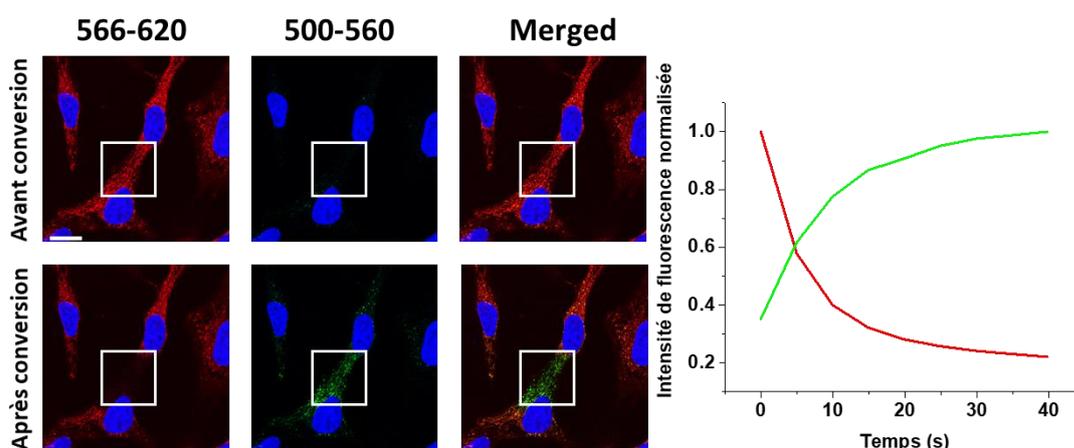


Figure IV.29 Conversion du **BODIPY-2 Mito** dans des cellules HeLa

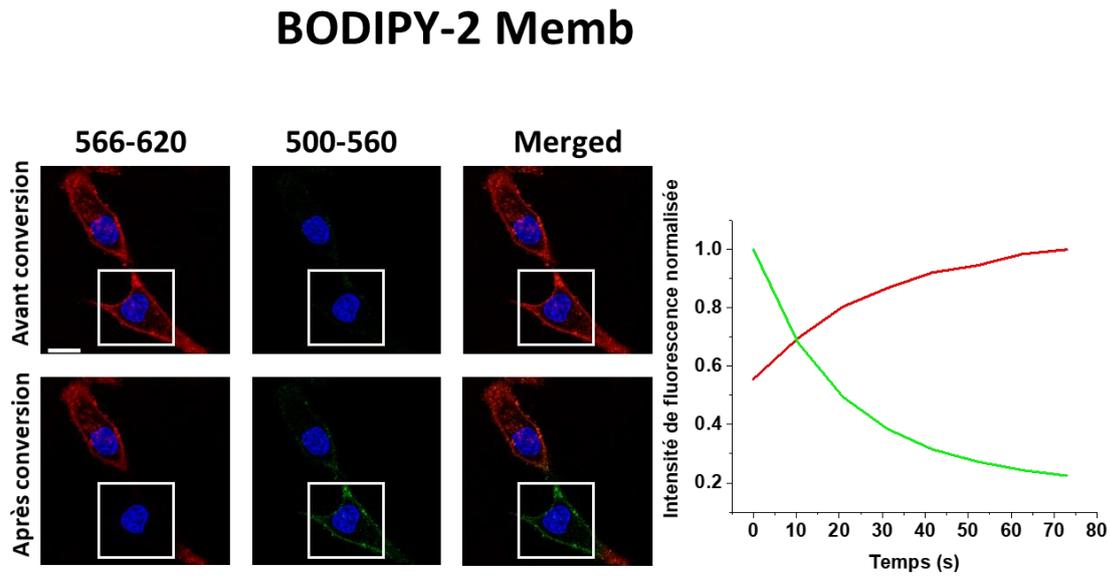


Figure IV.30 Conversion du **BODIPY-2 Memb** dans des cellules *HeLa*

Ces deux BODIPYs présentent des propriétés de photo-conversion au sein des cellules. De la même manière que pour les BODIPYs, la photo-conversion est plus efficace sur les mitochondries avec une augmentation de fluorescence d'un facteur 3, contre un facteur 2 au sein de la membrane plasmique.

Le **BODIPY-2 Mito** a ensuite été testé en imagerie de super résolution (Figure IV.31). La comparaison de l'image obtenue en champ large et celle reconstruite en super résolution montre que ce BODIPY est très prometteur pour ce type d'application. Des expériences supplémentaires sont cependant nécessaires afin d'optimiser les images obtenues et également d'obtenir les propriétés de clignotement comme le nombre de cycles ou le rapport cyclique.

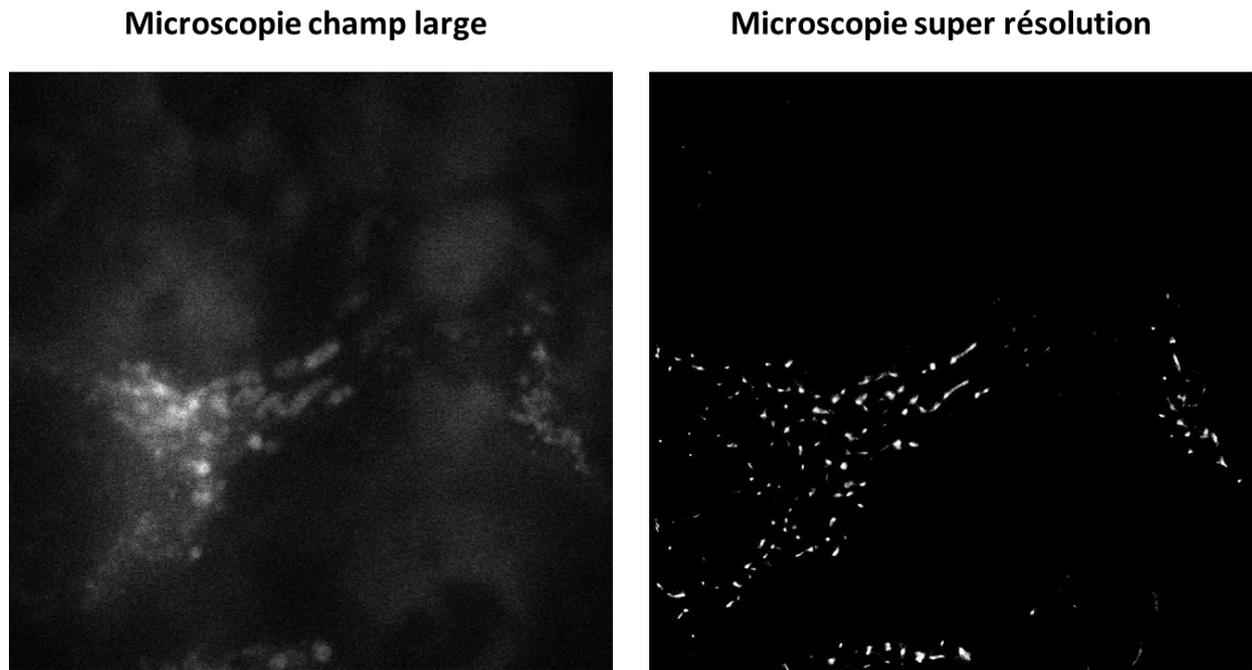


Figure IV.31 *Microscopie de champ large et super résolue du **BODIPY-2 Mito** au sein de cellules HeLa vivantes.*

Le mécanisme DPIS pouvant être appliqué sur des échantillons vivants, cette expérience a été conduite à 37°C. Cependant, l'acquisition a duré 1 minute 30 pouvant entraîner un déplacement des mitochondries. Afin d'observer ces mouvements, les points obtenus par reconstruction ont été colorés en fonction du temps auquel ils ont été obtenus (Figure IV.32).

Cette représentation de la reconstruction permet d'observer les mouvements des mitochondries pendant l'acquisition et modifie la résolution spatio-temporelle. En effet sur les zooms présentés figure IV.32 les mitochondries montrent un déplacement d'environ 500 nm en 60 s. Ces observations sont très encourageantes, car l'imagerie de super résolution reposant sur le STORM présente principalement des structures figées à cause des tampons utilisés nécessitant une fixation des cellules. Ici, à l'aide d'un fluorophore clignotant possiblement via le DPIS, il est possible d'obtenir en image avec une grande résolution spatio-temporelle. La résolution spatiale s'en trouve diminuée, car l'échantillon bouge, mais une résolution temporelle est présente permettant l'observation d'un déplacement inférieur à la barrière de diffraction.

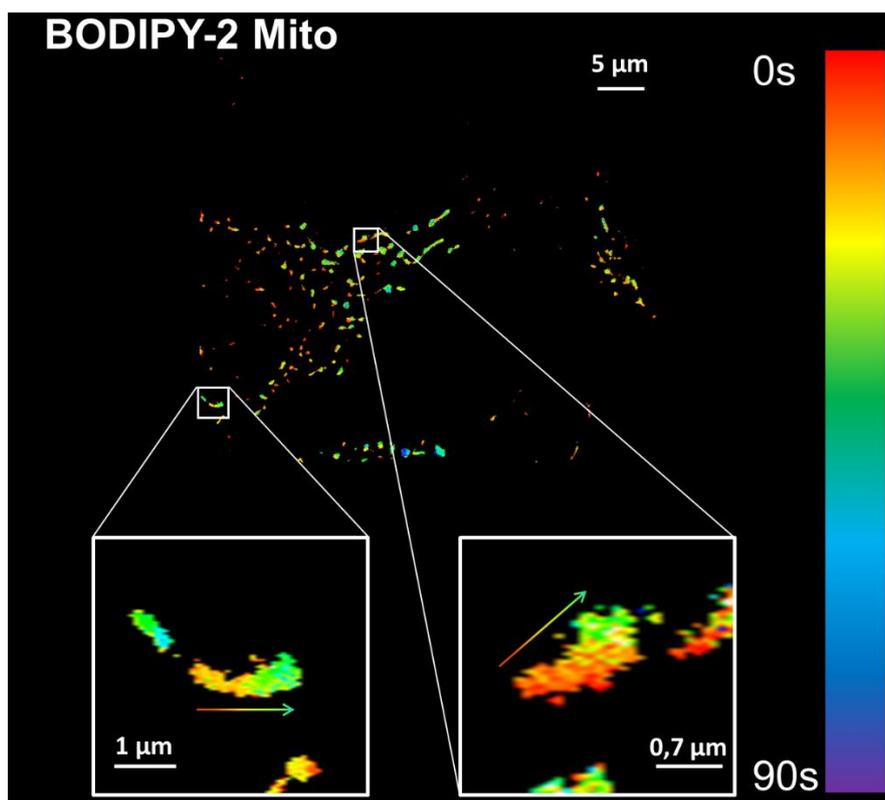


Figure IV.32 *Image reconstruite utilisant le **BODIPY-2 Mito** au cours du temps*

IV.6. Conclusion StyrylBODIPYs

Au cours de ce chapitre, 8 nouveaux fluorophores photo-convertibles ont été obtenus et caractérisés. Ces sondes ont permis d'exemplifier le mécanisme du DPIC aux styrylBODIPYs et à de nouveaux ASORMs dont deux nouvelles familles, les anthracènes et les pyridones. Ces fluorophores ont permis de montrer que plus la richesse électronique de l'ASORM est importante plus la sonde sera sensible à l'oxygène singulet et donc de mieux comprendre le mécanisme DPIC. Ensuite le **BODIPY-2** a pu être dérivé en version mitochondriale et membranaire afin de montrer son application en bioimagerie. La microscopie de super résolution reposant sur le DPIS a montré des résultats très prometteurs afin d'étudier le mouvement des organelles et potentiellement de protéines de manière super-résolue. Le caractère réversible des endo-péroxydes provenant de l'oxydation des pyridones n'a pas encore pu être exploité, mais fera l'objet d'études supplémentaires, en particulier en microscopie de super-résolution.

Chapitre V. Méthodologie

Dans ce chapitre seront présentées les différentes méthodes permettant d'obtenir les résultats présents dans ce manuscrit. Ce chapitre a également pour but de servir de point départ à de nouveaux étudiants désirant obtenir les mêmes propriétés photo-physiques de leurs molécules.

V.1. Constantes photo-physiques

Rendements quantiques

Un fluorophore photo-convertible passe de sa forme initiale (état A) à sa forme convertie (état B) sous l'effet d'un rayonnement avec une constante de vitesse de photo-conversion (k_{PC}) associée à un rendement quantique de photo-conversion (φ_{PC}). Au cours de la conversion, le fluorophore peut également photo-blanchir et mener à une forme éteinte avec une constante de vitesse de photo-blanchiment (k_{BI}) associée à un rendement quantique de photo-blanchiment (φ_{BI}). Ainsi le fluorophore se photo-transforme (et donc disparaît) avec une constante de vitesse de photo-transformation (k_{Pt}) qui est la somme de celle de photo-conversion et celle de photo-blanchiment (Figure V.1) associé à un rendement quantique de photo-transformation (φ_{Pt}) (Figure V.1).

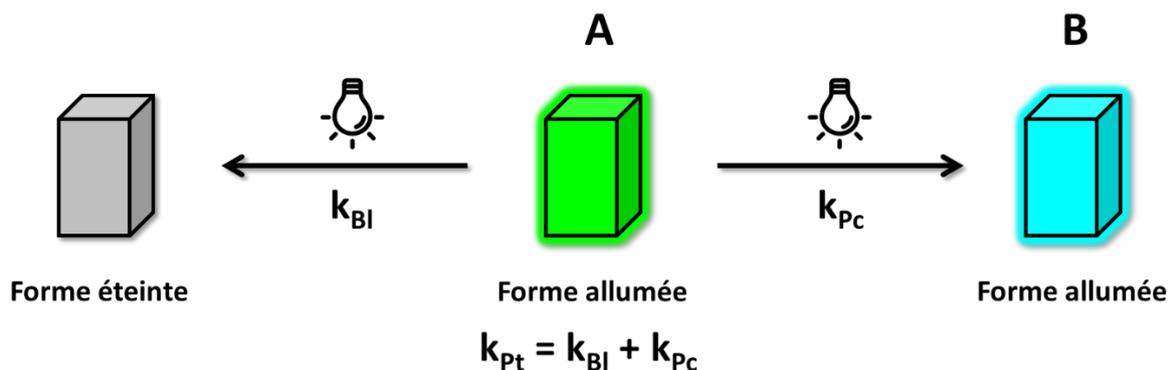


Figure V.1 Schéma de photo-transformation d'un fluorophore

Les rendements quantiques sont définis par :

$$\varphi_{Pt} = \frac{\text{Nombre de molécules transformées}}{\text{Nombre de molécules excitées}}$$

$$\varphi_{PC} = \frac{\text{Nombre de molécules converties}}{\text{Nombre de molécules excitées}}$$

$$\varphi_{BI} = \frac{\text{Nombre de molécules blanchies}}{\text{Nombre de molécules excitées}}$$

Les concentrations de l'espèce A et B sont décrites par des cinétiques d'ordre 1. Les équations V.1 et V.2 modélisent ces concentrations au cours du temps en supposant que l'espèce B ne photo-blanchisse pas au cours de l'irradiation. Il faut donc prendre garde à bien sélectionner les longueurs d'onde d'excitation afin d'irradier uniquement l'espèce A.

$$\text{Équation V.1 } A(t) = A(t = 0)e^{-k_{Pt}t}$$

$$\text{Équation V.2 } B(t) = \frac{k_{Pc}}{k_{Pt}} A(t = 0)(1 - e^{-k_{Pt}t})$$

Pendant une expérience de photo-conversion, il est difficile d'obtenir les concentrations au cours du temps et donc de déterminer k_{Pt} . Cependant, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de fluorophore. Attention toutefois à ne pas être en trop haute concentration afin d'éviter un effet d'écran pouvant fausser l'interprétation. L'intensité de fluorescence de l'espèce A ($I_{fA}(t)$) et de l'espèce B ($I_{fB}(t)$) sont reliées à leurs concentrations à l'aide de leurs coefficients d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation (ϵ_A et ϵ_B), de leurs rendements quantiques de fluorescence (φ_{fA} et φ_{fB}), de l'irradiance lumineuse utilisée (I_A et I_B) ainsi que du chemin optique l par les équations V.3 et V.4.

$$\text{Équation V.3 } I_{fA}(t) = 2,3\varphi_{fA}\epsilon_A I_A l A(t)$$

$$\text{Équation V.4 } I_{fB}(t) = 2,3\varphi_{fB}\epsilon_B I_B l B(t)$$

Grâce aux équations V.1 et V.2 on obtient alors les équations V.5 et V.6.

$$\text{Équation V.5 } I_{fA}(t) = 2,3\varphi_{fA}\epsilon_A I_A l A(t = 0)e^{-k_{Pt}t}$$

$$\text{Équation V.6 } I_{fB}(t) = 2,3\varphi_{fB}\epsilon_B I_B l \frac{k_{Pc}}{k_{Pt}} A(t = 0)(1 - e^{-k_{Pt}t})$$

En utilisant les conditions aux limites, il est possible de simplifier les équations et d'obtenir uniquement des valeurs à l'état stationnaire.

$$\text{à } t = 0 : I_{fA}(t = 0) = 2,3\varphi_{fA}\epsilon_A I_A l A(t = 0) \Rightarrow 2,3l A(t = 0) = \frac{I_{fA}(t=0)}{\varphi_{fA}\epsilon_A I_A}$$

$$\text{à } t = \infty : I_{fB}(t = 0) = 2,3\varphi_{fB}\epsilon_B I_B l \frac{k_{Pc}}{k_{Pt}} A(t = 0)$$

En remplaçant $2,3l A(t = 0)$ par $\frac{I_{fA}(t=0)}{\varphi_{fA}\epsilon_A I_A}$ dans $I_{fB}(t)$ on obtient alors :

$$I_{fB}(t = \infty) = \frac{I_{fA}(t = 0)}{\varphi_{fA}\epsilon_A I_A} \varphi_{fB}\epsilon_B I_B \frac{k_{Pc}}{k_{Pt}}$$

En réarrangeant cette expression on peut isoler k_{Pc} :

$$k_{PC} = \frac{I_{fB}(t = \infty)\varphi_{fA}\epsilon_A I_A}{I_{fA}(t = 0)\varphi_{fB}\epsilon_B I_B} k_{Pt}$$

$I_{fA}(t = 0)$ est l'intensité de fluorescence de l'espèce A au début de la conversion et $I_{fB}(t = \infty)$ l'intensité de fluorescence de l'espèce B une fois la conversion terminée.

De plus le rendement chimique (η) de la conversion est simplement le rapport des intensités de fluorescence des espèces A et B pondérées par leurs brillances et l'irradiation lumineuse respectives :

$$\eta = \frac{k_{PC}}{k_{Pt}} = \frac{I_{fB}(t = \infty)\varphi_{fA}\epsilon_A I_A}{I_{fA}(t = 0)\varphi_{fB}\epsilon_B I_B}$$

Cette équation donne les différents paramètres indépendants du temps et de la concentration en fluorophore. Toutefois, il s'agit d'un modèle physique, le comportement des fluorophores peut lui dépendre de la concentration et donc parfois être dépendant du temps. Il faut donc être vigilant sur le mécanisme observé et ne pas tirer des conclusions hâtives et tester plusieurs concentrations afin de valider ce modèle.

Il reste maintenant à déterminer k_{Pt} . Pour ce faire, il faut enregistrer les spectres d'émission de l'espèce A au cours du temps sans qu'il y ait de signal dû à l'espèce B pour d'une part ne pas le photo-blanchir et d'autre part avoir uniquement le signal de A. Au cours de ces travaux de thèse, les logiciels Oxxius Lasers et OceanView ont été utilisés. Les interfaces de ces logiciels sont présentées sur la Figure V.2.

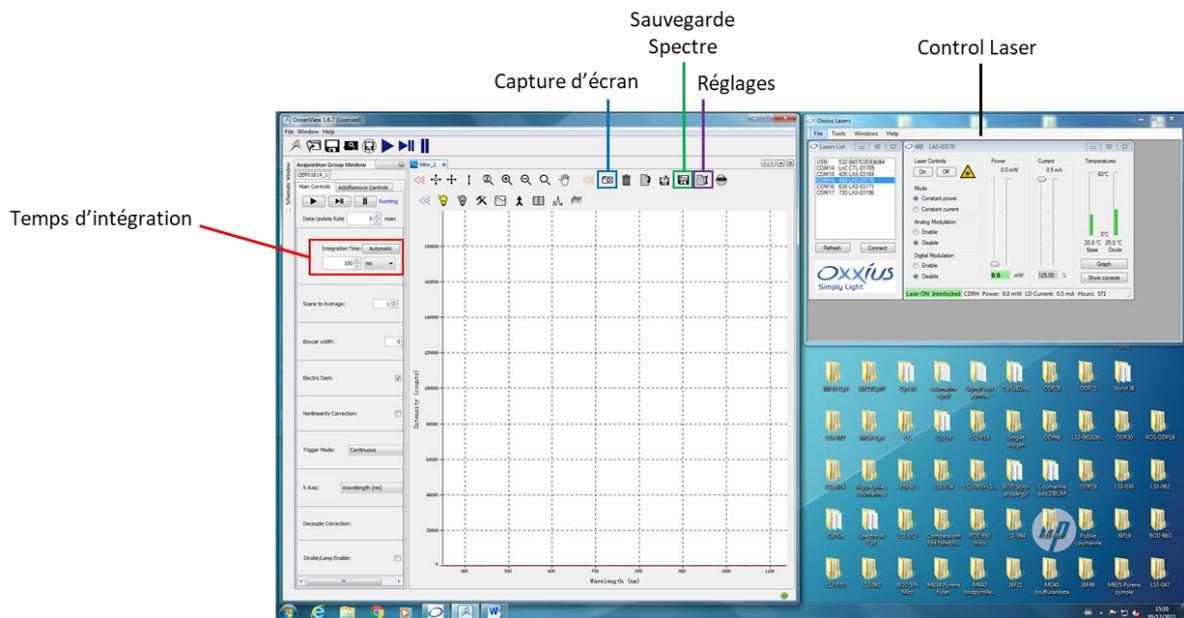


Figure V.2 Logiciel permettant l'observation des spectres d'émission et du contrôle des lasers

Le logiciel OceanView sature au-delà de 198 000 U.A, ainsi, le signal peut être modulé en modifiant la concentration du fluorophore et/ou le temps d'intégration. Il faut également veiller à ce que le temps d'intégration ne soit pas supérieur au pas de temps de sauvegarde des spectres. Il peut être utile d'effectuer des captures d'écran afin de savoir où on se trouve au cours de l'expérience.

Dans les réglages de ce logiciel, on peut définir le dossier dans lequel sauvegarder les fichiers correspondant aux spectres et également définir le temps entre chaque acquisition de spectre et pendant combien de temps. Ainsi il n'est pas nécessaire de rester devant l'ordinateur pendant la manipulation (Figure V.3).

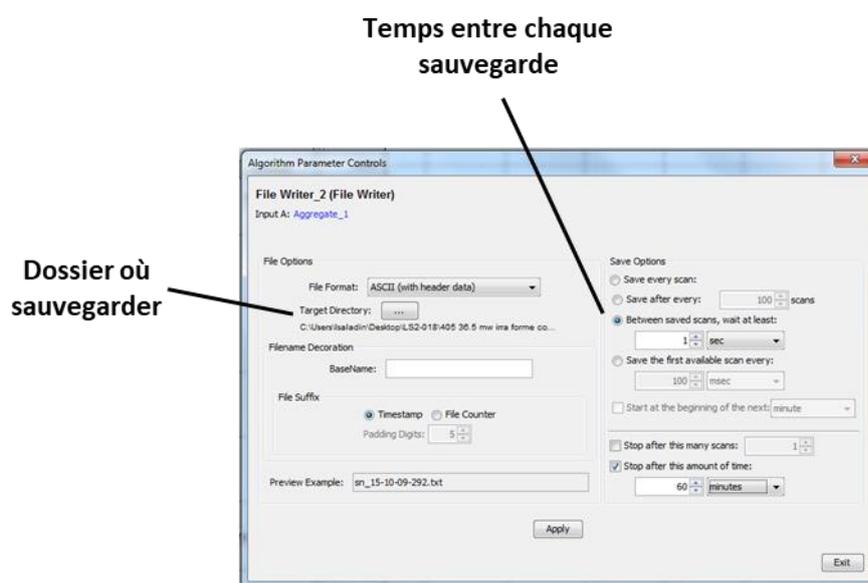


Figure V.3 Fenêtre de réglage du logiciel de spectroscopie

En ce qui concerne les lasers, il ne faut pas prendre en compte la puissance appliquée sur le logiciel, mais mesurer cette puissance à l'aide d'un powermeter. Ce powermeter doit être placé après la cuve d'irradiation afin de savoir avec précision combien de photons traversent cette cuve. D'un jour à l'autre les lasers n'ont pas nécessairement la même puissance et un autre expérimentateur peut par inadvertance changer l'alignement du laser. Il est donc recommandé de mesurer la puissance des lasers utilisés avant chaque expérience. Attention à bien définir la longueur d'onde utilisée sur le powermeter. Pour ces expériences de conversion une cuve de 45 μL a été utilisée afin que tout le volume de l'échantillon soit irradié.

Une fois les courbes obtenues, il faut toutes les intégrer et tracer l'intensité de fluorescence au cours du temps. Cependant, si un recouvrement spectral est présent entre les différentes formes, il est possible de retenir que l'intensité d'une unique longueur d'onde pour laquelle il n'y a qu'un seul phénomène présent (disparition ou apparition). Il est courant de convertir que 90% de

l'échantillon, car comme cette cinétique est exponentielle, la conversion ne sera jamais de 100%, dans la littérature il est courant de trouver cette valeur de 90%.^[139] Ensuite, un modèle mono exponentiel peut être appliqué afin d'obtenir la constante de vitesse. Cependant, il arrive souvent que le modèle mono-exponentiel ne convienne pas, auquel cas, la courbe peut être modélisée par une double exponentielle en suivant l'équation V.7 :

$$\text{Équation V.7 } A(t) = A_{\alpha}e^{-k_{\alpha}t} + A_{\beta}e^{-k_{\beta}t}$$

Pour obtenir k_{Pt} on utilise l'équation suivante :

$$k_{Pt} = \frac{\frac{A_{\alpha}}{k_{\alpha}} + \frac{A_{\beta}}{k_{\beta}}}{\frac{A_{\alpha}}{k_{\alpha}^2} + \frac{A_{\beta}}{k_{\beta}^2}}$$

Cependant, ce modèle bi exponentiel ne doit pas être utilisé à chaque fois, car si le modèle mono exponentiel fonctionne, alors la seconde constante de vitesse du modèle bi-exponentiel aura un ordre de grandeur très différent de la première. Il en résultera que la moyenne de ces deux constantes de vitesse représentera mal le phénomène. Pour savoir lequel utiliser, il est possible d'utiliser d'abord le modèle bi-exponentiel, et si les deux constantes de vitesse ont au moins deux ordres de grandeur de différence, il faut alors passer au modèle mono-exponentiel. La figure Figure V.4 présente le montage expérimental, les courbes obtenues, et le modèle exponentiel utilisé.

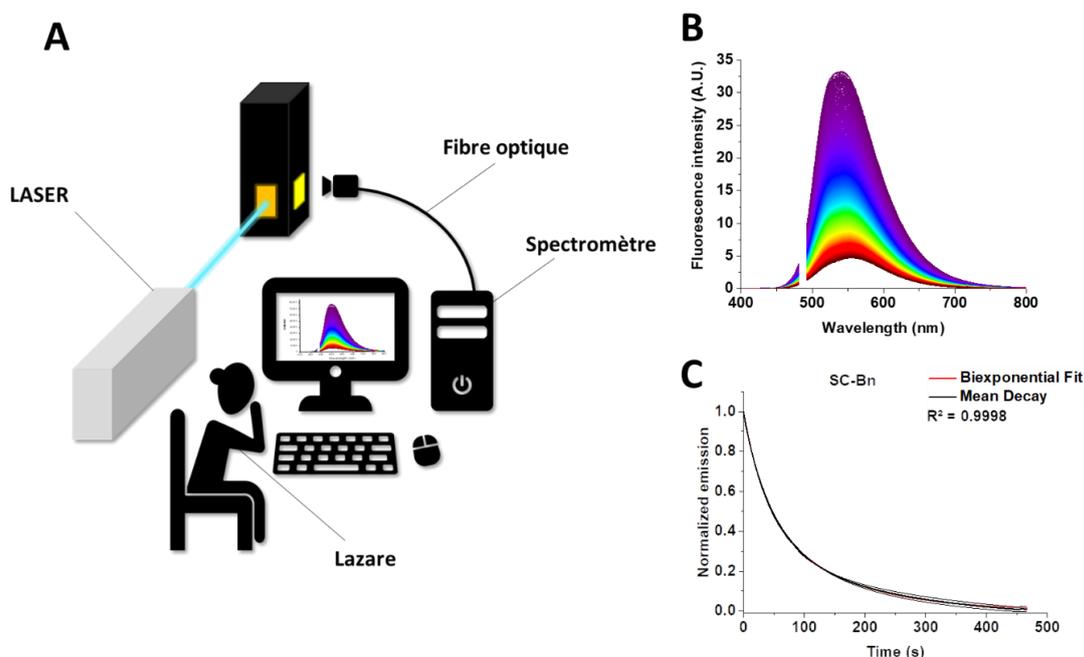


Figure V.4 A) montage expérimental, B) courbes obtenues lors de l'irradiation, C) modèle exponentiel appliqué à l'intégration du signal de fluorescence au cours du temps

L'analyse des résultats a été faite sur le logiciel Origin, les différentes étapes sont présentées figure Figure V.5.

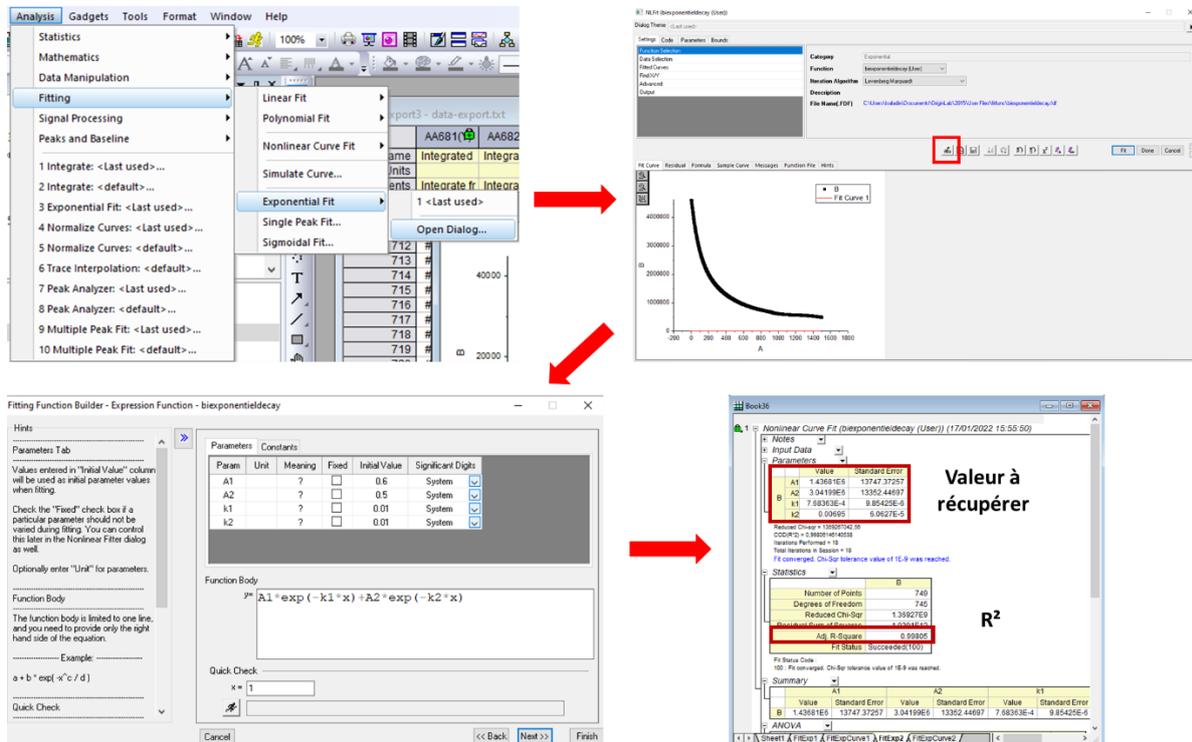


Figure V.5 Étapes effectuées sur le logiciel Origin pour la modélisation exponentielle

Dans ce manuscrit sont présentées des courbes montrant à la fois l'espèce A et l'espèce B, ces courbes ne servent pas à obtenir les constantes photo-physiques. Elles ont une valeur illustrative afin que le lecteur appréhende le changement de couleur. Pour les obtenir, il faut alterner entre 2 canaux : 1) un utilisant un laser excitant uniquement la forme A (souvent à forte puissance pour gagner du temps, un cache noir peut être utilisé pour occulter le détecteur afin de ne pas le saturer) et 2) un laser excitant les formes A et B à faible intensité et où les spectres correspondants seront enregistrés. Cette alternance de laser et la courbe obtenue sont présentées dans la figure Figure V.6. Dans cet exemple avec le **BODIPY 576**, le laser de conversion est à 532 nm et le laser d'observation à 488 nm.

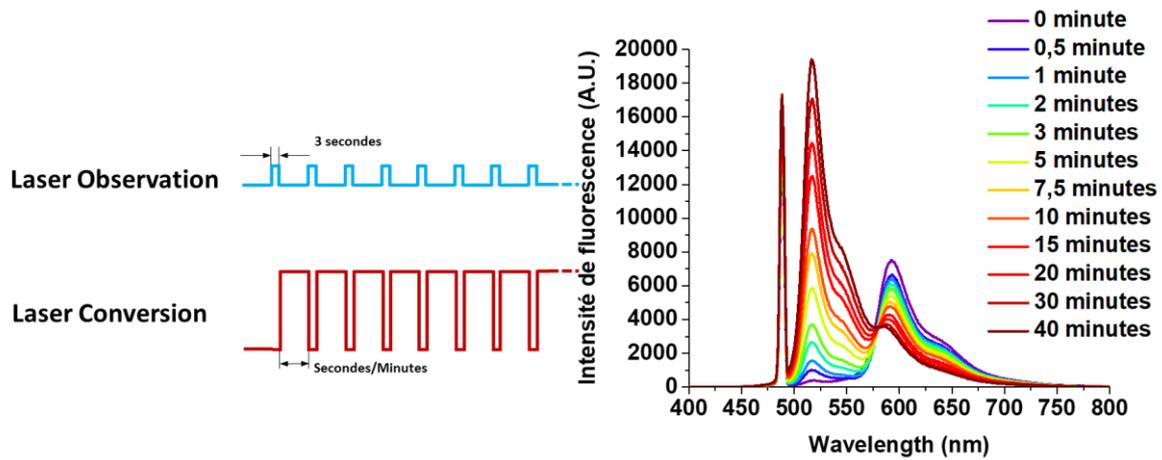


Figure V.6 Schéma de l'alternance des lasers et les courbes obtenues

Maintenant que la constante de vitesse de photo-transformation a été obtenue, il faut déterminer les rendements quantiques de photo-transformation (φ_{Pt}), photo-conversion (φ_{Pc}) et photo-blanchiment (φ_{Bl}). Le lien entre la constante de vitesse et le rendement quantique est donné par l'équation V.8 :

$$\text{Équation V.8 } k_{Pt} = I_A \sigma \varphi_{Pt}$$

I_A étant l'irradiance utilisée pour la conversion et σ la section efficace d'absorption. Contrairement au coefficient d'extinction molaire qui décrit l'absorbance d'une molécule de manière macroscopique, la section efficace d'absorption décrit de manière probabiliste l'absorption d'une molécule. Elle peut s'obtenir à partir de l'équation V.9 et l'irradiance avec l'équation V.10.

$$\text{Équation V.9 } \sigma(\lambda) = \frac{2303 \varepsilon(\lambda)}{N_A}$$

$$\text{Équation V.10 } I_A = \frac{P \lambda}{S h c}$$

Avec N_A la constante d'Avogadro, P la puissance du laser, S la surface d'irradiation, dans le cas de cette thèse elle était de $0,15 \text{ cm}^2$, h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière. Attention de bien prendre $\varepsilon(\lambda)$ à la longueur d'onde d'excitation utilisée pour la conversion.

Après avoir obtenu φ_{Pt} il faut obtenir le rendement chimique η . Ce rendement chimique s'obtient à l'aide de l'équation V.11 :

$$\text{Équation V.11 } \eta = \frac{I_{fB}(t=\infty) \varphi_{fA} \varepsilon_A I_A}{I_{fA}(t=0) \varphi_{fB} \varepsilon_B I_B}$$

Dans l'exemple présenté figure Figure V.7, $I_{fA}(t = 0)$ est l'intensité de fluorescence de **SCP-BOC** et $I_{fB}(t = \infty)$ l'intensité de **cSCP-BOC**.

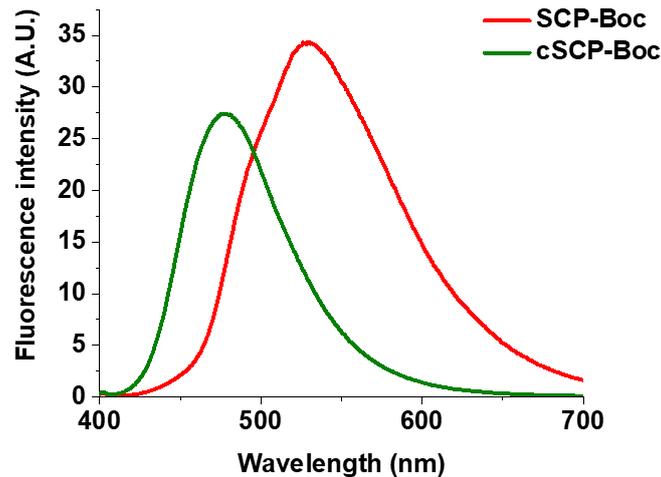


Figure V.7 Spectre d'émission de **SCP-Boc** avant et après photo-conversion

Pour connaître la brillance de l'espèce B, il est possible 1) d'isoler le produit et de le caractériser, 2) de synthétiser un modèle de cette forme comme **SC-V** présent dans le manuscrit ou enfin 3) de choisir un fluorophore semblable spectralement et chimiquement aux photo-produits potentiels comme le **BODIPY 576** pour la forme convertie du **BODIPY 650**. À noter qu'il s'agit de modèle amenant au rendement chimique. Ainsi ce rendement chimique est d'une certaine manière un rendement de propriété de brillance et peut être vu comme : si la molécule convertie de **SCP-Boc** est **SC-V** alors le rendement est de tant.

Enfin les équations V.12 et V.13 permettent d'obtenir les rendements quantiques de photo-conversion et de photo-blanchiment. En effet, le rendement quantique de photo-conversion correspond à la fraction de molécules photo-transformées qui sont émissives.

$$\text{Équation V.12 } \varphi_{Pc} = \varphi_{Pt} \eta$$

$$\text{Équation V.13 } \varphi_{Bl} = \varphi_{Pt} - \varphi_{Pc}$$

Oxygène singulet

Le rendement quantique de génération d'oxygène singulet (φ_{Δ}) a été obtenue d'une manière similaire à ce qui est fait pour le rendement quantique de fluorescence. C'est-à-dire en comparant deux fluorophores, celui pour lequel on cherche à le déterminer et un de référence. Dans le cas du rendement quantique de fluorescence, ce sont les intensités de fluorescence qui sont comparées, pour le rendement quantique de génération d'oxygène singulet, il s'agit de la décroissance du signal d'absorbance d'une sonde qui blanchit au contact de l'oxygène singulet. En effet si l'oxygène singulet généré via le croisement intersystème d'un fluorophore oxyde une molécule, le suivi de l'absorbance de cette dernière permet de remonter à la quantité d'oxygène singulet généré. La

sonde réactive à l'oxygène singulet est le DPBF (1,3-Diphénylisobenzofuran) qui s'oxyde en ODB (o-dibenzoylbenzene) (Figure V.8).

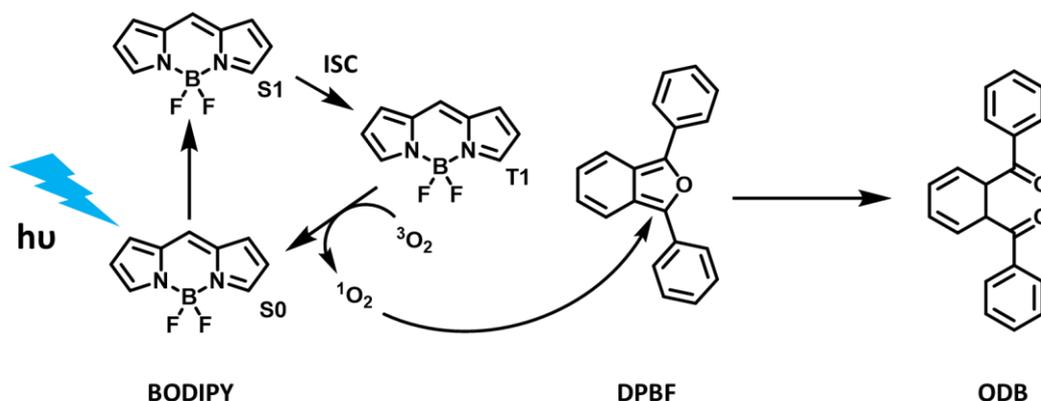


Figure V.8 Schéma de fonctionnement de la sonde à oxygène singulet DPBF

L'idée est donc d'irradier le fluorophore et d'observer la diminution de la quantité de DPBF, et de comparer cette diminution entre le fluorophore et la référence. Pour ce faire, il est courant d'effectuer des spectres d'absorption au cours du temps afin d'observer la diminution de l'absorption du DPBF.^[140] Cependant, cette méthode requiert d'irradier le fluorophore, puis de faire un spectre d'absorption et de recommencer plusieurs fois pour obtenir la pente de décroissance du signal d'absorption du DPBF. Au cours de cette thèse, une méthode différente a été utilisée. En effet, le DPBF est fluorescent. Ainsi, le signal de fluorescence du DPBF a été obtenu en même temps que le fluorophore a été irradié. Pour ne pas fausser les résultats, le laser excitant le DPBF (405 nm) a été utilisé à faible puissance tandis que le laser excitant la molécule est utilisé à forte puissance afin de négliger d'une part la génération d'oxygène singulet par le DPBF et d'autre part l'excitation du fluorophore par le laser à 405 nm. Un exemple de cette expérience est montré sur la figure Figure V.9 avec le **BODIPY-MePyri**.

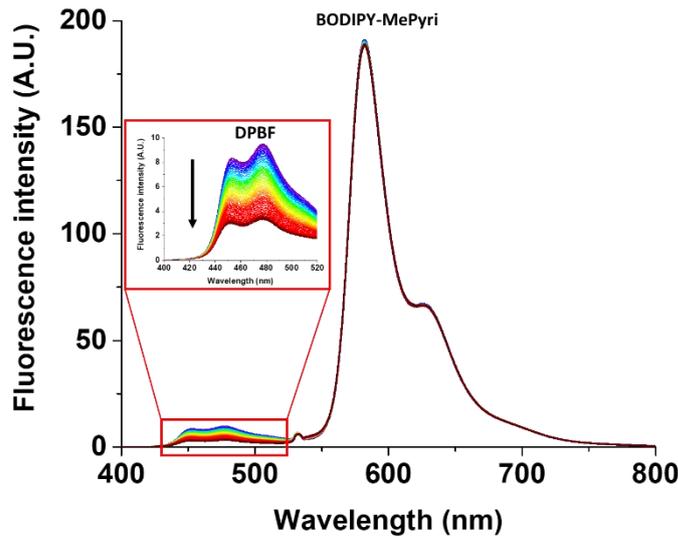


Figure V.9 Expérience permettant l'obtention du rendement quantique de génération d'oxygène singlet

Le fluorophore de référence utilisé pour les BODIPYs a été le Rose Bengal à part pour le **BODIPY 650** où le Bleu de Méthylène a été utilisé. En effet la source laser d'excitation doit être la même pour le fluorophore et la référence.

Une fois la pente de décroissance du DPBF obtenu avec le fluorophore et la référence, le rendement quantique est obtenu à l'aide de l'équation V.14 :

$$\text{Équation V.14 } \varphi_{\Delta\text{Fluorophore}} = \varphi_{\Delta\text{Référence}} \frac{p_{\text{Fluorophore}} F_{\text{Référence}}}{p_{\text{Référence}} F_{\text{Fluorophore}}}$$

Avec p_x la pente de décroissance pour la molécule x et F_x l'absorption corrigée :

$$F_x = 1 - 10^{-DO}$$

Avec DO la densité optique de la molécule générant l'oxygène singlet à la longueur d'onde d'irradiation.

Enfin pour la sensibilité à l'oxygène singlet il faut faire le rapport entre le rendement quantique de génération d'oxygène singlet et les rendements quantiques de photo-transformation :

$$S_{\Delta} = \frac{\varphi_{\Delta\text{Fluorophore}}}{\varphi_{Pt}} = \frac{\frac{\text{Nombre d'oxygène singlet générées}}{\text{Nombre de molécules excités}}}{\frac{\text{Nombre de molécules transformées}}{\text{Nombre de molécules excités}}} = \frac{\text{Nombre d'oxygène singlet générées}}{\text{Nombre de molécules transformées}}$$

$$S_{\Delta\text{ASORM}} = \frac{\varphi_{\Delta\text{Fluorophore}}}{\varphi_{Pc}}$$

$$S_{\Delta\text{Fluorophore}} = \frac{\varphi_{\Delta\text{Fluorophore}}}{\varphi_{Bl}}$$

V.2. Analyse de molécules uniques

Préparation de l'échantillon

L'analyse de molécules nécessite d'isoler chaque molécule afin de les observer indépendamment. Pour ce faire, elles sont placées sur une lamelle de verre traitée en différentes étapes (Figure V.10).

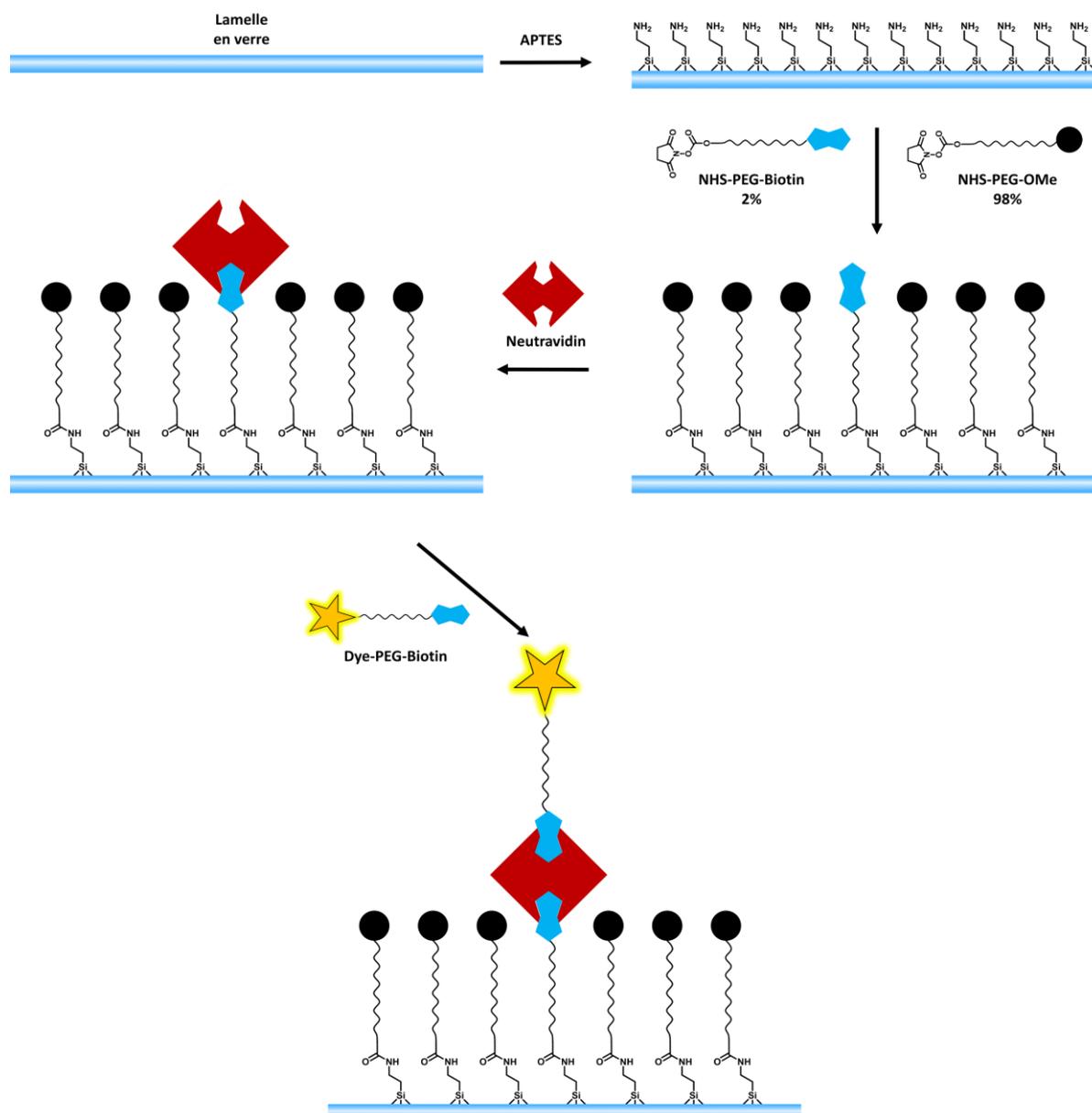


Figure V.10 Préparation de l'échantillon pour la microscopie de molécules uniques

Tout d'abord, la lamelle de verre est nettoyée à l'aide d'un plasma d'argon suivi d'un rinçage à l'acide sulfurique. Cette première étape permet d'éliminer toutes les traces d'autres molécules pouvant interférer avec l'analyse ainsi qu'à fonctionnaliser la surface avec des liaisons OH. Ensuite, la surface du verre est fonctionnalisée avec des fonctions amine amenée par le (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). Le silicium se greffe sur la surface et les fonctions amines

permettent la fonctionnalisation de la lame de verre. Ces amines sont conjuguées à des esters activés sur lesquels sont présent des PEG fonctionnalisés avec des groupes methoxy en bout de chaîne. 2% de ces chaines PEG possèdent des biotines entraînant le greffage sur la neutravidine. La neutravidine est une protéine pouvant se lier à quatre biotines.^[141] Avec seulement 2% de la surface présentant des biotines, seule 2% de la surface sera fonctionnalisée par de la neutravidine. Enfin, la conjugaison du fluorophore avec une biotine permet de le lier aux sites vacants de la neutravidine. Avec cette méthode, les fluorophores sont statistiquement séparés sur toute la surface de la lamelle afin d'éviter la formation d'aggrégats de fluorophores.

L'autre méthode utilisé pour ces expériences de molécules uniques est la création d'un film polymérique. Le fluorophore est introduit dans du toluène avec une concentration de l'ordre du picomolaire. Dans la solution est également présent 10% de PMMA. 200 μ L de la solution à 1 pM est ensuite placé sur une lamelle de verre préalablement nettoyée avec du plasma d'argon et de l'acide sulfurique par induction centrifuge à 500 rpm. Cette technique permet d'obtenir un film polymérique fin dans lequel est présent le fluorophore étudié en haute dilution.

Acquisition des images

Pour effectuer l'acquisition, la lamelle de verre est placée sur un microscope à champ large avec un objectif 100X. Un miroir dichroïque est placé avant la caméra afin de séparer le signal supérieur à 630 nm et inférieur à 630 nm. Ainsi le signal du **BODIPY 650** est obtenue en haut de l'image et celui de ses photo-produits en bas de l'image. Le film de l'échantillon est effectué jusqu'à blanchiment de toutes les molécules, cela peut durer 10 minutes. Une fois les images obtenues, elles sont d'abord traitées afin d'enlever le bruit de fond. Pour cela, la dernière image du film est soustraite à toutes les autres images. En effet à la fin du film toutes les molécules ont été détruites, il ne reste que le bruit de fond (Figure Figure V.11).

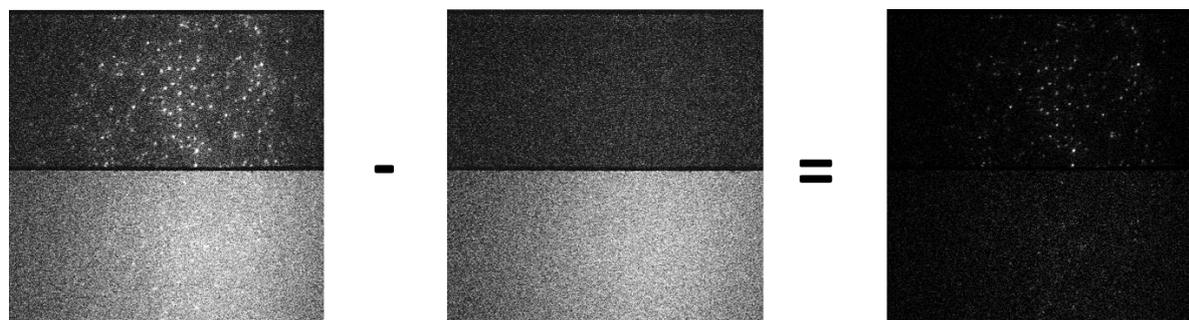


Figure V.11 *Retrait du bruit de fond des images de molécules uniques*

Afin d'observer toutes les molécules sur l'image, le film est projeté en une image via le maximum d'intensité (Figure V.12). C'est-à-dire que pour chaque pixel de l'image créée, l'intensité du pixel

sera la plus forte intensité observée tout au long du film. En effet, comme les molécules clignent, elles ne sont pas toutes présentes sur la première image du film.

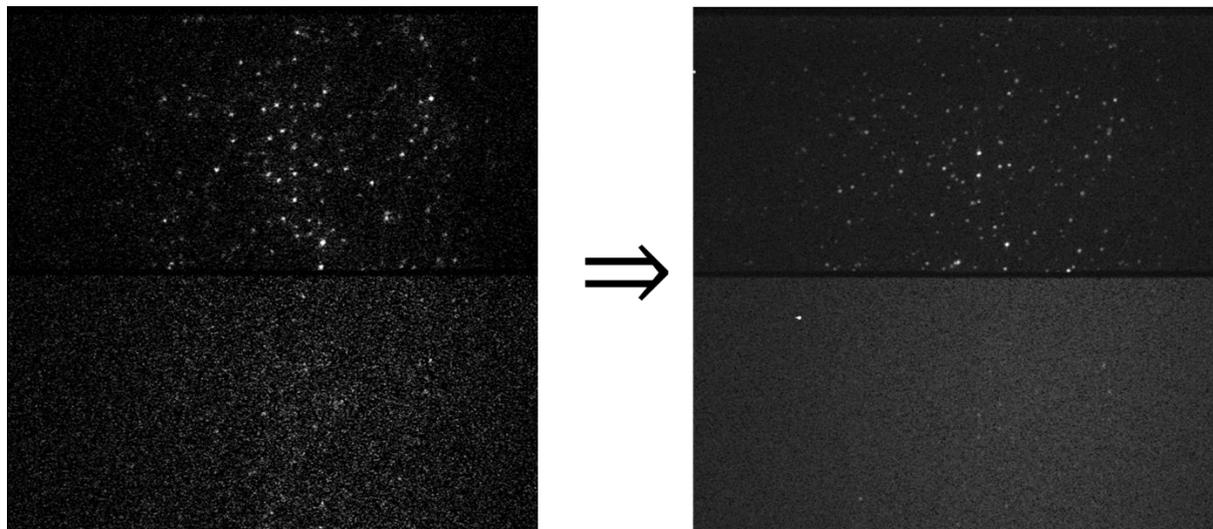


Figure V.12 *Projection des images sur le maximum d'intensité*

Ensuite le plugin ThunderSTORM^[142] permet de localiser toutes les molécules et d'obtenir le nombre de photon de chacune ainsi que la précision de localisation (Figure V.13 et Figure V.14).

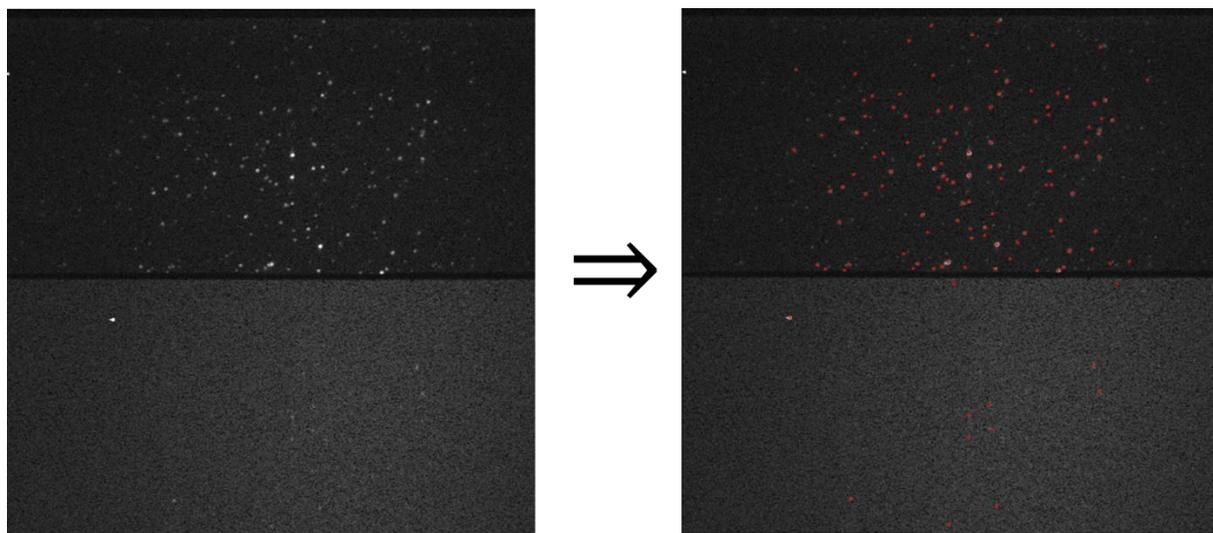


Figure V.13 *Localisation des molécules avec le plugin ThunderSTORM*

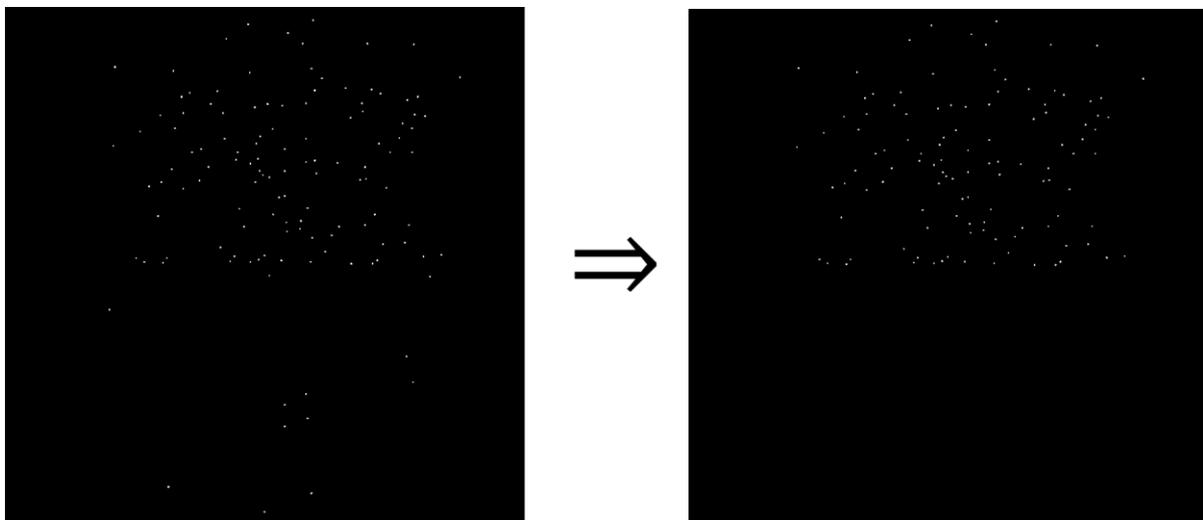
Position Intensité Incertitude de localisation

id	frame	x [nm]	y [nm]	sigma [...]	intensit...	offset [...]	bkgstd ...	chi2	uncert...
2	1	11424.897	14595.902	150.711	449.667	20.543	4.816	9988.847	15.345
3	1	11605.681	6357.528	95.282	259.621	18.04	4.045	9977.329	10.876
4	1	13807.139	26407.365	117.38	552.891	20.536	4.662	8845.733	9.04
5	1	14208.859	13064.971	186.358	440.908	18.702	4.874	8403.526	22.121
6	1	14611.548	26823.425	115.811	413.704	16.627	7.698	20922.613	14.367
7	1	15121.664	18835.642	116.297	730.46	21.16	6.823	11518.548	8.603
8	1	16041.018	22015.053	132.1	598.668	20.188	4.42	8677.33	9.848
9	1	16319.189	11402.565	168.347	742.654	18.164	5.726	10873.128	13.579
10	1	16382.868	18418.871	108.369	633.978	20.281	3.864	5275.105	7.07
11	1	16536.307	26943.125	75.878	223.385	16.693	10.012	27763.162	14.307
12	1	16993.211	26390.259	699.622	523.262	21.22	8.08	16320.454	23.521
14	1	17512.067	17117.209	99.886	288.228	19.562	5.115	11560.307	11.642
15	1	17852.689	6774.694	119.754	338.423	16.083	4.16	20846.089	12.531
16	1	17816.823	12786.08	128.793	795.393	19.865	5.925	13432.39	8.777
17	1	18569.944	9475.153	117.508	334.322	19.661	4.029	6945.771	12.139
18	1	18681.698	11125.733	104.939	356.011	20.356	5.838	11853.953	11.723
19	1	18735.224	19101.956	124.457	425.233	20.381	5.249	11490.962	12.523
20	1	19401.86	9025.079	131.804	357.726	18.223	4.611	14764.635	14.558
21	1	19656.05	15318.748	104.027	282.295	20.509	4.696	8823.749	12.348
22	1	20425.85	18276.198	89.435	297.935	21.325	4.795	8261.554	9.69
23	1	20527.17	14940.251	96.299	245.153	20.151	5.989	13610.786	13.938
24	1	21336.559	16826.984	119.432	930.077	22.509	5.095	7331.809	6.733
25	1	21586.605	10202.534	116.82	475.772	19.826	5.268	9632.801	10.507

Filter Density filter Remove duplicates Merging Drift correction Z-stage offset
 Filter: y < 27136 Apply Restrict to ROI
 Post-processing history: Filter Reset
 Preview Defaults Plot histogram Visualization Import Export
 12 out of 124 items were filtered out

Figure V.14 Résultats obtenus avec ThunderSTORM

Les statistiques sont ensuite effectuées uniquement sur les photo-produits du **BODIPY 650**, ainsi sur la fenêtre des résultats de ThunderSTORM sont enlevées les localisations en bas de l'image. Chaque pixel à une taille 106 nm et l'image fait 512x512, ainsi en enlevant les y < 27136 seules les photo-produits sont conservés (Figure V.15).

Figure V.15 Localisation des photo-produits du **BODIPY 650**

Analyse statistique

Le film auquel a été soustrait le bruit de fond ainsi que les statistiques obtenues via ThunderSTORM sont importés dans le logiciel Igor Pro. Attention à modifier les paramètres de l'image en allant dans Data/ChangeWaveScalling et de mettre un delta de 106 en x et y, car ce sont les tailles des pixels en nm.

L'objectif de cette analyse est d'obtenir plusieurs paramètres :

- Le rapport cyclique (Duty cycle), c'est-à-dire le temps On sur le temps Off
- Le nombre de photon par cycle
- Le nombre total de photon avant photo-blanchiment
- La précision de localisation
- Le temps avant photo-blanchiment (Photo-switching time)
- Le nombre de molécule non prise en compte, car trop peu intense ou ne clignotant pas
- Le nombre de molécules analysées

Un algorithme a ainsi été écrit afin d'obtenir toutes ces informations. Chaque ligne de ce code va être expliqué en rouge :

```
function SMLM(wv,xx,yy,intensity,uncertainty,t_int)
Créer la fonction dans laquelle il faut mettre l'image, les coordonnées, intensité, l'incertitude de localisation et le temps d'intégration de la caméra en ms
wave wv,xx,yy,intensity,uncertainty
variable t_int
variable /G ON,OFF,bleach,pourcentage,kill,j,k,l,n,m,nbphotons
variable nb=umpnts(xx)
Créer la variable nb comme étant le nombre de molécules analysées
variable i,cx,cy,px,py
variable dd=dimSize(wv,2)
make /o/n=(dd) out
make /o/n=(nb)
Photons,Switching_Cycles,Total_photons,PhotoswitchingTime,DutyCycle
Créer des tableaux dans lesquels seront introduit les résultats
make /o/N=(1,6) Results
SetdimLabel 1,0,Photons,Results
SetdimLabel 1,1,Switching_Cycles,Results
SetdimLabel 1,2,Total_Photons,Results
SetdimLabel 1,3,localization_precision,Results
SetdimLabel 1,4,Photoswitching_Time,Results
SetdimLabel 1,5,Duty_Cycle,Results

OFF=0
La variable OFF compte le nombre de fois la molécule s'éteint
ON=0
La variable ON compte le nombre de fois la molécule s'allume
n=0
m=0
kill=0
wavestats /q wv
Fait des statistiques sur l'image
Mean_intensity=V_rms
Créer la variable Mean_intensity comme étant l'intensité moyenne de l'image
for (i=0;i<nb;i+=1)
Commence une boucle se terminant quand toutes les molécules ont été analysées
    string ii=num2str(i)
    string trace="bl_"+ii
```

```
make /o/n=(dd) $trace
wave out=$trace
```

Trace les courbes d'intensités au cours du temps de chaque molécule

```
cx=xx[i]
px=ScaleToIndex(wv, cx, 0)
cy=yy[i]
py=ScaleToIndex(wv, cy, 1)
out[]=wv[px][py][p]
wavestats /q out
```

Fait des statistiques sur l'intensité d'une molécule au cours du temps

```
OFF=0
ON=0
n=0
m=0
bleach=0
```

Réinitialise les variables entre chaque passage dans la boucle

```
variable nc=numpts(out)
```

Créer la variable *nc* comme étant le nombre d'image dans le film

```
for(l=0;l<(nc);l+=1)
```

Commence une boucle sur l'intensité de la molécule au cours du temps

```
if(out[l]<Mean_intensity*6 && n<1)
```

Conditions permettant de compter le nombre d'état éteint, les conditions sont telles que l'intensité doit être inférieure à 6 fois la valeurs moyenne de l'image afin de considérer que c'est un état éteint et s'arrête dès que la molécule s'éteint

```
OFF=OFF+1
```

Ajoute 1 à la variable OFF dès que la molécule s'éteint

```
n=2
```

Interrompt la boucle cherchant les états éteints

```
m=0
```

Réinitialise la boucle cherchant les états allumés

```
bleach=1
```

La variable *bleach* donnera le temps afin le photo-blanchiment, elle est modifiée à chaque boucle OFF, sa valeur finale sera donc pour l'état OFF résultant du photo-blanchiment

```
elseif(out[l]>Mean_intensity*6 && m<1)
```

Comme pour l'état OFF mais cette fois pour l'état ON

```
ON=ON+1
```

Ajoute 1 à la variable ON dès que la molécule s'allume

```
m=2
```

Interrompt la boucle cherchant les états allumés

```
n=0
```

Réinitialise la boucle cherchant les états éteints

```
endif
```

```
endfor
```

```
k=0
```

```
j=0
```

```
nbphotons=0
```

```
for(l=0;l<bleach;l+=1)
```

Commence une boucle pour compter le temps que passe la molécule dans l'état ON et dans l'état OFF. La boucle dure jusqu'à que la molécule blanchie, donc pour *bleach* image

```
if(out[l]>Mean_intensity*6)
```

Compte le temps passé à l'état ON

```
k=k+1
```

```
nbphotons=nbphotons+out[l]/V_max*intensity[l]
```

Normalise l'intensité et la multiplie par le nombre de photon de l'intensité maximal de la molécule afin de compter le nombre total de photon

```
Else
```

```
j=j+1
```

Compte le temps passé à l'état OFF

```
endif
```

```
endfor
```

```
Switching_Cycles[i]=ON
PhotoswitchingTime[i]=bleach*t_int*1e-3
```

Le temps avant photo-blanchiment est le nombre d'image avant photo-blanchiment multiplié par le temps d'intégration de la caméra

```
DutyCycle[i]=k/j
```

K étant le temps ON et j le temps OFF, k/j est le rapport cyclique

```
Total_photons[i]=nbphotons
Photons[i]=nbphotons/ON
```

Le nombre de photon par cycle est le nombre de photons total divisé par le nombre de cycle

```
if (V_max<6*Mean_intensity || OFF<3)
```

Enlevé les molécules n'atteignant pas 6 fois la valeur d'intensité moyenne et/ou celle qui ne clignote pas au moins 3 fois

```
killWaves out
Switching_Cycles[i]=nan
PhotoswitchingTime[i]=nan
DutyCycle[i]=nan
Total_photons[i]=nan
Photons[i]=nan
uncertainty[i]=nan
kill = kill + 1
```

Donne le nombre de molécules éliminées de l'analyse

```
endif
endfor
```

```
print "Number of molecules"
print nb-kill
```

Affiche le nombre de molécules analysées

```
print "Pourcent removed"
print kill/nb*100
```

Affiche le pourcentage de molécules analysées

La suite de l'algorithme permet de représenter les résultats obtenus sous forme d'histogramme et d'ajuster la distribution par une fonction exponentielle. Les paramètres recherchés sont alors les constantes de vitesse de ces exponentielles :

```
Make/N=100/O Switching_Cycles_Hist;DelayUpdate
Histogram/B={0,5,100} Switching_Cycles,Switching_Cycles_Hist;DelayUpdate
CurveFit/L=10000 exp Switching_Cycles_Hist /D
wave w_coef
Results[][1]=1/w_coef[2]
Display/K=0 root:fit_Switching_Cycles_Hist,root:Switching_Cycles_Hist
ModifyGraph
lsize(fit_Switching_Cycles_Hist)=2,mode(Switching_Cycles_Hist)=5,lsize(Switching_Cycles_Hist)=0.1,rgb(Switching_Cycles_Hist)=(0,0,0)
ModifyGraph fStyle=1,fSize=16,font="Arial"
ModifyGraph standoff=0
Label left "Frequency"
Label bottom "Switching Cycles"
```

```
Make/N=100/O PhotoswitchingTime_Hist;DelayUpdate
Histogram/B={0,10,100}
PhotoswitchingTime,PhotoswitchingTime_Hist;DelayUpdate
CurveFit/L=10000 exp PhotoswitchingTime_Hist /D
wave w_coef
Results[][4]=1/w_coef[2]
Display/K=0 root:fit_PhotoswitchingTime_Hist,root:PhotoswitchingTime_Hist
ModifyGraph
lsize(fit_PhotoswitchingTime_Hist)=2,mode(PhotoswitchingTime_Hist)=5,lsize(PhotoswitchingTime_Hist)=0.1,rgb(PhotoswitchingTime_Hist)=(0,0,0)
ModifyGraph fStyle=1,fSize=16,font="Arial"
```

```

ModifyGraph standoff=0
Label left "Frequency"
Label bottom "Photoswitching Time (s)"

Make/N=1000/O DutyCycle_Hist;DelayUpdate
Histogram/B={0,0.1,1000} DutyCycle,DutyCycle_Hist;DelayUpdate
CurveFit/L=10000 exp DutyCycle_Hist /D
wave w_coef
Results[][5]=1/w_coef[2]
Display/K=0 root:fit_DutyCycle_Hist,root:DutyCycle_Hist
ModifyGraph
lsize(fit_DutyCycle_Hist)=2,mode(DutyCycle_Hist)=5,lsize(DutyCycle_Hist)=0.1,rgb(DutyCycle_Hist)=(0,0,0)
ModifyGraph fStyle=1,fSize=16,font="Arial"
ModifyGraph standoff=0
Label left "Frequency"
Label bottom "Duty Cycle"
SetAxis bottom *,20

Make/N=500/O Total_photons_Hist;DelayUpdate
Histogram/B={0,2000,500} Total_photons>Total_photons_Hist;DelayUpdate
CurveFit/L=10000 exp Total_photons_Hist /D
wave w_coef
Results[][2]=1/w_coef[2]
Display/K=0 root:fit_Total_photons_Hist,root>Total_photons_Hist
ModifyGraph
lsize(fit_Total_photons_Hist)=2,mode(Total_photons_Hist)=5,lsize(Total_photons_Hist)=0.1,rgb(Total_photons_Hist)=(0,0,0)
ModifyGraph fStyle=1,fSize=16,font="Arial"
ModifyGraph standoff=0
Label left "Frequency"
Label bottom "Total Photons"
SetAxis bottom *,400000

Make/N=100/O Photons_Hist;DelayUpdate
Histogram/B={0,1000,100} Photons,Photons_Hist;DelayUpdate
CurveFit/L=10000 exp Photons_Hist /D
wave w_coef
Results[][0]=1/w_coef[2]
Display/K=0 root:fit_Photons_Hist,root:Photons_Hist
ModifyGraph
lsize(fit_Photons_Hist)=2,mode(Photons_Hist)=5,lsize(Photons_Hist)=0.1,rgb(Photons_Hist)=(0,0,0)
ModifyGraph fStyle=1,fSize=16,font="Arial"
ModifyGraph standoff=0
Label left "Frequency"
Label bottom "Photons"

Make/N=100/O uncertainty_Hist;DelayUpdate
Histogram/B={0,1,100} uncertainty,uncertainty_Hist;DelayUpdate
Display/K=0 uncertainty_Hist
ModifyGraph mode=5,lsize=0.1,rgb=(0,0,0)
ModifyGraph fStyle=1,fSize=16,font="Arial"
ModifyGraph standoff=0
Label left "Frequency"
Label bottom "Localization Precision (nm)"
Wavestats /q uncertainty
Results[][3]=V_avg
end function

```

A l'aide de cet algorithme il suffit de rentrer les paramètres, et il en résulte tous les histogrammes, les modélisations exponentielles ainsi que les résultats sous forme de tableau (Figure V.16).

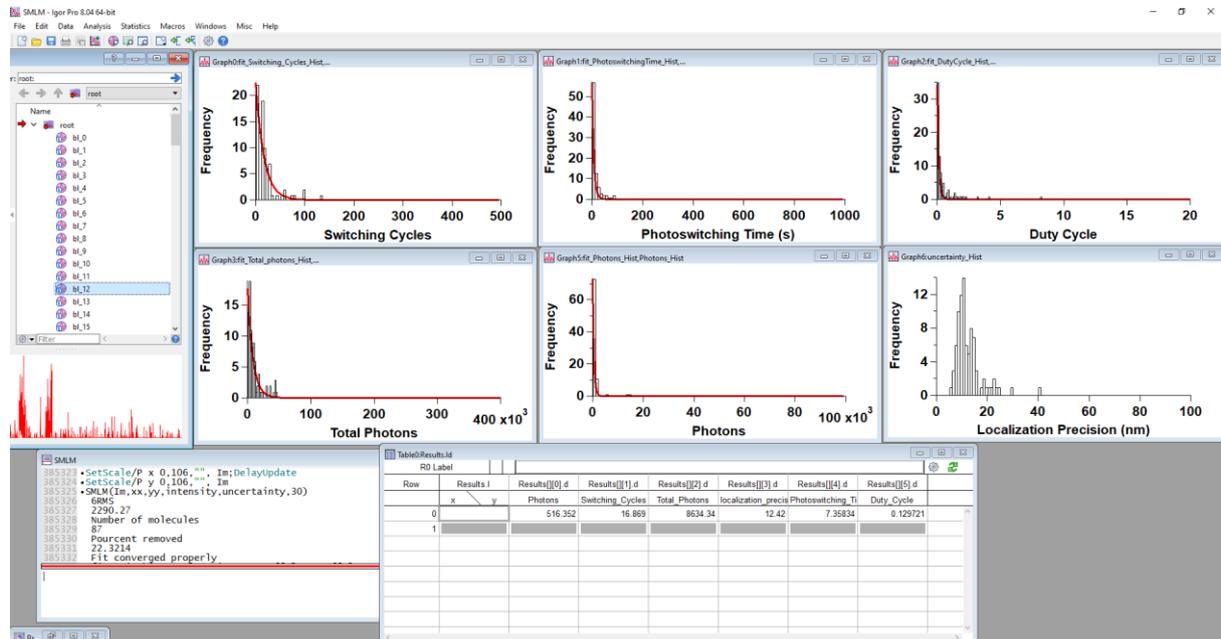


Figure V.16 Résultats obtenus avec l'algorithme SMLM

Afin d'observer le signal d'une molécule dans les deux canaux, un autre algorithme a été écrit. Cet algorithme requiert la position de molécules dans un seul des deux canaux ainsi que de l'image sans le bruit de fond :

```
Function Colocalization(wv,xx,yy)
wave wv,xx,yy
variable nb=umpnts(xx)
variable i,cx,cy,px,py,cyr,pyr,l,Vred,Vgreen
variable dd=dimSize(wv,2)

for (i=0;i<nb;i+=1)
  string ii=num2str(i)
  string traceG="Green_"+ii, TraceR="Red_"+ii
  make /o/n=(dd) $traceG
  make /o/n=(dd) $TraceR
  wave outG=$traceG
  Trace l'intensité dans le canal du bas
  wave outR=$traceR
  Trace l'intensité dans le canal du haut
  cx=xx[i]
  px=ScaleToIndex(wv,cx,0)
  cy=yy[i] //-27136
  cyr=yy[i]+27136
  Ces deux lignes dépendent d'où la localisation a été faite, si c'est sur le canal du bas il faut le +27136, sinon
  le -27137. En effet les positions entre le haut et le bas ont 27136 nm d'écart
  py=ScaleToIndex(wv,cy,1)
  pyr=ScaleToIndex(wv,cyr,1)
  outG[]=wv[px][py][p]
  outR[]=wv[px][pyr][p]
  wavestats /q outG
  Vgreen=V_max
  wavestats /q outR
```

```
Vred=V_max
outg=outg/Vgreen
outr=outr/Vred
Normalise les courbes obtenues
Endfor
End Function
```

Cet algorithme permet de tracer les courbes présentées dans le chapitre III (Figure V.17).

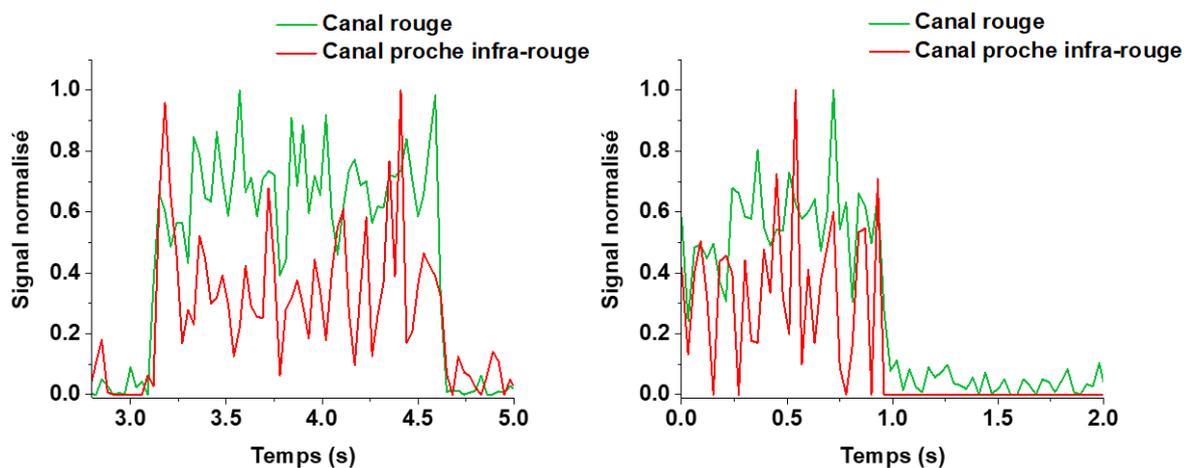


Figure V.17 Signal de fluorescence d'une molécule unique au cours du temps dans le canal rouge et proche-infrarouge.

Conversion microscope confocal

Les conversions au sein des cellules ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica SPE. Une des difficultés de cette expérience est qu'au départ la forme convertie n'est pas présente, il est donc délicat de paramétrer la puissance du laser ainsi que le gain pour pouvoir bien observer cette forme. C'est pourquoi, la première chose à faire est de convertir les cellules afin de régler les paramètres d'observation. Ensuite, le temps que prend cette conversion est différente pour chaque sonde, il y a donc de nombreux essais à faire avant d'obtenir les réglages optimaux. Le microscope utilisé au cours de cette thèse ne disposait que d'un seul photomultiplicateur, rendant l'observation simultanée des deux formes impossible, et l'obligation de travailler en séquentiel. Cependant pour certaines sondes, comme **SCP-Me**, le réglage séquentiel est nécessaire afin de diminuer le recouvrement spectral. Ensuite, la conversion requiert une puissance du laser plus importante que pour l'observation, cependant, cela ne signifie pas qu'il faut nécessairement augmenter la puissance du laser. L'application d'un zoom peut être suffisant, en effet, le microscope confocal à balayage laser scanne l'échantillon pendant un temps fixe. Ainsi si l'image est plus petite le laser reste plus longtemps sur chaque domaine et augmente donc la puissance par unité de surface. Au cours d'une conversion, les canaux sont alternés afin d'observer les deux couleurs. Afin d'avoir une conversion efficace sans pour autant blanchir la forme convertie, plusieurs scans sont effectués sur la forme non convertie et un seul

sur la forme convertie. Enfin, afin de savoir où en est la conversion, il est déconseillé de faire confiance à ses yeux mais plutôt recommander de regarder les histogrammes des deux canaux. Quand l'histogramme de la forme initiale cesse de diminuer, la conversion est finie (Figure V.18). Attention à garder l'œil sur la forme convertie afin de vérifier qu'elle ne photo-blanchisse pas. En effet, le photo-blanchiment est inévitable, mais il est compensé par la photo-conversion, quand cette dernière arrive sur la fin le photo-blanchiment prend alors le dessus et le signal se met à diminuer.

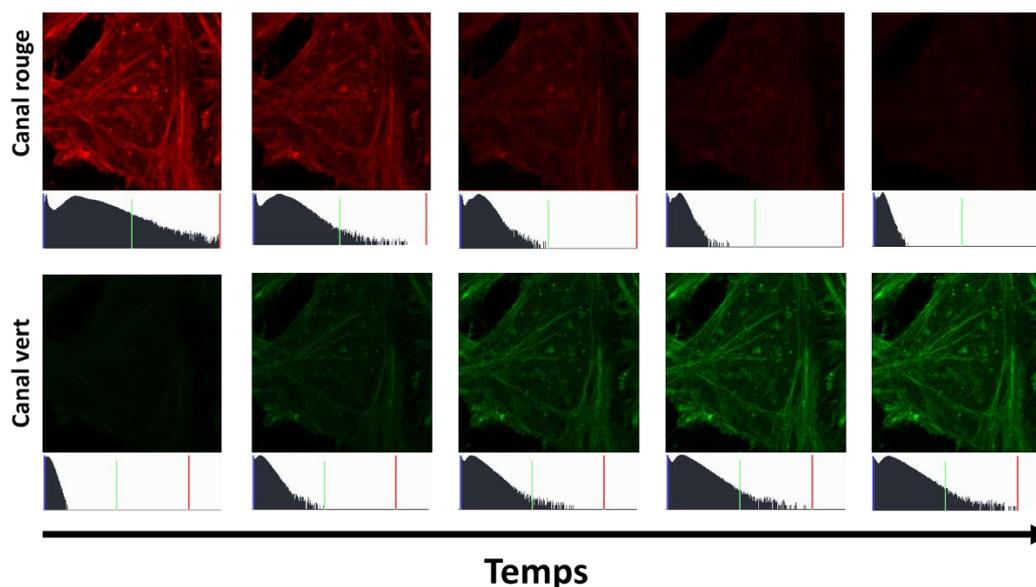


Figure V.18 Exemple de conversion avec le **BODIPY 650 Actin** au cours du temps avec les histogrammes d'intensité

V.3. Conclusion méthodologie

Ces travaux de thèse ont permis l'élaboration de nombreuses méthodes de caractérisation de fluorophores présentant des propriétés de photo-conversion et de photo-commutation. Tout d'abord les propriétés liées à la photo-conversion ont été élucidées grâce à l'obtention des rendements quantique de photo-transformation à l'aide de modèles cinétiques reliés aux variations des propriétés d'émission des fluorophores. Ensuite les rendements quantiques de génération d'oxygène singulet ont pu être obtenus en se servant de la fluorescence du DBPF et non de son absorption permettant des expériences plus pratiques à mettre en place. Les propriétés liées à la photo-commutation ont été obtenues grâce aux greffages des fluorophores sur des surfaces fonctionnalisées par la neutravidin, l'analyse des données, quant à elle, a été conduite à l'aide d'algorithmes donnant accès aux caractéristiques de photo-commutation de manière automatisés. Toutes ces techniques sont décrites dans la littérature mais étaient peu développées dans le laboratoire. Cette thèse a permis d'étendre le savoir-faire de l'unité de recherche.

Chapitre VI. Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans un contexte où peu de fluorophores photo-convertibles et photo-commutables ont été décrits. L'objectif a été de synthétiser et caractériser de nouvelles sondes fluorescentes possédant ces propriétés et d'en expliciter le mécanisme.

Un nouveau mécanisme de photo-conversion a été décrit, la conversion induite par photo-oxydation dirigée (DPIC en Anglais), basé sur l'incorporation d'un groupement aromatique sensible à l'oxygène singulet (ASORM en Anglais) conjugué à un fluorophore. Sous irradiation, le fluorophore génère de l'oxygène singulet, oxydant l'ASORM et entraînant une rupture de la conjugaison, menant donc à un effet hypsochrome du fluorophore. Ce mécanisme a pu être prouvé à l'aide de coumarines avec l'utilisation de quatre aromatiques différents, le pyrrole, le furane, le thiophène et l'anisole. Cette première étude a donné lieu à **SC-P** une sonde de gouttelettes lipidiques utilisable en bioimagerie. Ensuite, la modification du pyrrole a donné lieu à sept photo-convertisseurs possédant des propriétés de photo-conversion différentes démontrant alors la possible modulation des propriétés de photo-conversion.

Le DPIC a ensuite pu être appliqué à une autre famille de fluorophores plus brillants, les BODIPYs. Ces derniers ont pu être caractérisés et utilisés en bioimagerie sur de nombreuses organelles, ainsi que sur des protéines à l'aide d'un ligand HaloTag. La famille des BODIPYs photo-convertibles a ensuite pu être élargie à l'aide de condensation de Knoevenagel amenant à huit nouveaux composés stryrylBODIPYs, dont trois possédant de nouveaux ASORMs, l'anthracène et les pyridones. Ces composés ont mis en lumière que plus l'ASORM est riche en électron, plus la sonde sera sensible à l'oxygène singulet. Un de ces BODIPYs, le **BODIPY-2** a pu être utilisé en imagerie cellulaire sur la membrane plasmique et les mitochondries.

L'étude portant sur les BODIPYs a également permis d'élucider un nouveau mécanisme de photo-commutation, le DPIS. Ce mécanisme repose sur l'intermédiaire endo-péroxyde réversible provenant de l'attaque de l'oxygène singulet entraînant un clignotement de la molécule, et ce sans l'utilisation de tampons spécifiques, permettant des images super-résolues sur des échantillons vivants en conditions physiologiques. Les propriétés de clignotement du **BODIPY 650** ont été étudiées à l'aide d'un greffage de ce dernier sur des lamelles de verre fonctionnalisées avec de la neutravidin, prouvant qu'il est un bon candidat pour la microscopie de super-résolution. Le **BODIPY-2** a également été utilisé en microscopie de super-résolution conduisant à des images de hautes résolutions dynamiques.

Cette thèse a également permis d'apporter de nouveaux savoir-faire au laboratoire avec l'obtention des rendements quantiques de photo-transformation, le rendement quantique de

génération d'oxygène singulet ainsi que les propriétés de clignotements d'un fluorophore (le rapport cyclique, le nombre de cycle, etc.).

Néanmoins, d'autres études sont nécessaires afin de parfaire les résultats présents dans ce manuscrit. Tout d'abord, à propos des styrylBODIPYs qui ont montré deux photo-conversions, les formes converties doivent être plus précisément décrites afin de mieux comprendre la raison de cette propriété. Ensuite, le mécanisme DPIS doit être plus profondément validé à l'aide de la synthèse d'un composé possédant un ASORM présentant une forme endo-péroxyde plus stable afin d'observer si c'est cette espèce transitoire qui est responsable des propriétés de clignotement.

Au cours de cette thèse, d'autres résultats non discutés dans ce manuscrit ont été obtenus. Premièrement, lors de la synthèse des styrylCoumarines, les isomères Z ont pu être isolés et testés en photo-conversion. Ils ont présenté des propriétés intéressantes, en effet, l'irradiation laser a entraîné l'isomérisation vers les isomères E. Les isomères Z étaient peu brillants, certainement à cause de la mauvaise planarité entre l'ASORM et le cœur coumarine. Ainsi, la photo-isomérisation a considérablement augmenté l'intensité de fluorescence (Figure VI.1). Le rendement quantique de photo-transformation et le rendement chimique ont pu être obtenus montrant une conversion très efficace ($\phi_{Pt} = 1,2\%$) et quantitative ($\eta = 96\%$). Une comparaison des chromatogrammes HPLC a confirmé cette photo-isomérisation. Ces propriétés en font des candidats de sondes photo-activables.

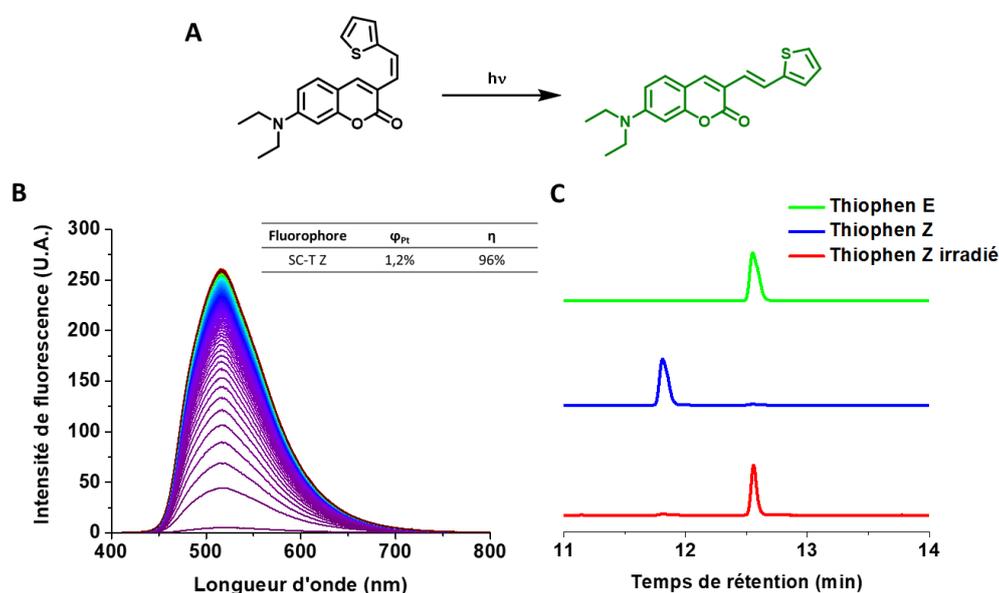


Figure VI.1 A) Réaction de photo-isomérisation, B) intensité de fluorescence au cours du temps avec les propriétés de photo-isomérisation, C) chromatogrammes HPLC.

Ensuite, lors de ces travaux de thèse l'ASORM a été utilisé comme aromatique entraînant un effet bathochrome lors de sa conjugaison, puis un effet hypsochrome lors de son oxydation. Cependant,

l'incorporation d'un aromatique riche en électrons en position β d'un BODIPY est décrite pour induire une diminution de fluorescence causée par un transfert de charge interne.^[143] Ainsi, l'hypothèse a été faite que l'introduction d'un ASORM dans cette position engendrerait un BODIPY non fluorescent, puis l'oxydation de l'ASORM un déplacement hyperchrome de ce dernier. La synthèse d'un tel BODIPY a été effectuée en utilisant un furane comme ASORM. Ce BODIPY a présenté une augmentation de fluorescence d'un facteur 200 sous irradiation laser dans le MeOH confirmant l'hypothèse (Figure VI.2). Cette expérience préliminaire ouvre la porte à l'obtention de sondes photo-activables basées potentiellement sur un nouveau mécanisme, l'Activation Induite par Photo-oxydation Dirigée (DPIA en Anglais).

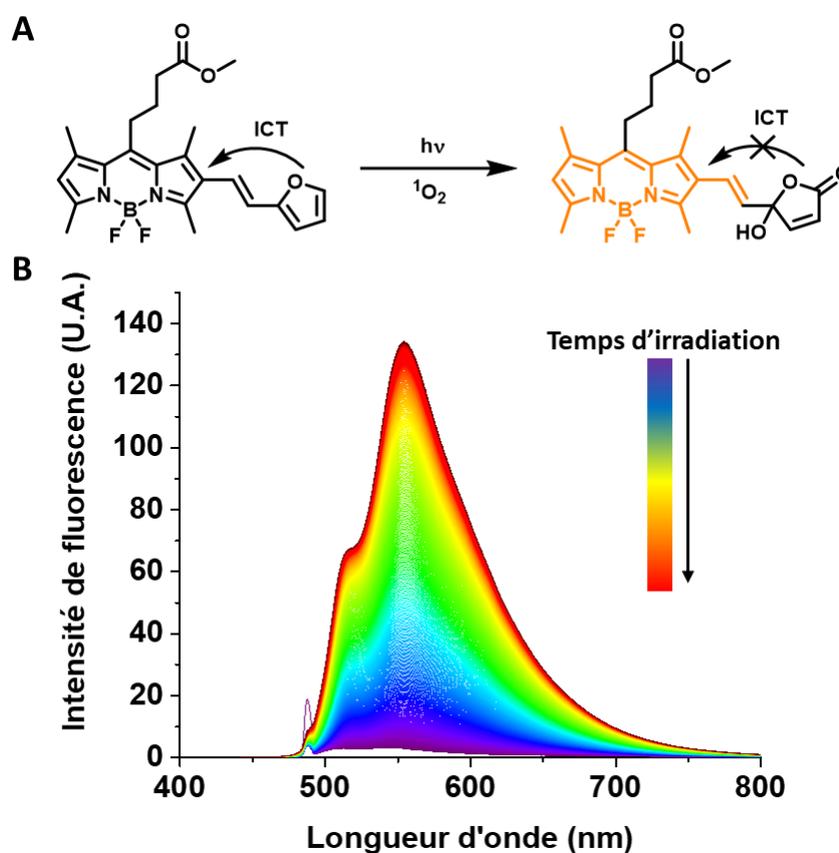


Figure VI.2 A) Mécanisme de la photo-activation, B) intensité de fluorescence au cours du temps sous irradiation laser.

Le mécanisme du DPIC a également été appliqué à des cyanines lors du passage d'un stagiaire de M2, Jean-Baptiste Florin. Les synthèses de cyanine 3, cyanine 5 et cyanine 7 possédant soit deux pyrroles soit deux furanes ont pu être effectuées. L'irradiation laser de ces composés a entraîné des déplacements hypsochromes renforçant l'utilisation du DPIC sur de nouvelles familles de fluorophores (Figure VI.3).

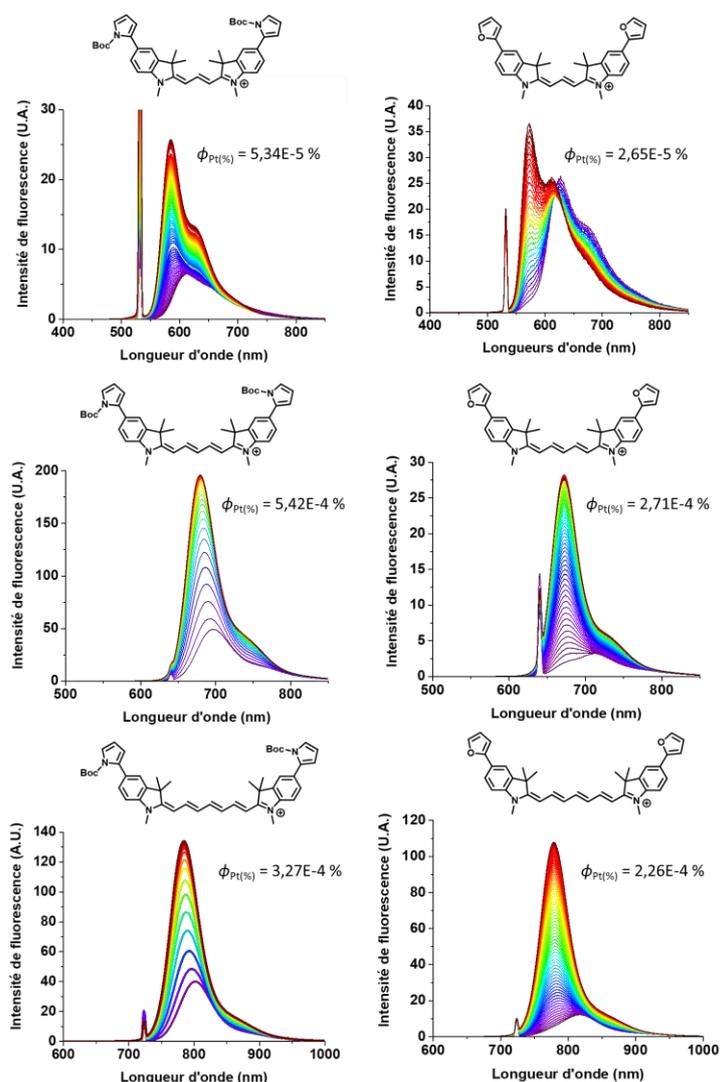


Figure VI.3 Structures et spectres d'émission au cours du temps des cyanines présentant des ASORMs.

Enfin, l'introduction d'un pyrrole sur d'autres fluorophores a été tentée, mais peu caractérisée pour le moment. Tout d'abord, sur des BOPHYs avec l'aide d'un stagiaire de M2, Maxence Bonneval, qui ont présenté des propriétés de photo-conversion. Ensuite, sur une coumarine présentant un dioxaborine qui a également montré des propriétés de photo-conversion. Et enfin, l'obtention d'un aza-BODIPY a été tentée, mais sans succès.

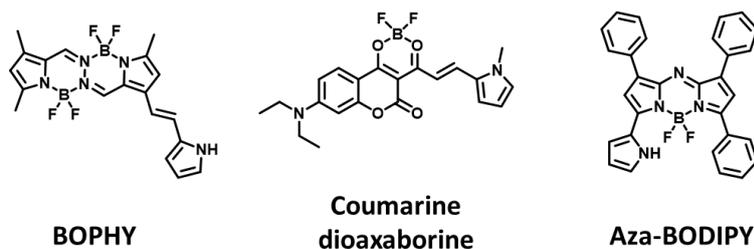


Figure VI.4 Fluorophores sur lesquels l'utilisation du DPIC a été envisagée.

Ces résultats de thèse ont montré que la conjugaison de groupements aromatiques sensibles à l'oxygène singulet avec des fluorophores permet d'obtenir des sondes fluorescentes photo-modulables et que leurs propriétés sont adaptables en fonction de la richesse électronique du fluorophore et de l'ASORM.

Chapitre VII. Références bibliographiques

- [1] *Phil. Trans. R. Soc.* **1845**, 135, 147–153.
- [2] *Phil. Trans. R. Soc.* **1852**, 142, 463–562.
- [3] J. R. Lakowicz, Ed. , *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [4] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim New York Chichester [Etc.], **2002**.
- [5] A. Jabłoński, *Z. Physik* **1935**, 94, 38–46.
- [6] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, 9, 14.
- [7] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142–155.
- [8] Y. Chu, J. Park, E. Kim, S. Lee, *Materials* **2021**, 14, 4180.
- [9] M. Collot, P. Ashokkumar, H. Anton, E. Boutant, O. Faklaris, T. Galli, Y. Mély, L. Danglot, A. S. Klymchenko, *Cell Chemical Biology* **2019**, 26, 600-614.e7.
- [10] M. P. Murphy, R. A. J. Smith, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, 47, 629–656.
- [11] D. I. Danylchuk, P.-H. Jouard, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 912–924.
- [12] W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang, L. Yuan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13658–13699.
- [13] V. V. Shynkar, A. S. Klymchenko, C. Kunzelmann, G. Duportail, C. D. Muller, A. P. Demchenko, J.-M. Freyssinet, Y. Mely, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2187–2193.
- [14] K. T. Fam, M. Collot, A. S. Klymchenko, *Chem. Sci.* **2020**, 11, 8240–8248.
- [15] T. Wieland, H. Faulstich, L. Fiume, *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **1978**, 5, 185–260.
- [16] J. A. Cooper, *Journal of Cell Biology* **1987**, 105, 1473–1478.
- [17] J. A. Evangelio, M. Abal, I. Barasoain, A. A. Souto, M. P. Lillo, A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, J. M. Andreu, *Cell Motil. Cytoskeleton* **1998**, 39, 73–90.
- [18] D. Singh, D. Rajput, S. Kanvah, *Chem. Commun.* **2022**, 58, 2413–2429.
- [19] T. Hirayama, M. Inden, H. Tsuboi, M. Niwa, Y. Uchida, Y. Naka, I. Hozumi, H. Nagasawa, *Chem. Sci.* **2019**, 10, 1514–1521.
- [20] J. Portugal, M. J. Waring, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1988**, 949, 158–168.
- [21] M. Collot, T. K. Fam, P. Ashokkumar, O. Faklaris, T. Galli, L. Danglot, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 5401–5411.
- [22] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373–382.
- [23] G. Crivat, J. W. Taraska, *Trends in Biotechnology* **2012**, 30, 8–16.
- [24] O. M. Ighodaro, O. A. Akinloye, *Alexandria Journal of Medicine* **2018**, 54, 287–293.
- [25] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2620–2640.
- [26] Y. Yue, F. Huo, S. Lee, C. Yin, J. Yoon, *Analyst* **2017**, 142, 30–41.
- [27] X. Qin, X. Yang, L. Du, M. Li, *RSC Med. Chem.* **2021**, 12, 1826–1838.
- [28] C. Ma, W. Sun, L. Xu, Y. Qian, J. Dai, G. Zhong, Y. Hou, J. Liu, B. Shen, *J. Mater. Chem. B* **2020**, 8, 9642–9651.
- [29] M. N. Tran, R.-A. F. Rarig, D. M. Chenoweth, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 4508–4512.
- [30] A. Goujon, A. Colom, K. Straková, V. Mercier, D. Mahecic, S. Manley, N. Sakai, A. Roux, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 3380–3384.

- [31] K. T. Fam, L. Saladin, A. S. Klymchenko, M. Collot, *Chem. Commun.* **2021**, 57, 4807–4810.
- [32] S. Michelis, L. Danglot, R. Vauchelles, A. S. Klymchenko, M. Collot, *Anal. Chem.* **2022**, 94, 5996–6003.
- [33] C. Lai, Y. Zhao, X. Zou, Y. Liang, W. Lin, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, 369, 132267.
- [34] E. Abbe, *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **1873**, 9, 413–468.
- [35] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780.
- [36] A. Einstein, *Phys. Z.* **1917**, 121–128.
- [37] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62, 2535–2538.
- [38] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642–1645.
- [39] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 18911–18916.
- [40] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat Methods* **2006**, 3, 793–796.
- [41] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6172–6176.
- [42] F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf, S. W. Hell, *Science* **2017**, 355, 606–612.
- [43] Z. Zou, *Trends in Analytical Chemistry* **2020**, 16.
- [44] M. Olesińska-Mönch, C. Deo, *Chem. Commun.* **2023**, 10.1039.D2CC05870G.
- [45] H. Li, J. C. Vaughan, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 9412–9454.
- [46] G. H. Patterson, *Science* **2002**, 297, 1873–1877.
- [47] N. Griffiths, E.-A. Jaipargas, M. R. Wozny, K. A. Barton, N. Mathur, K. Delfosse, J. Mathur, *Journal of Microscopy* **2016**, 263, 148–157.
- [48] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, 273, 1392–1395.
- [49] D. M. Shcherbakova, V. V. Verkhusha, *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, 20, 60–68.
- [50] J. N. Henderson, R. Gepshtein, J. R. Heenan, K. Kallio, D. Huppert, S. J. Remington, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4176–4177.
- [51] K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, J. Wiedenmann, H. Nar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 9156–9159.
- [52] A. C. Stiel, S. Trowitzsch, G. Weber, M. Andresen, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, M. C. Wahl, *Biochemical Journal* **2007**, 402, 35–42.
- [53] L. D. Lavis, *Biochemistry* **2017**, 56, 5165–5170.
- [54] S. van de Linde, M. Heilemann, M. Sauer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, 63, 519–540.
- [55] K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, V. V. Verkhusha, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2005**, 6, 885–890.
- [56] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269–272.
- [57] K. Shiraiwa, R. Cheng, H. Nonaka, T. Tamura, I. Hamachi, *Cell Chemical Biology* **2020**, 27, 970–985.
- [58] S. Bou, A. S. Klymchenko, M. Collot, *Mater. Adv.* **2021**, 2, 3213–3233.
- [59] W. Holzer, M. Mauerer, A. Penzkofer, R.-M. Szeimies, C. Abels, M. Landthaler, W. Bäuml, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1998**, 47, 155–164.
- [60] J. Xu, H. Ma, Y. Liu, *Current Protocols in Cytometry* **2017**, 81, DOI 10.1002/cpcy.23.
- [61] T. Liu, T. Stephan, P. Chen, J. Keller-Findeisen, J. Chen, D. Riedel, Z. Yang, S. Jakobs, Z. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, 119, e2215799119.

- [62] A. L. Carlson, J. Fujisaki, J. Wu, J. M. Runnels, R. Turcotte, C. L. Celso, D. T. Scadden, T. B. Strom, C. P. Lin, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69257.
- [63] S. Osseiran, L. A. Austin, T. M. Cannon, C. Yan, D. M. Langenau, C. L. Evans, *Sci Rep* **2019**, *9*, 5713.
- [64] S. J. J. Kwok, M. Choi, B. Bhayana, X. Zhang, C. Ran, S.-H. Yun, *Sci Rep* **2016**, *6*, 23866.
- [65] Y. Cho, H. J. An, T. Kim, C. Lee, N. K. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 14125–14135.
- [66] S. S. Matikonda, D. A. Helmerich, M. Meub, G. Beliu, P. Kollmannsberger, A. Greer, M. Sauer, M. J. Schnermann, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1144–1155.
- [67] D. A. Helmerich, G. Beliu, S. S. Matikonda, M. J. Schnermann, M. Sauer, *Nat Methods* **2021**, *18*, 253–257.
- [68] H. Fukushima, S. S. Matikonda, S. M. Usama, A. Furusawa, T. Kato, L. Štacková, P. Klán, H. Kobayashi, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 11075–11080.
- [69] R. R. Nani, A. P. Gorka, T. Nagaya, T. Yamamoto, J. Ivanic, H. Kobayashi, M. J. Schnermann, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 329–337.
- [70] M. N. Tran, D. M. Chenoweth, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 6442–6446.
- [71] H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, E. Masliah, *Nat Rev Neurosci* **2013**, *14*, 38–48.
- [72] J. V. Jun, C. M. Haney, R. J. Karpowicz, S. Giannakoulis, V. M.-Y. Lee, E. J. Petersson, D. M. Chenoweth, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 1893–1897.
- [73] J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat Methods* **2015**, *12*, 244–250.
- [74] Z.-Q. Hu, M. Li, M.-D. Liu, W.-M. Zhuang, G.-K. Li, *Dyes and Pigments* **2013**, *96*, 71–75.
- [75] C. Sun, J. Chen, H. Ma, Y. Liu, J. Zhang, Q. Liu, *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 1101–1108.
- [76] S. Bae, J. Tae, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 5389–5392.
- [77] J. B. Grimm, B. P. English, H. Choi, A. K. Muthusamy, B. P. Mehl, P. Dong, T. A. Brown, J. Lippincott-Schwartz, Z. Liu, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat Methods* **2016**, *13*, 985–988.
- [78] H. Lan, F. Xue, Z. Liu, L. Chen, C. Huang, T. Yi, *Advanced Optical Materials* **2016**, *4*, 1367–1372.
- [79] X. Ling, L. Huang, Y. Li, Q. Wan, Z. Wang, A. Qin, M. Gao, B. Z. Tang, *Mater. Horiz.* **2020**, *7*, 2696–2701.
- [80] Q. Lin, Z. Du, Y. Yang, Q. Fang, C. Bao, Y. Yang, L. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16314–16319.
- [81] L. Kortekaas, W. R. Browne, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3406–3424.
- [82] Y. Fu, X. Zhang, F. Cao, W. Wang, G. Qian, J. Zhang, **2019**, *9*.
- [83] Y. Fu, H.-H. Han, J. Zhang, X.-P. He, B. L. Feringa, H. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 8671–8674.
- [84] W. Zhang, F. Huo, Y. Yue, Y. Zhang, J. Chao, F. Cheng, C. Yin, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 3262–3268.
- [85] J. Zhang, Y. Fu, H.-H. Han, Y. Zang, J. Li, X.-P. He, B. L. Feringa, H. Tian, *Nat Commun* **2017**, *8*, 987.
- [86] W. Zhang, F. Huo, C. Yin, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 5277–5280.
- [87] J. Tang, *Sensors and Actuators* **2022**, *9*.

- [88] X. Chai, H.-H. Han, A. C. Sedgwick, N. Li, Y. Zang, T. D. James, J. Zhang, X.-L. Hu, Y. Yu, Y. Li, Y. Wang, J. Li, X.-P. He, H. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 18005–18013.
- [89] Y. Zhang, K.-H. Song, S. Tang, L. Ravelo, J. Cusido, C. Sun, H. F. Zhang, F. M. Raymo, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12741–12745.
- [90] Q. Gong, X. Zhang, W. Li, X. Guo, Q. Wu, C. Yu, L. Jiao, Y. Xiao, E. Hao, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 21992–21999.
- [91] E. C. Freundt, M. Czapiga, M. J. Lenardo, *Cell Res* **2007**, *17*, 956–958.
- [92] B. Wagner, *Molecules* **2009**, *14*, 210–237.
- [93] N. R. Ayyangar, K. V. Srinivasan, T. Daniel, *Dyes and Pigments* **1991**, *16*, 197–204.
- [94] K. Hara, Z.-S. Wang, T. Sato, A. Furube, R. Katoh, H. Sugihara, Y. Dan-oh, C. Kasada, A. Shinpo, S. Suga, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15476–15482.
- [95] H.-Y. Yin, J. Tang, J.-L. Zhang, *Chinese Chemical Letters* **2018**, *29*, 267–270.
- [96] J. R. Casley-Smith, R. G. Morgan, N. B. Piller, *N Engl J Med* **1993**, *329*, 1158–1163.
- [97] W. H. Perkin, *J. Chem. Soc.* **1868**, *21*, 53–63.
- [98] R. M. Christie, C.-H. Lui, *Dyes and Pigments* **1999**, *42*, 85–93.
- [99] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2012**.
- [100] S. Habuchi, H. Tsutsui, A. B. Kochaniak, A. Miyawaki, A. M. van Oijen, *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3944.
- [101] D. A. Lightner, C.-S. Pak, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2724–2728.
- [102] T. Montagnon, D. Kalaitzakis, M. Triantafyllakis, M. Stratakis, G. Vassilikogiannakis, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15480–15498.
- [103] J. K. Howard, K. J. Rihak, A. C. Bissember, J. A. Smith, *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 155–167.
- [104] R. Hajiboland, in *Oxidative Damage to Plants*, Elsevier, **2014**, pp. 1–63.
- [105] R. V. Bensasson, G. Jori, E. J. Land, T. G. Truscott, Eds., *Primary Photo-Processes in Biology and Medicine*, Springer US, Boston, MA, **1985**.
- [106] T. Entradas, S. Waldron, M. Volk, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, *204*, 111787.
- [107] J. A. Howard, G. D. Mendenhall, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 2199–2201.
- [108] K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, T. Nagano, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 3170–3175.
- [109] N. Zeinali, I. Oluwoye, M. Altarawneh, B. Z. Dlugogorski, *Theor Chem Acc* **2019**, *138*, 90.
- [110] M. K. Kuimova, G. Yahiolglu, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 332–340.
- [111] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 1184–1201.
- [112] T. Bura, N. Leclerc, S. Fall, P. Lévêque, T. Heiser, P. Retailleau, S. Rihn, A. Mirloup, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17404–17407.
- [113] S. C. Guggenheimer, J. H. Boyer, K. Thangaraj, M. Shah, M.-L. Soong, T. G. Pavlopoulos, *Appl. Opt.* **1993**, *32*, 3942.
- [114] M. Collot, E. Boutant, M. Lehmann, A. S. Klymchenko, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 192–199.
- [115] A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77–88.
- [116] A. Treibs, F.-H. Kreuzer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208–223.
- [117] K. Gräf, T. Körzdörfer, S. Kümmel, M. Thelakkat, *New J. Chem.* **2013**, *37*, 1417.
- [118] G. Fan, L. Yang, Z. Chen, *Front. Chem. Sci. Eng.* **2014**, *8*, 405–417.
- [119] A. Harriman, G. Izzet, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10868–10875.

- [120] P. H. Marek-Urban, M. Urban, M. Wiklińska, K. Paplińska, K. Woźniak, A. Blacha-Grzechnik, K. Durka, *J. Org. Chem.* **2021**, acs.joc.1c01254.
- [121] Y. Wang, J. Li, Z. Zhou, R. Zhou, Q. Sun, P. Wu, *Nat Commun* **2021**, *12*, 526.
- [122] N. Epelde-Elezcano, V. Martínez-Martínez, E. Peña-Cabrera, C. F. A. Gómez-Durán, I. L. Arbeloa, S. Lacombe, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 41991–41998.
- [123] S. Bolte, F. P. Cordelières, *J Microsc* **2006**, *224*, 213–232.
- [124] J. H. Lin, P. Walter, T. S. B. Yen, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2008**, *3*, 399–425.
- [125] M. Lelek, M. T. Gyparaki, G. Beliu, F. Schueder, J. Griffié, S. Manley, R. Jungmann, M. Sauer, M. Lakadamyali, C. Zimmer, *Nat Rev Methods Primers* **2021**, *1*, 39.
- [126] C. S. Wijesooriya, J. A. Peterson, P. Shrestha, E. J. Gehrman, A. H. Winter, E. A. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12685–12689.
- [127] N. Olivier, D. Keller, V. S. Rajan, P. Gönczy, S. Manley, *Biomed. Opt. Express* **2013**, *4*, 885.
- [128] A. A. Gorman, I. Hamblett, C. Lambert, B. Spencer, M. C. Standen, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8053–8059.
- [129] Z. Gao, Y. Han, F. Wang, *Nat Commun* **2018**, *9*, 3977.
- [130] Y. Gidi, L. Payne, V. Glembockyte, M. S. Michie, M. J. Schnermann, G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 12681–12689.
- [131] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6770–6776.
- [132] T. Kottke, S. van de Linde, M. Sauer, S. Kakorin, M. Heilemann, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3156–3159.
- [133] A. M. Bittel, A. Nickerson, I. S. Saldivar, N. J. Dolman, X. Nan, S. L. Gibbs, *Sci Rep* **2016**, *6*, 29687.
- [134] D. Faust, K.-H. Funken, G. Horneck, B. Milow, J. Ortner, M. Sattlegger, M. Schäfer, C. Schmitz, *Solar Energy* **1999**, *65*, 71–74.
- [135] P. P. Fu, Q. Xia, X. Sun, H. Yu, *Journal of Environmental Science and Health, Part C* **2012**, *30*, 1–41.
- [136] A. Gollmer, J. Arnbjerg, F. H. Blaikie, B. W. Pedersen, T. Breitenbach, K. Daasbjerg, M. Glasius, P. R. Ogilby, *Photochemistry and Photobiology* **2011**, *87*, 671–679.
- [137] E. Sato, Y. Ikeda, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 507–513.
- [138] S. Callaghan, M. A. Filatov, E. Sitte, H. Savoie, R. W. Boyle, K. J. Flanagan, M. O. Senge, *Photochem Photobiol Sci* **2017**, *16*, 1371–1374.
- [139] M. A. Thompson, J. S. Biteen, S. J. Lord, N. R. Conley, W. E. Moerner, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **2010**, pp. 27–59.
- [140] N. Adarsh, R. R. Avirah, D. Ramaiah, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5720–5723.
- [141] T. N. Sut, H. Park, D. J. Koo, B. K. Yoon, J. A. Jackman, *Sensors* **2022**, *22*, 5185.
- [142] M. Ovesný, P. Křížek, J. Borkovec, Z. Švindrych, G. M. Hagen, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2389–2390.
- [143] S. Xuan, N. Zhao, X. Ke, Z. Zhou, F. R. Fronczek, K. M. Kadish, K. M. Smith, M. G. H. Vicente, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2545–2557.
- [144] D. Ray, P. K. Bharadwaj, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2252–2254.
- [145] K. Renault, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 6494–6498.
- [146] R. Ambre, C.-Y. Yu, S. B. Mane, C.-F. Yao, C.-H. Hung, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4680–4688.
- [147] B. M. Trost, C. A. Kalnals, D. Ramakrishnan, M. C. Ryan, R. W. Smaha, S. Parkin, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 2584–2589.
- [148] J. Gordo, J. Avó, A. J. Parola, J. C. Lima, A. Pereira, P. S. Branco, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5112–5115.

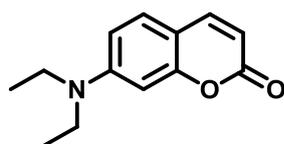
-
- [149] S. Padmanabhan, R. Peri, A. Rutledge, D. J. Triggle, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1997**, *34*, 301–304.
- [150] H. M. L. Davies, J. J. Matasi, G. Ahmed, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2305–2313.
- [151] T. Purkarthofer, K. Gruber, M. H. Fechter, H. Griengl, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7661–7668.
- [152] J. Waser, B. Gaspar, H. Nambu, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11693–11712.
- [153] F. de Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, J.-C. Olivo-Marin, *Nat Methods* **2012**, *9*, 690–696.
- [154] T. Lagache, A. Grassart, S. Dallongeville, O. Faklaris, N. Sauvonnet, A. Dufour, L. Danglot, J.-C. Olivo-Marin, *Nat Commun* **2018**, *9*, 698.

Chapitre VIII. Partie expérimentale

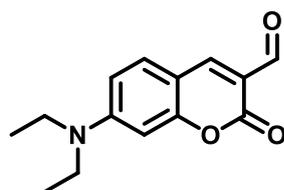
VIII.1. Synthèse

Materials and methods

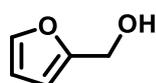
All starting materials for synthesis were purchased from Alfa Aesar, Sigma-Aldrich, or TCI Europe and used as received unless stated otherwise. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer. The ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts are reported relative to residual solvent signals. Data are presented as follows: chemical shift (ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, dd = doublet of doublets, m = multiplet, br = broad), coupling constant J (Hz) and integration. Mass spectra were obtained using an Agilent Q-TOF 6520 mass spectrometer and the MALDI-TOF spectra were collected on a Bruker autoflex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA). HPLC analyses were performed on Agilent 1260 Infinity II system equipped with Interchim PF5C18AQ-250/046 reversed phase column with gradual eluting from water to acetonitrile for 20min at 1.5 mL/min.



1. To a solution of 4-(Diethylamino)salicylaldehyde **1** (2.00 g, 10.35 mmol, 1 eq) and Meldrum's acid (1.64 g, 11.38 mmol, 1.1 eq) in EtOH (15 mL) was added piperidine (0.1 mL, 1.03 mmol, 0.1 eq.). The solution was warmed at 90°C overnight, cooled down with ice bath. The orange solid **2** was filtered, added to a solution of HCl 17%. The solution was refluxed at 130°C until disappearance of the suspension. The solution was cooled on ice bath and neutralized with NaOH (6M). The precipitate was filtered and washed with water to give **1** as a yellow solid (1.44 g, 64%). The NMR was in accordance with the literature.^[144] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (dd, $J = 9.3, 0.6$ Hz, 1H, H Ar), 7.26 (s, 1H, H Ar), 7.24 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H Ar), 6.56 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H, H Ar), 6.49 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H Ar), 6.03 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2 ethyl), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3 ethyl).

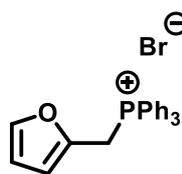


2. To a solution of DMF (2 mL, 26 mmol, 4 eq) was dropwise added POCl_3 (3.28 g, 21 mmol, 3.3 eq, 2 mL) at 0°C under argon. The solution was stirred 20 minutes at 60°C . **1** (1.4 g, 6.44 mmol) in 10 mL of DMF was added the reaction was heated at 60°C for 3 hours. The reaction was followed by TLC. After the disappearance of the starting material the mixture was cooled down and poured into water. The precipitate was filtered and then solubilized in DCM, washed with a solution of saturated NaHCO_3 , dried over MgSO_4 . Solvents were evaporated under reduced pressure to give **2** as an orange solid (1.25 g, 79%). The NMR was in accordance with the literature.^[145] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.12 (s, 1H, CHO), 8.25 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H, H Ar), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H Ar), 6.63 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H, H Ar), 6.48 (dd, $J = 2.5, 0.7$ Hz, 1H, H Ar), 3.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH_2 ethyl), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3 ethyl).

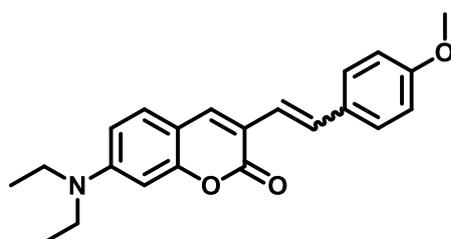


3. To a solution of furfural (1 g, 10.4 mmol, 1 eq, 0.86 mL) at 0°C in ethanol (10 mL) was added dropwise NaBH_4 (393 mg, 10.4 mmol, 1 eq). The solution was allowed to warm at RT. Acetone (0.1 mL) and water (10 mL) were added to the mixture. The product was extract with DCM, washed with brine, and dried over MgSO_4 . Solvents were evaporated under reduced pressure to give **3** (700 mg, 69%). The NMR was in accordance with the literature except for the hydroxyl proton which is prompt to shift.^[146] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (dd, $J = 1.9, 0.8$

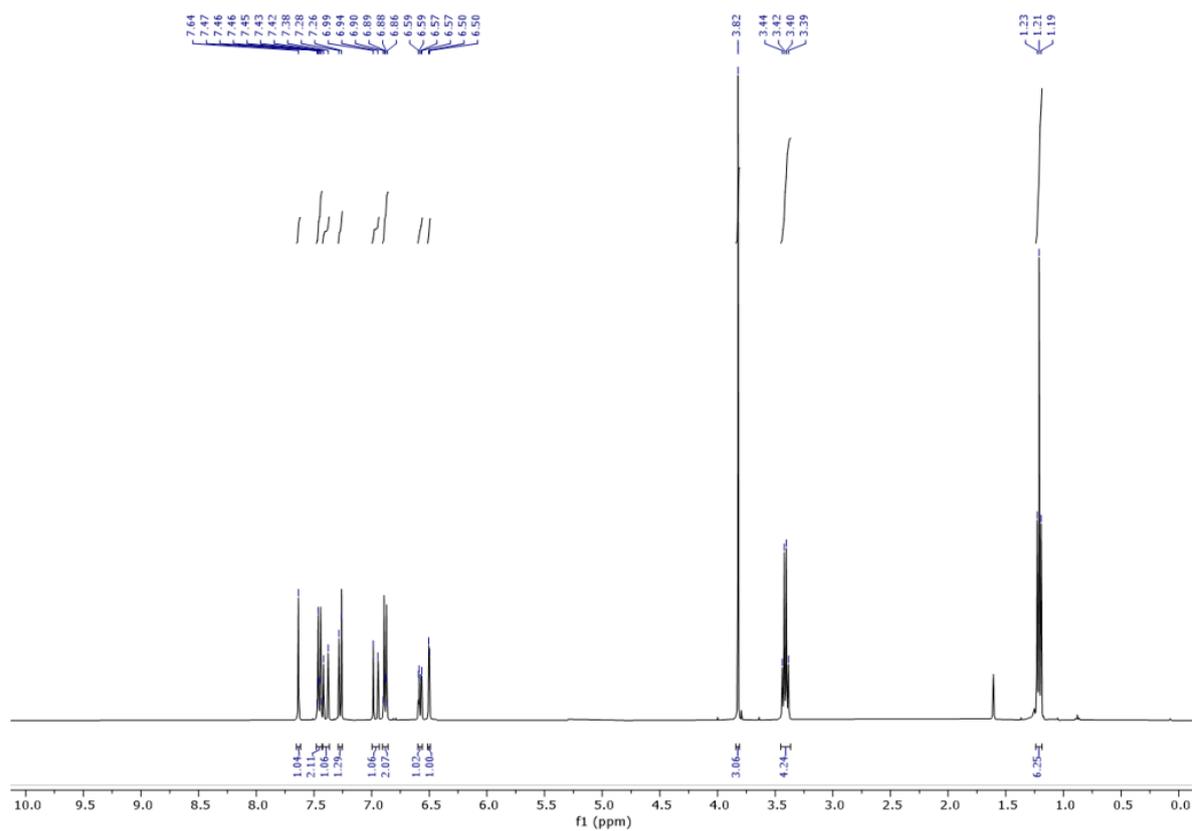
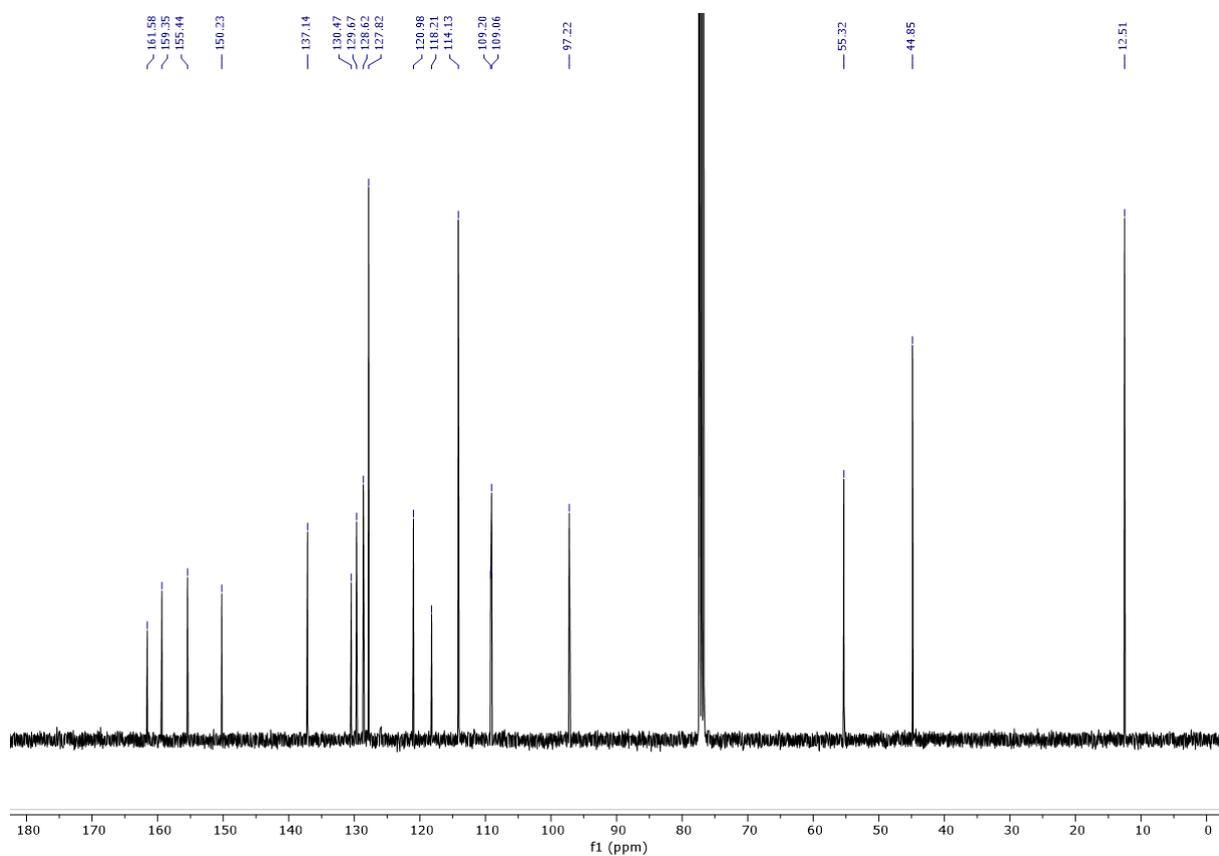
Hz, 1H), 6.34 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.31 – 6.26 (m, 1H), 4.61 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.91 – 1.78 (m, 1H).

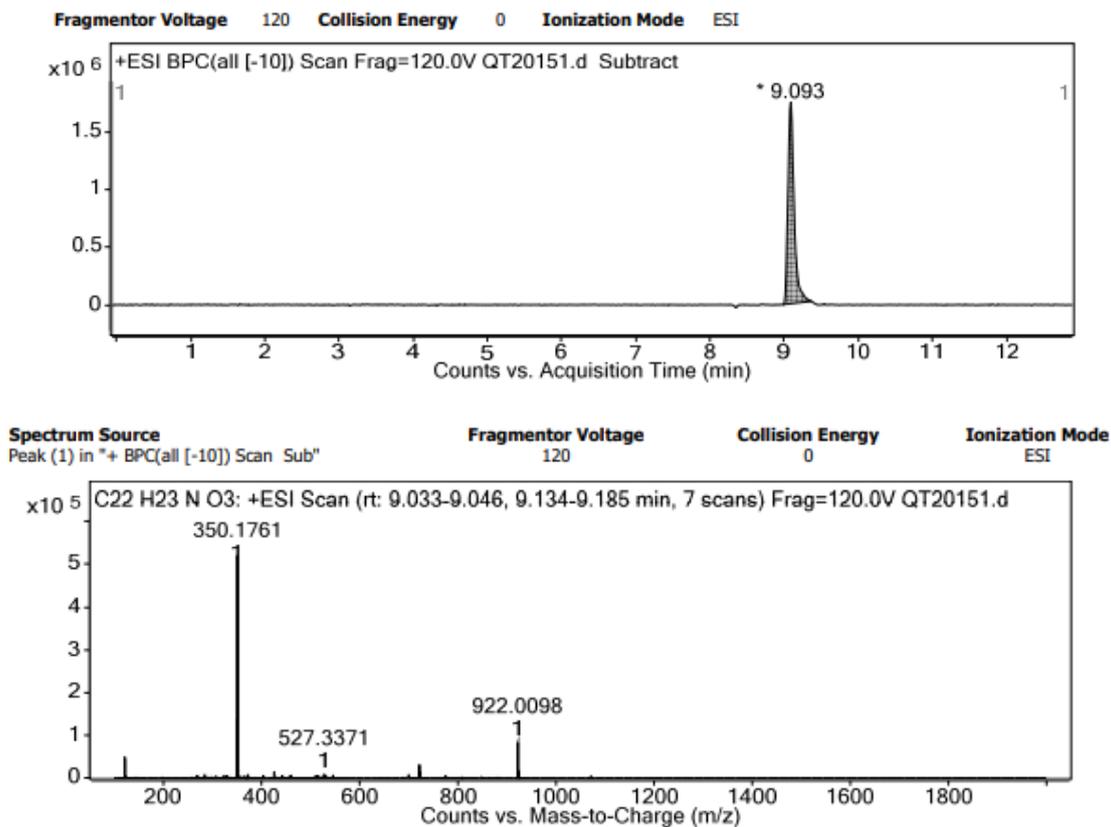
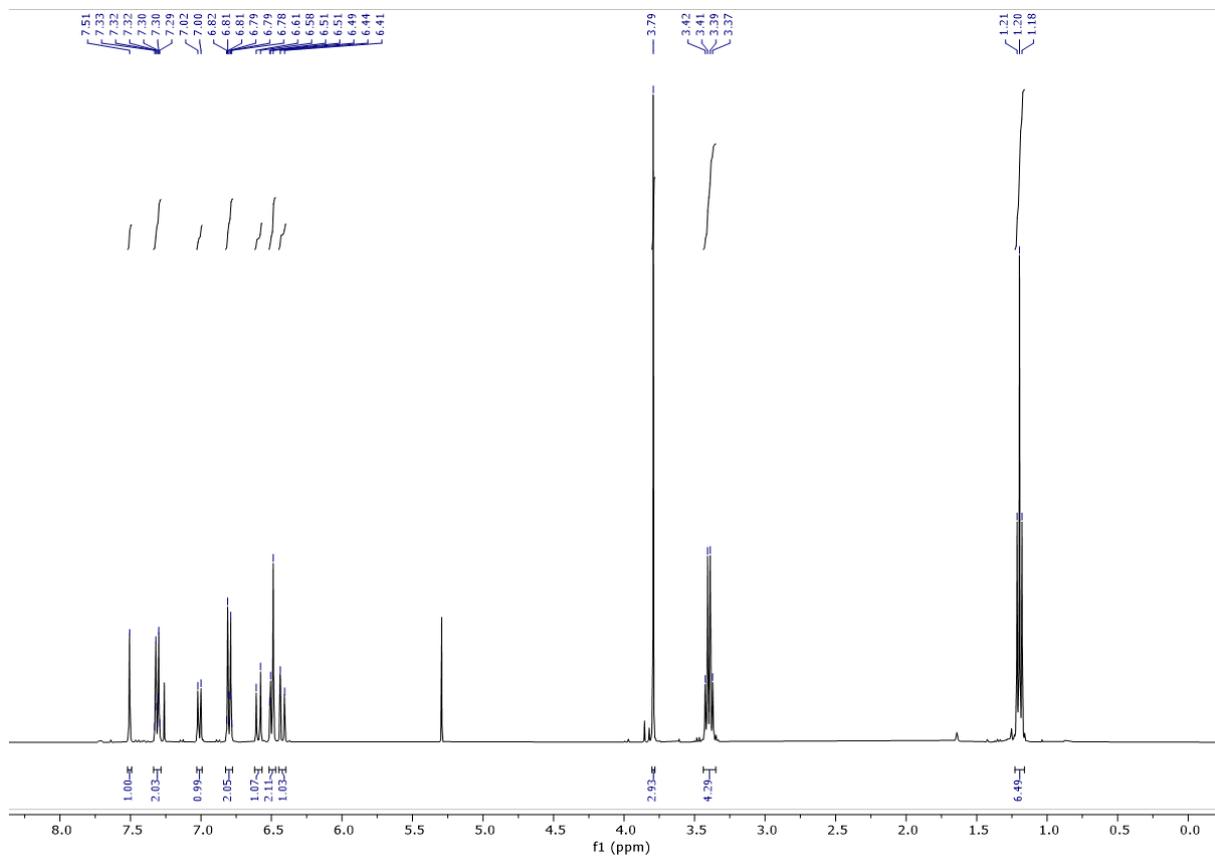


4. To a solution of HBrPPh₃ (1.31 g, 3.81 mmol, 1.1 eq) in ACN (10 mL) was added **3** (340 mg, 3.47 mmol, 1 eq). The solution was refluxed 2 hours. The mixture was cooled down at RT and filtered. The powder was washed with Et₂O to give **4** (1.35 g, 92%) as an off-white powder. The NMR was in accordance with the literature.^[147] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (dt, $J = 12.2, 7.0$ Hz, 9H), 7.67 – 7.62 (m, 6H), 7.18 (s, 1H), 6.57 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.64 (d, $J = 13.1$ Hz, 2H).



SC-A. To a solution of **2** (100 mg, 0.407 mmol, 1 eq) and (4-methoxybenzyl)triphenylphosphonium chloride (205 mg, 0.490 mmol, 1.2 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (64 mg, 0.571 mmol, 1.4 eq). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 5 minutes. The mixture was diluted with water and extracted with Et₂O. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ solution, then with brine solution, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/Heptane: 40/60 to 100/0) to obtain **SC-A** (Z) as an orange amorphous solid (25 mg, 18%) and **SC-A** (E) as an orange amorphous solid (12.5 mg, 9%). $R_{fZ} = 0.33$, $R_{fE} = 0.44$ (DCM). **SC-A** (E): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.64 (s, 1H, ArH), 7.48 – 7.43 (m, 2H, ArH), 7.40 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, CH alkene), 7.29 – 7.25 (m, 1H, ArH), 6.96 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, CH alkene), 6.92 – 6.84 (m, 2H), 6.58 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.58 (CO₂ Lactone), 159.35, 155.44, 150.23, 137.14, 130.47, 129.67, 128.62, 127.82, 120.98, 118.21, 114.13, 109.20, 109.06, 97.22, 55.32 (OMe), 44.85 (CH₂ ethyl), 12.51 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₂₂H₂₄NO₃ [M+H]⁺ 350.1756, found 350.1751. **SC-A** (Z): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, ArH), 7.31 – 7.23 (m, 2H, ArH), 7.01 – 6.94 (m, 1H, ArH), 6.80 – 6.72 (m, 2H, ArH), 6.55 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, CH alkene), 6.46 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 6.38 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, CH alkene), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.36 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.40 (CO₂ Lactone), 158.71, 155.99, 150.40, 140.34, 130.89, 129.94, 129.42, 128.84, 122.22, 117.29, 113.90, 108.80, 108.57, 97.29, 55.82 (OMe), 44.83 (CH₂ ethyl), 12.47 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₂₂H₂₄NO₃ [M+H]⁺ 350.1756, found 350.1784.

Figure VIII.1 ^1H NMR spectrum of SC-A (E)Figure VIII.2 ^{13}C NMR spectrum of SC-A (E)

Figure VIII.3 HRMS spectrum of *SC-A* (E)Figure VIII.4 ^1H NMR spectrum of *SC-A* (Z)

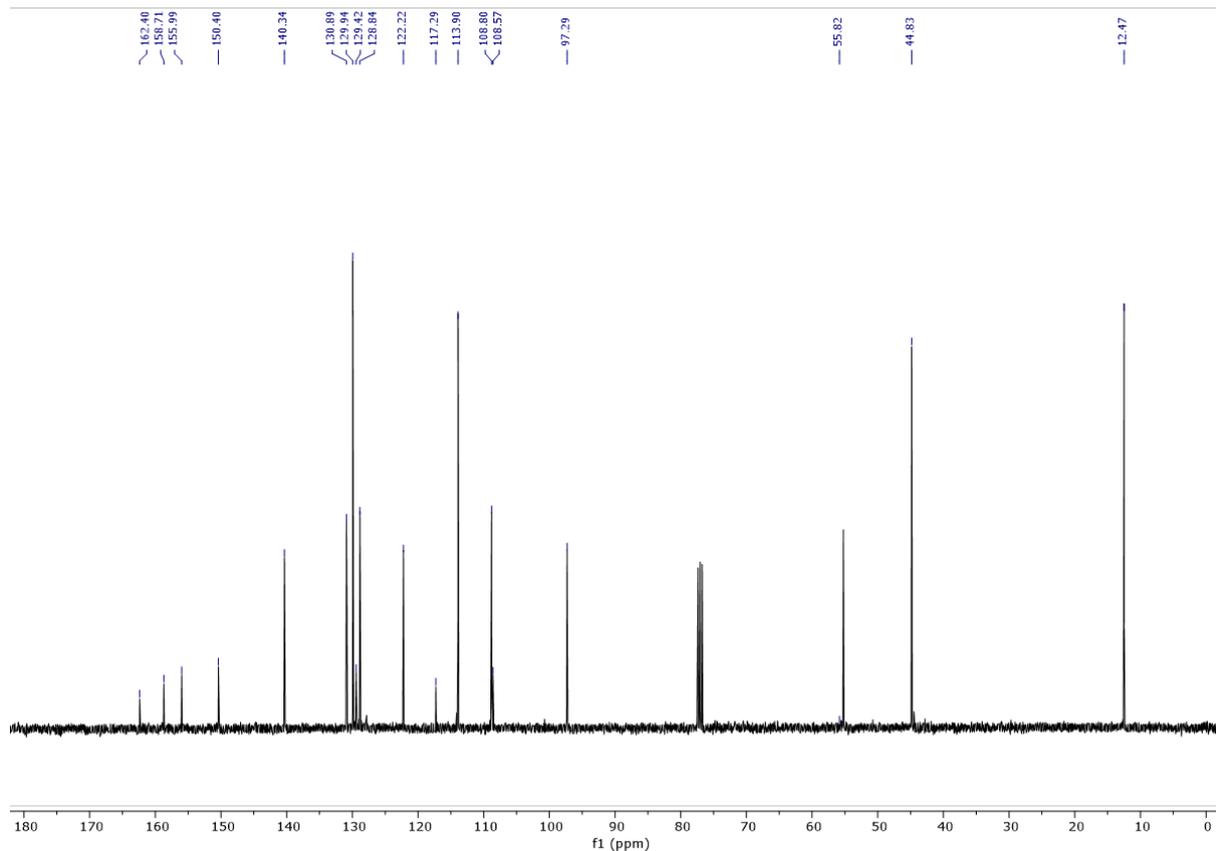


Figure VIII.5 ¹³C NMR spectrum of SC-A (Z)

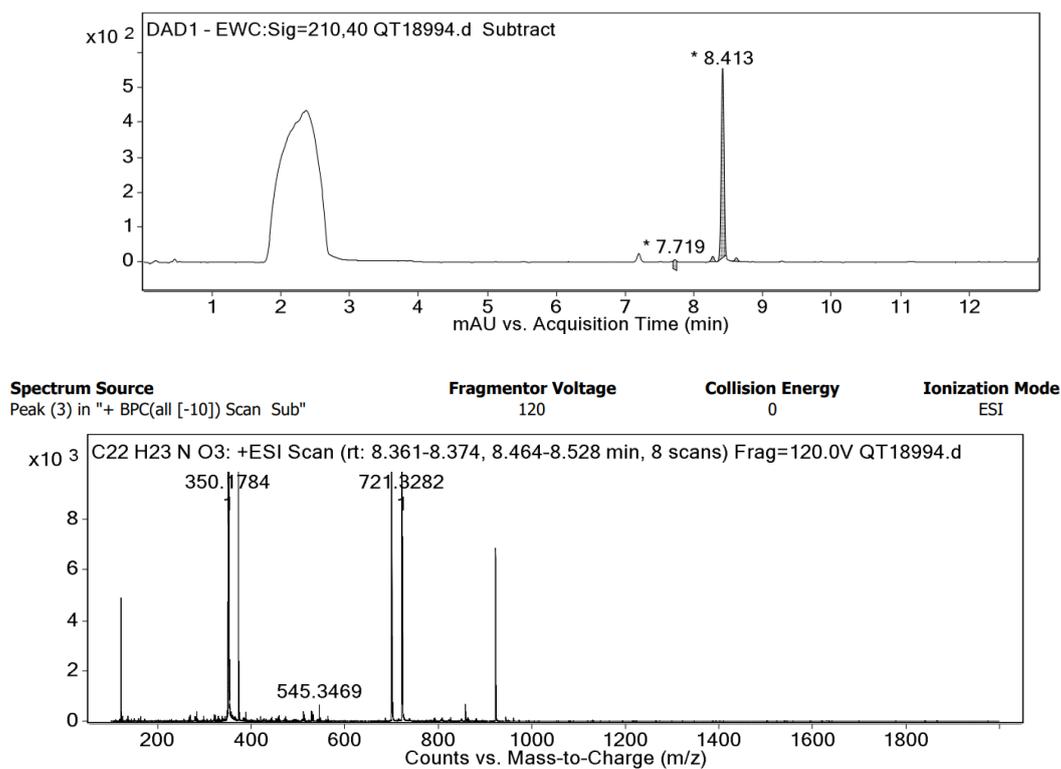
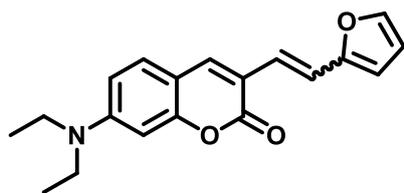


Figure VIII.6 HRMS spectrum of SC-A (Z)



SC-F. To a solution of **2** (100 mg, 0.407 mmol, 1 eq) and **4** (207 mg, 0.489 mmol, 1.2 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (64 mg, 0.571 mmol, 1.4 eq). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 5 minutes. The mixture was diluted with water and extracted with Et₂O. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ solution, then with brine solution, dried over MgSO₄,

filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/Heptane: 40/60 to 100/0) to obtain **SC-F (E)** as an orange amorphous solid (5 mg, 4%) and **SC-F (Z)** as an orange amorphous solid (50 mg, 40%). $R_{fE} = 0.65$, $R_{fZ} = 0.4$ (DCM). **SC-F (E)**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (s, 1H, ArH), 7.47 (d, J = 16.1 Hz, 1H, CH alkene), 7.39 (dd, J = 1.9, 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 – 7.22 (d, J = 8 Hz, 1H, ArH), 6.92 (dd, J = 16.1 Hz, 1H, CH alkene), 6.58 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.50 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.41 (dd, J = 3.3, 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.35 (dd, J = 3.4, 0.7 Hz, 1H, ArH), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.00 (CO₂ Lactone), 156.13, 153.69, 151.27, 142.17, 138.90, 128.70, 122.05, 118.62, 117.46, 112.79, 109.68, 109.07, 97.16, 44.86 (CH₂ ethyl), 13.03 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₁₉H₂₀NO₃ [M+H]⁺ 310.1443, found 310.1445. **SC-F (Z)**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (s, 1H, ArH), 7.35 (t, J = 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 6.60 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.46 – 6.34 (m, 4H, ArH and CH alkene), 3.45 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.86 (CO₂ Lactone), 156.14, 152.26, 148.90, 144.09, 140.79, 131.09, 120.85, 119.02, 116.57, 113.42, 111.30, 108.91, 108.71, 95.06, 48.78 (CH₂ ethyl), 13.44 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₁₉H₂₀NO₃ [M+H]⁺ 310.1443, found 310.1455.

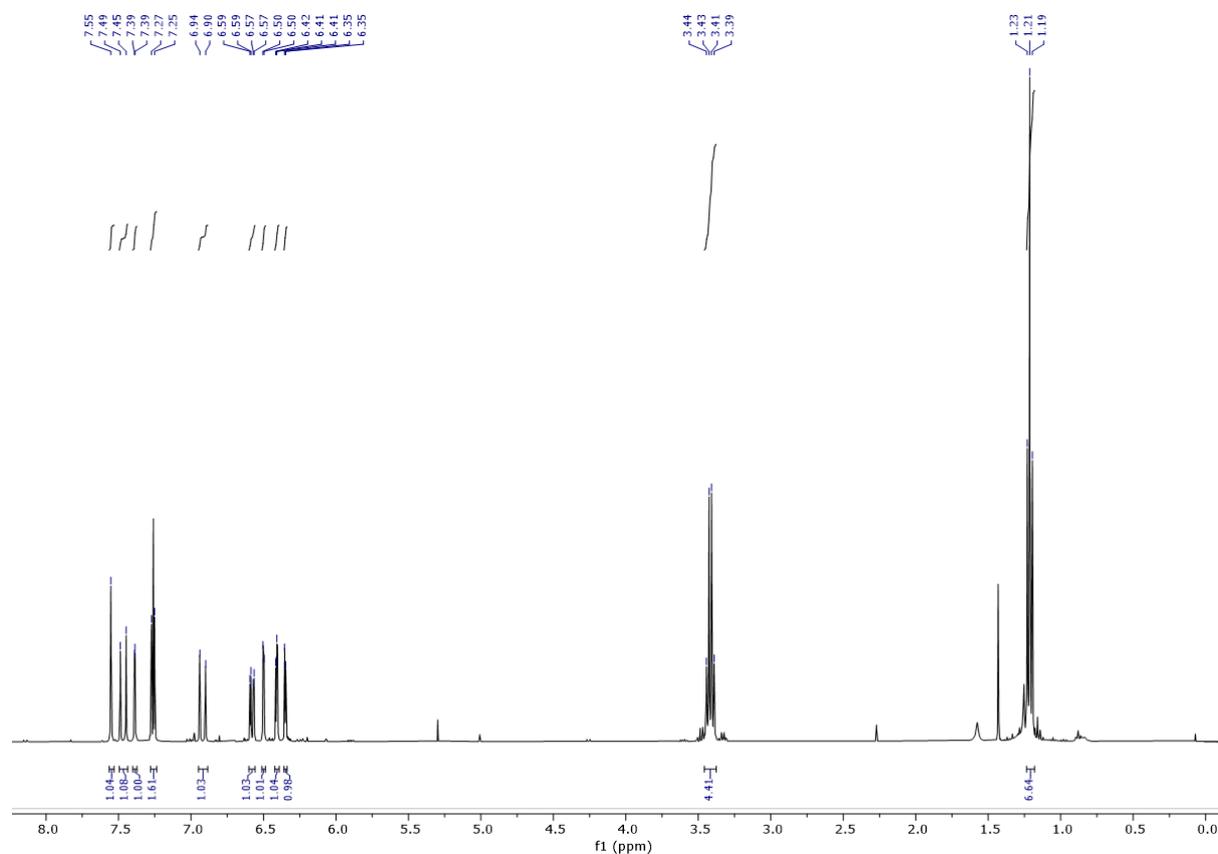


Figure VIII.7 ¹H NMR spectrum of **SC-F (E)**

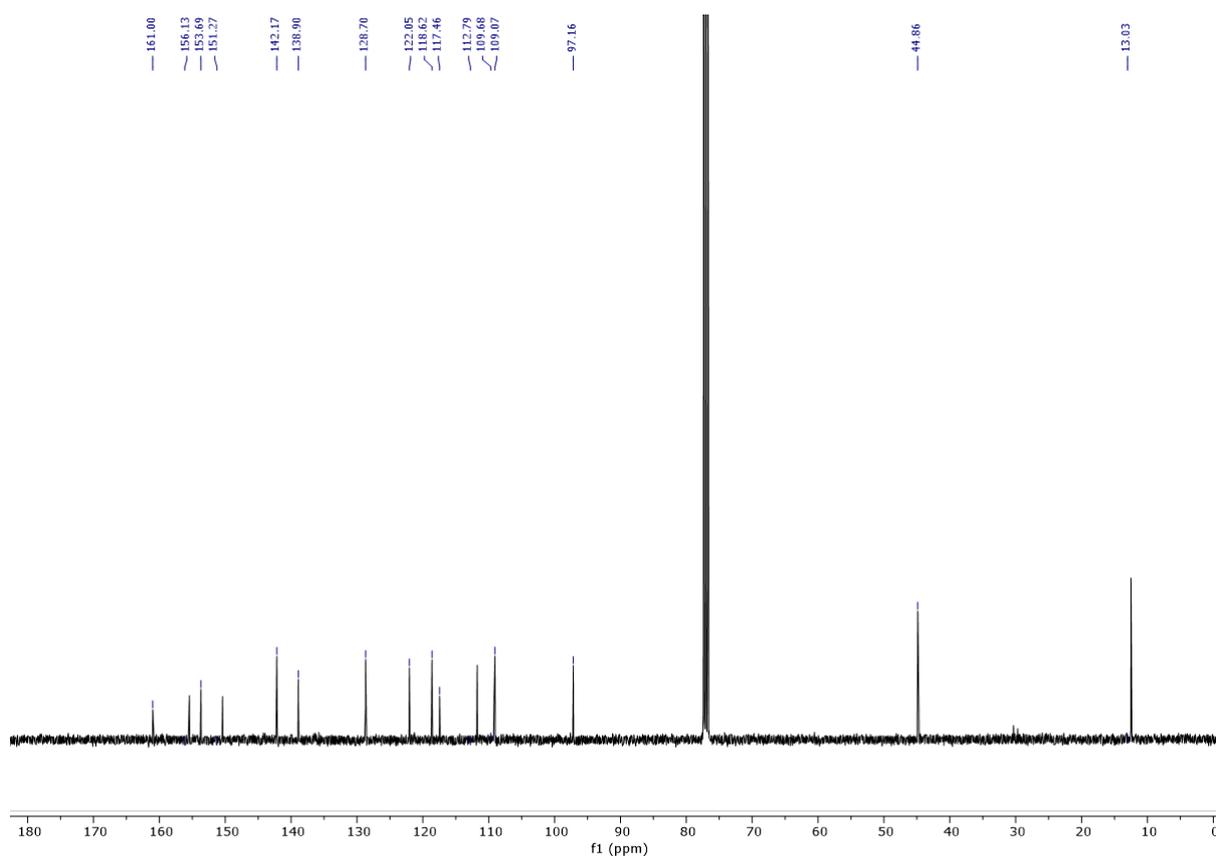


Figure VIII.8 ^{13}C NMR spectrum of *SC-F (E)*

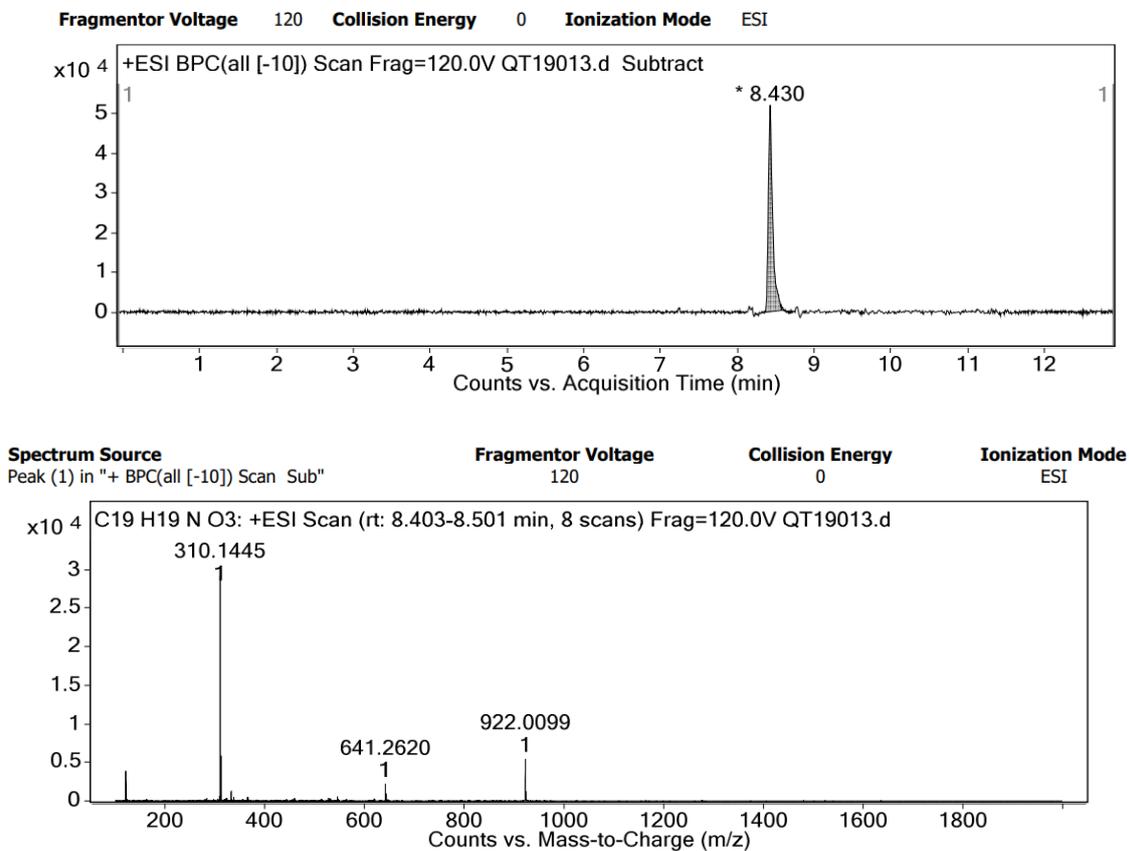
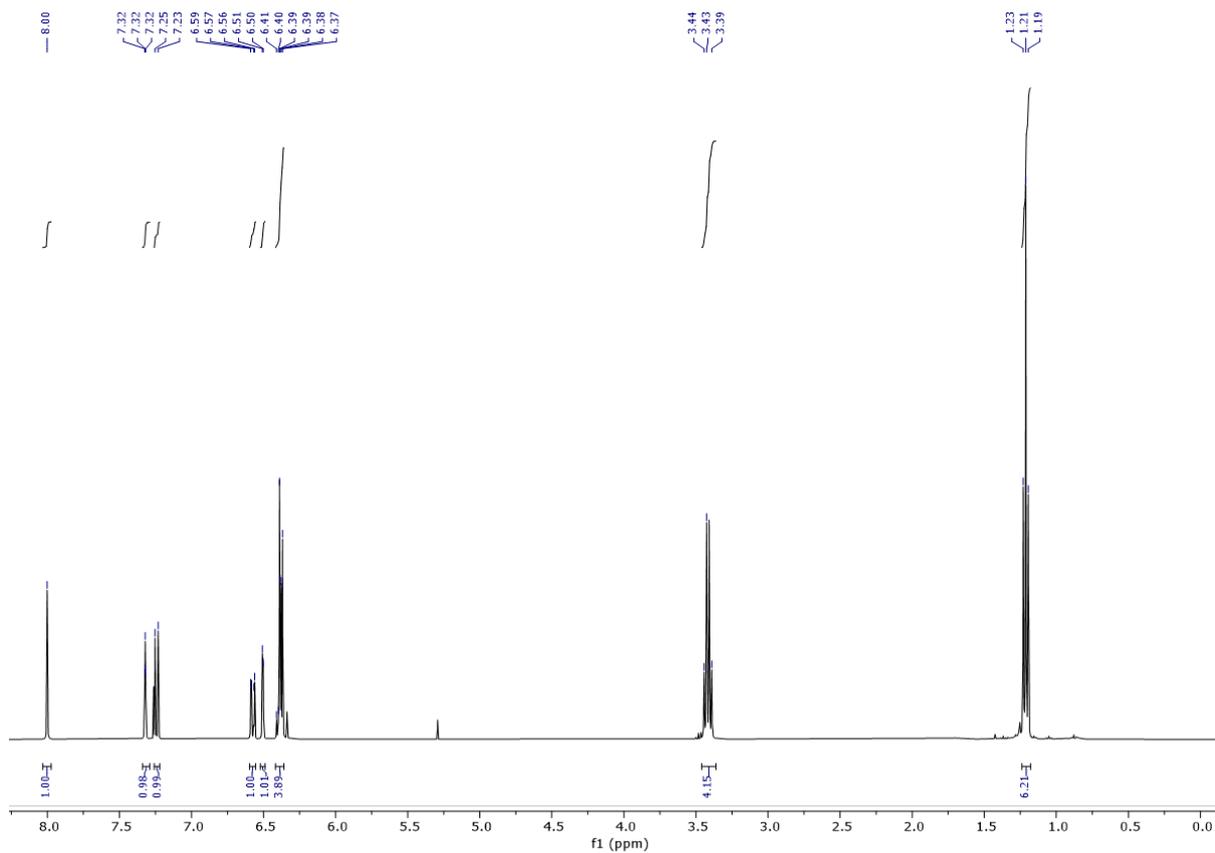
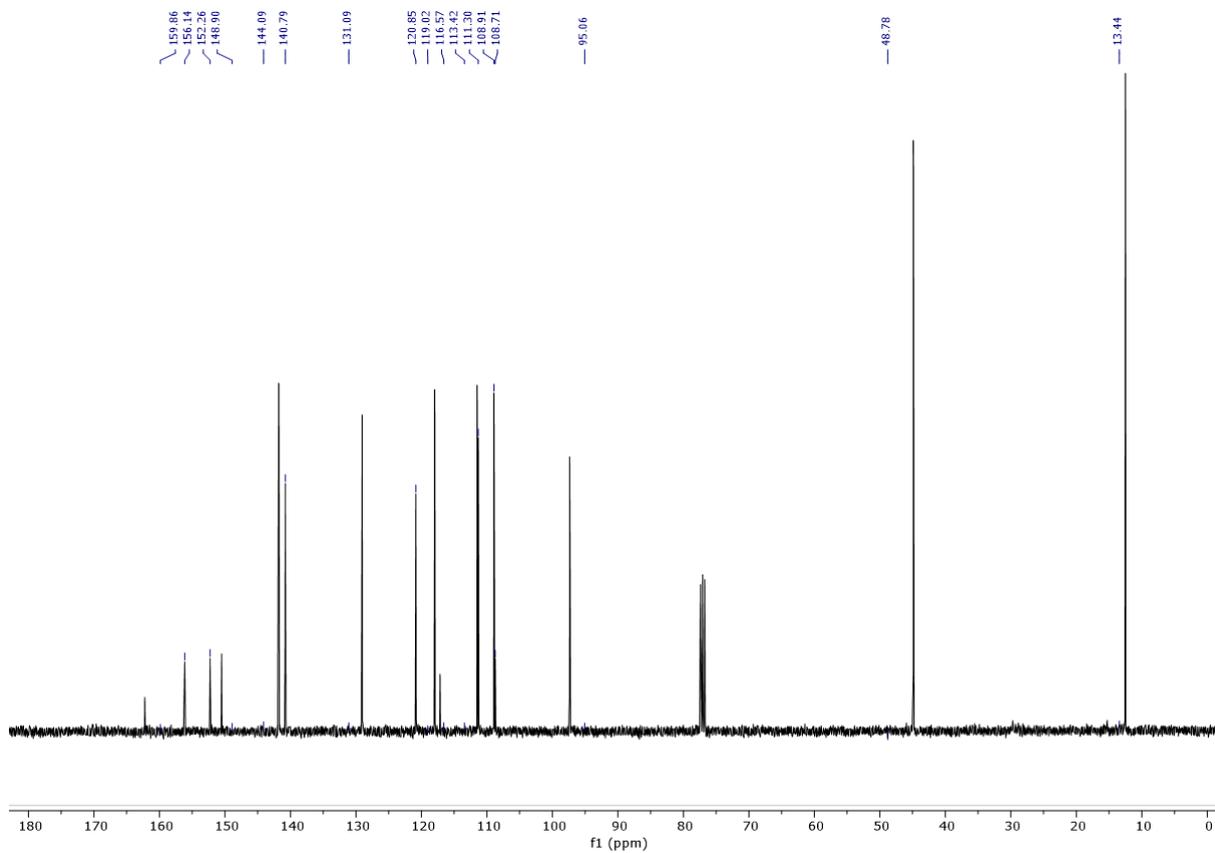
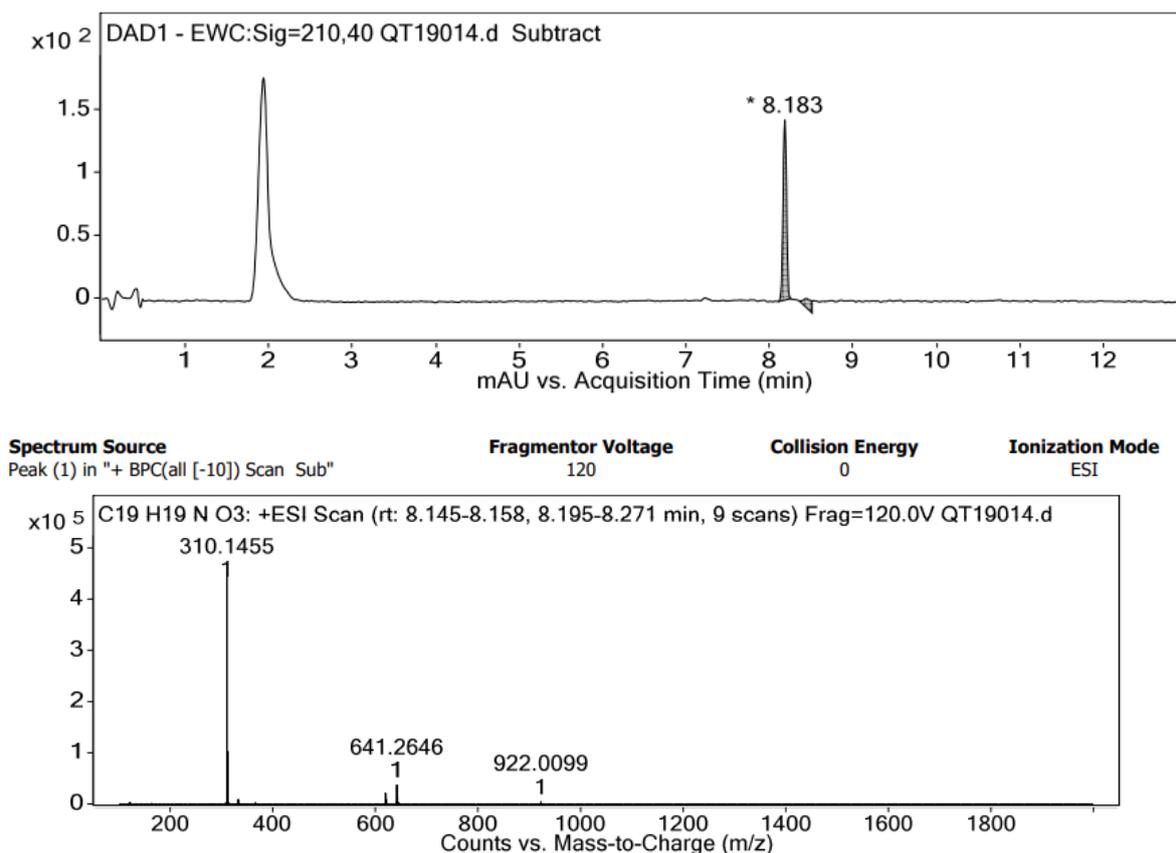
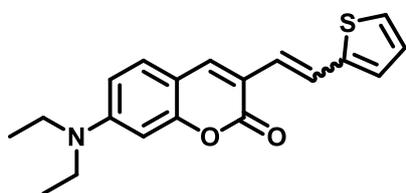


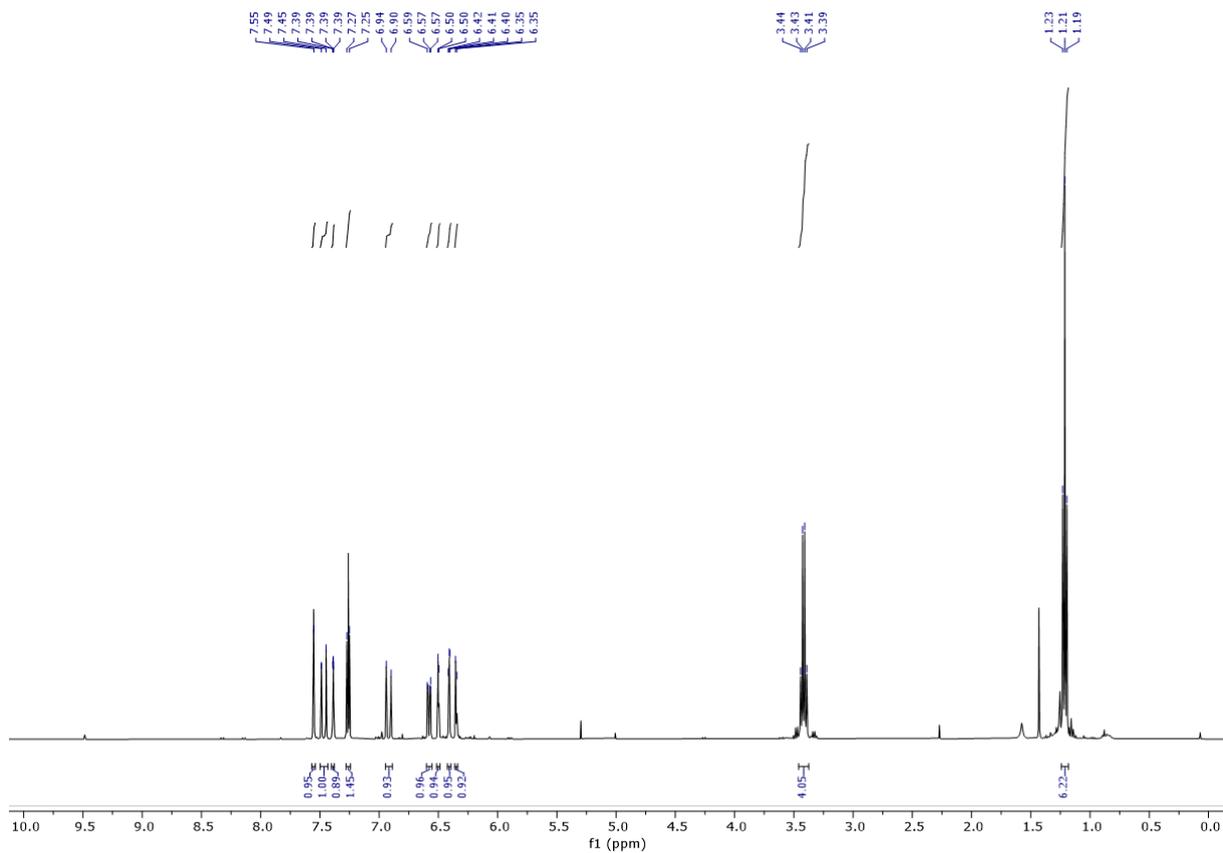
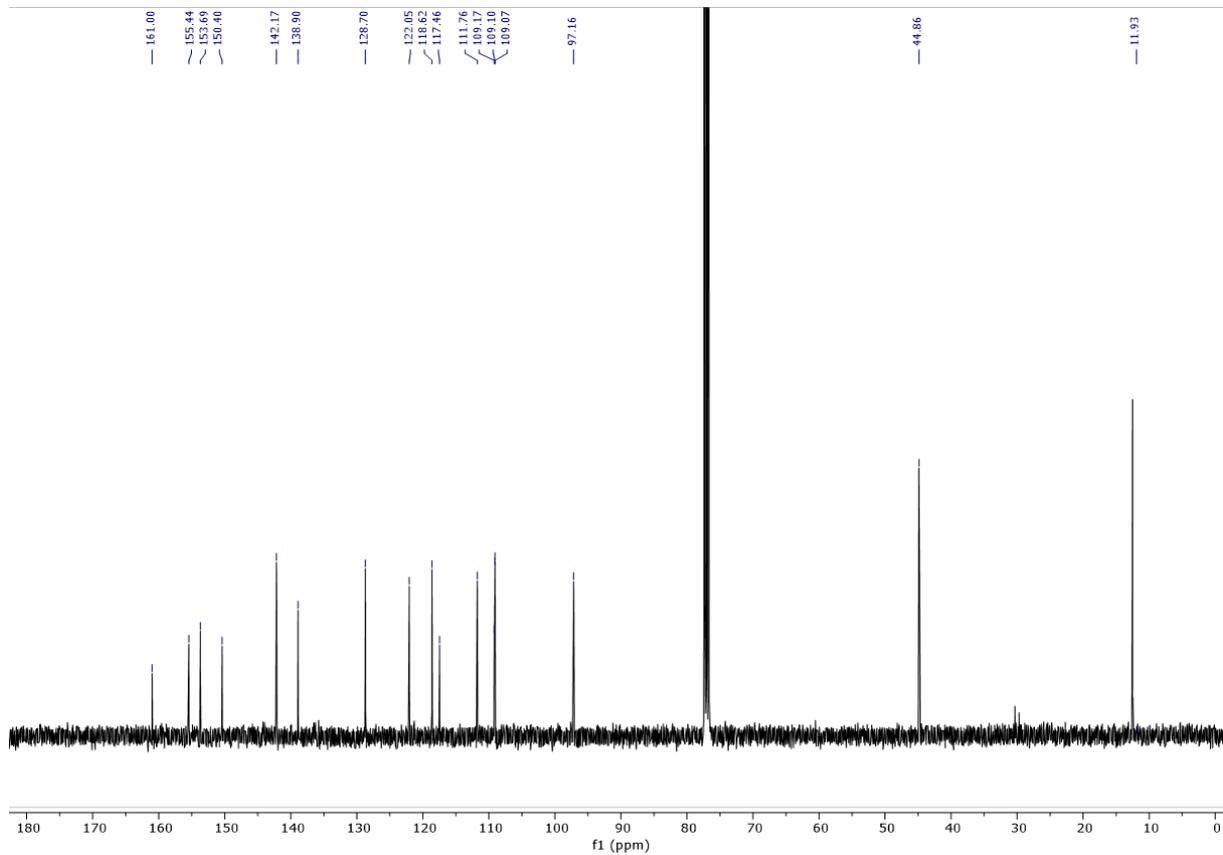
Figure VIII.9 HRMS Spectrum of *SC-F (E)*

Figure VIII.10 ^1H NMR spectrum of *SC-F* (Z)Figure VIII.11 ^{13}C NMR spectrum of *SC-F* (Z)

Figure VIII.12 HRMS Spectrum of **SC-F (Z)**

SC-T. To a solution of **2** (100 mg, 0.407 mmol, 1 eq) and Triphenyl(2-thienylmethyl)phosphonium bromide (215 mg, 0.490 mmol, 1.2 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (64 mg, 0.571 mmol, 1.4 eq). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 5 minutes. The mixture was diluted with water and extracted with Et₂O. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃

solution, then with brine solution, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to obtain **SC-T (Z)** as an orange amorphous solid (90 mg, 68%) and **SC-T (E)** as an orange amorphous solid (5 mg, 4%). $R_{fZ} = 0.3$, $R_{fE} = 0.63$ (DCM). **SC-T (E)**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (s, 1H, ArH), 7.47 (d, J = 16.1 Hz, 1H, CH alkene), 7.39 (dd, J = 1.9, 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 – 7.23 (d, 1H, J = 8.8 Hz, ArH), 6.92 (d, J = 16.1 Hz, 1H, CH alkene), 6.58 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.50 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.41 (dd, J = 3.3, 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.35 (dd, J = 3.3, 0.6 Hz, 1H, ArH), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.00 (CO₂ Lactone), 155.44, 153.69, 150.40, 142.17, 138.90, 128.70, 122.05, 118.62, 117.46, 111.76, 109.17, 109.10, 109.07, 97.16, 44.86 (CH₂ ethyl), 11.93 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₁₉H₂₀NO₂S [M+H]⁺ 326.1215, found 326.1201. **SC-T (Z)**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (s, 1H, ArH), 7.35 (t, J = 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH alkene), 6.60 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.45 – 6.35 (m, 4H), 3.45 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.23 (CO₂ Lactone), 156.14, 152.26, 150.50, 141.77, 140.79, 129.05, 120.85, 117.96, 117.15, 111.48, 111.30, 108.91, 108.71, 97.36, 44.85 (CH₂ ethyl), 12.08 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₁₉H₂₀NO₂S [M+H]⁺ 326.1215, found 326.1199.

Figure VIII.13 ¹H NMR spectrum of SC-T (E)Figure VIII.14 ¹³C NMR spectrum of SC-T (E)

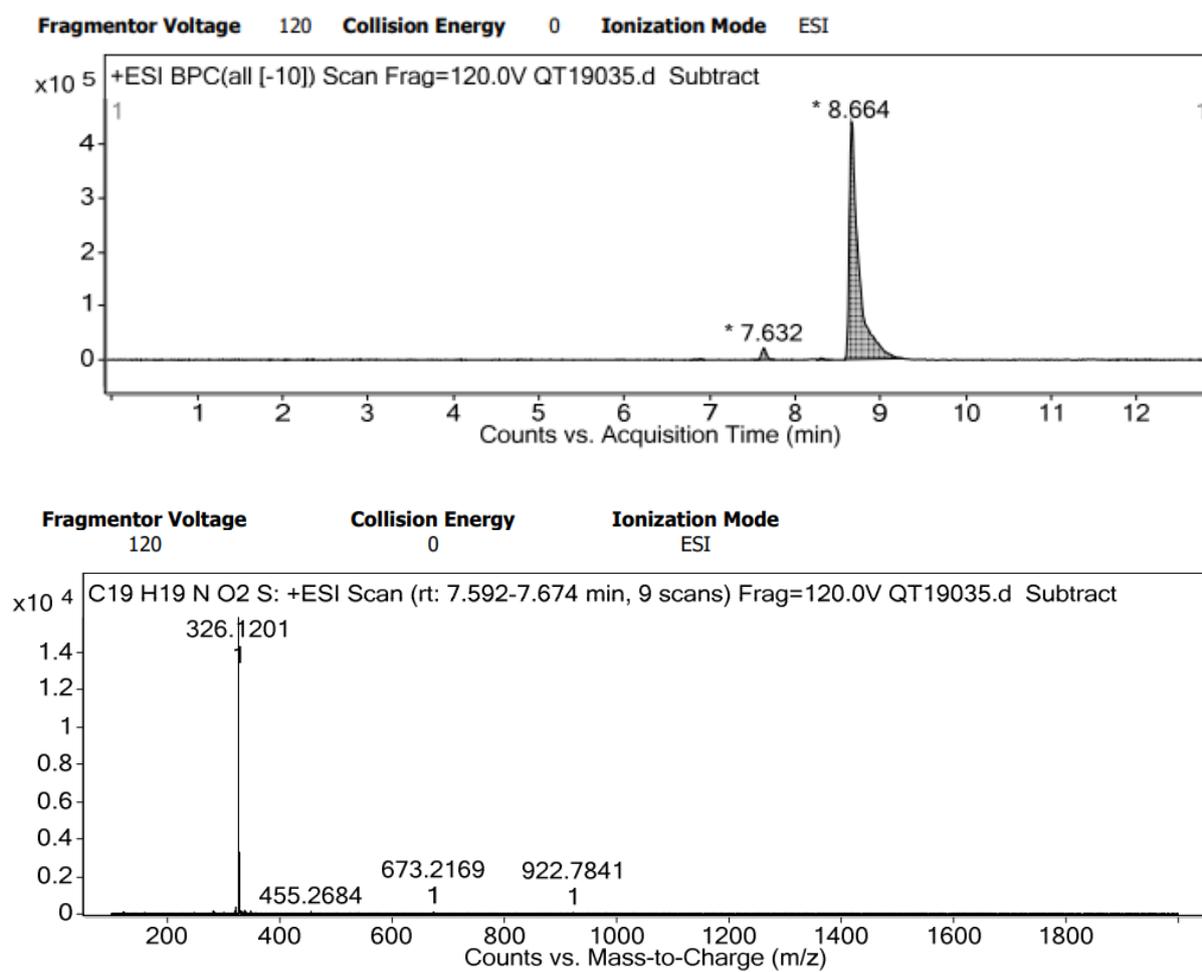
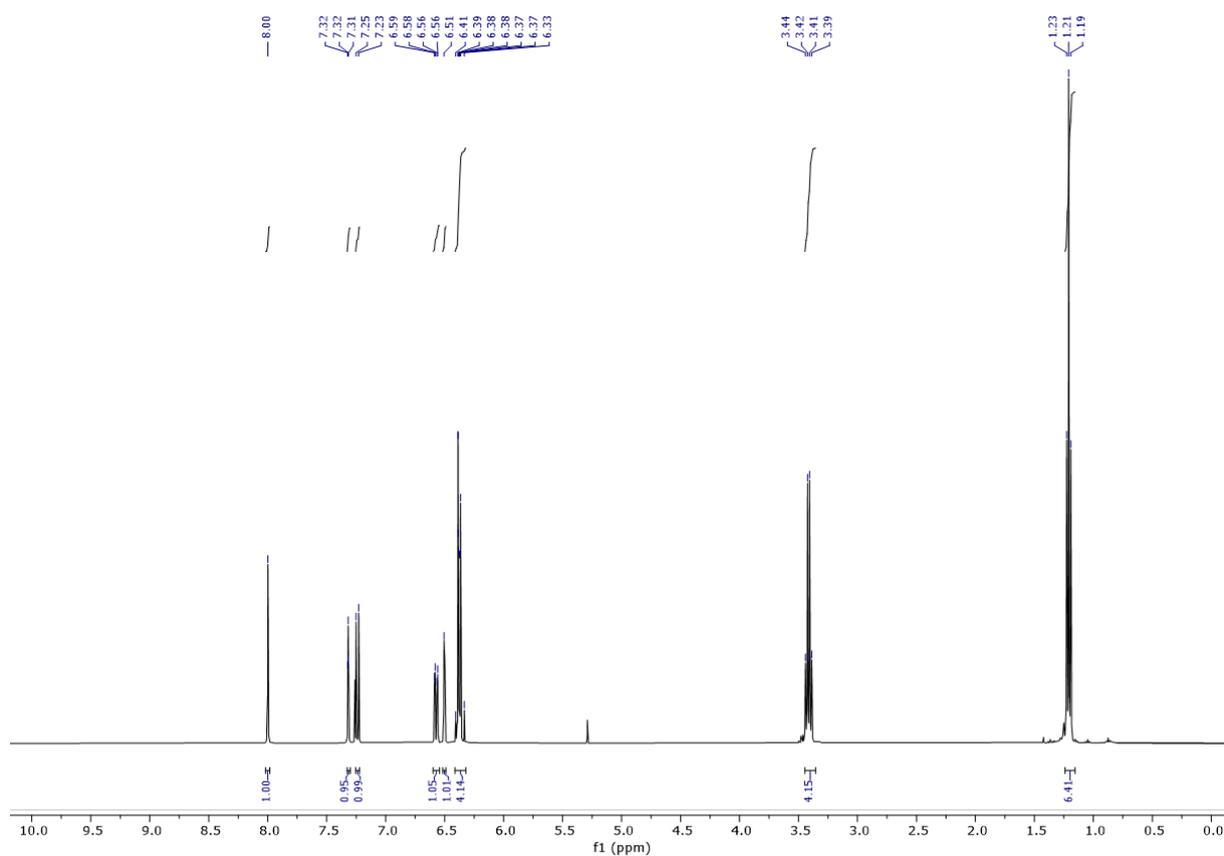
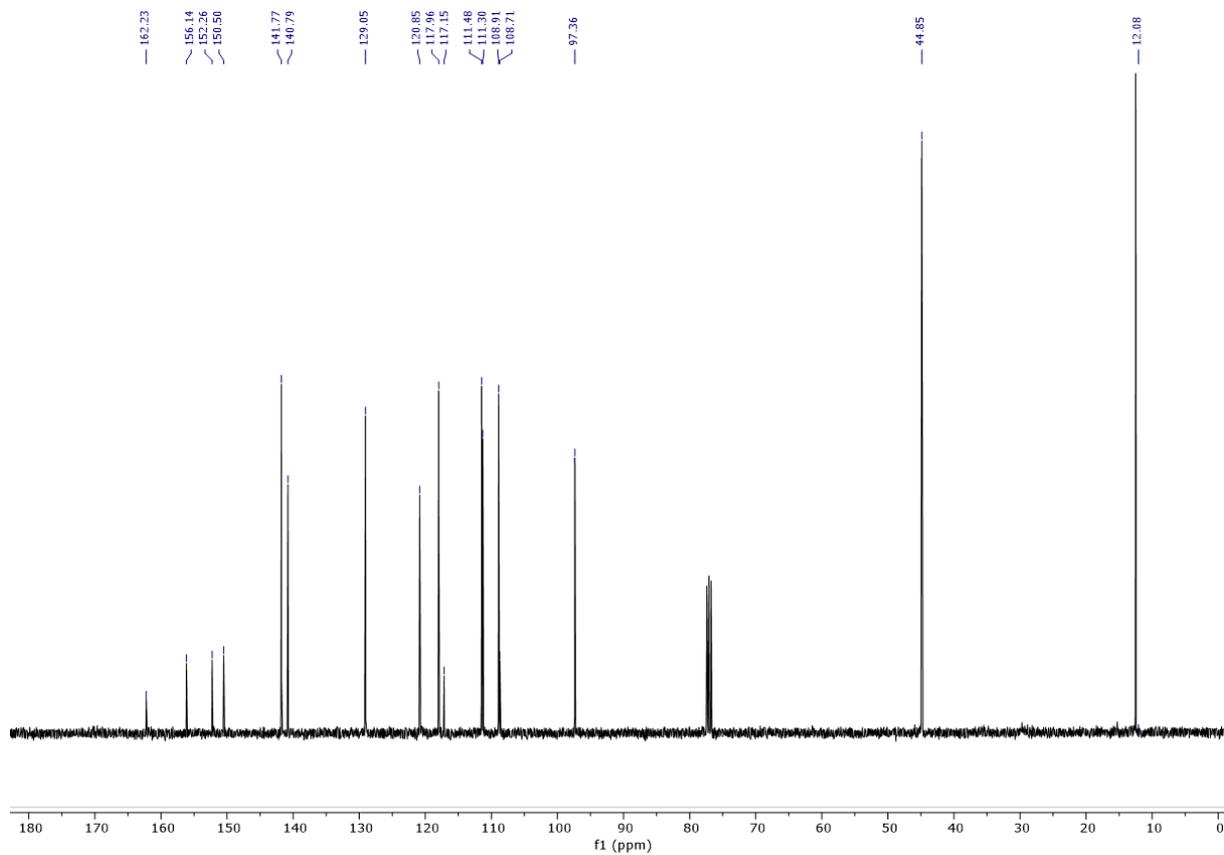
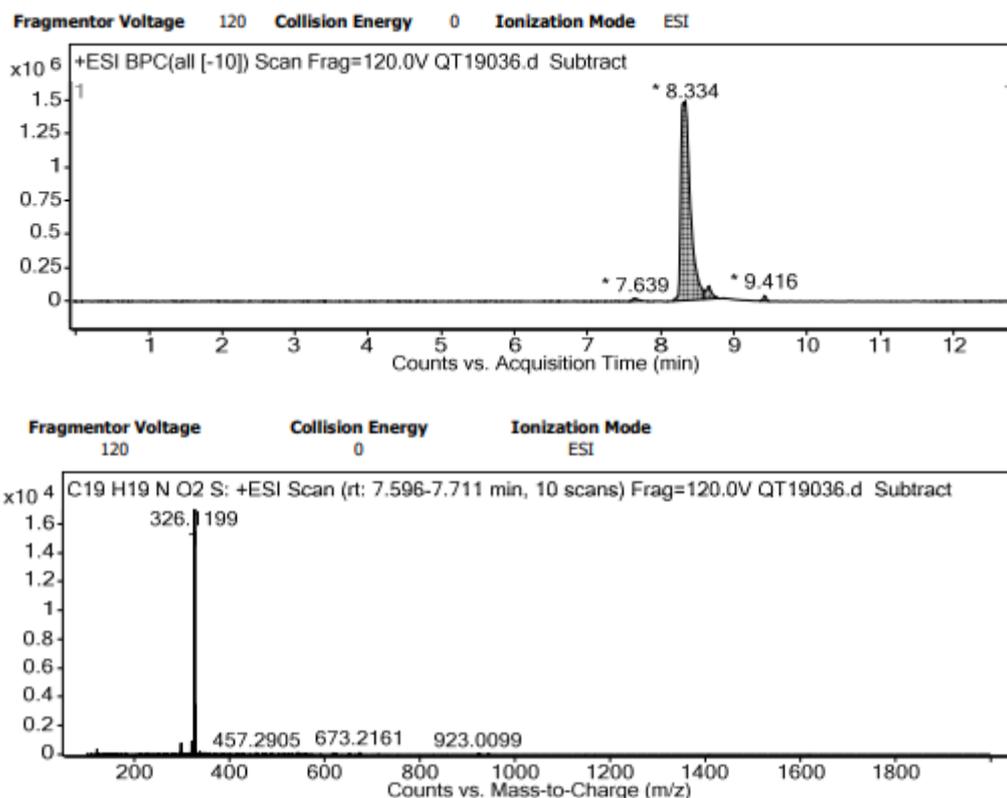
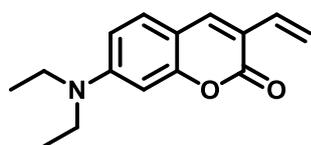
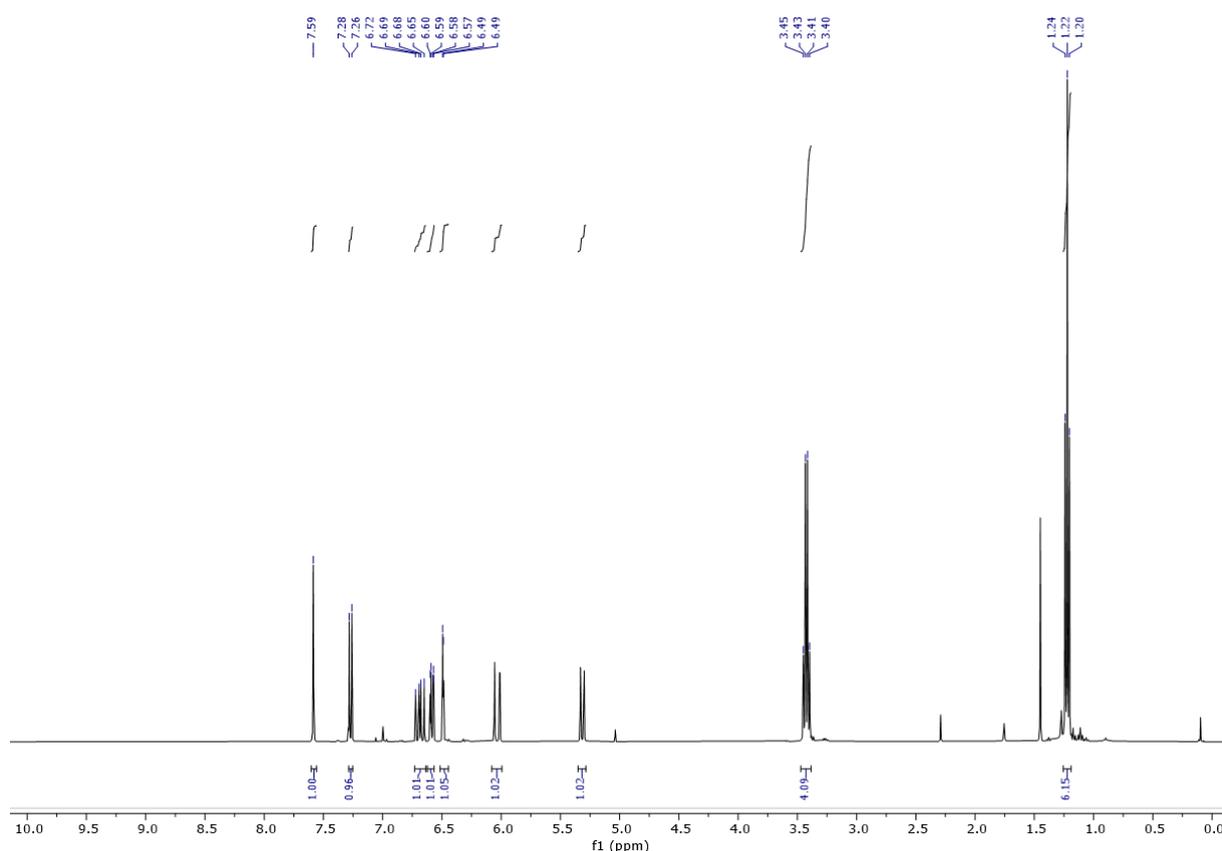
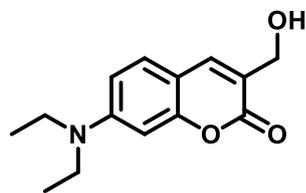


Figure VIII.15 HRMS Spectrum of SC-T (E)

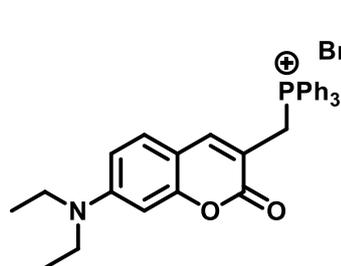
Figure VIII.16 ^1H NMR spectrum of SC-T (Z)Figure VIII.17 ^{13}C NMR spectrum of SC-T (Z)

Figure VIII.18 HRMS spectrum of **SC-T** (Z)

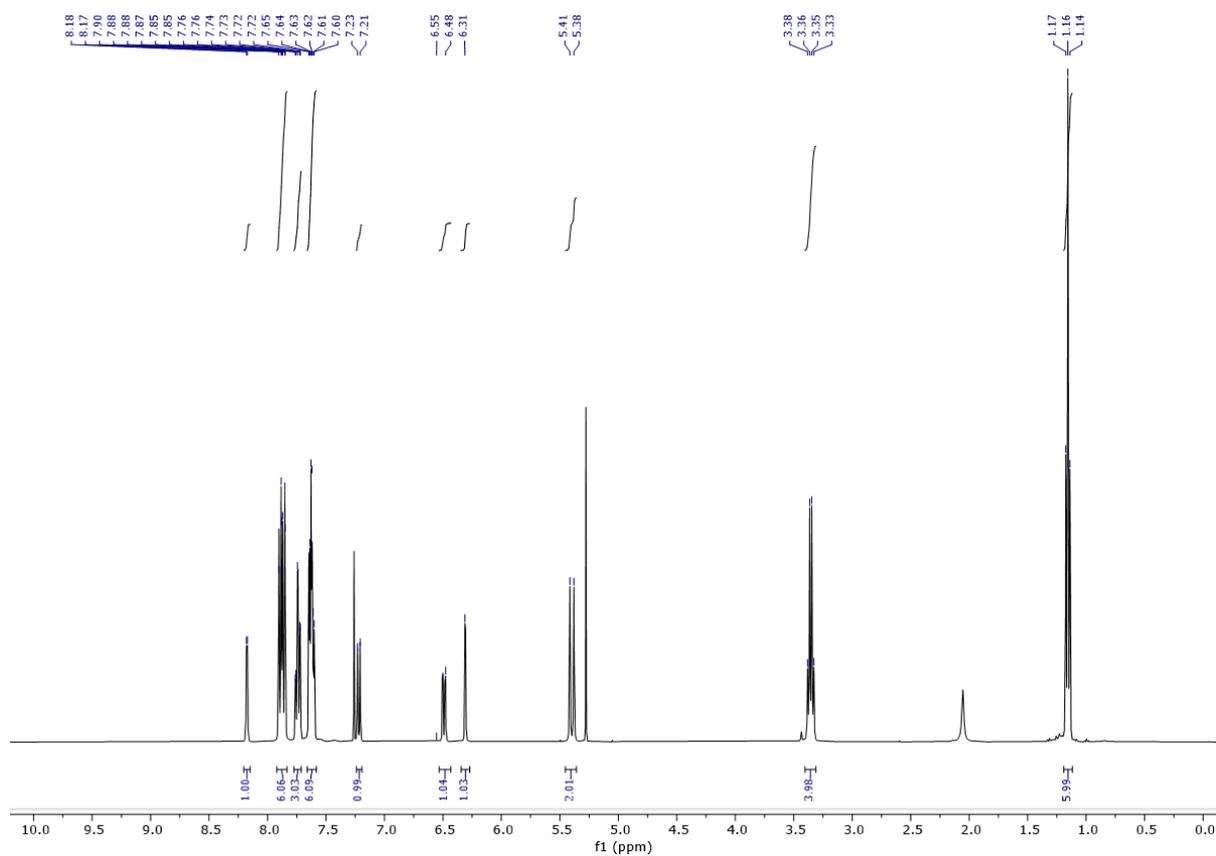
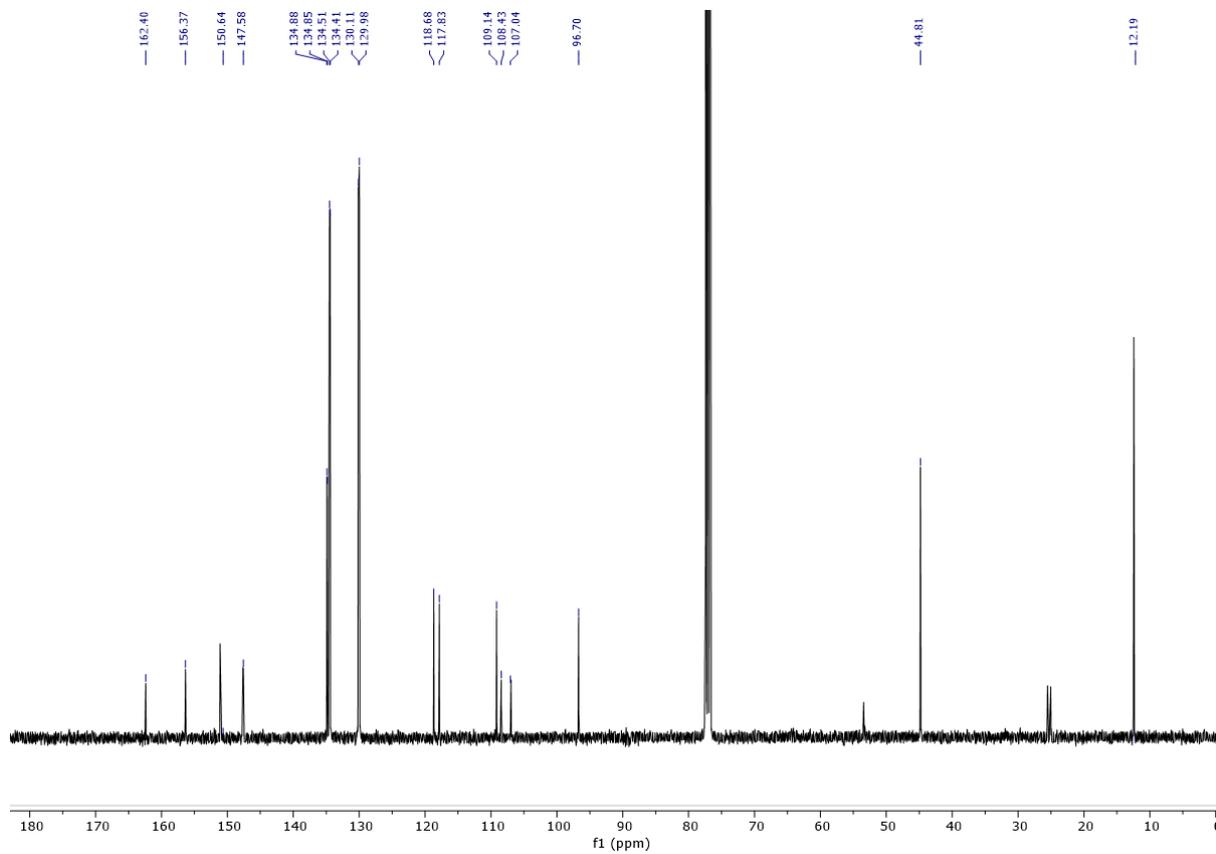
SC-V. To a solution of **2** (100 mg, 0.407 mmol, 1 eq) and Methyltriphenylphosphonium bromide (175 mg, 0.490 mmol, 1.2 eq) in THF (10 mL) was added K_2CO_3 (90 mg, 0.571 mmol, 1.6 eq). The reaction mixture was refluxed for 2 hours. The mixture was diluted with water and extracted with Et_2O . The organic phase was washed with saturated $NaHCO_3$ solution, then with brine solution, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to obtain **SC-V** (55 mg, 55%) as a yellowish syrup. The NMR was in accordance with the literature.^[148] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H, ArH), 7.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, ArH), 6.71 – 6.61 (m, 1H, CH alkene), 6.56 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 6.46 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, ArH), 6.01 (dd, $J = 17.6, 1.4$ Hz, 1H, CH alkene), 5.29 (dd, $J = 11.3, 1.4$ Hz, 1H, CH alkene), 3.39 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2 ethyl), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3 ethyl).

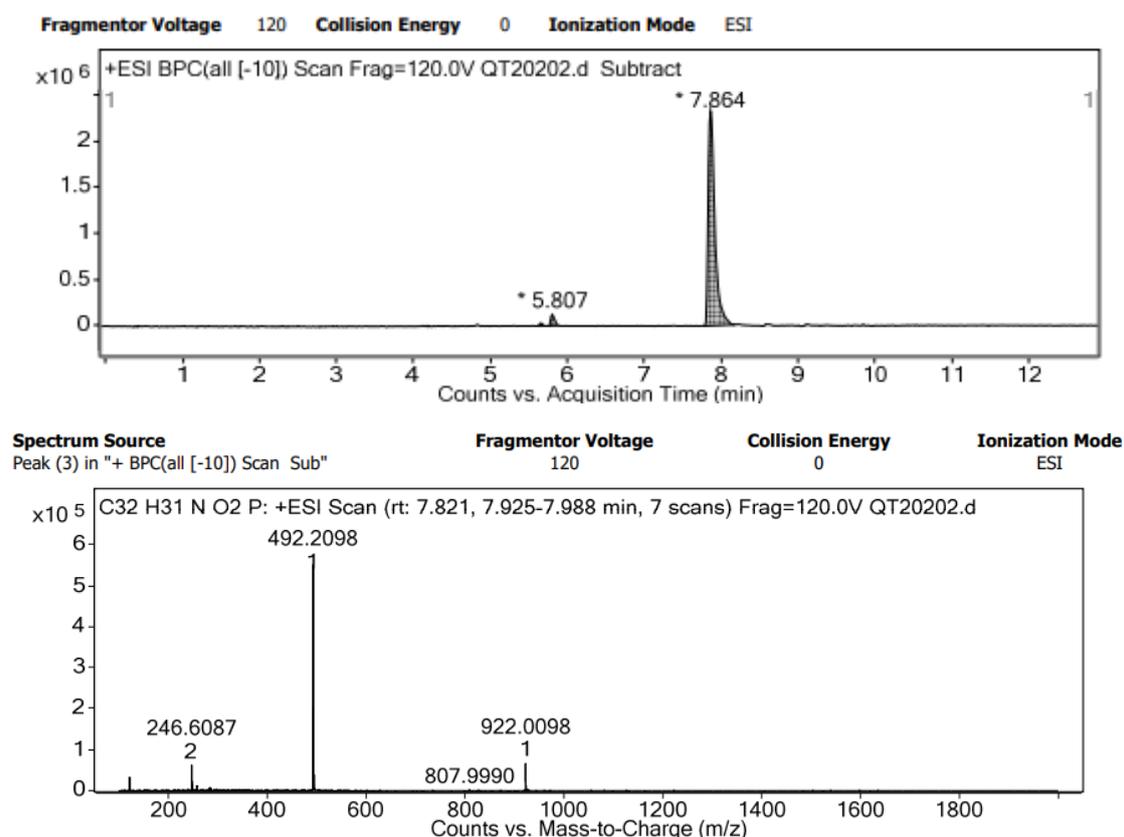
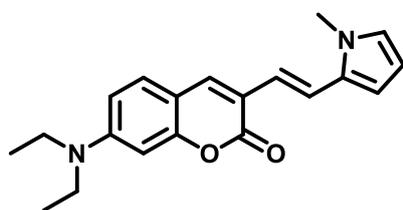
Figure VIII.19 ^1H NMR spectrum of **5C-V**

5. To a solution of **2** (500 mg, 2.04 mmol, 1 eq) at 0°C in methanol (5 mL) was added dropwise NaBH_4 (77 mg, 2.04 mmol, 1 eq). The solution was allowed to warm at RT. Acetone (0.1 mL) and water (5 mL) was added to the mixture. The product was extracted with DCM and washed with brine, dried over MgSO_4 . Solvents were evaporated under reduced pressure to give **5** (464 mg, 92%) as a yellow syrup. The NMR was in accordance with the literature.^[149] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.55 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, ArH), 6.58 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 6.51 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, ArH), 4.54 (dd, $J = 6.3, 0.9$ Hz, 2H, CH_2OH), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2 ethyl), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3 ethyl).



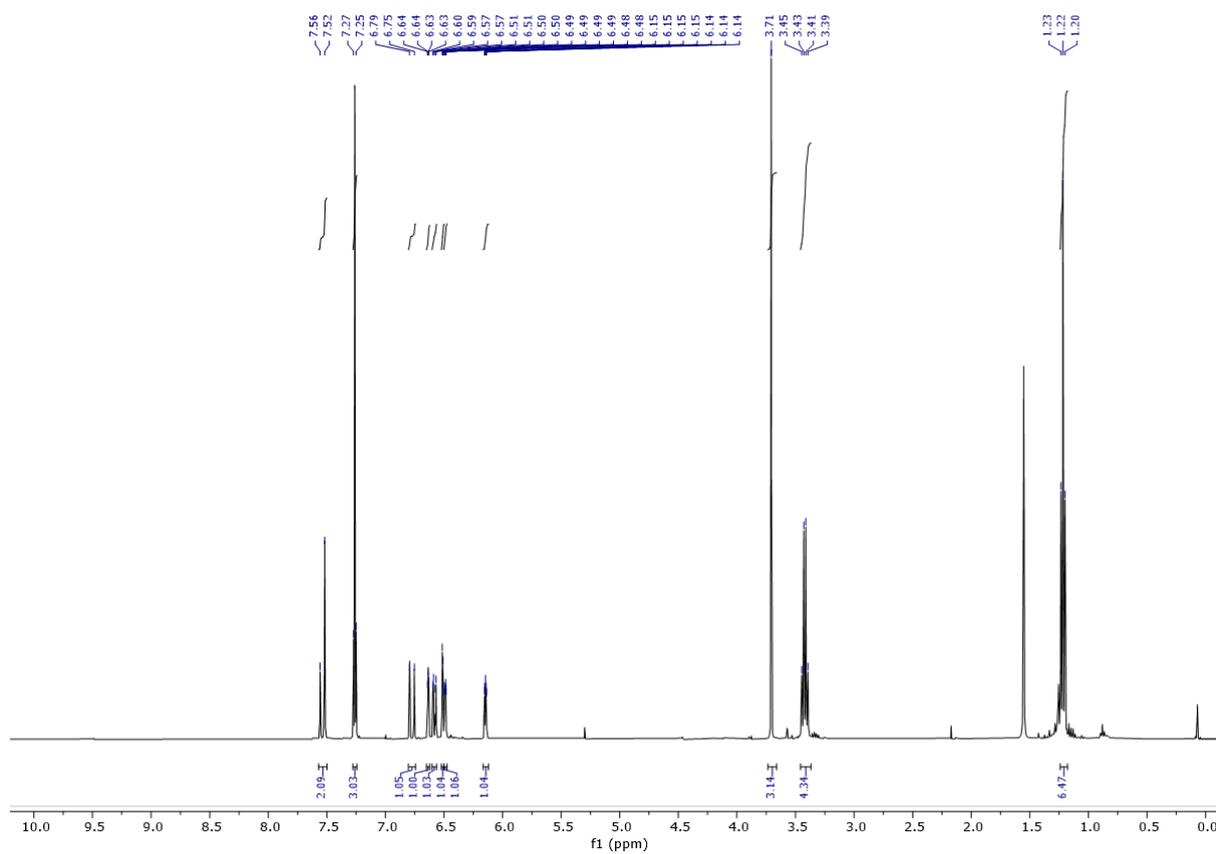
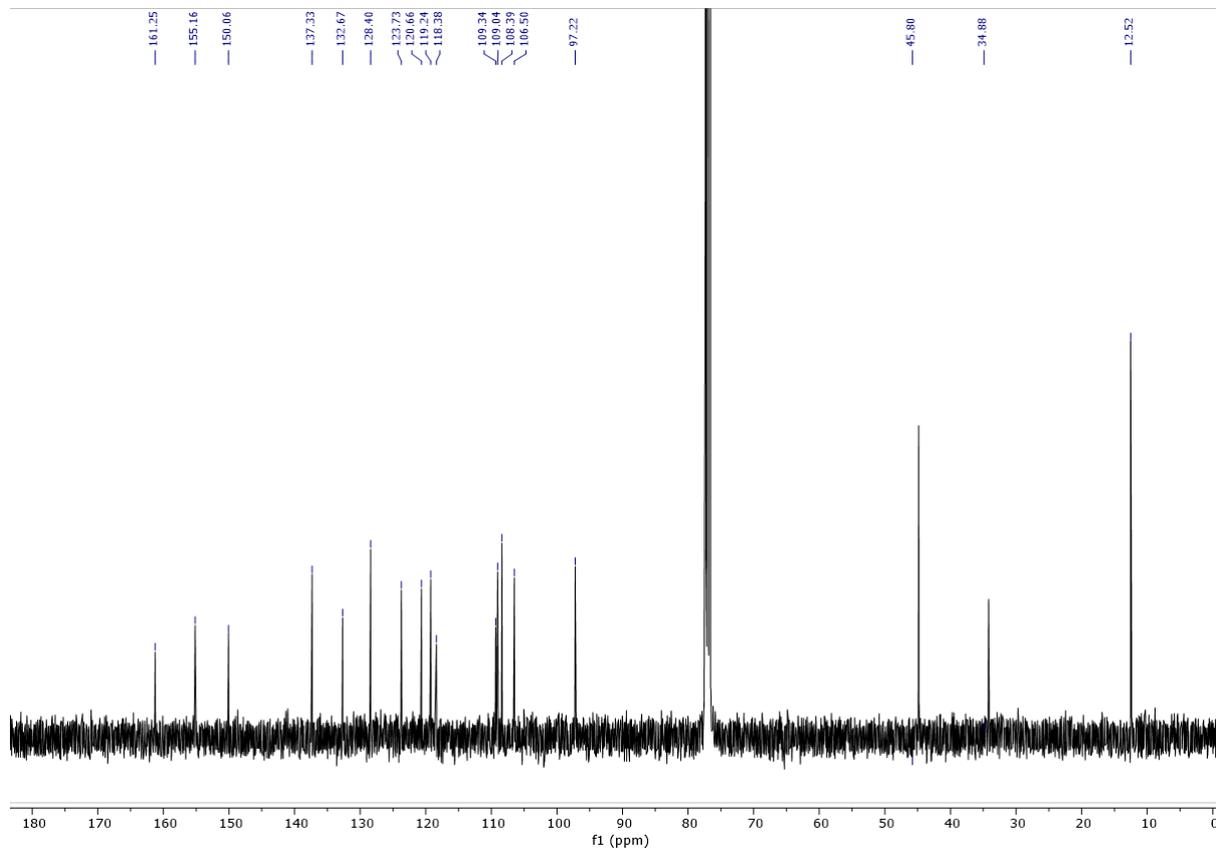
CP⁺. To a solution of **5** (320 mg, 1.29 mmol, 1 eq) in chloroform (25 ml) was added HBrPPh_3 (1.33 g, 3.88 mmol, 3 eq). The reaction mixture was heated at reflux overnight. The mixture was diluted with NaOH 1M (10 mL). The product was extracted with DCM dried over MgSO_4 . The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 98/2 to 90/10) to obtain **CP⁺** (626 mg, 85%) as a yellow foam. $R_f = 0.3$ (9/1 : DCM/MeOH). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, ArH), 7.93 – 7.83 (m, 6H, PPh_3), 7.79 – 7.69 (m, 3H, PPh_3), 7.62 (ddd, $J = 9.1, 7.2, 3.5$ Hz, 6H, PPh_3), 7.22 (dd, $J = 8.9, 0.8$ Hz, 1H, ArH), 6.49 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 6.31 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 5.40 (d, $J = 13.8$ Hz, 2H, CH_2PPh_3), 3.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2 ethyl), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3 ethyl). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.40 (CO_2 Lactone), 156.37, 150.64, 147.58, 134.88, 134.85, 134.51, 134.41, 130.11, 129.98, 118.68, 117.83, 109.14, 108.43, 107.04, 96.70, 44.81 (CH_2 ethyl), 12.19 (CH_3 ethyl). RMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NO}_2\text{P} [\text{M}]^+$ 492.2087, found 492.2098.

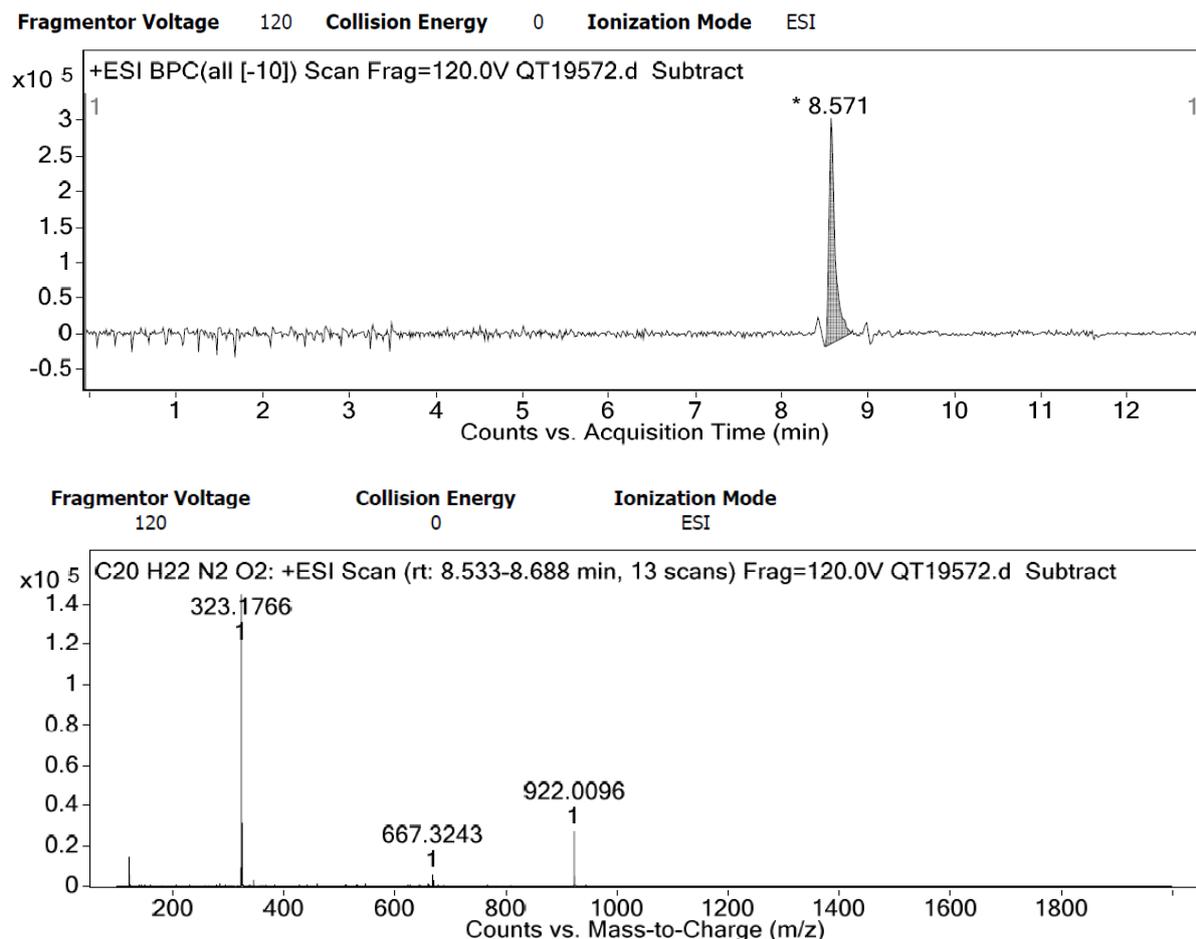
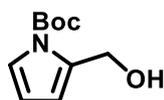
Figure VIII.20 ^1H NMR spectrum of CP^+ Figure VIII.21 ^{13}C NMR spectrum of CP^+

Figure VIII.22 HRMS spectrum of CP^+ 

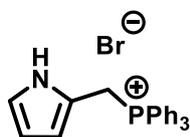
SC-P. To a solution of **6** (200 mg, 0.35 mmol, 1 eq) and 1-Methylpyrrole-2-carboxaldehyde (36 mg, 0.33 mmol, 35 μ l, 0.95 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (47 mg, 0.42 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 1 hour. The mixture was diluted with LiCl 5% and extracted with Et₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated.

The crude was purified by column chromatography (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1) to obtain **SC-P** (10 mg, 9%) as an orange amorphous solid. R_f = 0.47 (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (d, J = 15.5 Hz, 2H, CH alkene and ArH), 7.26 (d, J = 8 Hz, 1H, ArH), 6.77 (dd, J = 16.0, 0.7 Hz, 1H, CH alkene), 6.63 (dd, J = 2.6, 1.7 Hz, 1H, H pyrrole), 6.58 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.51 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.49 (ddd, J = 3.8, 1.7, 0.6 Hz, 1H, H pyrrole), 6.15 (ddd, J = 3.6, 2.6, 0.6 Hz, 1H, H pyrrole), 3.71 (s, 3H, N-methyl), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.25 (CO₂ Lactone), 155.16, 150.06, 137.33, 132.67, 128.40, 123.73, 120.66, 119.24, 118.38, 109.34, 109.04, 108.39, 106.50, 97.22, 45.80 (CH₂ ethyl), 34.88 (CH₃ N-mehtyl), 12.52 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₂₀H₂₂N₂O₂ [M+H]⁺ 323.1715, found 323.1766.

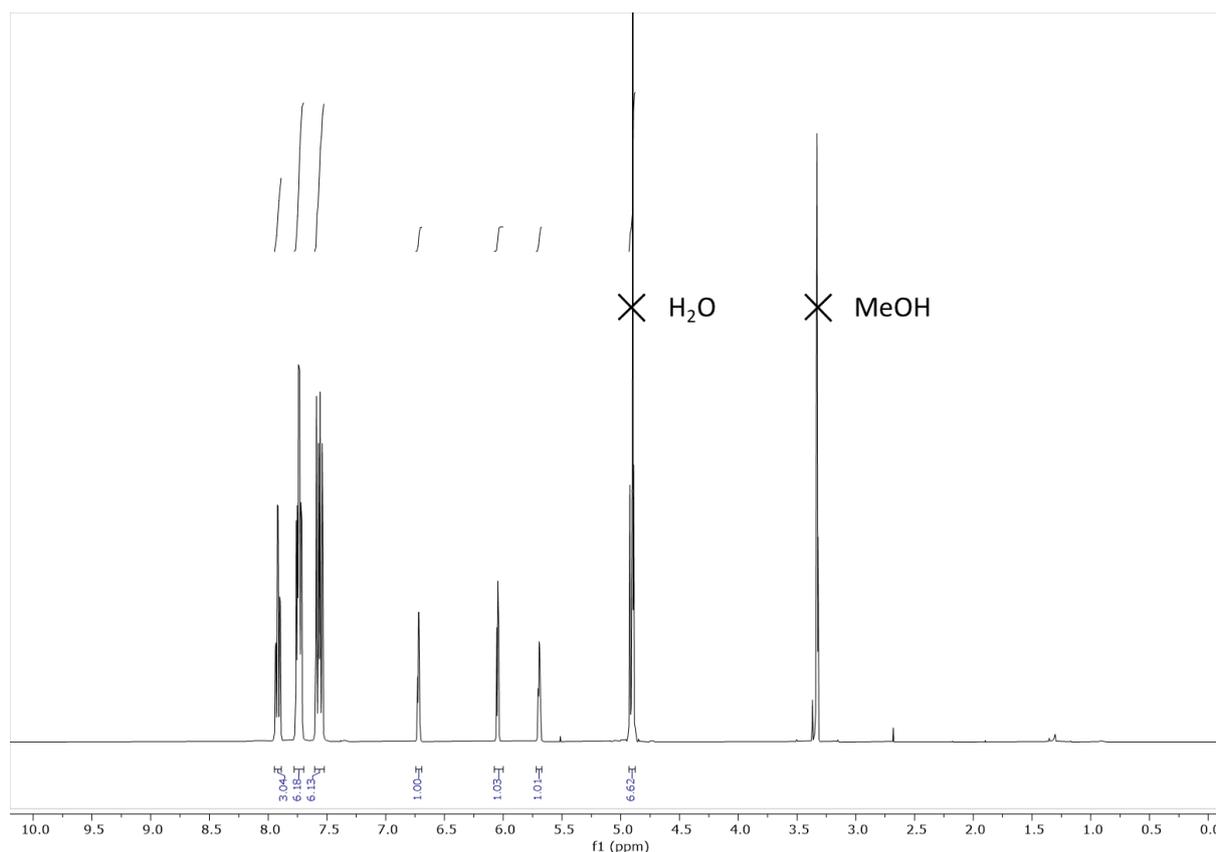
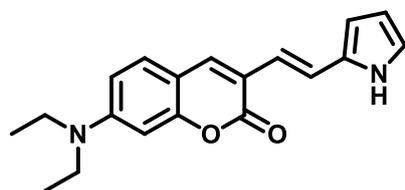
Figure VIII.23 ^1H NMR spectrum of SC-PFigure VIII.24 ^{13}C NMR spectrum of SC-P

Figure VIII.25 HRMS spectrum of **SC-P**

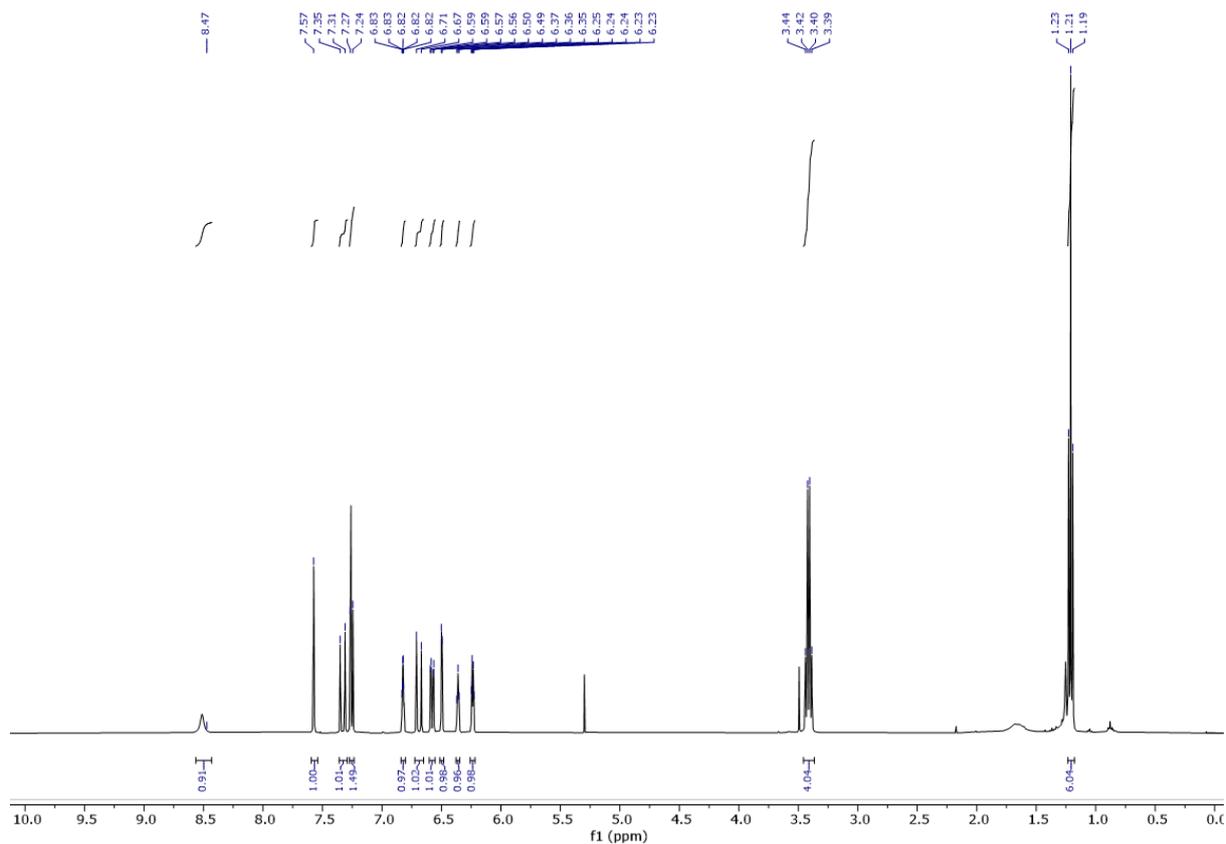
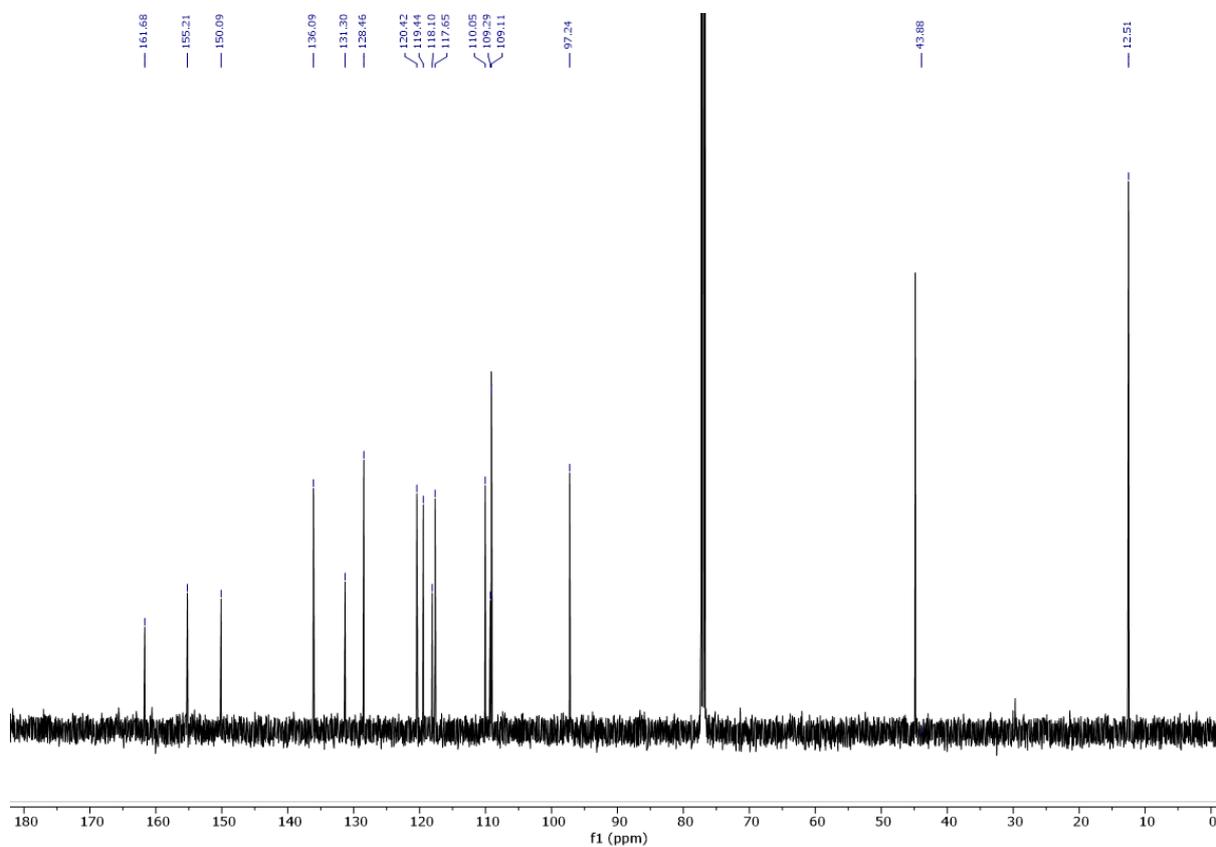
6. To a solution Tert-butyl 2-formyl-1H-pyrrole-1-carboxylate (367 mg, 1.88 mmol, 1 eq) in EtOH (5 mL) at 0°C was dropwise added NaBH₄ (71 mg, 1.88 mmol, 1 eq). The solution was allowed to warm at RT. Acetone (0.1 mL) and water (10 mL) was added to the mixture. The product was extract with DCM and washed with brine, dried over MgSO₄. The solvents were evaporated under reduced pressure to give **6** as a yellowish oil (352 mg, 65%). The NMR was in accordance with the literature.^[150] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (dd, J = 3.4, 1.8 Hz, 1H), 6.17 (dt, J = 3.1, 1.2 Hz, 1H), 6.10 (t, J = 3.3 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 7.4, 0.6 Hz, 2H), 1.61 (s, 9H).

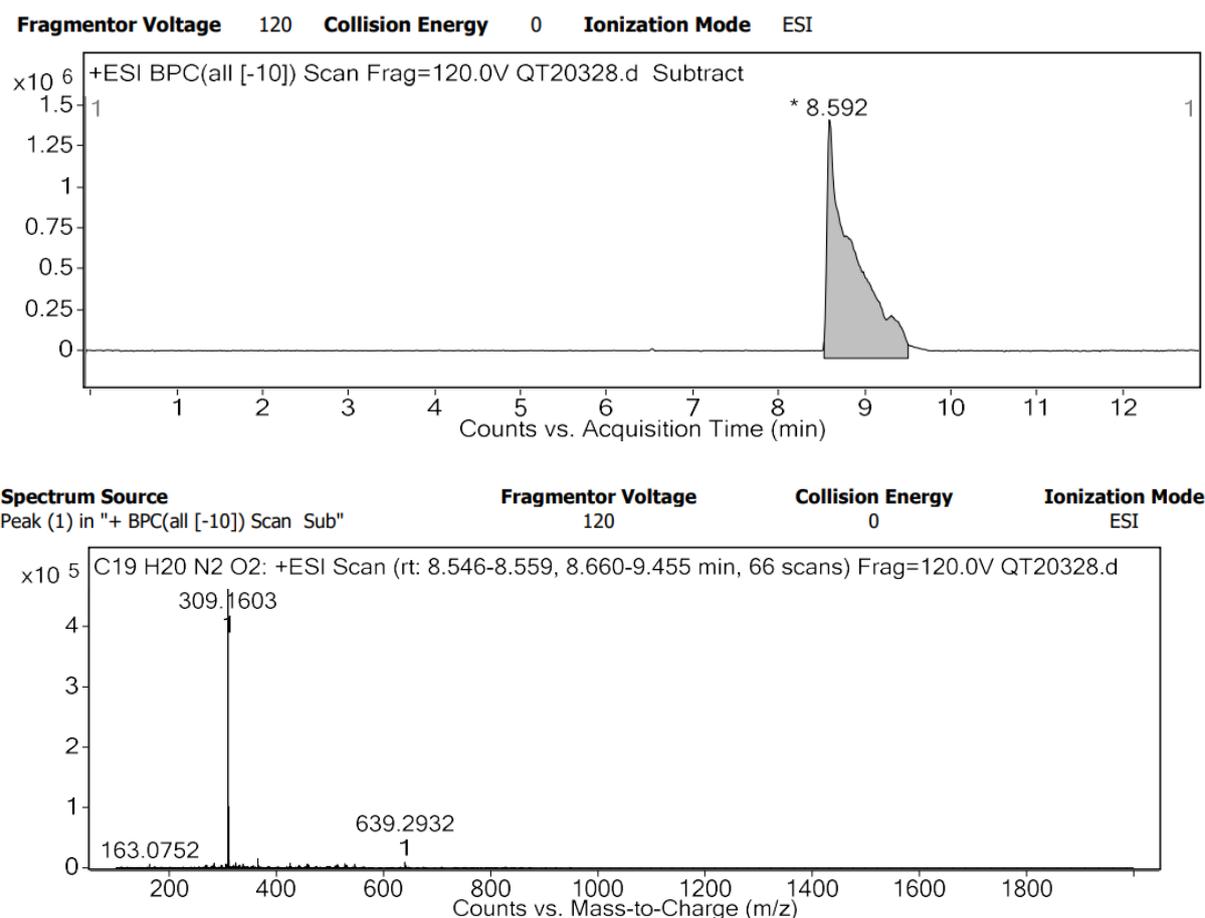
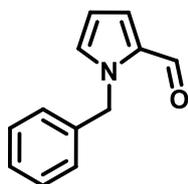


7. To a solution of **7** (950 mg, 4.82 mmol, 1 eq) in DCM (20 mL) and THF (20 mL) was added PPh₃ (1.14 g, 4.33 mmol, 0.9 eq) and HBr.Pyridine (848 mg, 5.3 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was heated at 80°C for 3 days until dryness. The crude was purified by column chromatography (DCM/MeOH : 9/1) to give **7** (650mg, 32%) as a white powder. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.96 – 7.87 (m, 3H), 7.79 – 7.69 (m, 6H), 7.62 – 7.51 (m, 6H), 6.72 (td, J = 2.7, 1.4 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 3.4, 2.8 Hz, 1H), 5.69 (td, J = 3.4, 1.4 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 12 Hz, 2H).

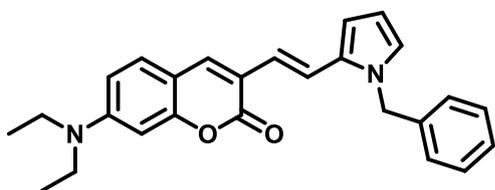
Figure VIII.26 ^1H NMR spectrum of **8**

SCP-H. To a solution of **7** (100 mg, 0.407 mmol, 1 eq) and **2** (206 mg, 0.490 mmol, 1.2 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (64 mg, 0.571 mmol, 1.4 eq). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 5 minutes. The mixture was diluted with water and extracted with DCM. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by HPLC to obtain **SCP-H** (10 mg, 8%) R_f = 0.68 (DCM). ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (s, 1H, NH pyrrole), 7.57 (s, 1H, ArH), 7.33 (d, J = 16.4 Hz, 1H, CH alkene), 7.29 – 7.22 (d, J = 12 Hz, 1H, ArH), 6.82 (td, J = 2.7, 1.4 Hz, 1H, H pyrrole), 6.69 (d, J = 16.6 Hz, 1H, CH alkene), 6.58 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.50 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.39 – 6.33 (m, 1H, H pyrrole), 6.24 (dt, J = 3.5, 2.5 Hz, 1H, H pyrrole), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.68 (CO₂ Lactone), 155.21, 150.09, 136.09, 131.30, 128.46, 120.42, 119.44, 118.10, 117.65, 110.05, 109.29, 109.11, 97.24, 43.88 (CH₂ ethyl), 12.51 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₁₉H₂₀N₂O₂ [M+H]⁺ 309.1525, found 309.1603.

Figure VIII.27 ^1H NMR spectrum of SCP-HFigure VIII.28 ^{13}C NMR spectrum of SCP-H

Figure VIII.29 HRMS spectrum of **SCP-H**

8. To a solution of 1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde (1 g, 10.5 mmol, 1 eq) and benzyl bromide (1.8 g, 1.25 mL, 10.5 mmol, 1 eq) in THF (15 mL) was added NaH (60% dispersion in mineral oil) (462 mg, 11.8 mmol, 1.1 eq). the reaction mixture was allowed to stir at RT for 5 hours. 1 mL of MeOH was added. The mixture was diluted with water and extracted three times with DCM. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography (DCM) to obtain **8** (1.35 g, 69%). The NMR was in accordance with the literature.^[151] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.56 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 4H), 7.21 – 7.11 (m, 2H), 6.97 (d, J = 3.4 Hz, 2H), 6.30 – 6.24 (m, 1H), 5.57 (s, 2H).



SCP-Bn. To a solution of **CP⁺** (200 mg, 0.35 mmol, 1 eq) and **9** (62 mg, 0.33 mmol, 0.95 eq) in DMF (4 mL) at 0°C was added tBuOK (47 mg, 0.42 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to warm up at RT to stir for 1 hour. DMF was evaporated and the mixture was diluted with LiCl 5% and extracted with Et₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1) to obtain **SCP-Bn** (14 mg, 10%). R_f = 0.6 (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH alkene), 7.17 (ddd, J = 7.4, 6.1, 1.3 Hz, 2H, ArH), 7.12 – 7.08 (m, 1H, ArH), 7.06 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 6.99 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 2H, ArH), 6.62 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH alkene), 6.57 (dd, J = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 6.43 – 6.37 (m, 2H, ArH and H pyrrole), 6.32 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H pyrrole), 6.07 (t, J = 2.9 Hz, 1H, H pyrrole), 5.05 (s, 2H, CH₂

benzyl), 3.25 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.05 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.16 (CO₂ Lactone), 155.15, 150.05, 138.04, 137.24, 132.45, 128.76, 128.41, 127.51, 126.85, 123.23, 120.97, 119.11, 118.30, 109.27, 109.02, 109.00, 106.76, 97.17, 50.61 (CH₂ Benzyl), 44.82 (CH₂ ethyl), 12.01 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₂₆H₂₆N₂O₂ [M+H]⁺ 399.1994, found 399.2080.

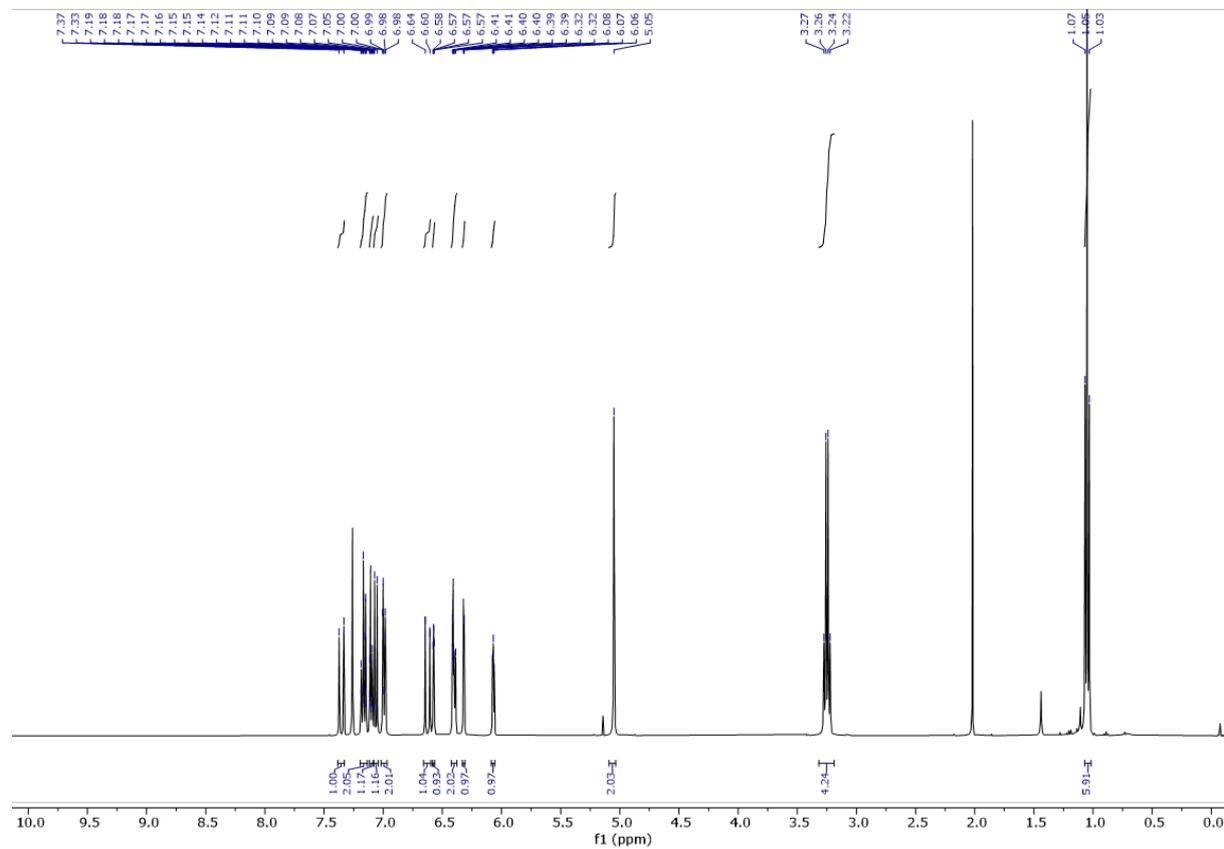
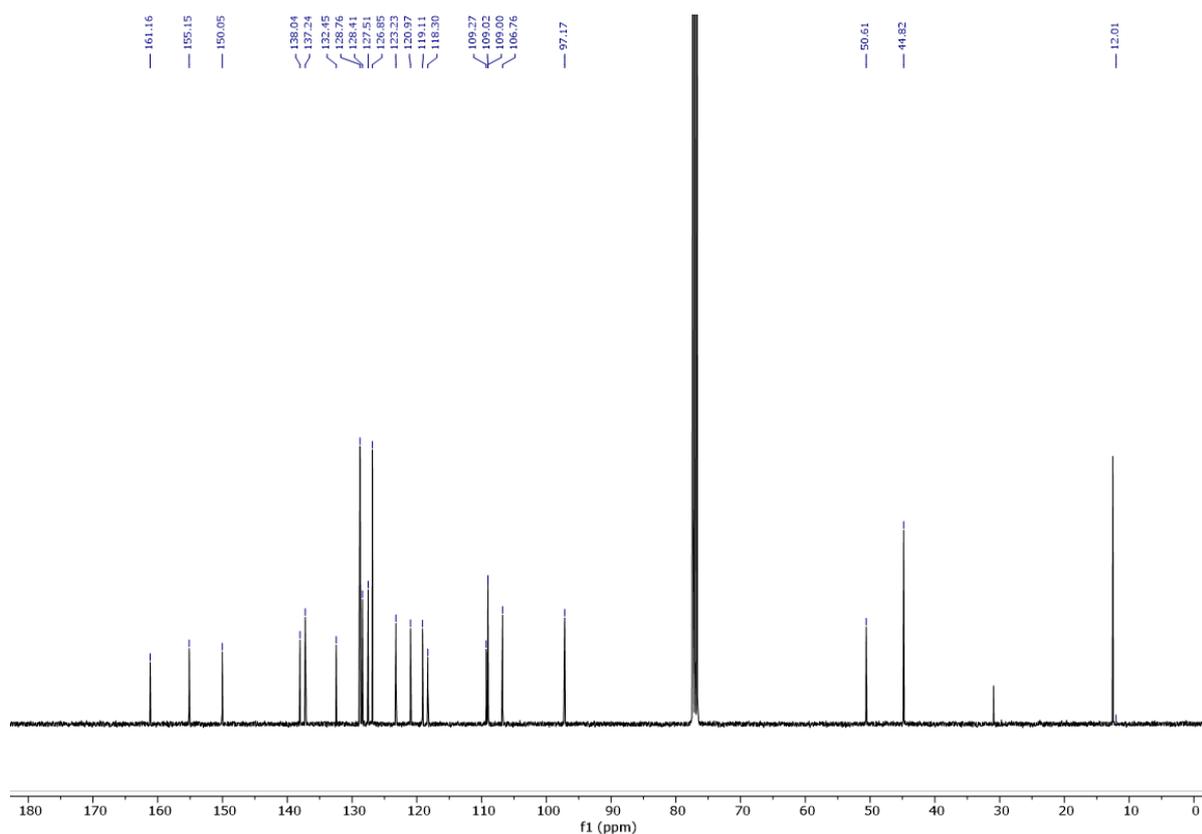
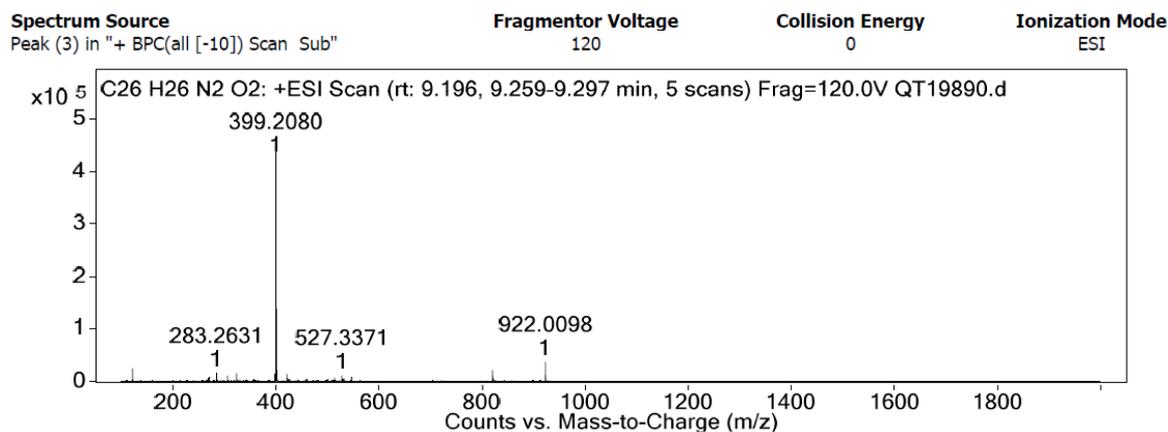
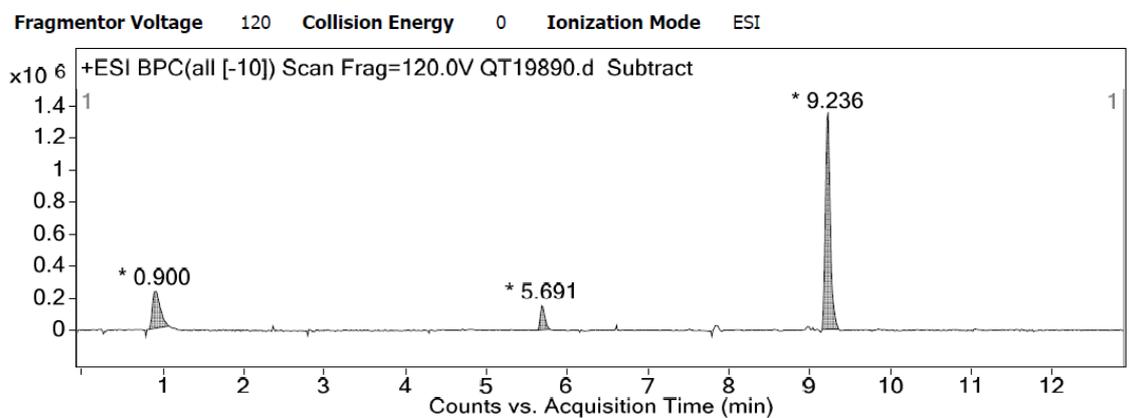
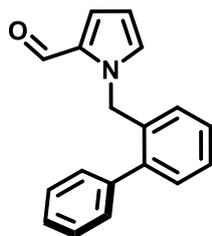


Figure VIII.30 ¹H NMR spectrum of *SCP-Bn*

Figure VIII.31 ^{13}C NMR spectrum of *SCP-Bn*Figure VIII.32 HRMS spectrum of *SCP-Bn*



9. To a solution of 1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde (1 g, 10.5 mmol, 1 eq) and 2-Phenylbenzyl bromide (6.64 g, 2.69 mL 14.7 mmol, 1.4 eq) in THF (6 mL) was added NaH (60% dispersion in mineral oil) (421 mg, 10.5 mmol, 1 eq). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 3 hours. 1 mL of MeOH was added. The mixture was diluted with water and extracted three times with DCM. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography (DCM/Heptan : 7/3) to obtain **9** (1.45 g, 53%) R_f = 0.61 (DCM). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.48 (t, J = 1.3 Hz, 1H), 7.45 – 7.25 (m, 5H), 6.92 (dd, J = 4.0, 1.8 Hz, 1H), 6.87 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 6.69 (dt, J = 2.6, 1.3 Hz, 1H), 6.21 (ddd, J = 4.0, 2.6, 1.6 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 179.34 (CHO Carbonyl), 141.83, 140.45, 135.00, 131.70, 131.35, 130.14, 129.07, 128.40, 127.87, 127.59, 127.40, 127.38, 124.44, 111.54, 50.92 (CH₂ o-phenylbenzyl). HRMS (ESI+) calculated for C₁₈H₁₆NO [M+H]⁺ 262.1164, found 262.1228.

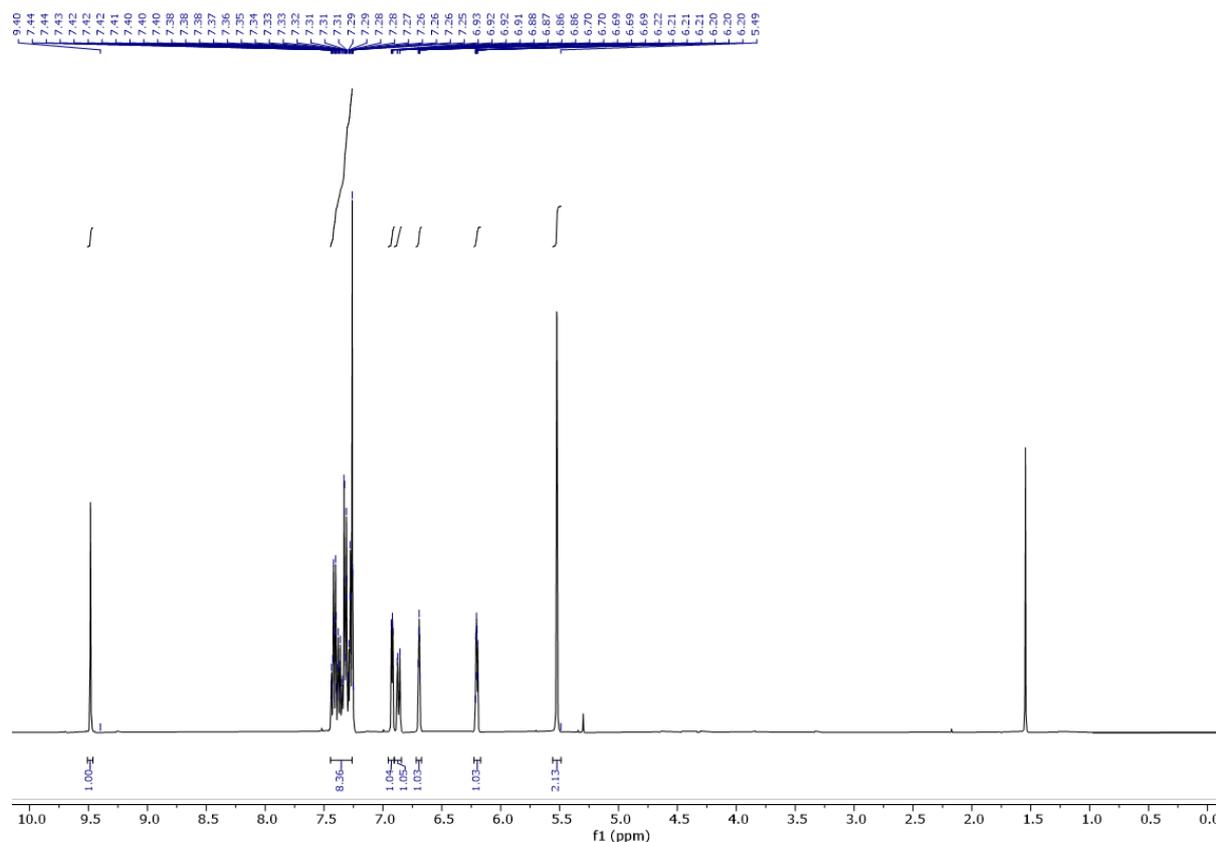
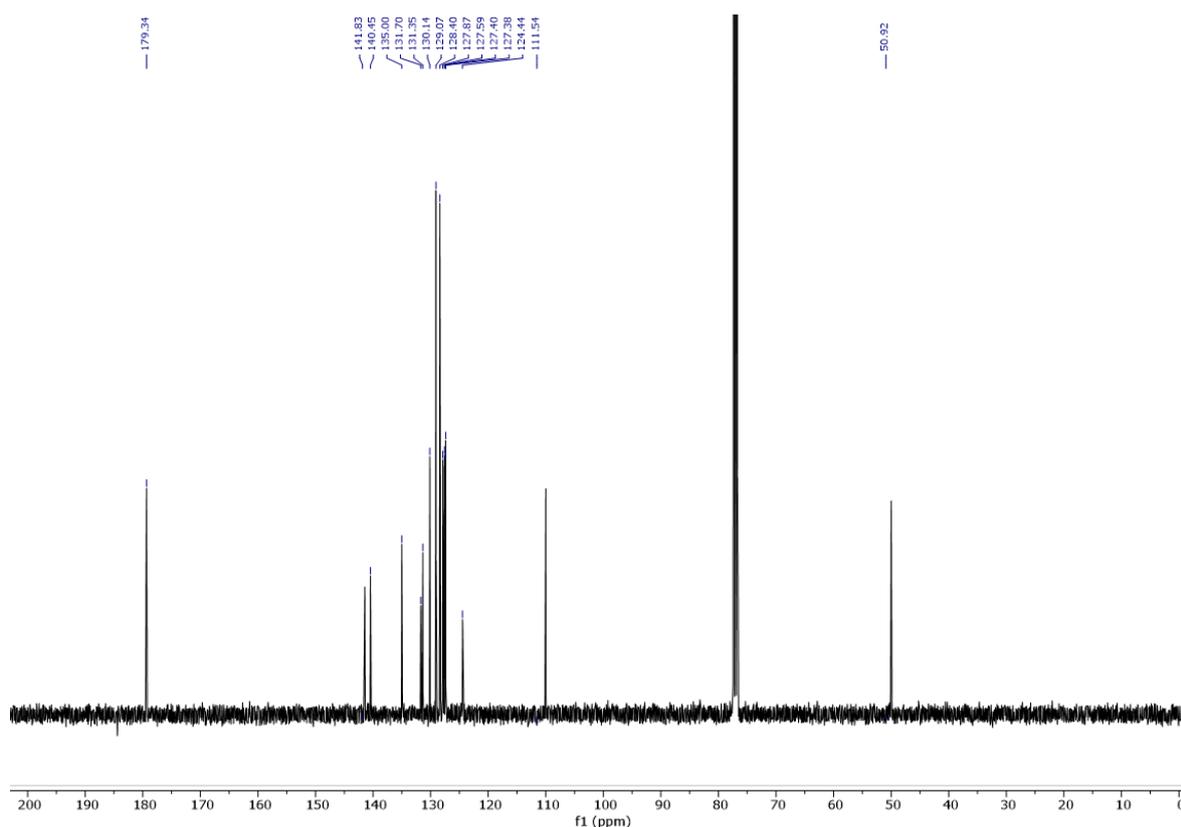
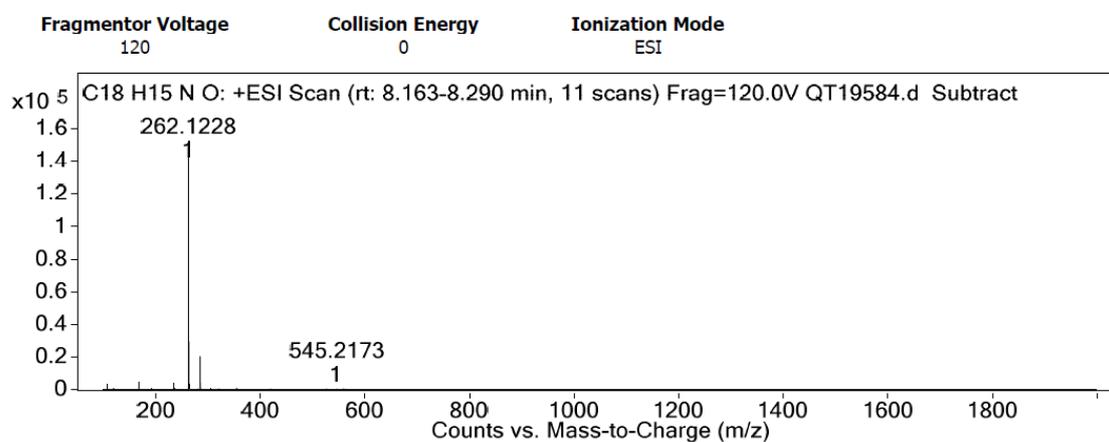
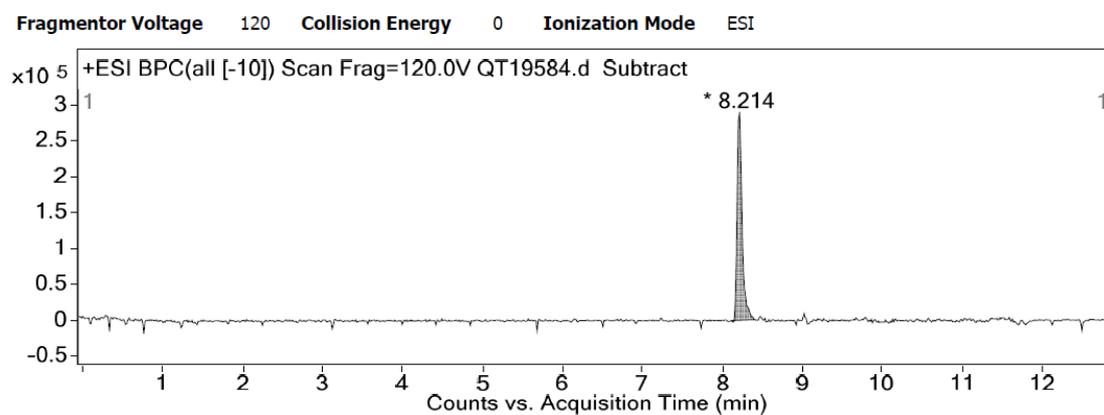
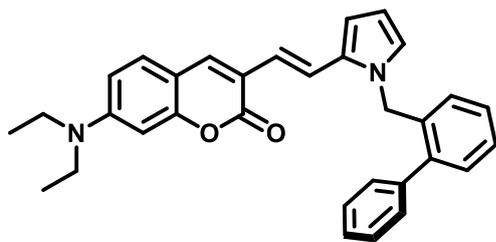


Figure VIII.33 ¹H NMR spectrum of **9**

Figure VIII.34 ^{13}C NMR spectrum of **9**Figure VIII.35 HRMS spectrum of **9**



SCP-OPB. To a solution of **CP⁺** (200 mg, 0.35 mmol, 1 eq) and **9** (87 mg, 0.33 mmol, 50 μ l, 0.95 eq) in DMF (5 mL) at 0°C was added tBuOK (47 mg, 0.42 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to warm up at RT to stir for 1 hour. DMF was evaporated and the mixture was diluted with LiCl 5% and extracted with Et₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated.

The crude was purified by column chromatography (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1) to obtain **SCP-OPB** (11 mg, 7%). R_f = 0.62 (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.51 – 7.43 (m, 2H, ArH), 7.42 – 7.35 (m, 4H, ArH), 7.34 – 7.17 (m, 4H, ArH and CH alkene), 6.87 – 6.80 (m, 1H, H pyrrole), 6.74 (dd, J = 15.9, 0.7 Hz, 1H, CH alkene), 6.60 – 6.55 (m, 2H, H pyrrole and ArH) and ArH, 6.55 – 6.51 (m, 1H, ArH), 6.49 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.21 – 6.15 (m, 1H, H pyrrole), 5.11 (s, 2H, CH₂ benzyl), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.16 (CO₂ Lactone), 155.16, 150.01, 140.84, 140.53, 136.88, 135.41, 132.33, 129.94, 129.15, 128.52, 128.35, 128.04, 127.42, 127.36, 127.17, 123.37, 120.63, 118.93, 118.38, 109.26, 108.98, 108.89, 106.76, 97.20, 48.61 (CH₂ Orthophenylbenzyl), 44.84 (CH₂ ethyl), 12.52 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI⁺) calculated for C₃₂H₃₁N₂O₂ [M+H]⁺ 475.2307, found 475.2395.

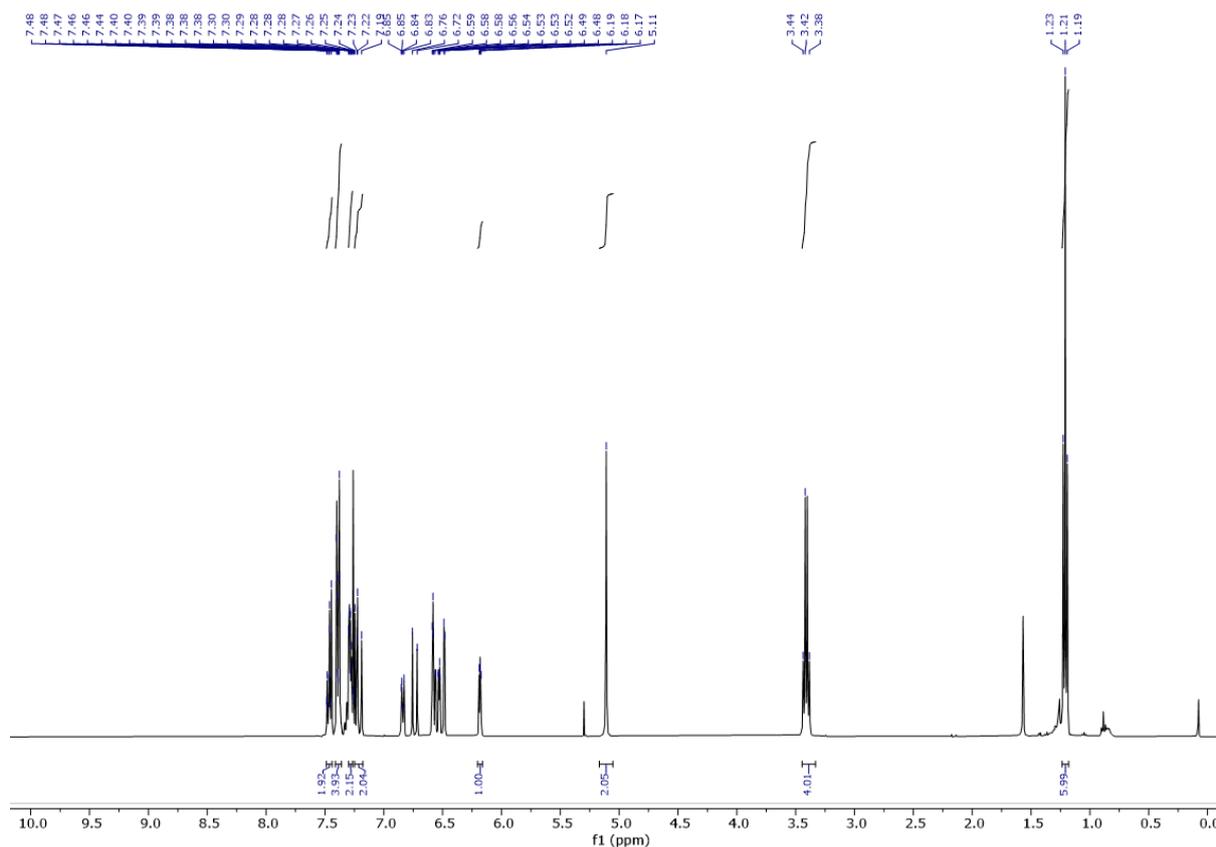


Figure VIII.36 ¹H NMR spectrum of **SCP-OPB**

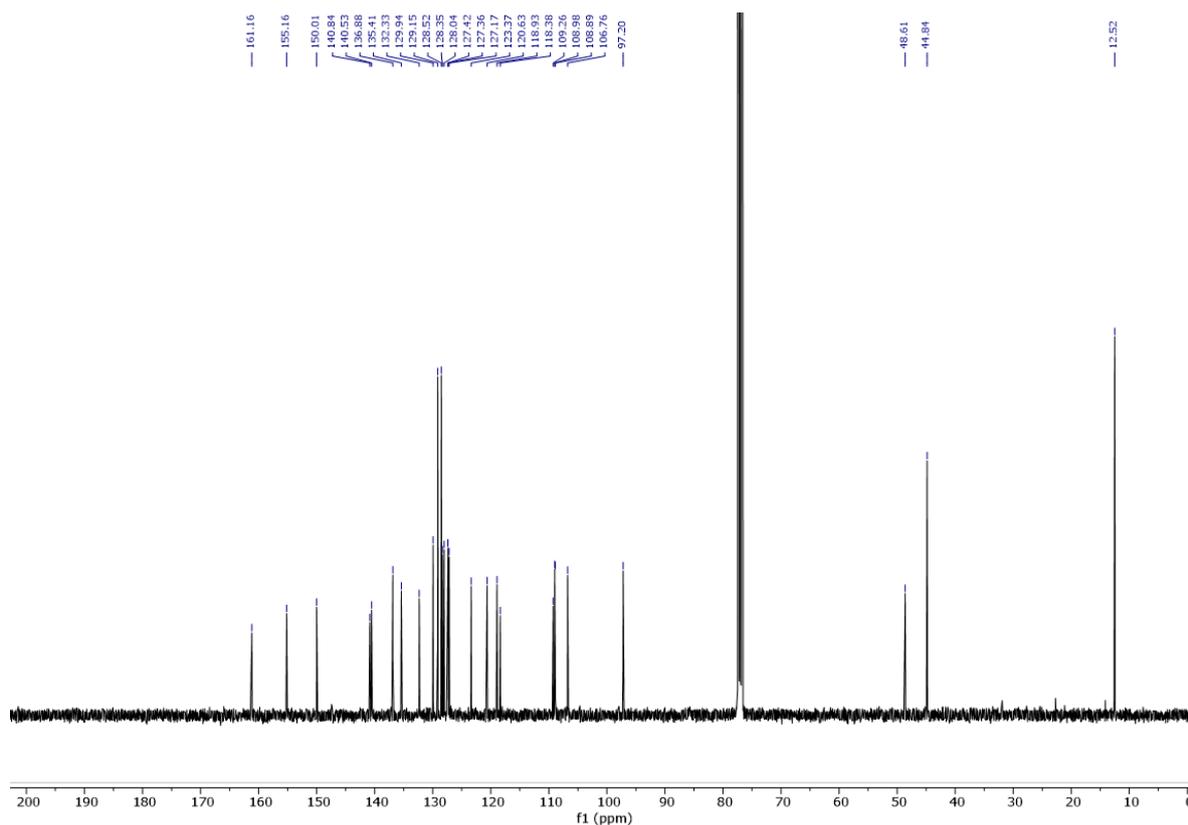


Figure VIII.37 ^{13}C NMR spectrum of *SCP-OPB*

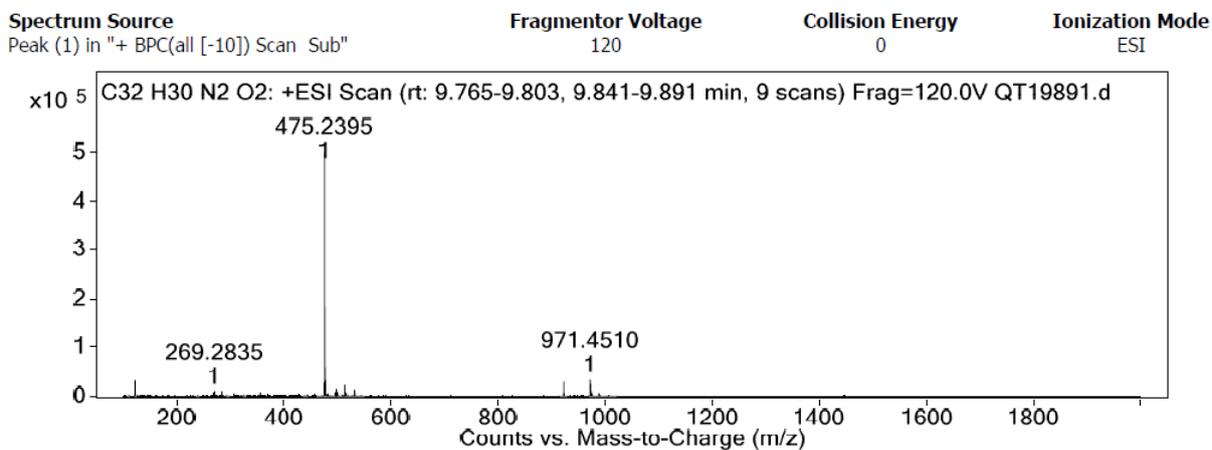
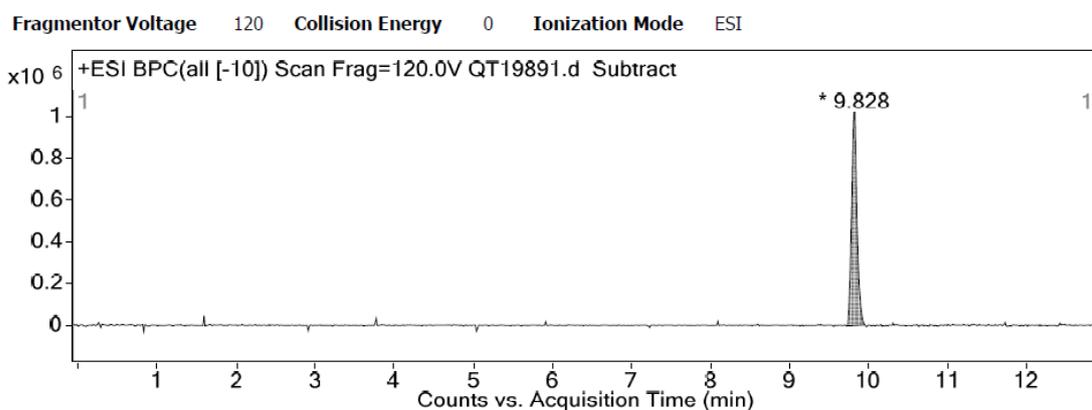
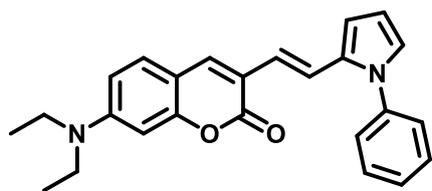


Figure VIII.38 HRMS spectrum of *SCP-OPB*



SCP-Ph. To a solution of **CP⁺** (200 mg, 0.35 mmol, 1 eq) and 1-Phenyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde (57 mg, 0.33 mmol, 50 μ l, 0.95 eq) in DMF (5 mL) at 0°C was added tBuOK (47 mg, 0.42 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to warm up at RT to stir for 1 hour. DMF was evaporated and the mixture was diluted with LiCl 5% and extracted with Et₂O. The organic phase

was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1) to obtain **SCP-Ph** (12 mg, 9%). R_f = 0.58 (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53 – 7.33 (m, 6H, ArH and CH alkene), 7.22 (s, 1H, ArH), 7.19 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.91 – 6.82 (m, 2H, H pyrrole and CH alkene), 6.67 (ddd, J = 3.8, 1.7, 0.7 Hz, 1H, H pyrrole), 6.54 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.46 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ArH), 6.33 (t, J = 3.6 Hz, 1H, H pyrrole), 3.40 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.38 (CO₂ Lactone), 155.29, 150.05, 139.74, 136.37, 132.74, 129.24, 128.45, 127.25, 126.17, 123.68, 120.61, 119.61, 118.44, 109.83, 109.22, 108.97, 107.79, 97.22, 44.80 (CH₂ ethyl), 11.53 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI⁺) calculated for C₂₅H₂₅N₂O₂ [M+H]⁺ 385.1838, found 385.1924.

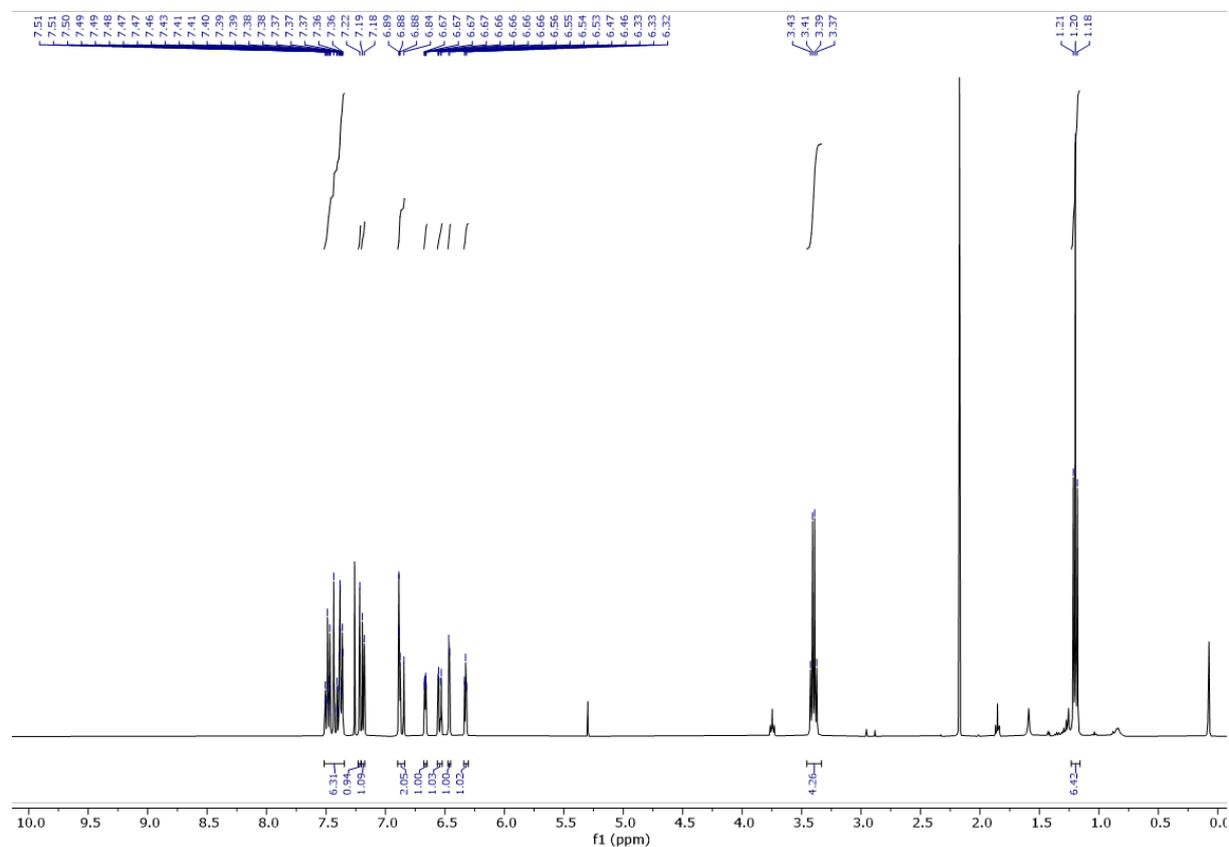


Figure VIII.39 ¹H NMR spectrum of **SCP-Ph**

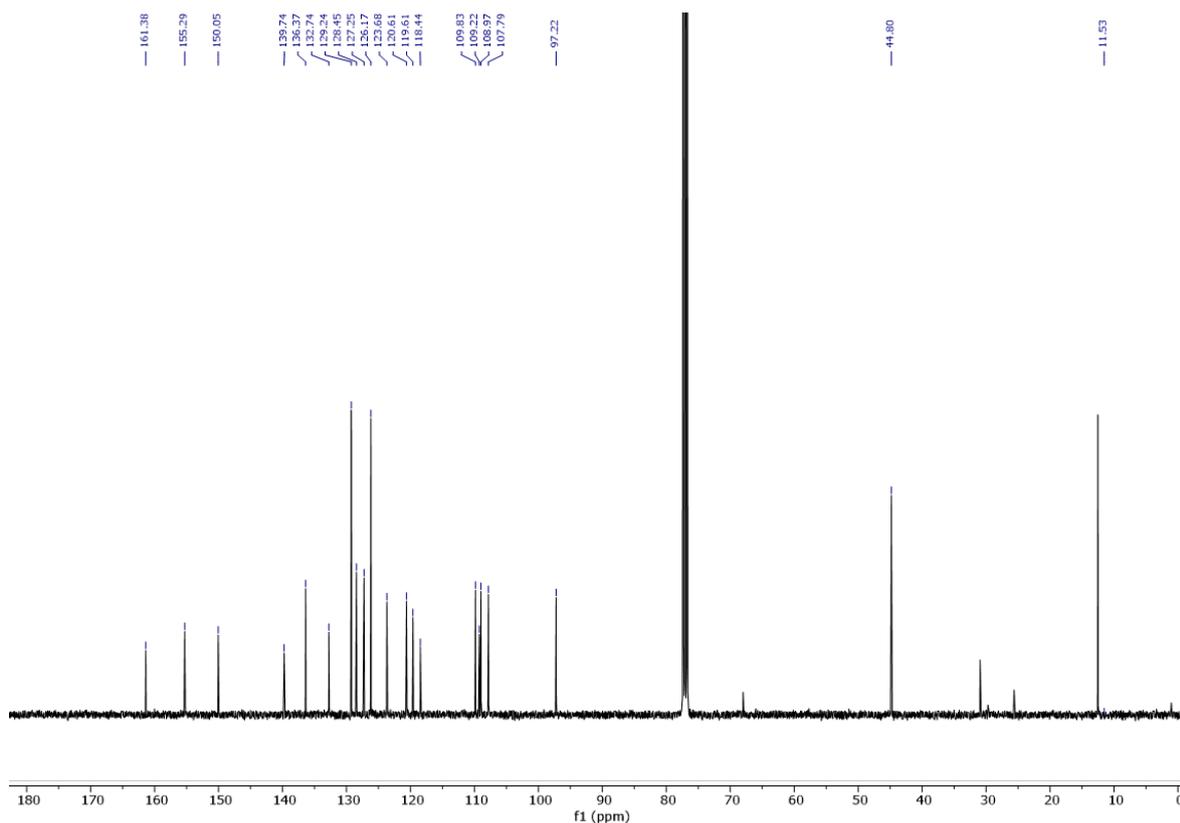


Figure VIII.40 ^{13}C NMR spectrum of SCP-Ph

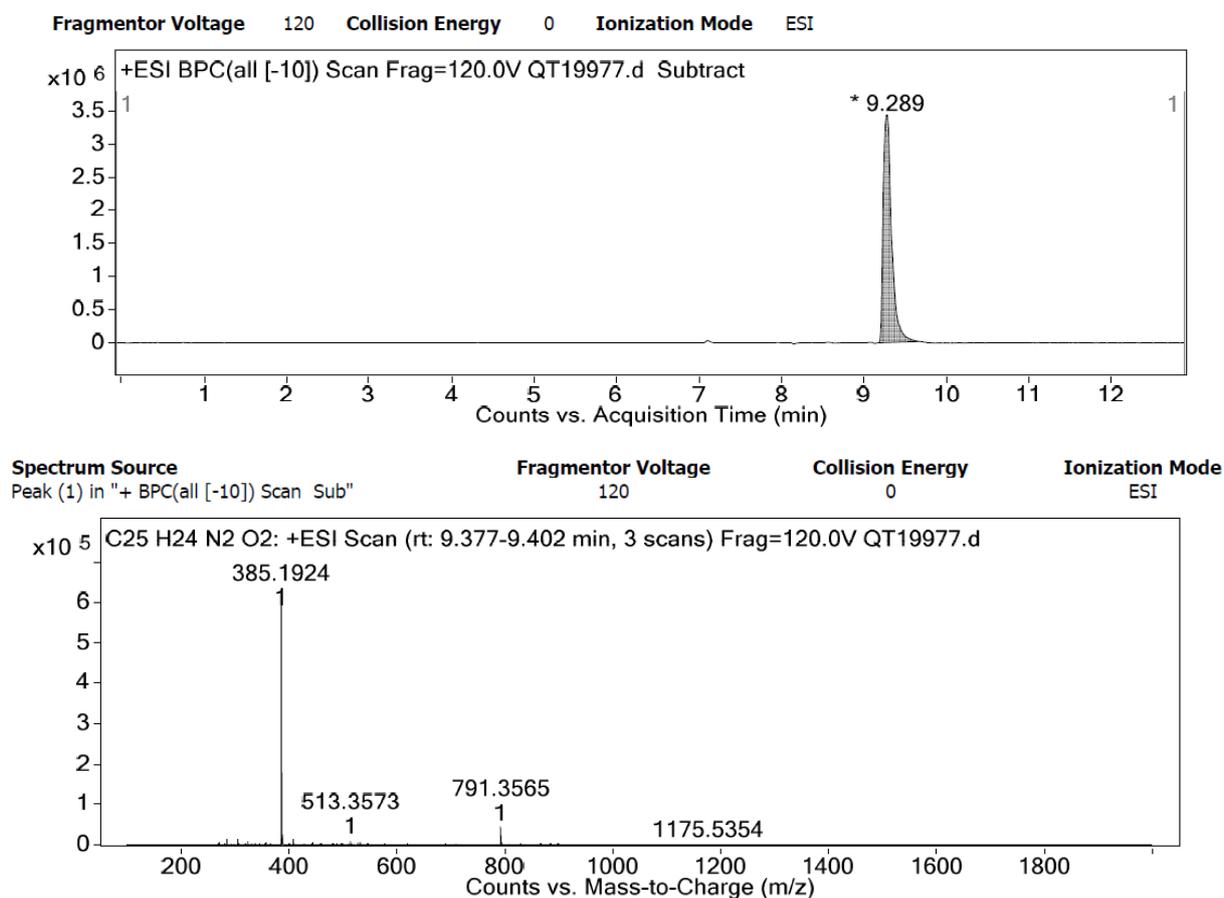
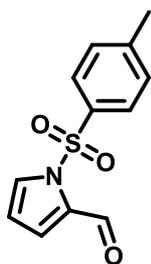
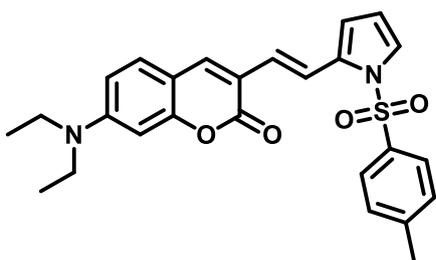


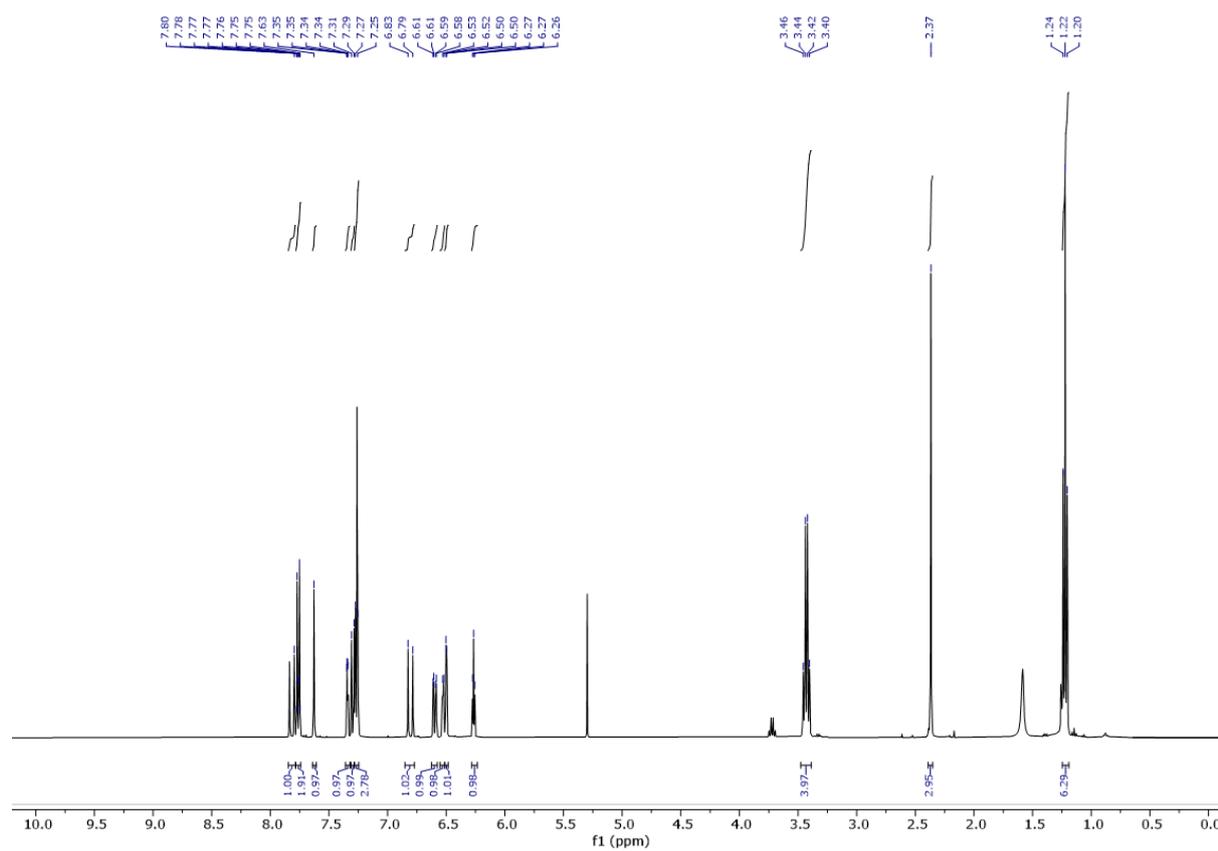
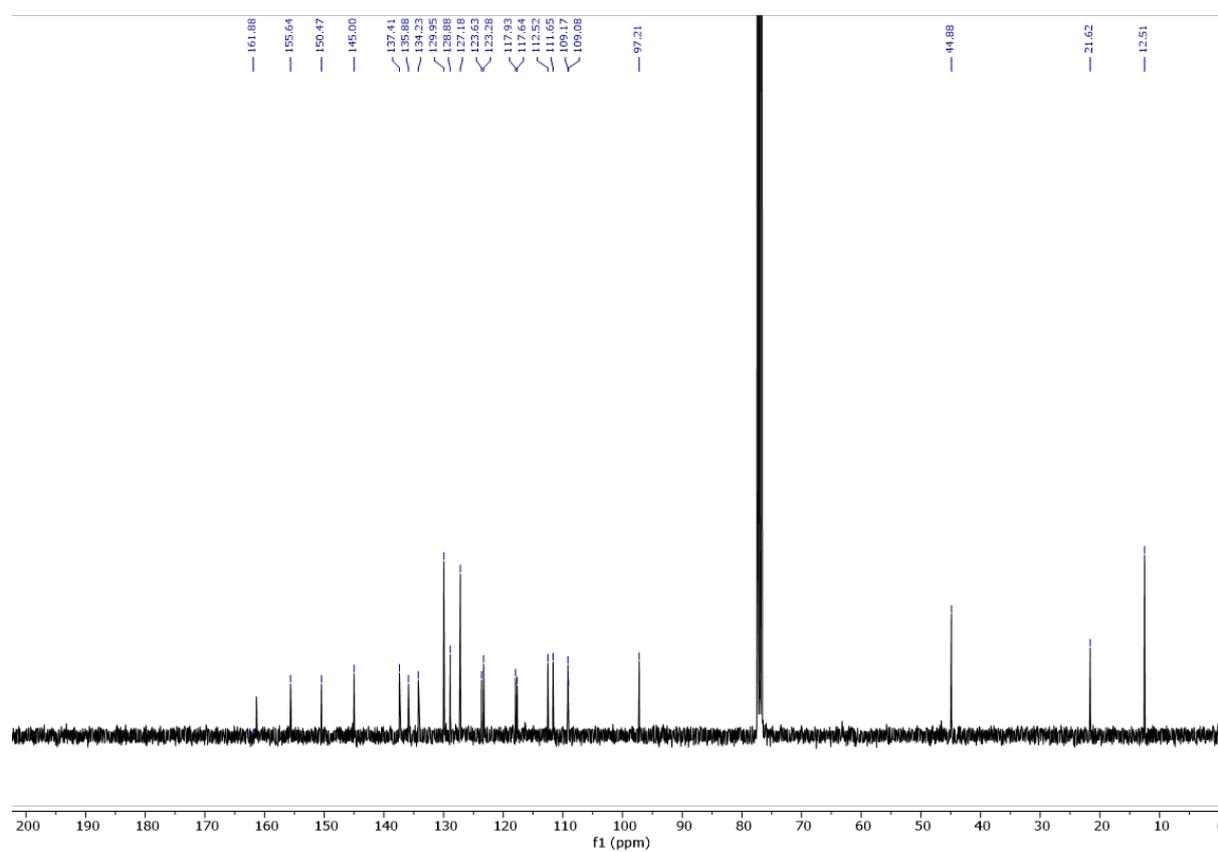
Figure VIII.41 HRMS spectrum of SCP-Ph

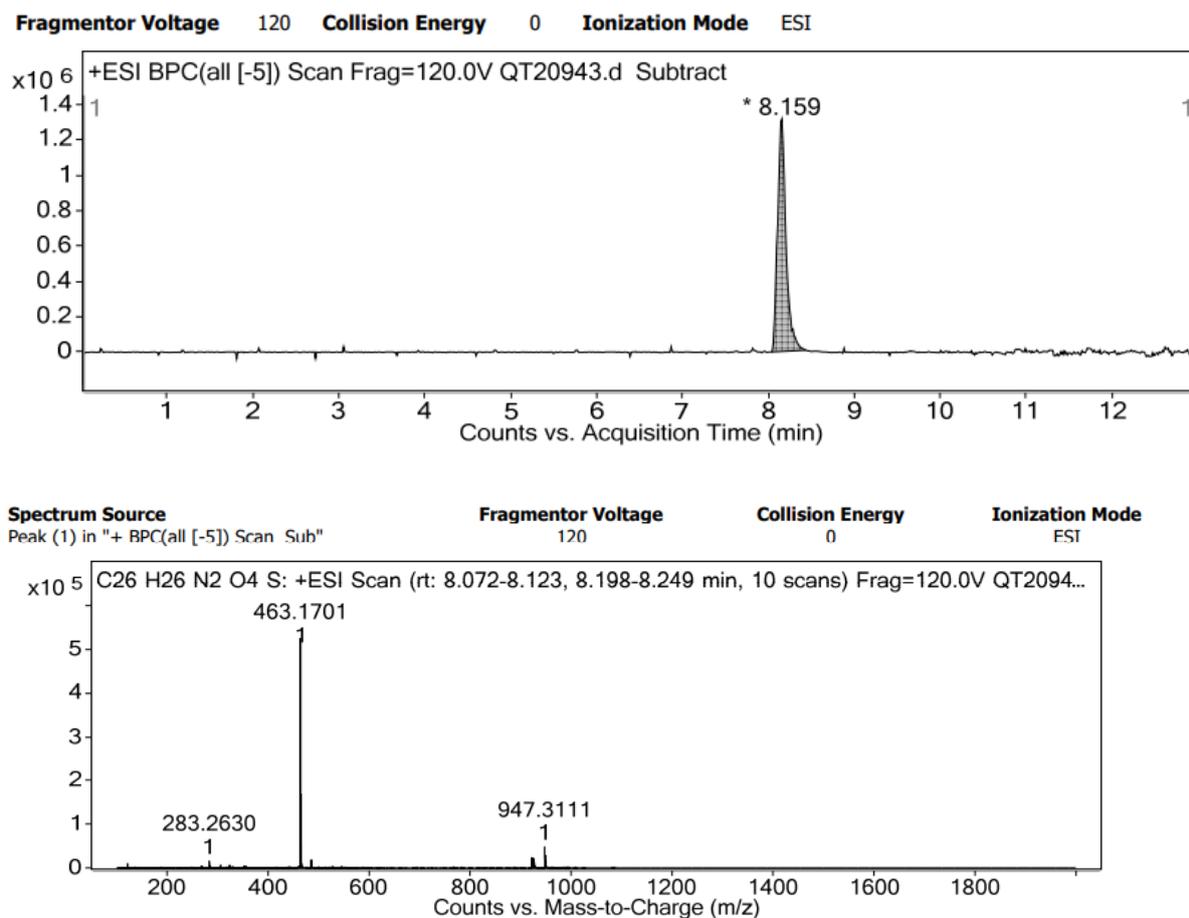
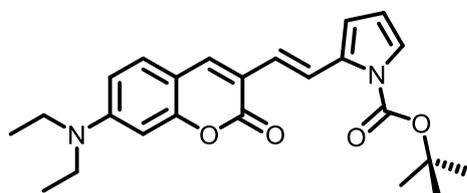


10. To a solution of 1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde (5 g, 50.3 mmol, 1 eq) in THF (200 mL) was added NaH (60% dispersion in mineral oil) (2.5 g, 63 mmol, 1.2 eq). After 30 minutes TsCl (11 g, 58 mmol, 1.1 eq) was added. The reaction mixture was allowed to stir overnight. 1 mL of MeOH was added. The mixture was diluted with a saturated solution of NaHCO₃ and extracted three times with EtOAc. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography (DCM) to obtain **10** (2.99 g, 23%). R_f = 0.56 (DCM). The NMR was in accordance with the literature.^[152] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.90 (s, 0H), 7.77 – 7.69 (m, 2H), 7.55 (dd, J = 3.1, 1.7 Hz, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 2H), 7.08 (dd, J = 3.7, 1.7 Hz, 1H), 6.33 (t, J = 3.4 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H).



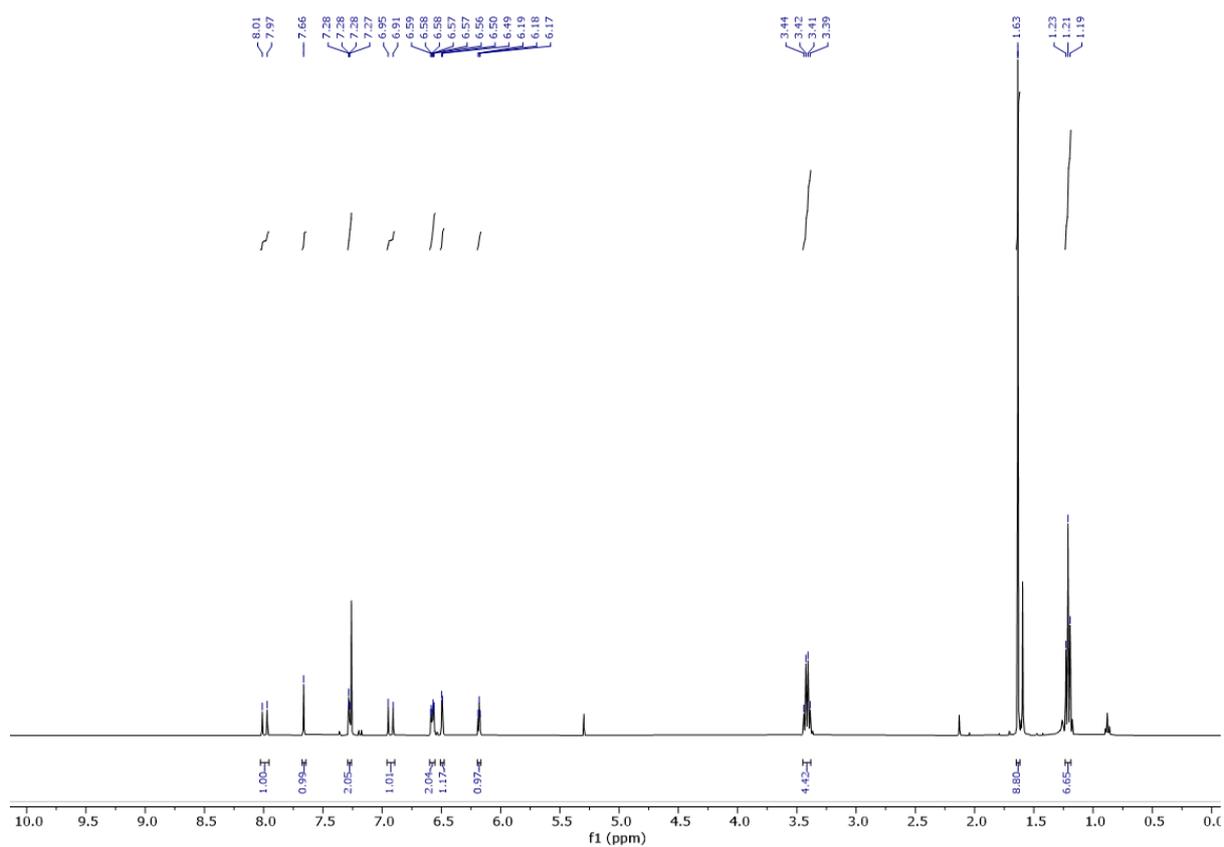
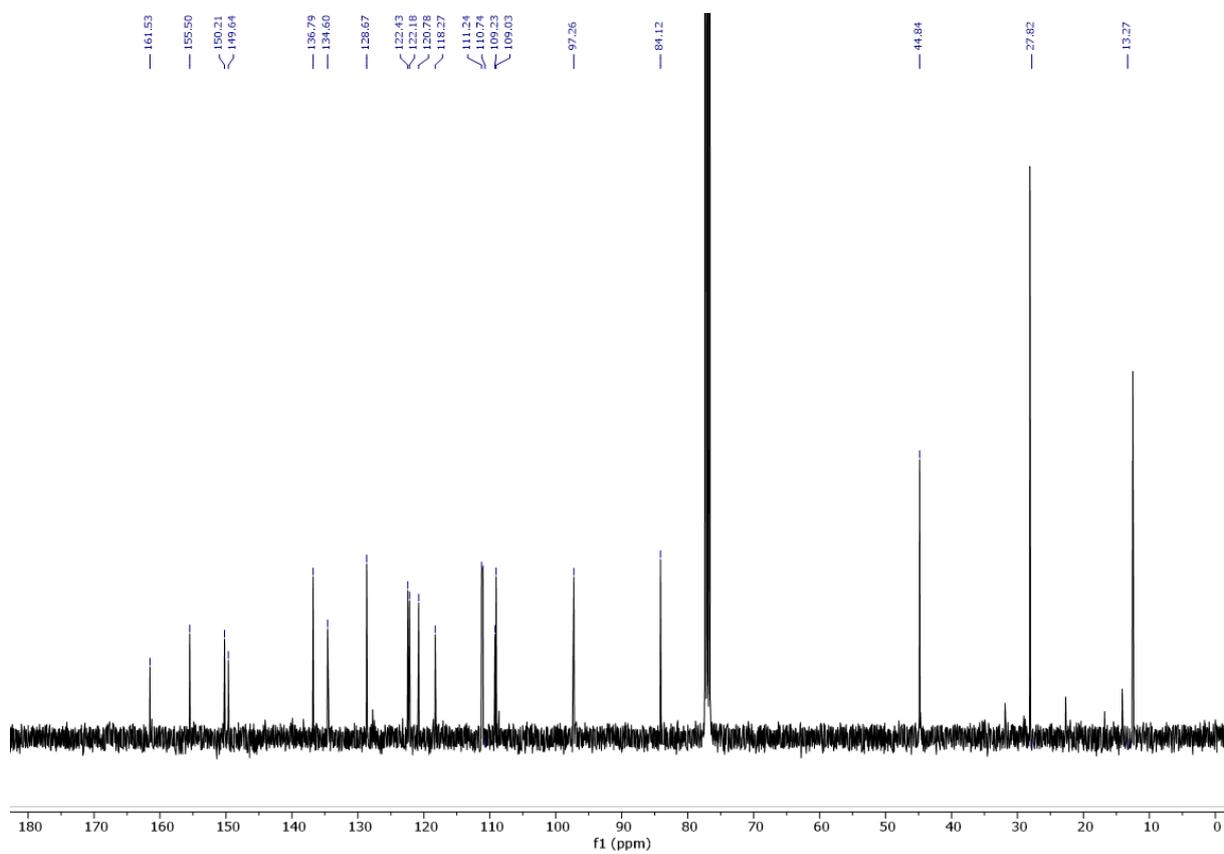
SCP-Tos. To a solution of **CP**⁺ (300 mg, 0.52 mmol, 1 eq) and **10** (124 mg, 0.50 mmol, 0.95 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (71 mg, 0.63 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was stirred at RT 2 hours. DMF was evaporated and the mixture was diluted with water and extracted with DCM. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by preparative HPLC to obtain (7 mg, 3%) of **SCP-Tos**. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (d, J = 16.2 Hz, 1H, CH Alkene), 7.79 – 7.73 (m, 2H, H tosyl), 7.63 (s, 1H, ArH), 7.34 (dd, J = 3.2, 1.6 Hz, 1H, H pyrrole), 7.30 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.28 – 7.24 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H tosyl), 6.81 (d, J = 16.2 Hz, 1H, CH alkene), 6.60 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.55 – 6.51 (m, 1H, H pyrrole), 6.50 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.27 (t, J = 3.4 Hz, 1H, H pyrrole), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 2.37 (s, 3H, H tosyl), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.88 (CO₂ Lactone), 155.64, 150.47, 145.00, 137.41, 135.88, 134.23, 129.95, 128.88, 127.18, 123.63, 123.28, 117.93, 117.64, 112.52, 111.65, 109.17, 109.08, 97.21, 44.88 (CH₂ ethyl), 21.62 (CH₃ Toly), 12.51 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₂₆H₂₇N₂O₄S [M+H]⁺ 463.1613, found 463.1701.

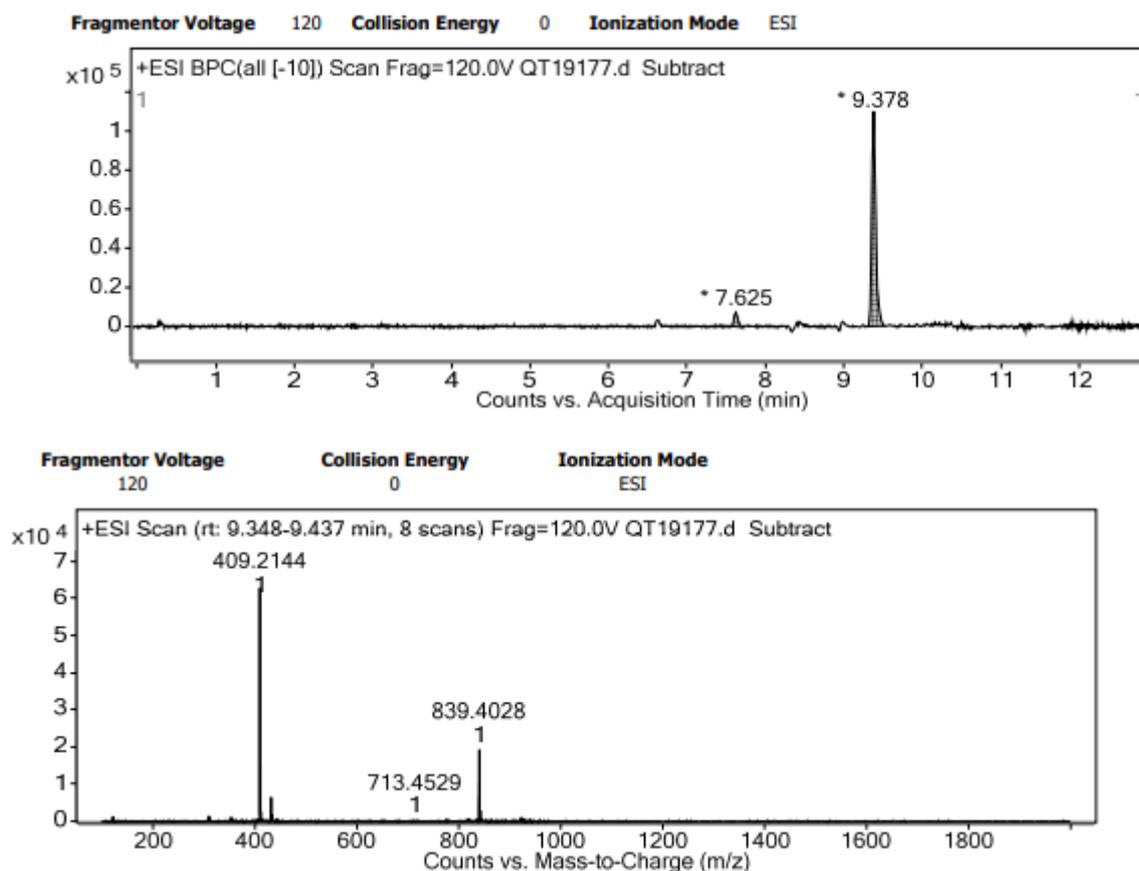
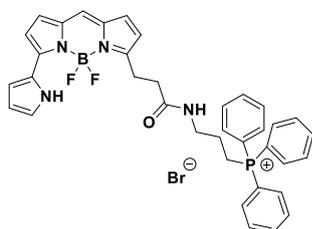
Figure VIII.42 ^1H NMR spectrum of SCP-TosFigure VIII.43 ^{13}C NMR spectrum of SCP-Tos

Figure VIII.44 HRMS spectrum of *SCP-Tos*

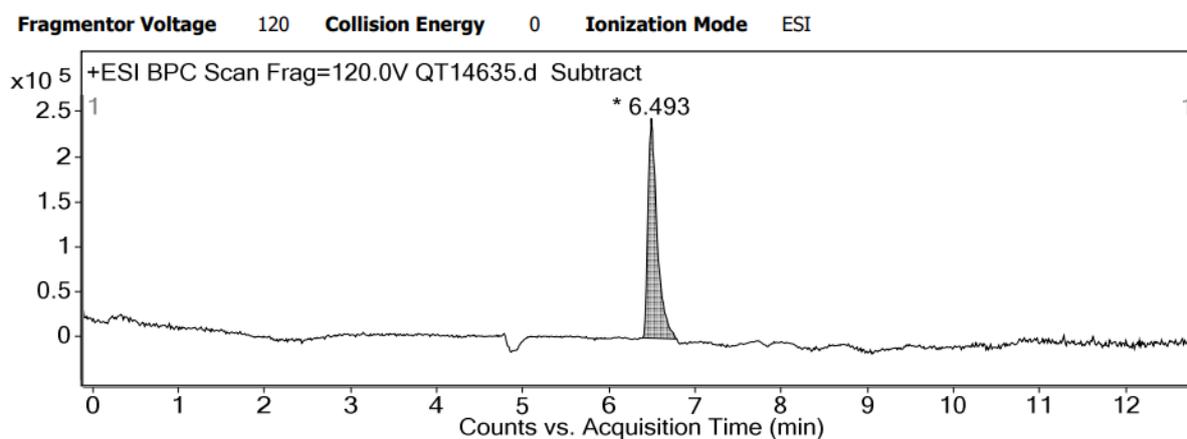
SCP-Boc. To a solution of **CP⁺** (100 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) and N-Boc-pyrrole-2-carboxaldehyde (31 mg, 0.16 mmol, 1 eq) in DMF (10 mL) was added tBuOK (25 mg, 0.22 mmol, 1.4 eq). The reaction mixture was stirred at RT 5 minutes. DMF was evaporated and the mixture was diluted with water and extracted with DCM. The organic phase was dried over

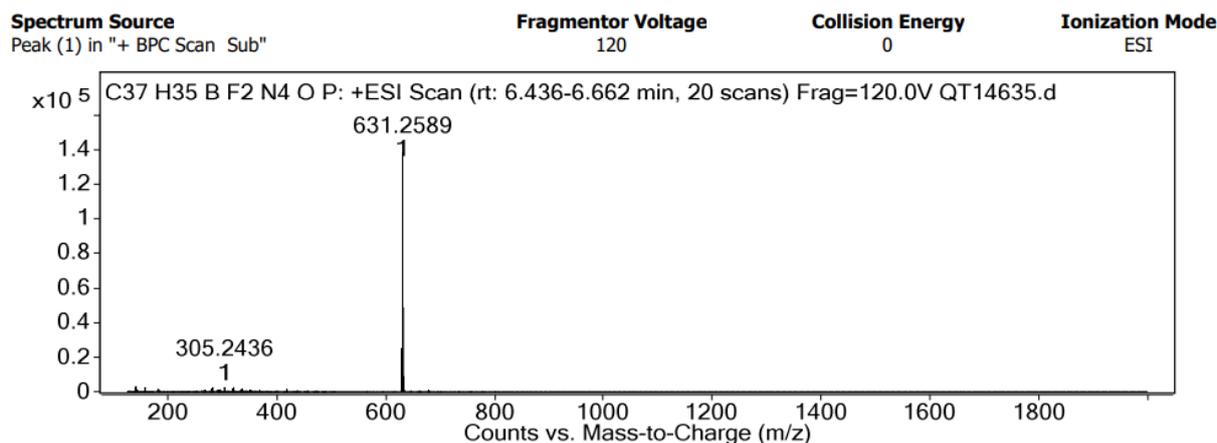
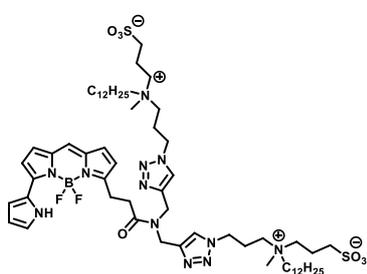
MgSO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography (Heptan/DCM/EtOAc : 5/4/1) to obtain **SCP-Boc** (23 mg, 35%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (d, J = 16.3 Hz, 1H, CH alkene), 7.66 (s, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 2H, ArH), 6.93 (dd, J = 16.3, 0.7 Hz, 1H, CH alkene), 6.61 – 6.54 (m, 2H, ArH), 6.49 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.18 (t, J = 3.4, 1H, ArH), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H, CH₂ ethyl), 1.63 (s, 9H, Boc), 1.20 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.53 (CO₂ Lactone), 155.50, 150.21, 149.64 (CO₂ Boc), 136.79, 134.60, 128.67, 122.43, 122.18, 120.78, 118.27, 111.24, 110.74, 109.23, 109.03, 97.26, 84.12 (OC Boc), 44.84 (CH₂ ethyl), 27.82 (CH₃ Boc), 13.27 (CH₃ ethyl). HRMS (ESI+) calculated for C₂₄H₂₈N₂O₂ [M+H]⁺ 409.2083, found 409.2144.

Figure VIII.45 ^1H NMR spectrum of SCP-BocFigure VIII.46 ^{13}C NMR spectrum of SCP-Boc

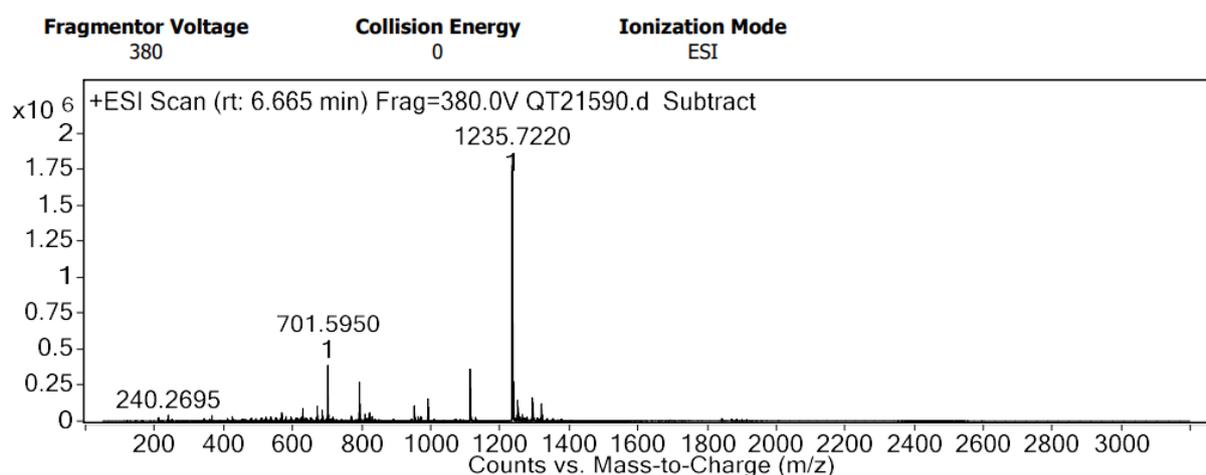
Figure VIII.47 HRMS spectrum of *SCP-Boc*

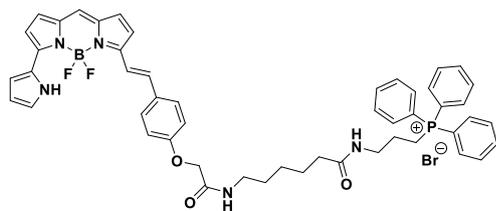
BODIPY 576 Mito. To a solution of BODIPY 576 NHS (11.7 mg, 24 μmol , 2 eq) and Diisopropylethylamine (30 μL , 171 μmol , 14 eq) in ACN (1 mL) was added **11** (5 mg, 12 μmol , 1 eq). The reaction mixture was left to stir at RT for 1 hour. The crude was purified by preparative TLC (DCM/MeOH: 9/1) to give **BODIPY 576 Mito**. $R_f = 0.33$ (DCM/MeOH: 9/1). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_4\text{OP} [\text{M}]^+$ 631.2610, found 631.2589.



Figure VIII.48 HRMS spectrum of **BODIPY 576 Mito**

BODIPY 576 Memb. To a solution of BOD 576 NHS ester (5 mg, 23.5 μmol , 1 eq) in ACN (3 mL) was added dipropargylamine (2.4 μL , 23.5 μmol , 1 eq). The reaction mixture was left to stir at RT for 4 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and solubilized in DMF (3 mL) with **CAZ** (21 mg, 51.7 μmol , 2.2 eq). 200 μL of an aqueous solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (7.2 mg, 30 μmol , 1.3 eq) and ascorbic acid (6 mg, 36 μmol , 1.5 eq) was then added. The reaction mixture was left to stir at 50°C overnight. The solvent was evaporated and the crude was purified by size exclusion column using DCM/MeOH, 1/1 to give **BODIPY 576 Memb** after evaporation. HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{60}\text{H}_{98}\text{BF}_2\text{N}_{12}\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1234.7082, found 1235.7220.

Figure VIII.49 HRMS spectrum of **BODIPY 576 Memb**



BODIPY 650 Mito. To a solution of BOD 650 NHS ester (5 mg, 7.8 μmol , 1 eq) and **11** (7.3 mg, 15 μmol , 1.95 eq) in ACN (1 mL) was added diisopropylethylamine (20 μL , 117 μmol , 15 eq). the reaction mixture was left to stir at RT for 4 hours. The crude was concentrated under

reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 9/1 to 8/2) to obtain **BODIPY 650 Mito** (4 mg, 55%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.45 (s, 1H, NH Pyrrole), 8.65 (s, 1H, NH Amide), 7.82 – 7.62 (m, 15H, PPH₃), 7.58 – 7.47 (m, 3H, ArH), 7.21 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ArH), 7.05 – 6.83 (m, 9H, ArH), 6.37 (d, J = 6.3 Hz, 1H, ArH), 4.52 (s, 2H, H Amide), 3.71 (d, J = 12.5 Hz, 2H, H Amide), 3.45 (d, J = 4.3 Hz, 2H, H Amide), 3.34 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H Amide), 2.41 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H CH₂PPH₃), 1.75 – 1.54 (m, 8H, CH₂). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_3\text{P}$ [M]⁺ 848.3712, found 848.3741.

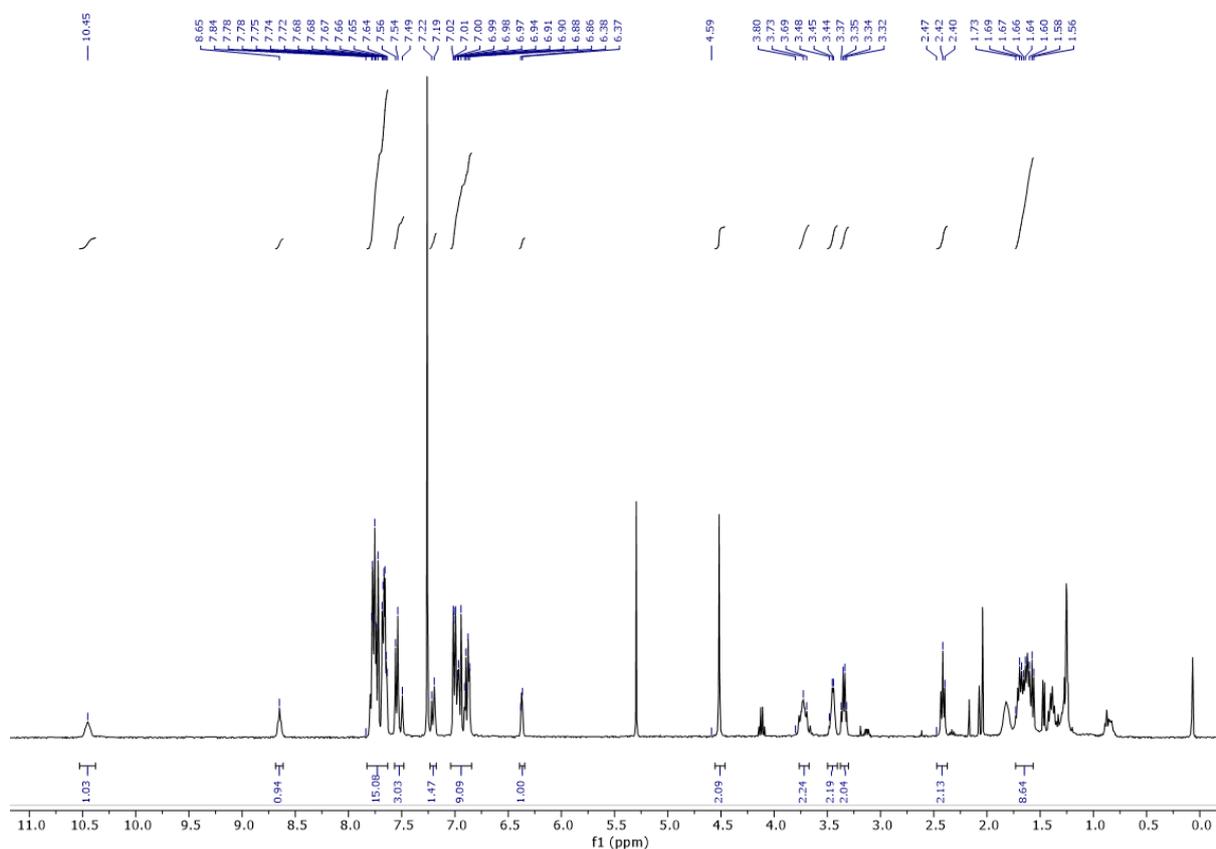
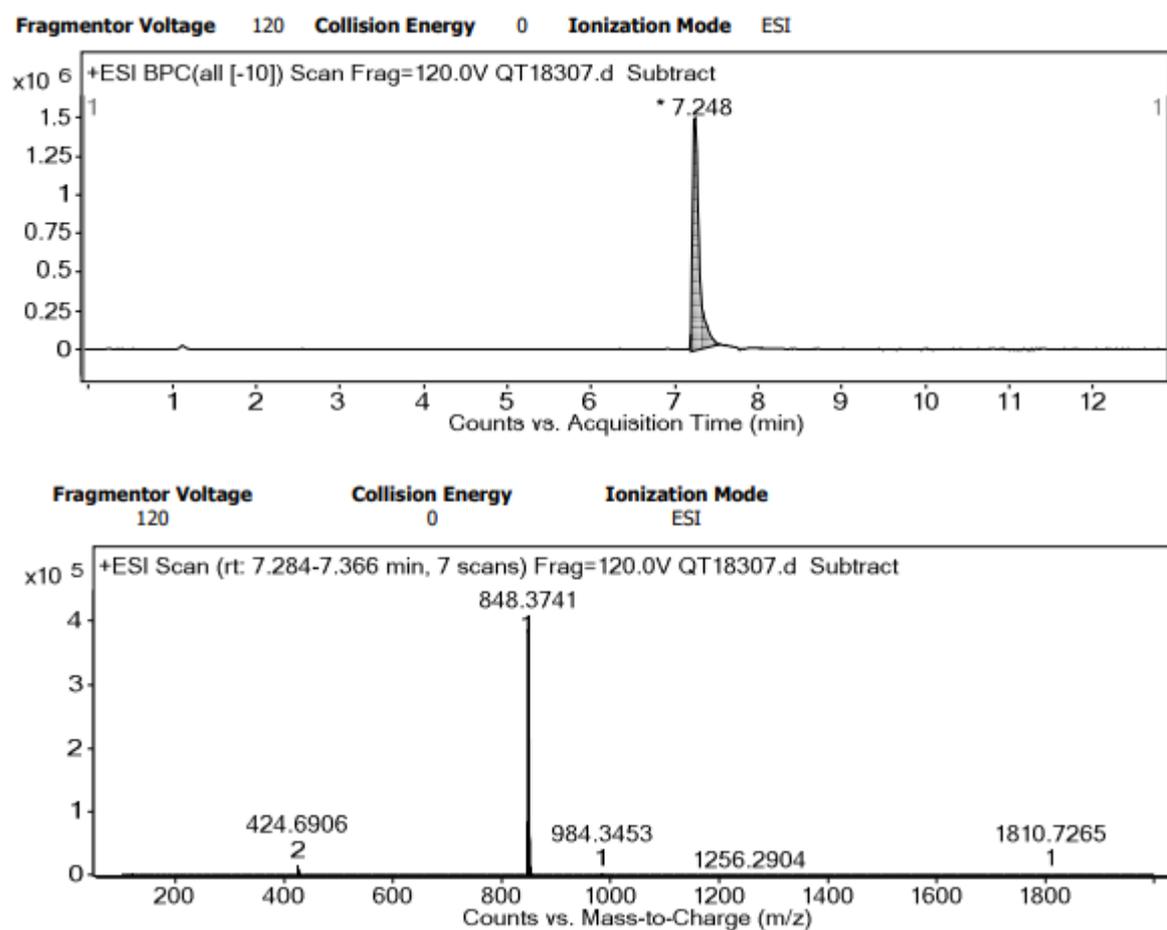
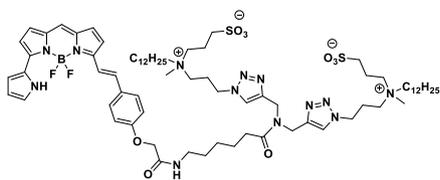
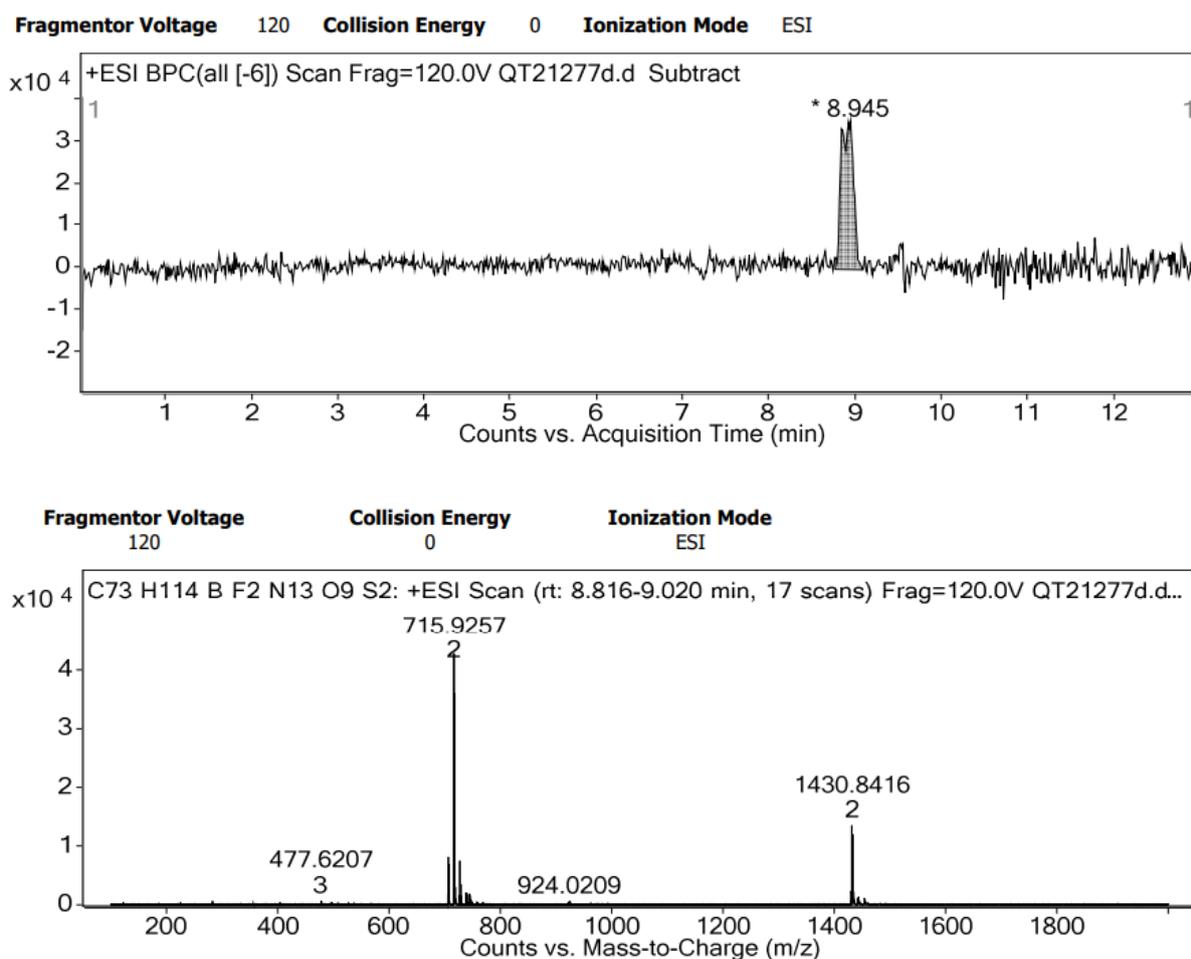
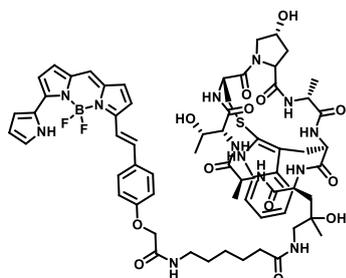


Figure VIII.50 ^1H NMR spectrum of **BODIPY 650 Mito**

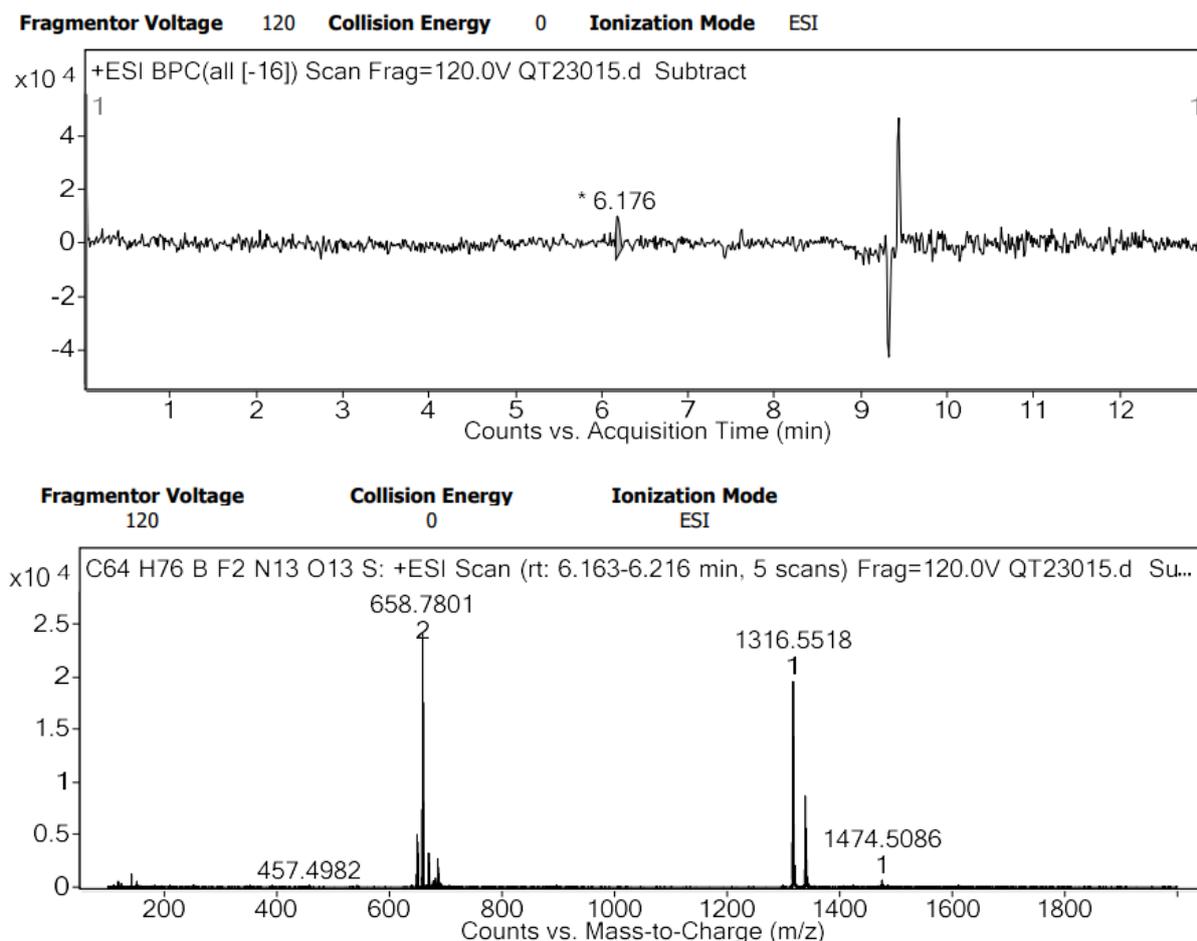
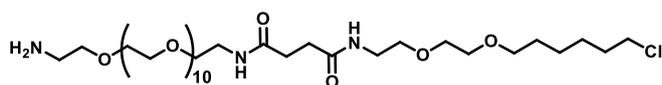
Figure VIII.51 HRMS spectrum of **BODIPY 650 Mito**

BODIPY 650 Memb. To a solution of BOD 650 NHS ester (5 mg, 7.8 μmol , 1 eq) in ACN (3 mL) was added dipropargylamine (0.8 μL , 7.8 μmol , 1 eq). The reaction mixture was left to stir at RT for 4 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and solubilized in DMF (3 mL) with **CAZ** (7 mg, 17.4 μmol , 2.2 eq). 200 μL of an aqueous solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.4 mg, 10 μmol , 1.3 eq) and ascorbic acid (2 mg, 12 μmol , 1.5 eq) was then added. The reaction mixture was left to stir at 50°C overnight. The solvent was evaporated and the crude was purified by size exclusion column using DCM/MeOH, 1/1 to give **BODIPY 650 Memb** after evaporation (400 μg , 4%). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{73}\text{H}_{115}\text{BF}_2\text{N}_{13}\text{O}_9\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1430.8443, found 1430.8416.

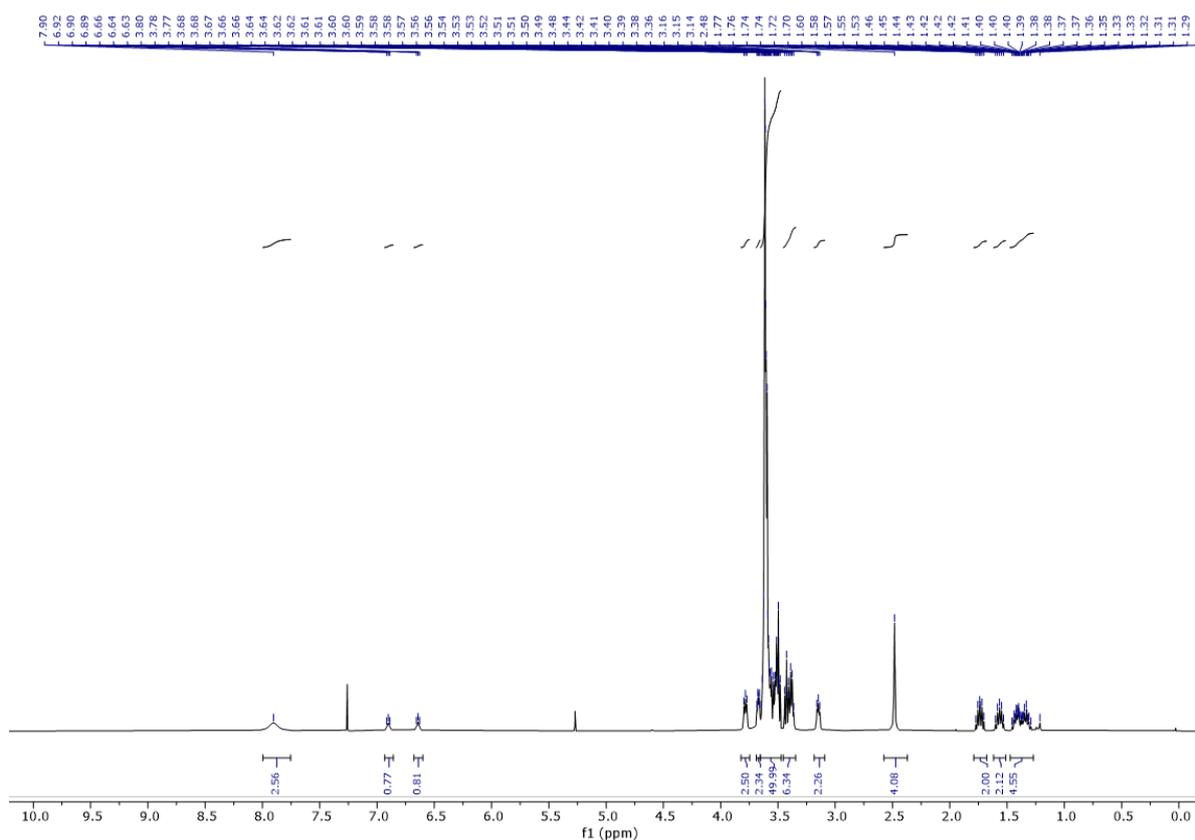
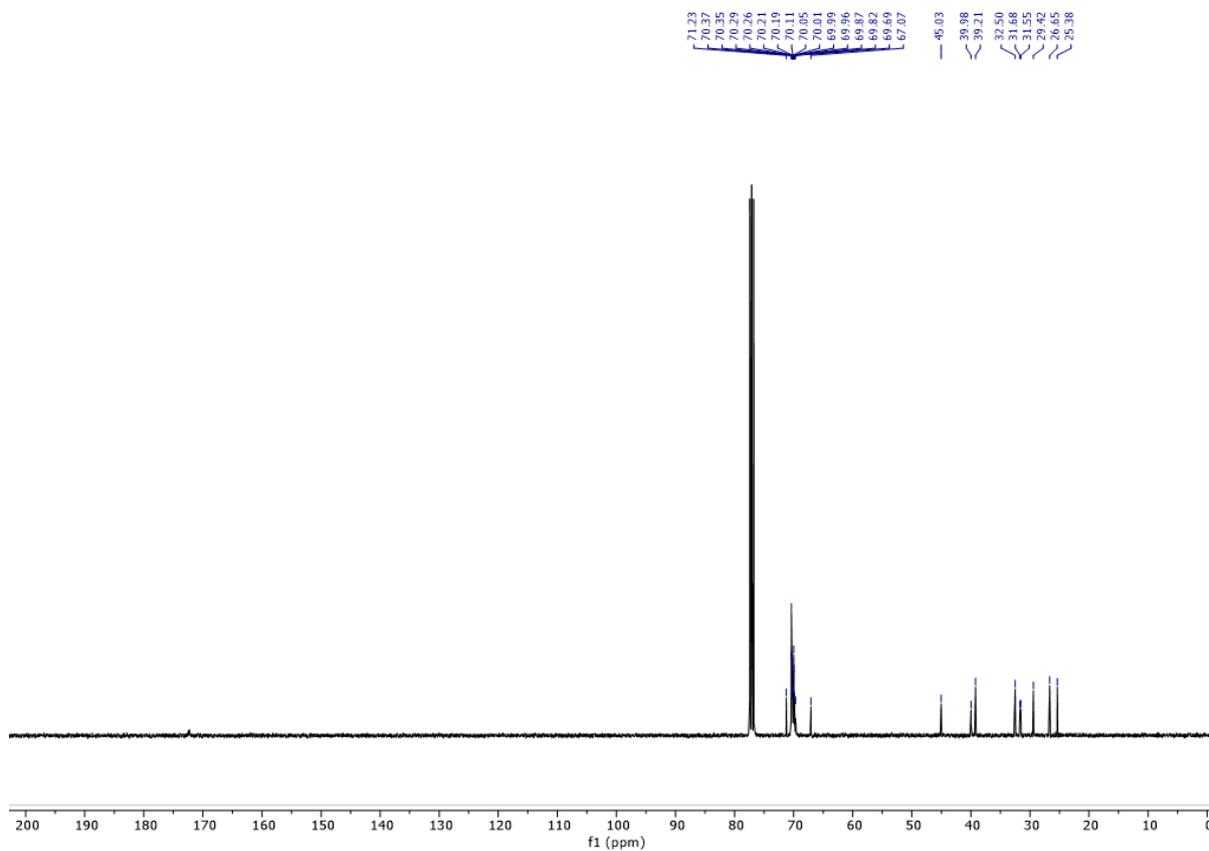
Figure VIII.52 HRMS spectrum of **BODIPY 650 Mito**

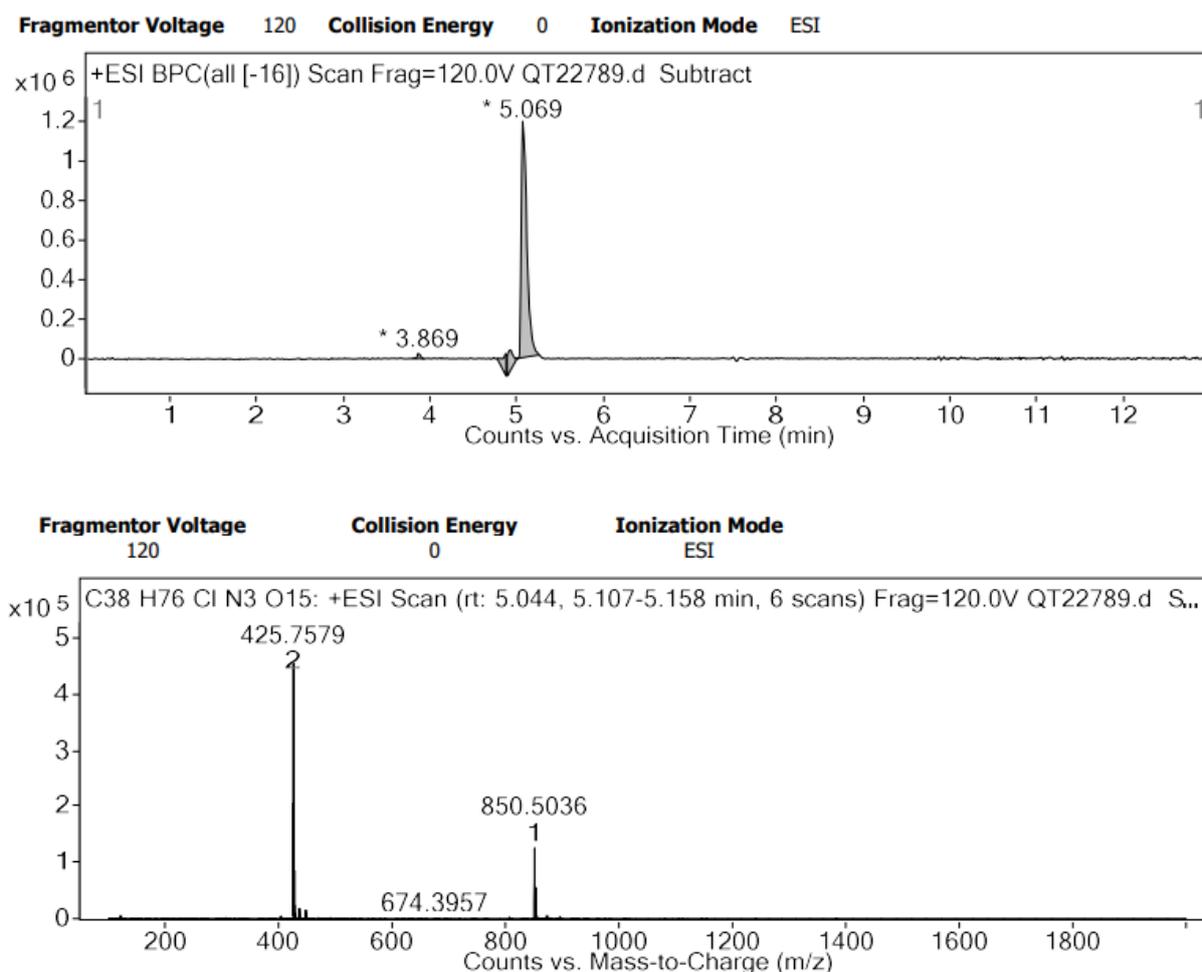
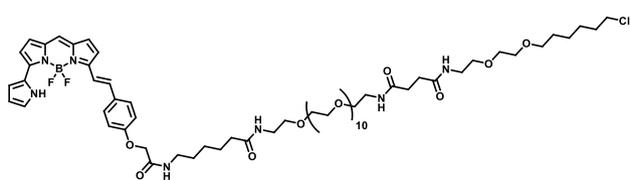
BODIPY 650 Actin. To a solution of BOD 650 NHS ester (1 mg, 1.3 μmol , 1 eq) and Phalloidin amine (800 μg , 1.3 μmol , 1 eq) in DMF (1 mL) was added diisopropylethylamine (3 μL , 19 μmol , 15 eq). the reaction mixture was left to stir at RT for 4 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$: 95/5 to 5/95) to obtain **BODIPY 650 Actin** (1.2 mg,

72%). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{64}\text{H}_{77}\text{BF}_2\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1313.5546, found 1316.5518.

Figure VIII.53 HRMS spectrum of **BODIPY 650 Actin**

12. To a solution of Boc-N-amido-PEG12-amine (100 mg, 154 μmol , 1 eq) in DMF (2 mL) was added 4-[[2-[2-[(6-Chlorohexyl)oxy]ethoxy]ethyl]amino]-4-oxo-butanoic Acid (50 mg, 154 μmol , 1 eq), HATU (76 mg, 201 μmol , 1.3 eq) and DIEA (81 μL , 463 μmol , 3 eq). The solution was left to stir for 3 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 9/1 to 8/2) to obtain **12** (50 mg, 38%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s, 2H), 6.90 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.64 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.82 – 3.75 (m, 2H), 3.67 (dd, $J = 5.6, 2.7$ Hz, 2H), 3.65 – 3.46 (m, 50H), 3.46 – 3.33 (m, 6H), 3.15 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 2.48 (s, 4H), 1.80 – 1.68 (m, 2H), 1.57 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.48 – 1.27 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 71.23, 70.37, 70.35, 70.29, 70.26, 70.21, 70.19, 70.11, 70.05, 70.01, 69.99, 69.96, 69.87, 69.82, 69.69, 67.07, 45.03, 39.98, 39.21, 32.50, 31.68, 31.55, 29.42, 26.65, 25.38. HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{ClN}_3\text{O}_{15}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 850.5043, found 850.5036.

Figure VIII.54 ^1H NMR spectrum of **12**Figure VIII.55 ^{13}C NMR spectrum of **12**

Figure VIII.56 HRMS spectrum of **12**

BODIPY 650 HaloTag. To a solution of BODIPY 650 NHS (5 mg, 8 μmol , 1 eq) in DMF (3 mL) was added **12** (6.6 mg, 8 μmol , 1 eq), HATU (3.8 mg, 10 μmol , 1.3 eq) and DIEA (4 μL , 23 μmol , 3 eq). The solution was left to stir for 3 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 9/1) to obtain **BODIPY 650 HaloTag** (1.5 mg, 14%). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{67}\text{H}_{103}\text{BClF}_2\text{N}_7\text{NaO}_{18}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1400.7007, found 1400.6966.

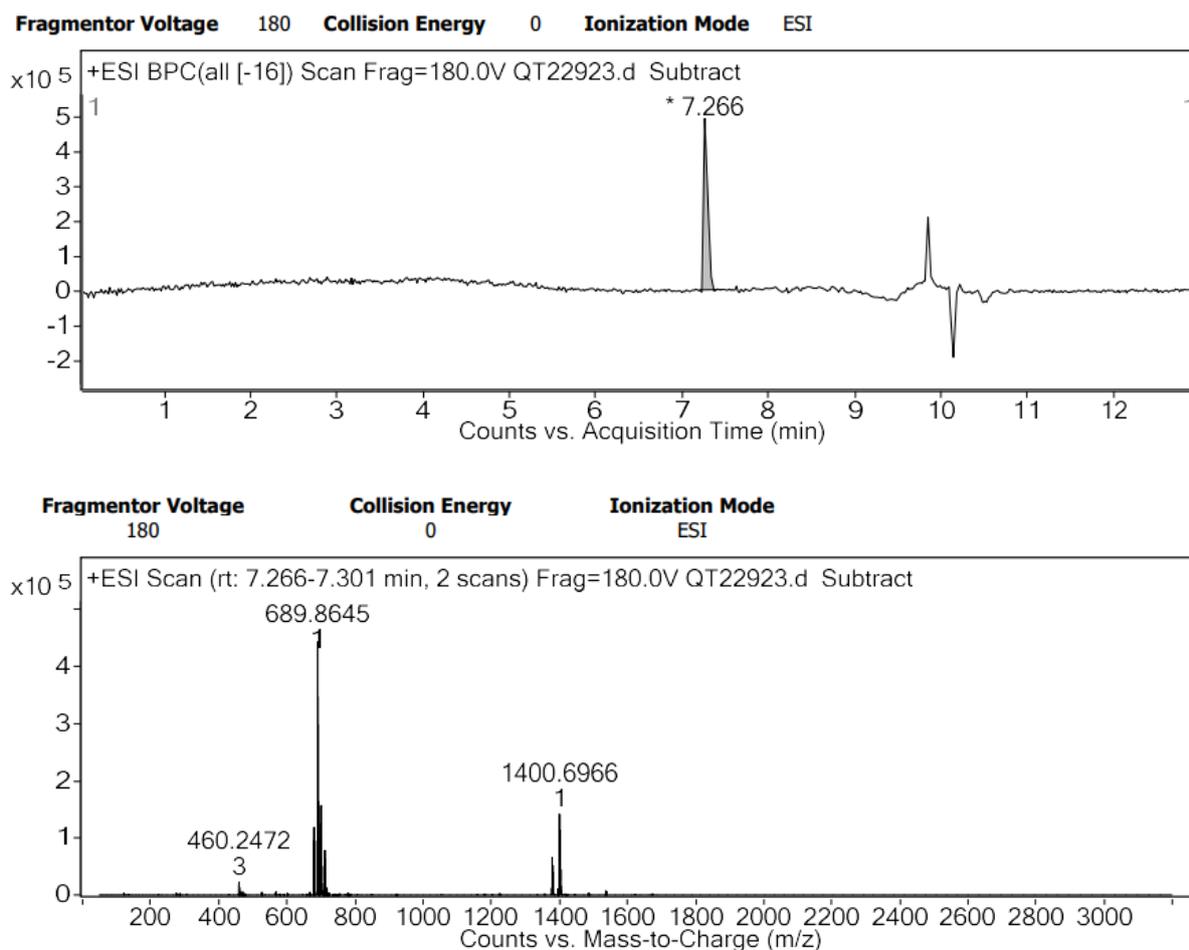
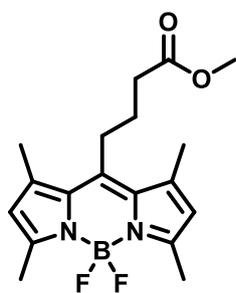
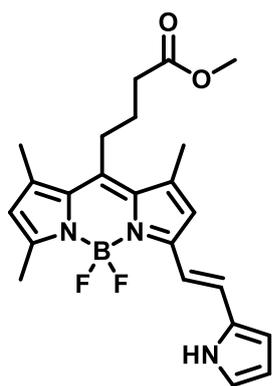


Figure VIII.57 HRMS spectrum of **BODIPY 650 HaloTag**



13. To a solution of Methyl 5-chloro-5-oxovalerate (3 mL, 22 mmol, 1 eq) in DCM (50 mL) was added dropwise 2,4-dimethylpyrrole (5 mL, 48 mmol, 2.2 eq) at 0°C. The solution was left to stir at RT for 30 minutes. TEA (8.9 mL, 65 mmol, 3eq) was added dropwise and the solution was left to stir at RT for 15 minutes. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (13.5 mL, 110 mmol, 5 eq) was added dropwise at 0°C and the solution was left to stir overnight at RT. The crude was filtered through silica using DCM, dry under reduced pressure and crystallized in EtOH to give **13** (3 g, 39%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.06 (s, 2H, ArH), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.05 – 2.96 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.55 – 2.47 (m, 8H, Dimethyl and CH_2 Alkyl), 2.43 (s, 6H, Dimethyl), 2.02 – 1.90 (m, 2H, CH_2 Alkyl).



BODIPY-2. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and Pyrrole-2-carboxaldehyde (54.6 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to give **BODIPY-2** (94 mg, 31%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (s, 1H, NH Pyrrole), 7.11 (s, 2H, H Alkene), 6.89 (m, 1H, H Pyrrole), 6.61 (s, 1H, ArH), 6.44 (m, 1H, H Pyrrole) 6.29 – 6.23 (m, 1H, H Pyrrole), 6.06 (s, 1H, ArH), 3.70 (s Hz, 3H, OMe), 3.05 – 2.96 (m, 2H, CH_2 alkyl), 2.52 (m, 5H, Methyl and CH_2 Ethyl), 2.46 (s, 3H, Methyl), 2.42 (s, 3H, Methyl), 2.02 – 1.90 (m, 2H, CH_2 Ethyl). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.02 (Ester), 152.76, 152.36, 142.28, 140.49, 138.78, 133.00, 131.40, 130.58, 126.10, 121.85, 121.35, 118.03, 113.56, 112.79, 110.74, 51.72(OMe), 34.13 (Methyl BODIPY), 27.41 (Methyl BODIPY), 26.97 (Methyl BODIPY), 16.60 (Alkyl), 16.24 (Alkyl), 14.48 (Alkyl). ^{11}B NMR (128 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (t, $J = 33.8$ Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -142.31 (dd, $J = 66.9, 32.5$ Hz). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 426.2164, found 426.2162.

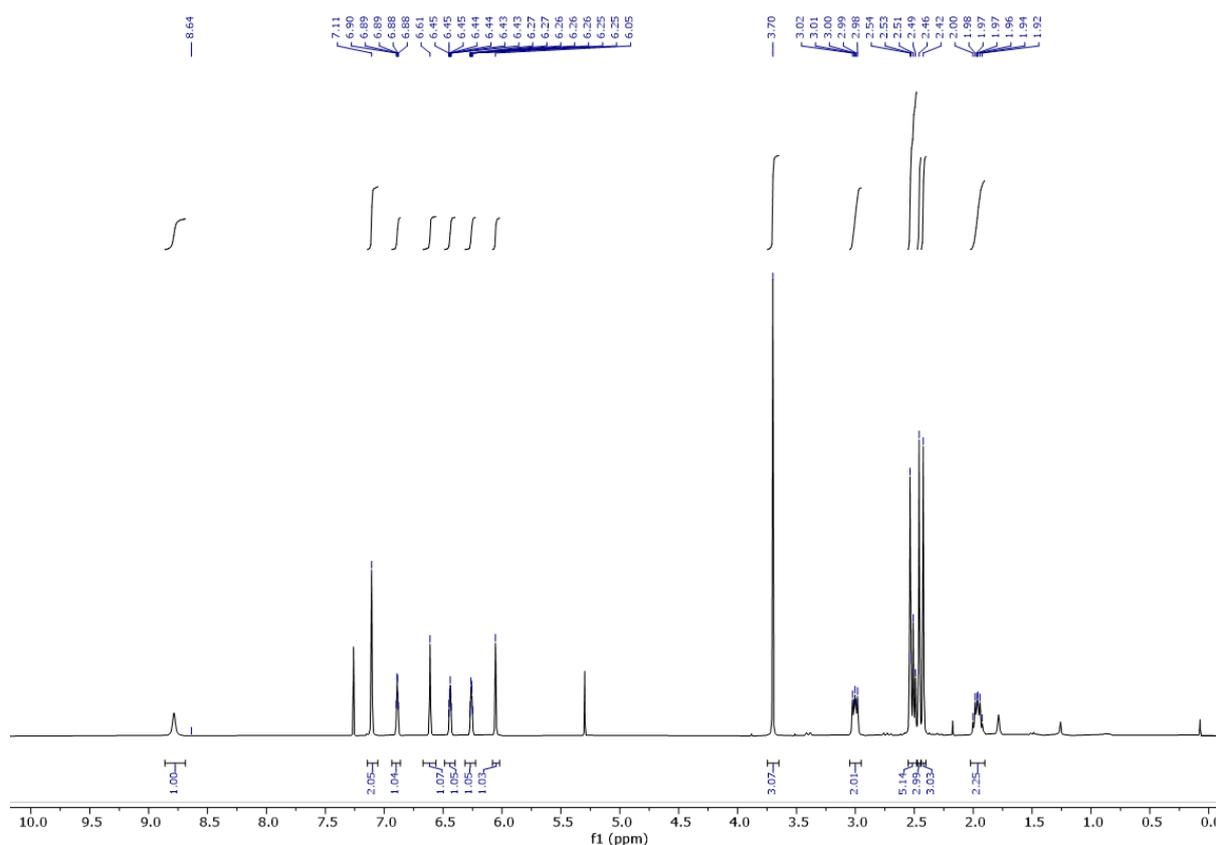
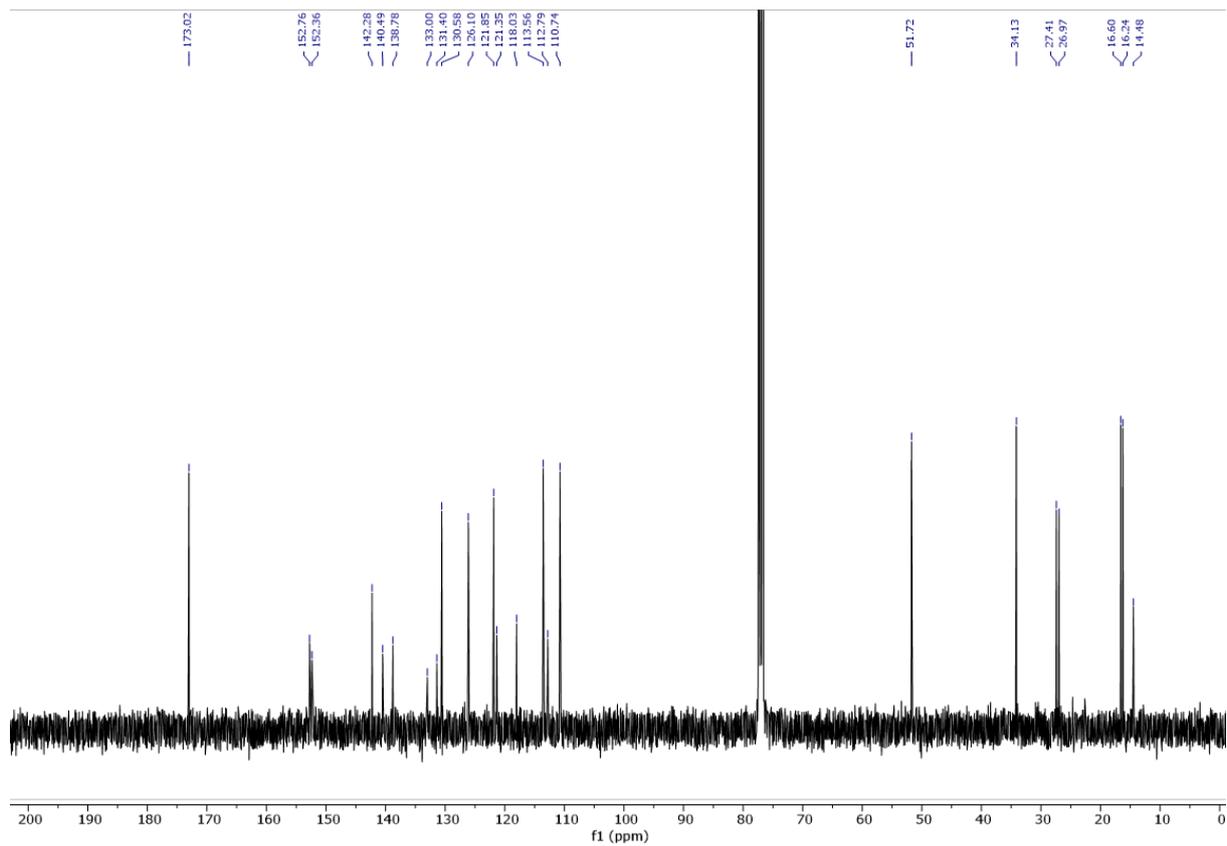
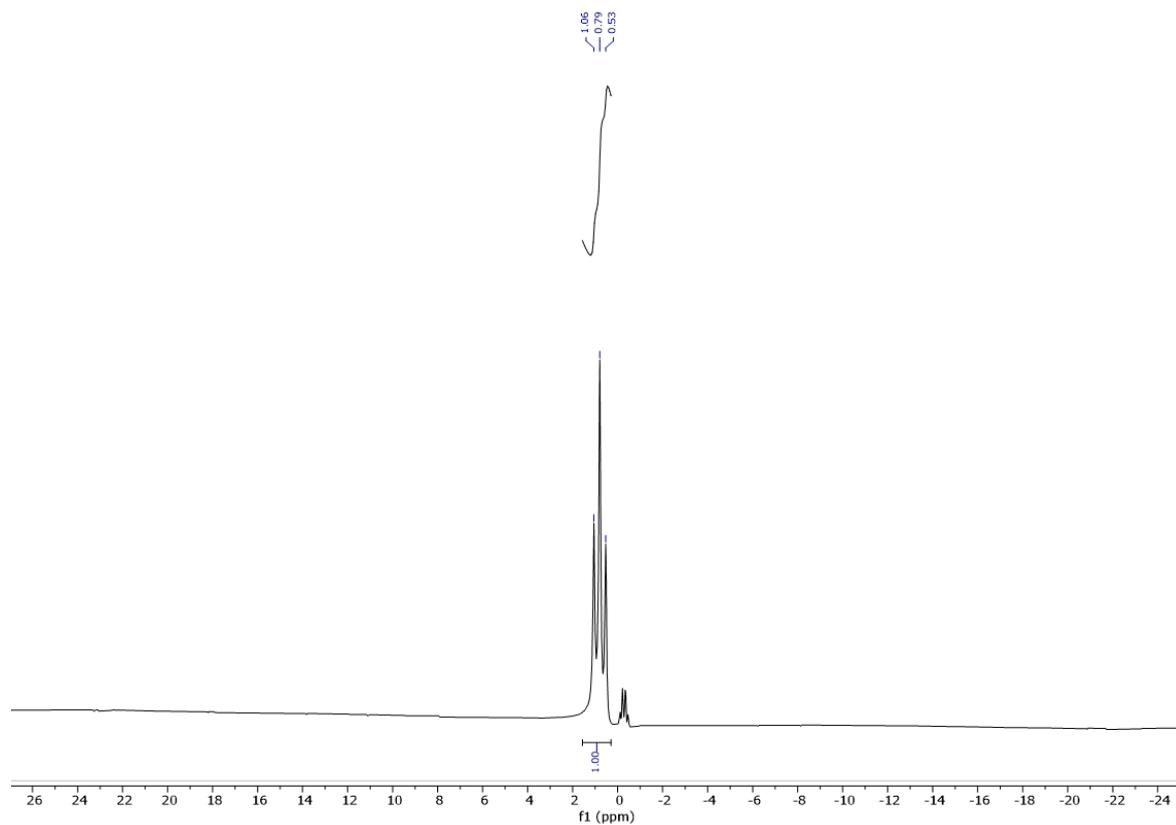
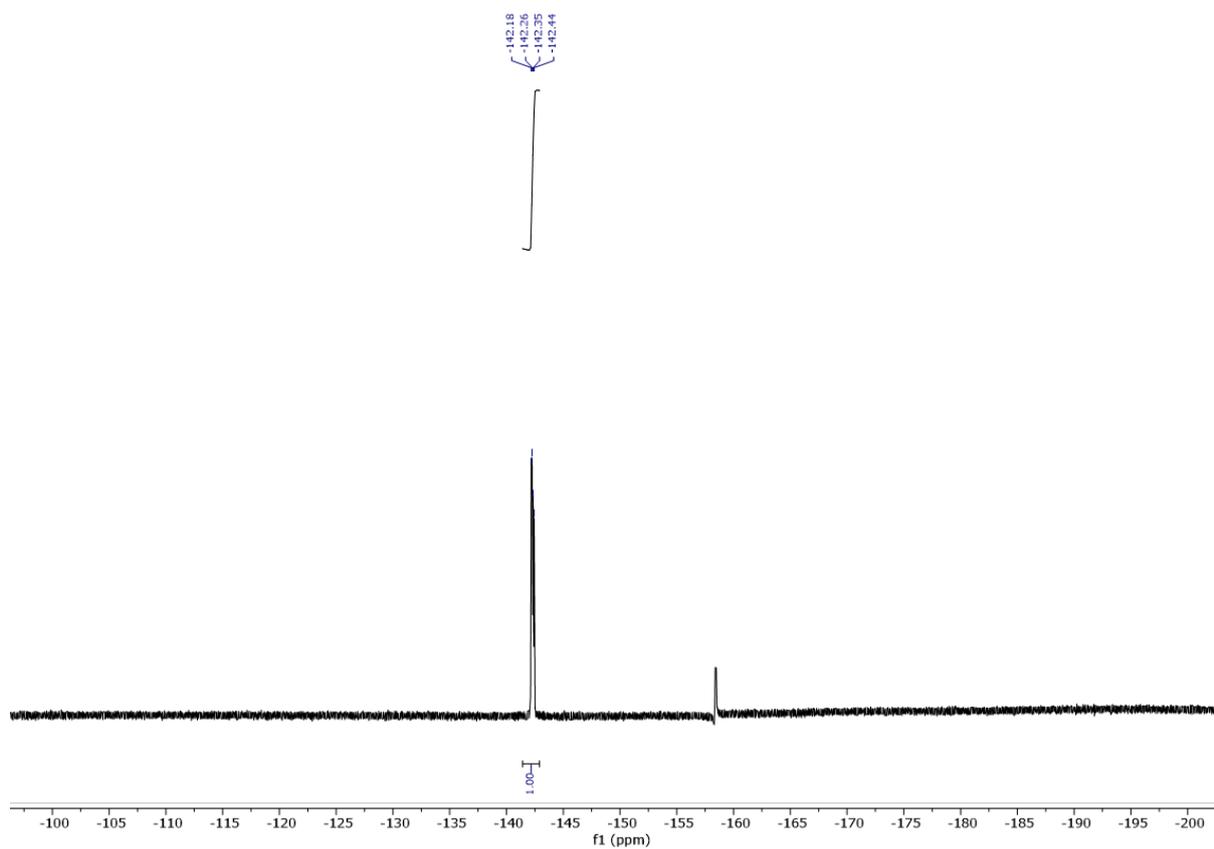
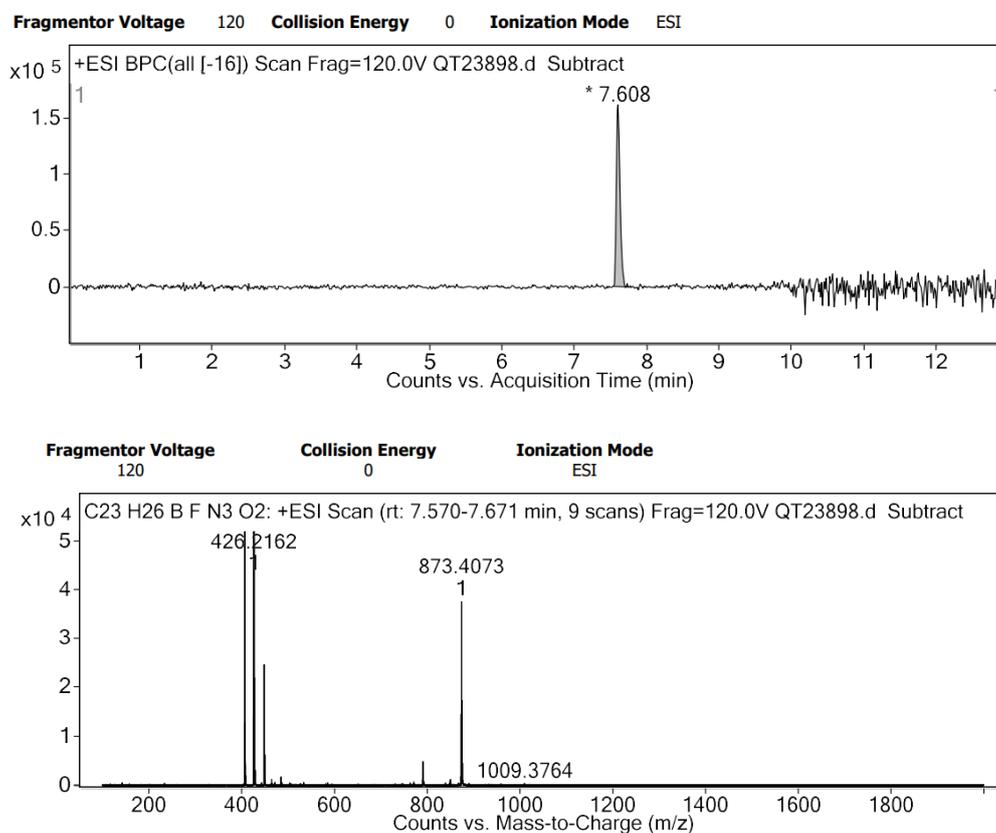
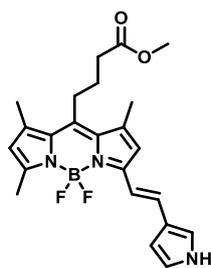


Figure VIII.58 ^1H NMR spectrum of **BODIPY-2**

Figure VIII.59 ^{13}C NMR spectrum of BODIPY-2Figure VIII.60 ^{11}B NMR spectrum of BODIPY-2

Figure VIII.61 ^{19}F NMR spectrum of **BODIPY-2**Figure VIII.62 HRMS spectrum of **BODIPY-2**



BODIPY-3. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and Pyrrole-3-carboxaldehyde (54.6 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EA : 98/2) to give **BODIPY-3** (106 mg, 43%). Rf = 0.49 (DCM/EA: 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.34 (s, 1H, NH Pyrrole), 7.31 (dt, J = 16.2, 1.9 Hz, 1H, H Alkene), 7.26 – 7.21 (m, 1H, H Alkene), 7.00 (dd, J = 2.8, 1.5 Hz, 1H, H Pyrrole), 6.78 (q, J = 2.4 Hz, 1H, H Pyrrole), 6.63 (s, 1H, ArH), 6.58 (td, J = 2.8, 1.5 Hz, 1H, H Pyrrole), 6.04 (s, 1H, ArH), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.05 – 2.96 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.54 (s, 3H, Methyl), 2.51 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.47 (s, 3H, Methyl), 2.42 (s, 3H, Methyl), 2.03 – 1.91 (m, 2H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.04 (Ester), 151.80, 142.05, 140.55, 138.25, 138.11, 132.91, 131.38, 131.09, 123.08, 121.03, 119.68, 119.65, 118.23, 115.24, 107.10, 51.70 (OMe), 34.16 (Methyl BODIPY), 27.39 (Methyl BODIPY), 26.99 (Methyl BODIPY), 16.65 (Alkyl), 16.21 (Alkyl), 10.70 (Alkyl). ^{11}B NMR (128 MHz, CDCl_3) δ 0.78 (t, J = 33.4 Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -142.84 (dd, J = 65.6, 32.2 Hz). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$ [M+H] $^+$ 426.2164, found 426.2168.

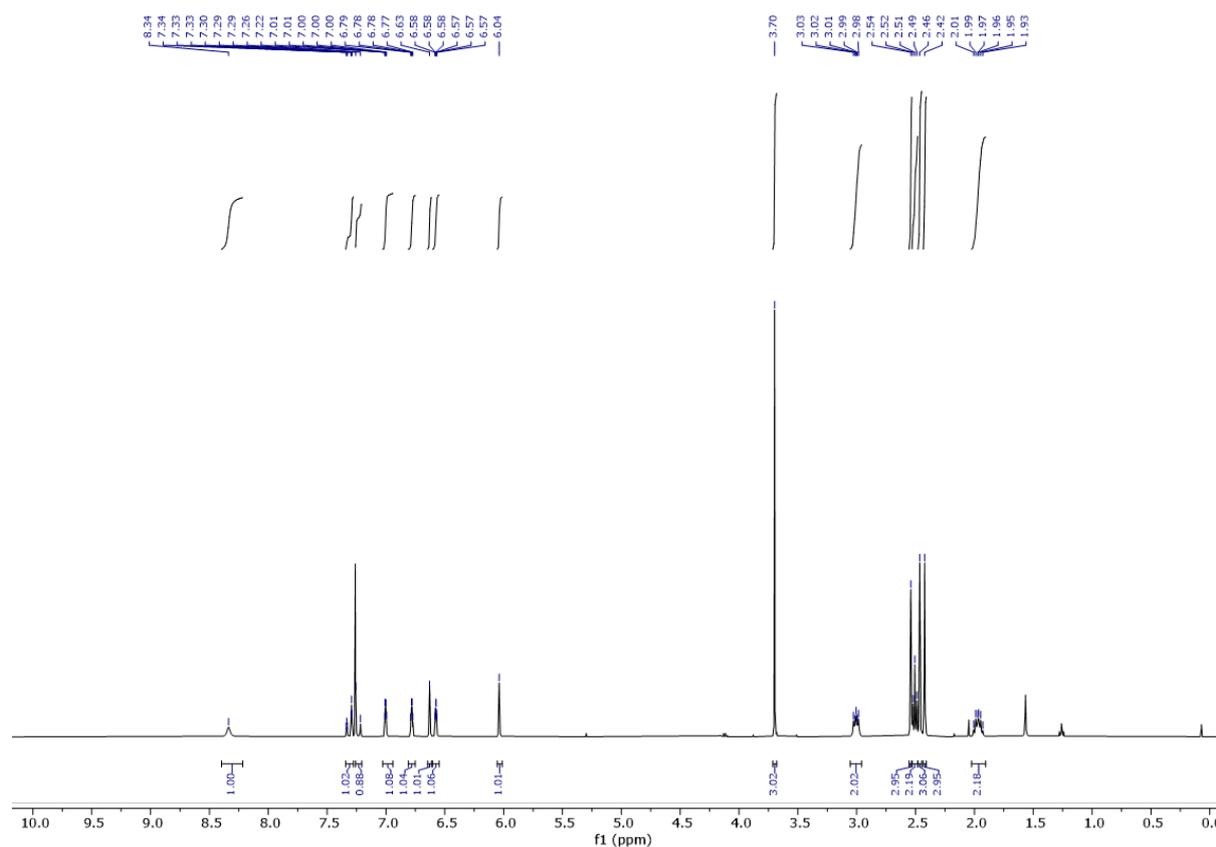
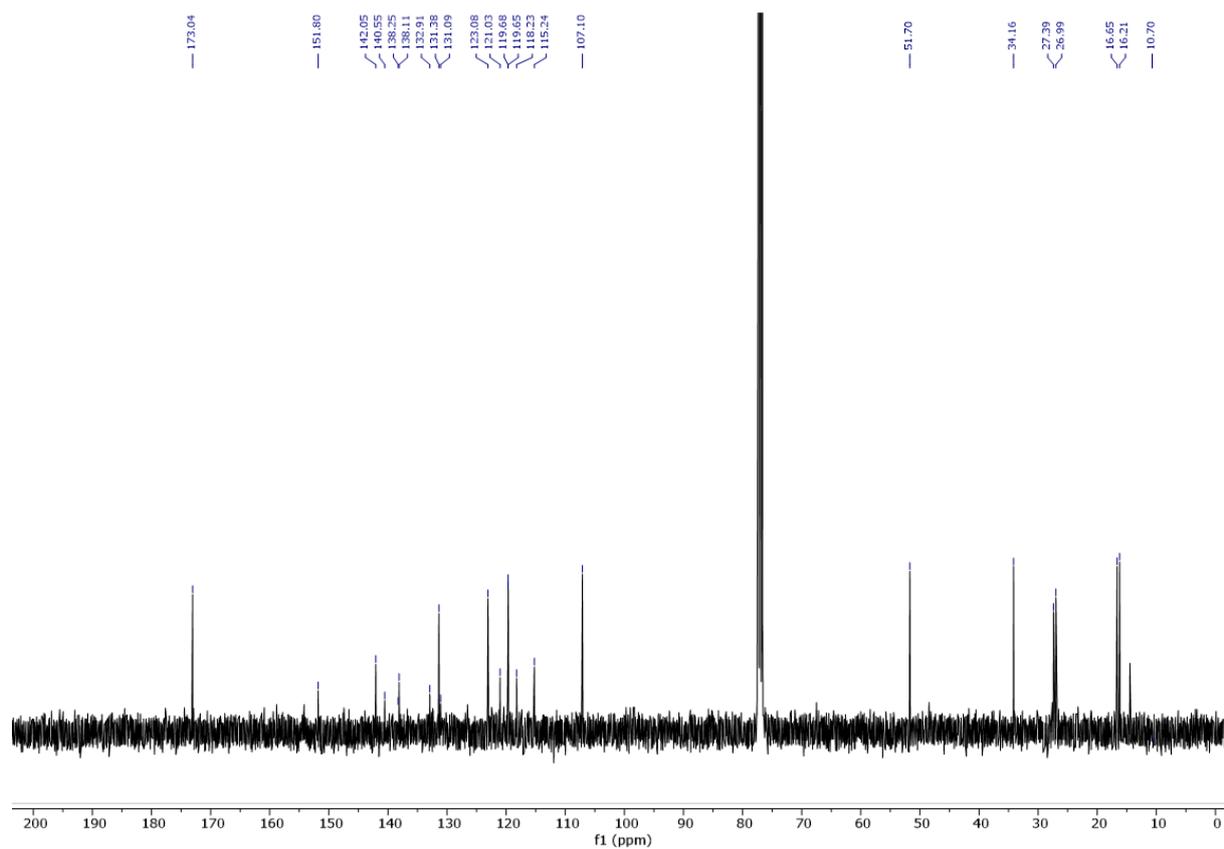
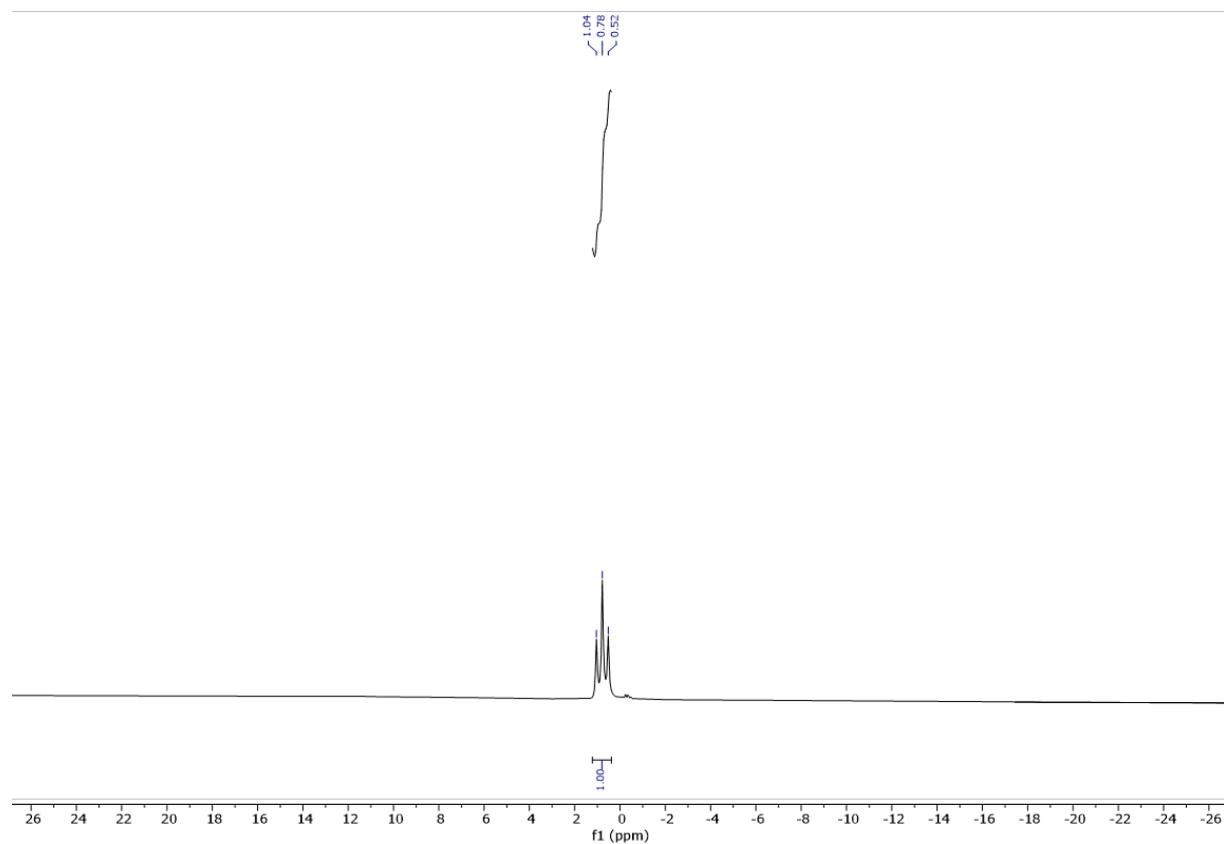
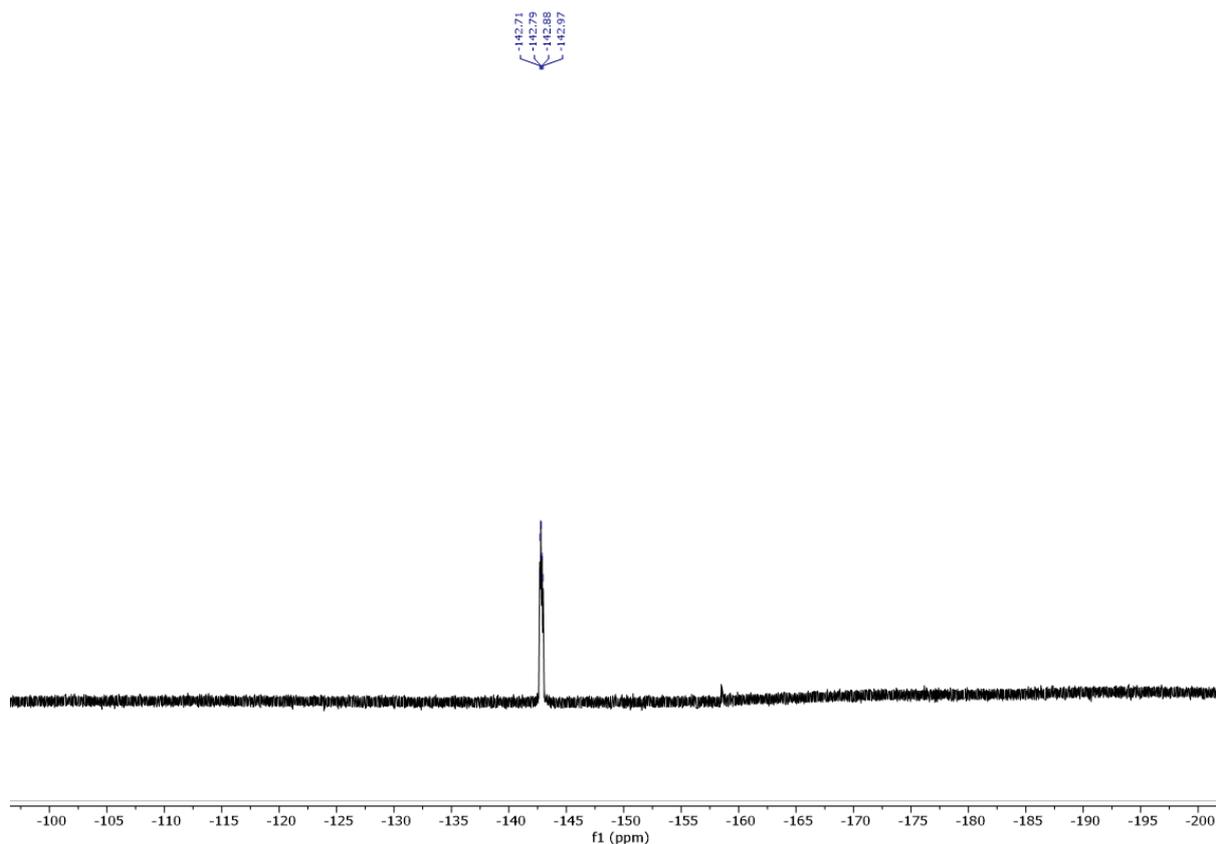
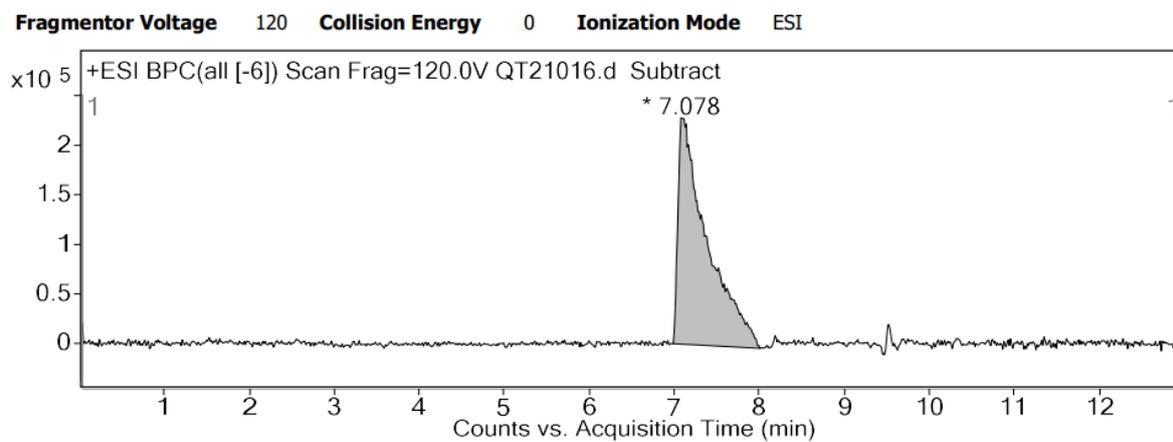
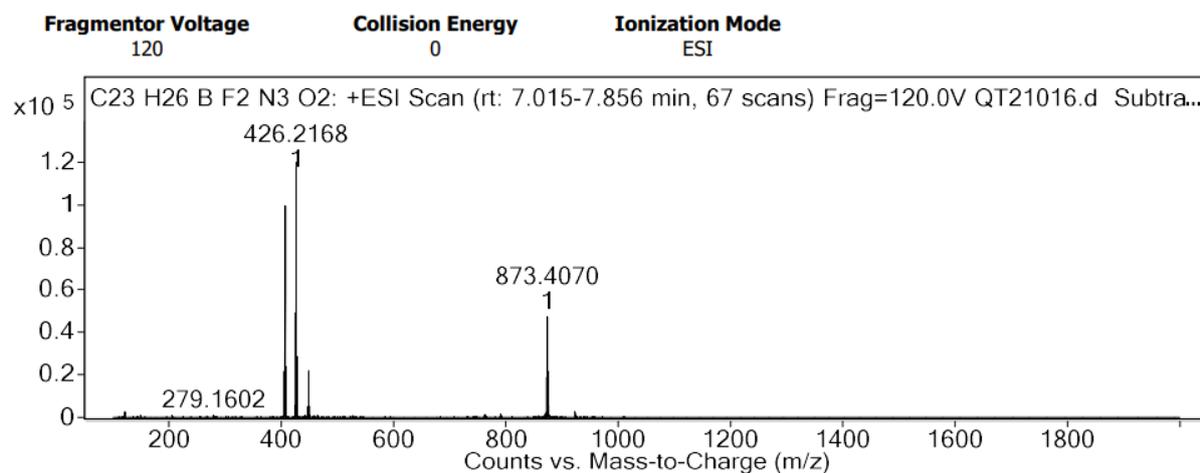
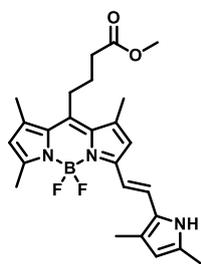


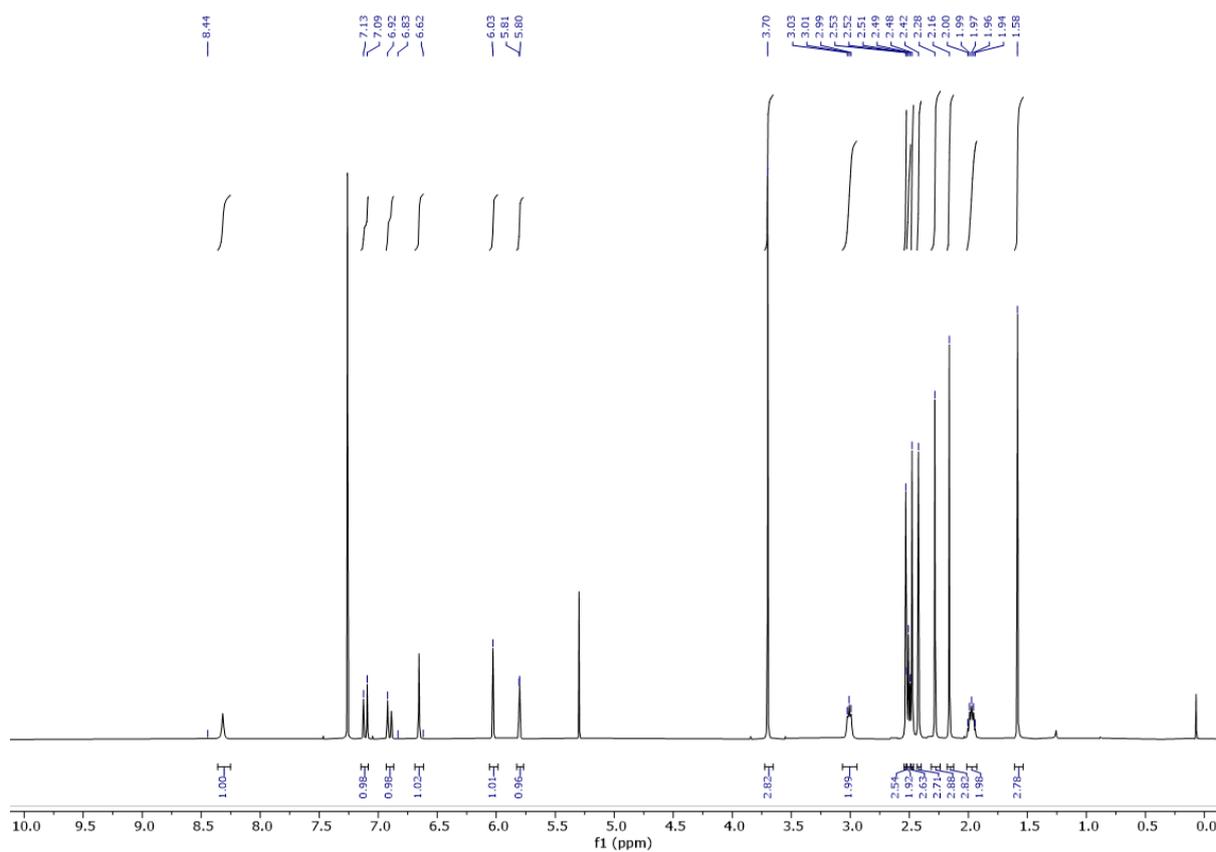
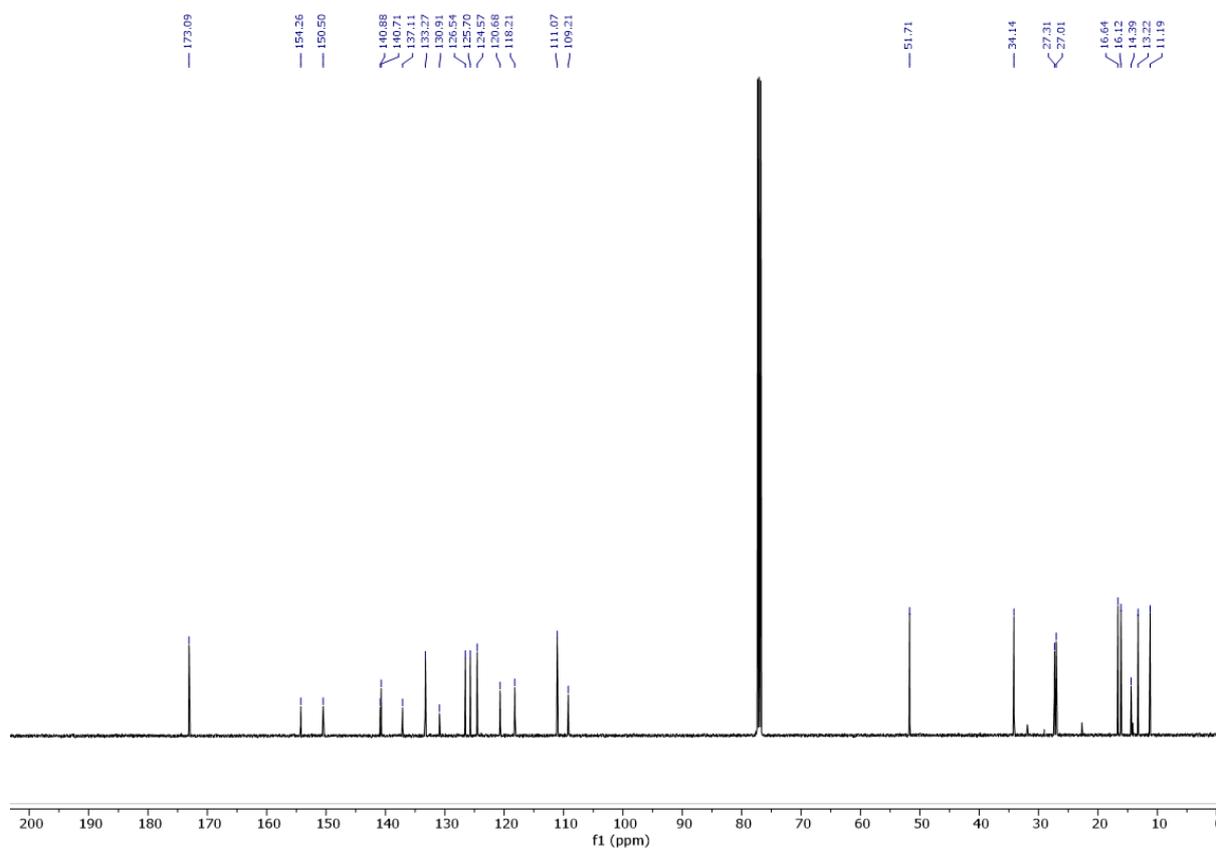
Figure VIII.63 ^1H NMR spectrum of **BODIPY-3**

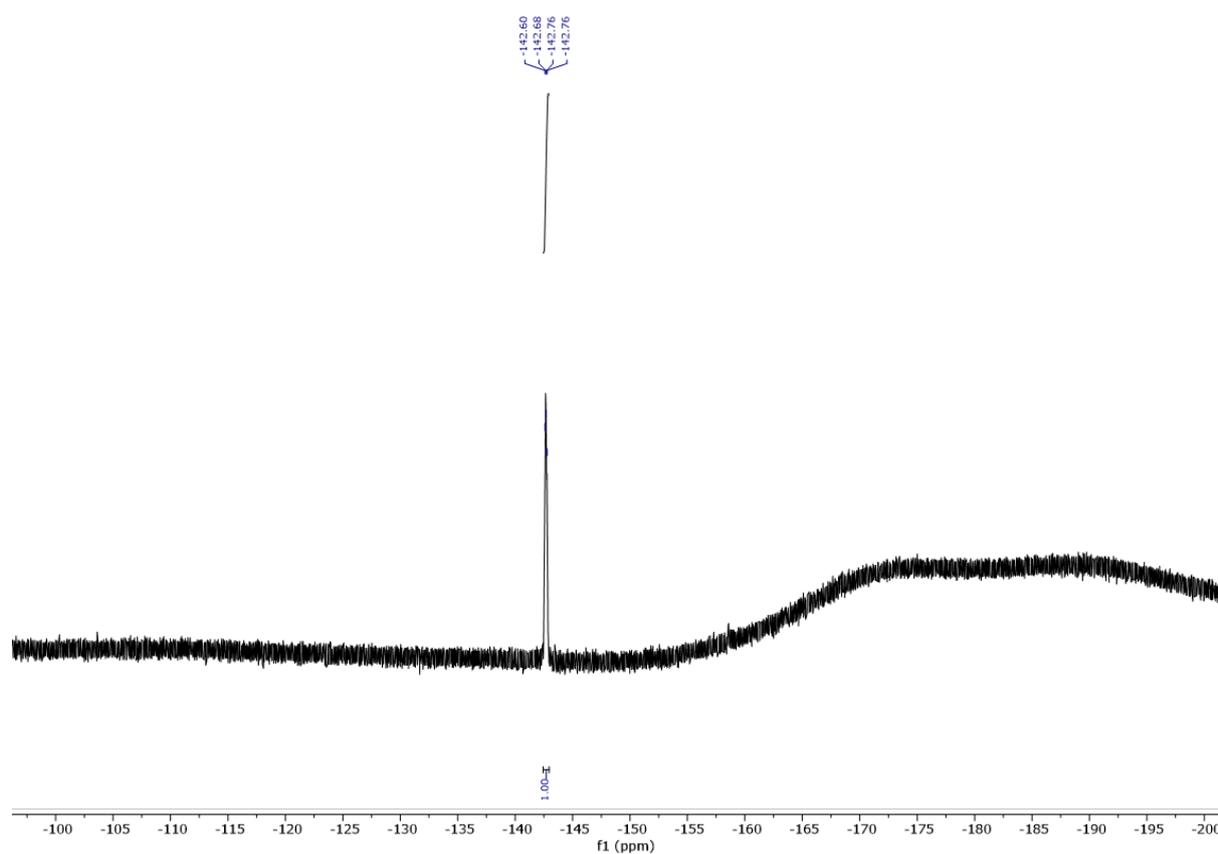
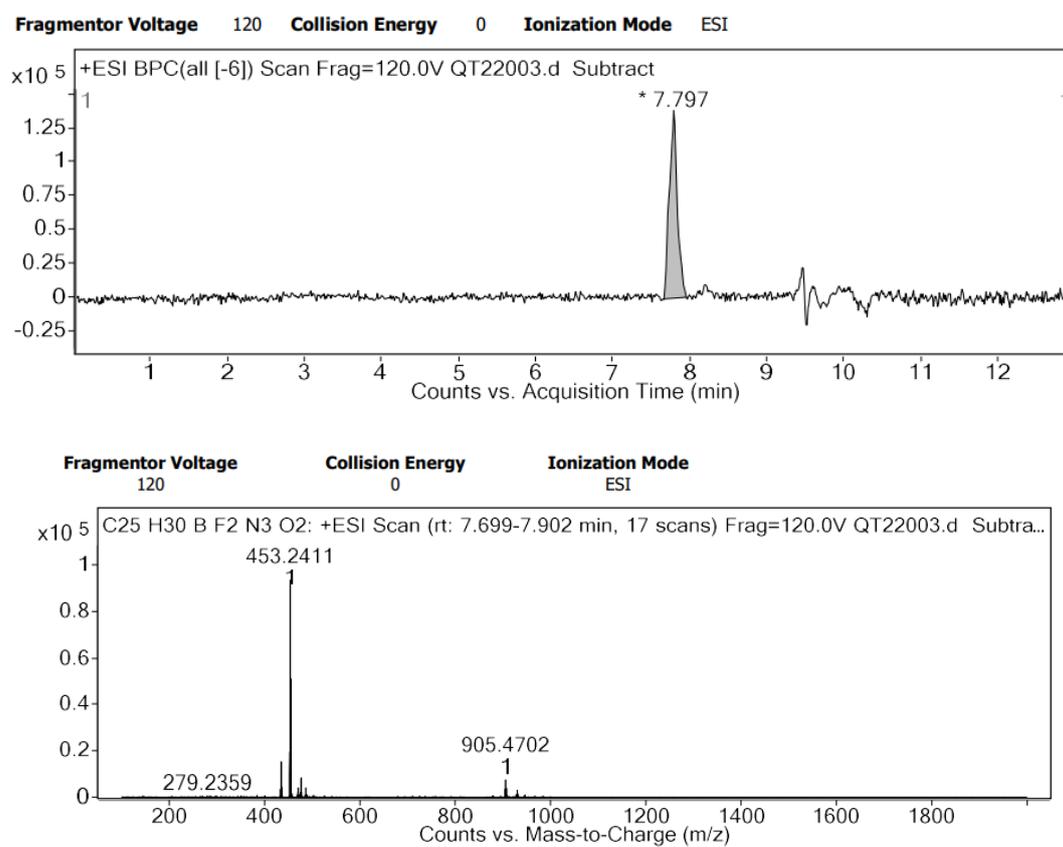
Figure VIII.64 ^{13}C NMR spectrum of BODIPY-3Figure VIII.65 ^{11}B NMR spectrum of BODIPY-3

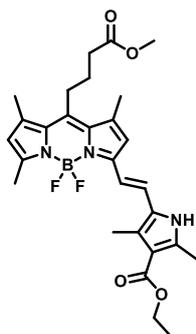
Figure VIII.66 ^{19}F NMR spectrum of **BODIPY-3**

Figure VIII.67 HRMS spectrum of **BODIPY-3**

BODIPY-2,4. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and 3,5-Dimethyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde (70.7 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to give **BODIPY-2,4** (110 mg, 42%). Rf = 0.16 (DCM). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (s, 1H, NH Pyrrole), 7.11 (d, J = 16.2 Hz, 1H, H Alkene), 6.90 (d, J = 16.3 Hz, 1H, H Alkene), 6.65 (s, 1H, ArH), 6.03 (s, 1H, ArH), 5.80 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H Pyrrole), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.01 (t, J = 8.6 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.53 (s, 3H, Methyl), 2.50 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.48 (s, 3H, Methyl), 2.42 (s, 3H, Methyl), 2.28 (s, 3H, Methyl), 2.16 (s, 3H, Methyl), 1.97 (p, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 173.09 (Ester), 154.26, 150.50, 140.88, 140.71, 137.11, 133.27, 130.91, 126.54, 125.70, 124.57, 120.68, 118.21, 111.07, 109.21, 51.71 (OMe), 34.14 (Methyl BODIPY), 27.31 (Methyl BODIPY), 27.01 (Methyl BODIPY), 16.64 (Methyl Pyrrole), 16.12 (Methyl Pyrrole), 14.39 (Alkyl), 13.22 (Alkyl), 11.19 (Alkyl). ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl_3) δ -142.45 – -142.93 (m). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 453.2399, found 453.2411.

Figure VIII.68 ^1H NMR spectrum of **BODIPY-2,4**Figure VIII.69 ^{13}C NMR spectrum of **BODIPY-2,4**

Figure VIII.70 ^{19}F NMR spectrum of **BODIPY-2,4**Figure VIII.71 HRMS spectrum of **BODIPY-2,4**



BODIPY-Ester. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and Ethyl 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylate (112.1 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc : 6/4) to give **BODIPY-Ester** (94 mg, 31%). Rf = 0.16 (Heptane/EtOAc : 6/4). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.65 (s, 1H, NH Pyrrole), 7.13 (d, J = 16.3 Hz, 1H, H Alkene), 6.98 (d, J = 16.4 Hz, 1H, H Alkene), 6.66 (s, 1H, ArH), 6.06 (s, 1H, ArH), 4.29 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2 Ethyl), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.06 – 2.99 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.55 (s, 3H, Methyl), 2.54 – 2.50 (m, 5H, Methyl and CH_2 Alkyl), 2.49 (s, 3H, Methyl), 2.44 (s, 3H, Methyl), 2.36 (s, 3H, Methyl), 1.98 (p, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3 Ethyl). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 173.02 (Ester), 165.63 (Ester Pyrrole), 153.08, 151.90, 141.84, 140.67, 139.91, 138.45, 133.06, 131.27, 126.07, 125.92, 123.42, 121.24, 118.04, 113.12, 111.38, 59.33 (OEt), 51.73 (OMe), 34.11 (Methyl BODIPY), 27.37 (Methyl BODIPY), 26.95 (Methyl BODIPY), 16.58 (Methyl Pyrrole), 16.19 (Methyl Pyrrole), 14.49 (OEt), 14.43 (Alkyl), 14.04 (Alkyl), 11.16 (Alkyl). ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl_3) δ -142.35. HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$ [M+H] $^+$ 526.2689, found 526.2682.

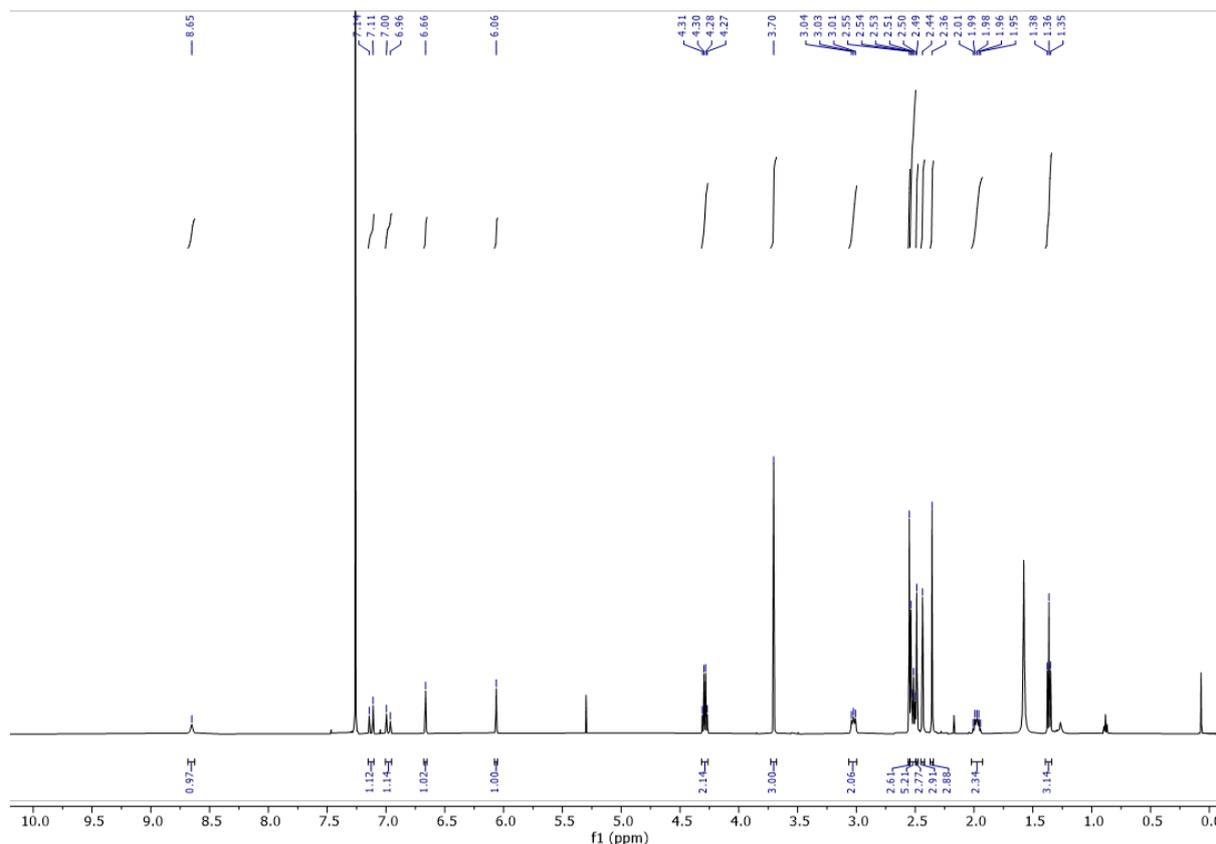
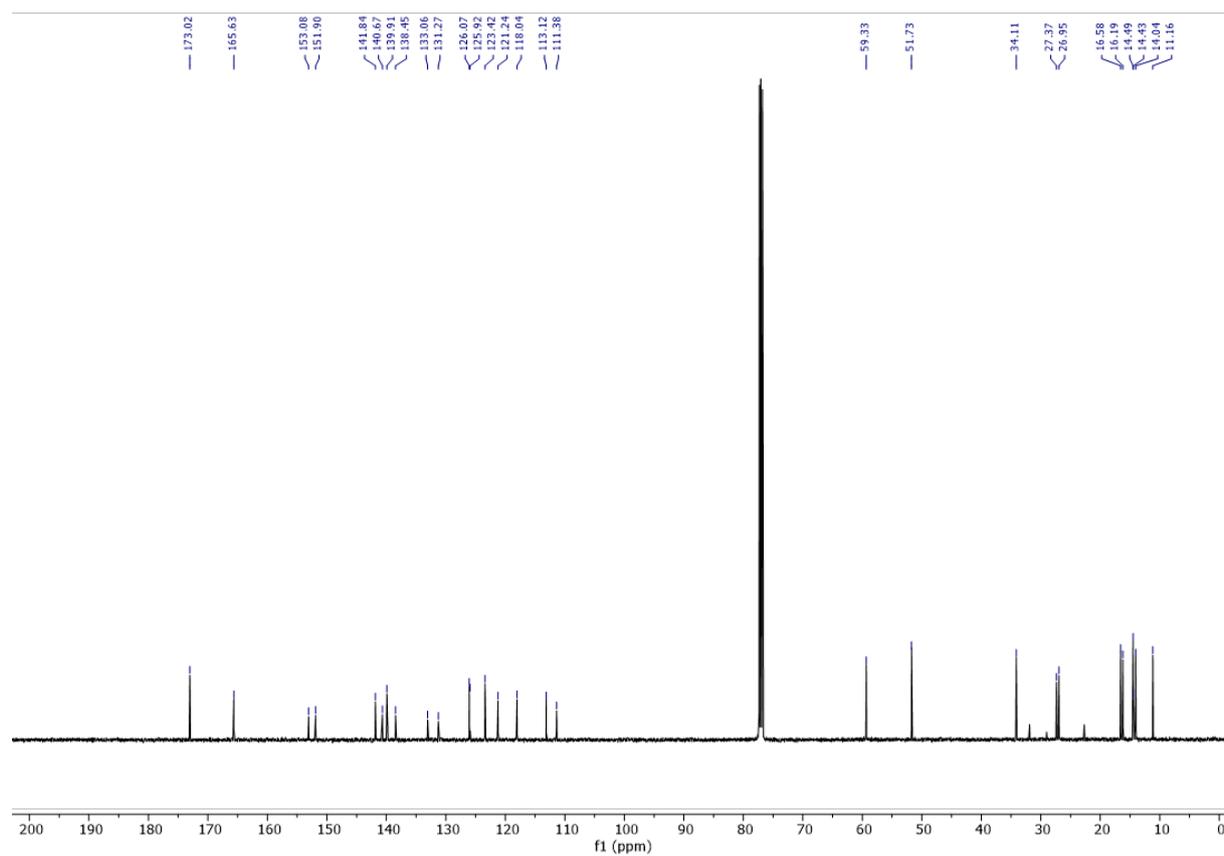
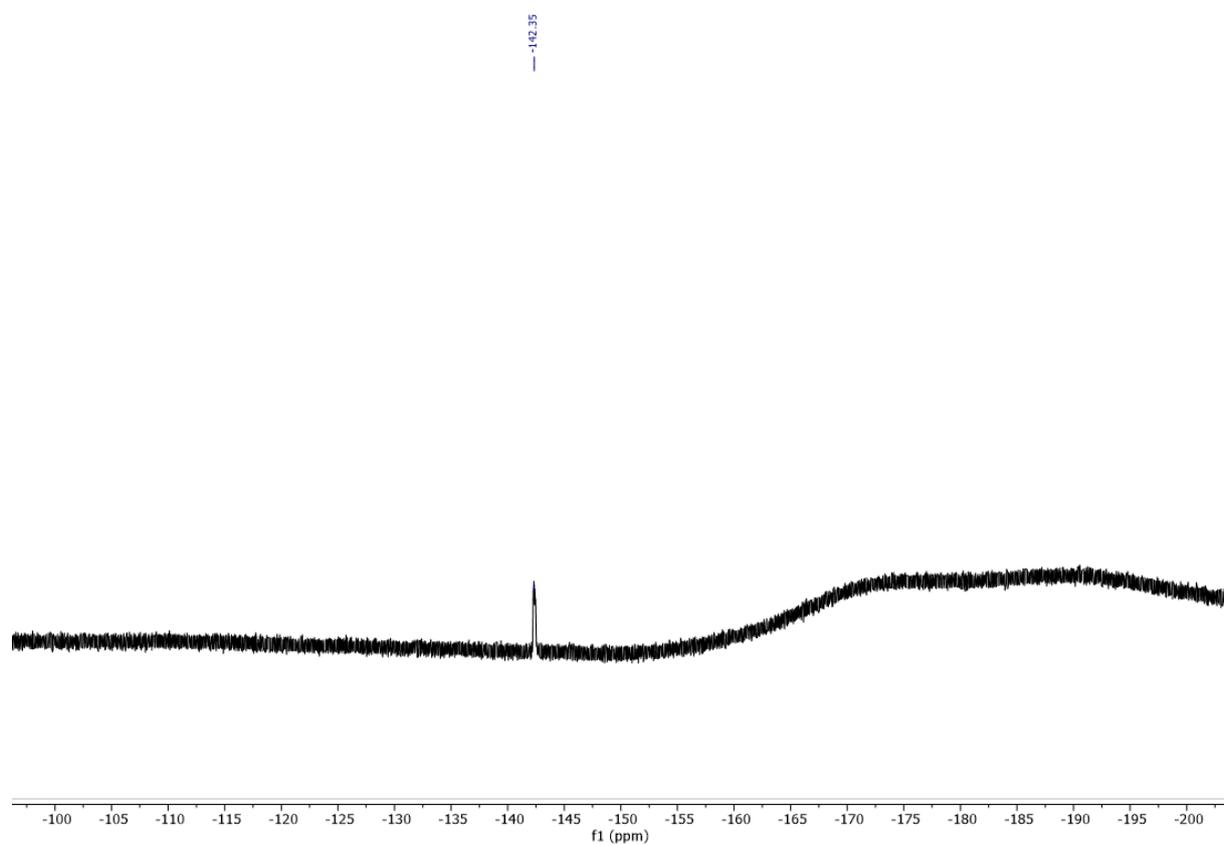
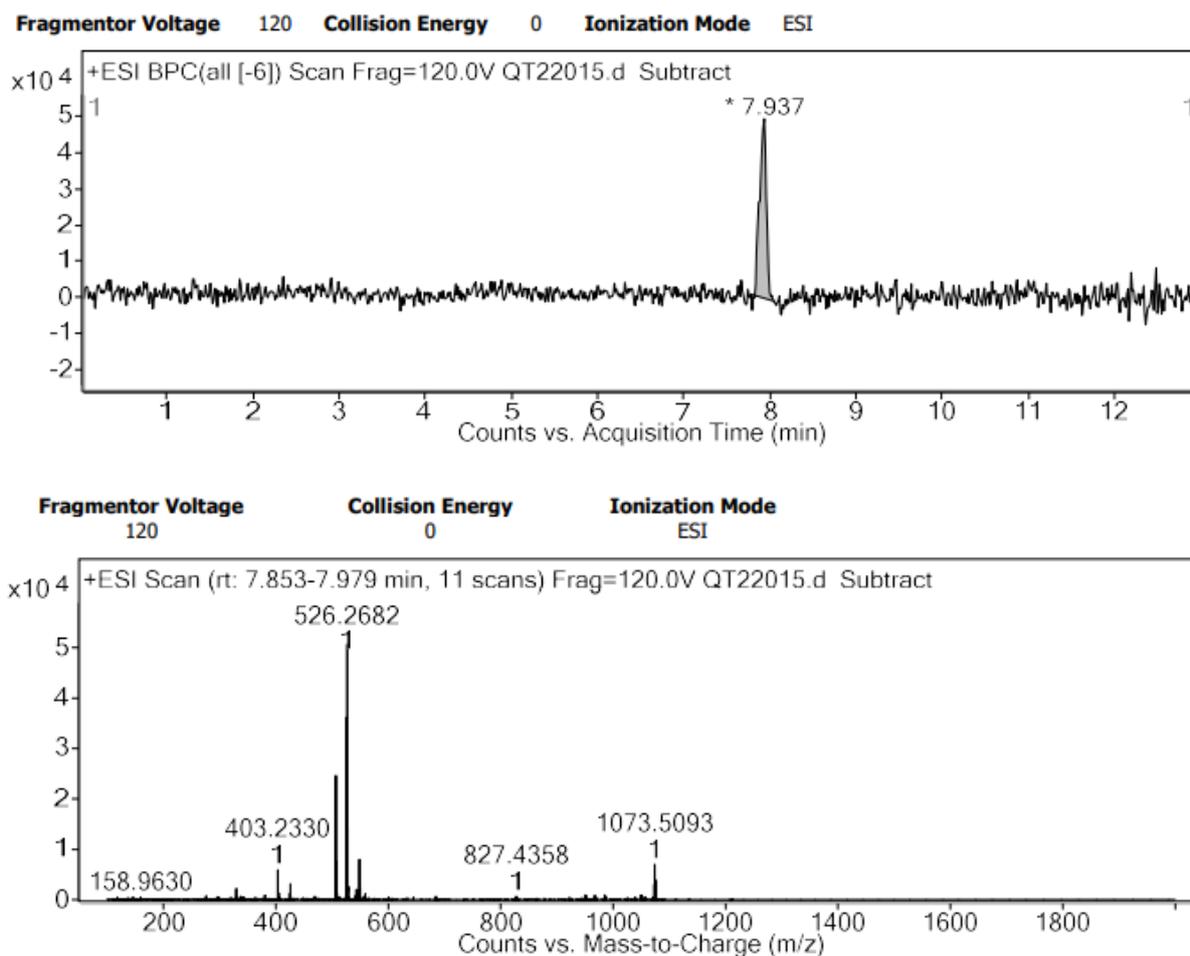
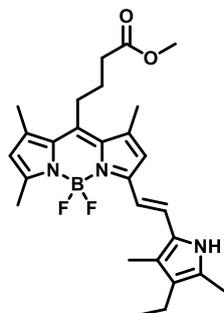
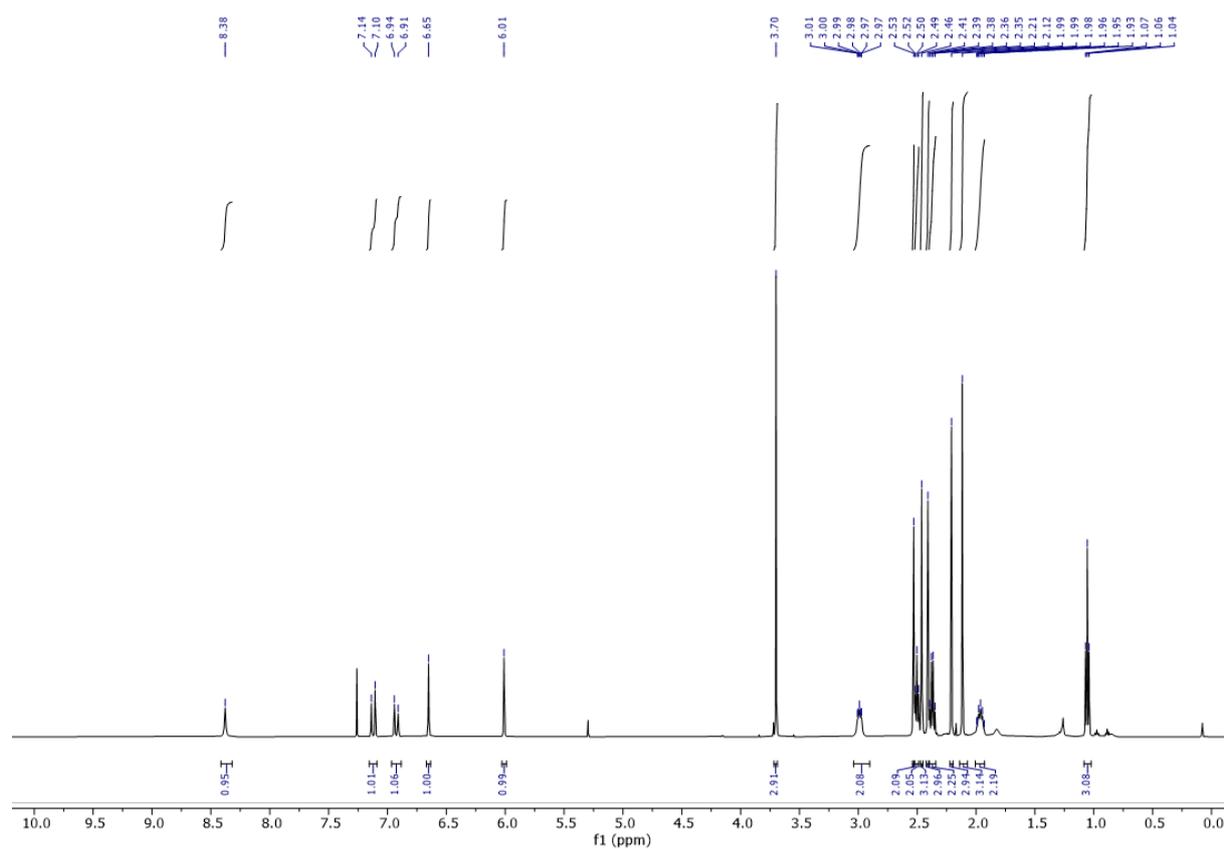
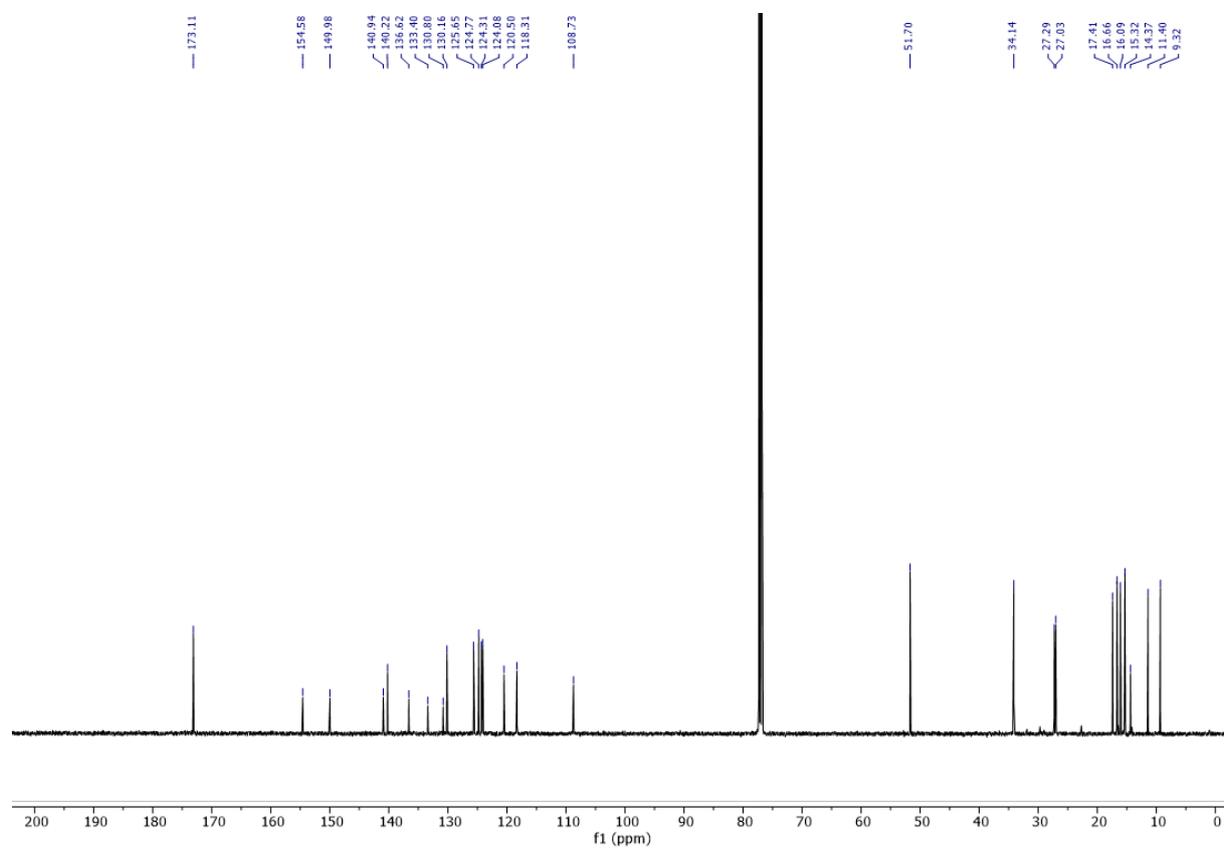


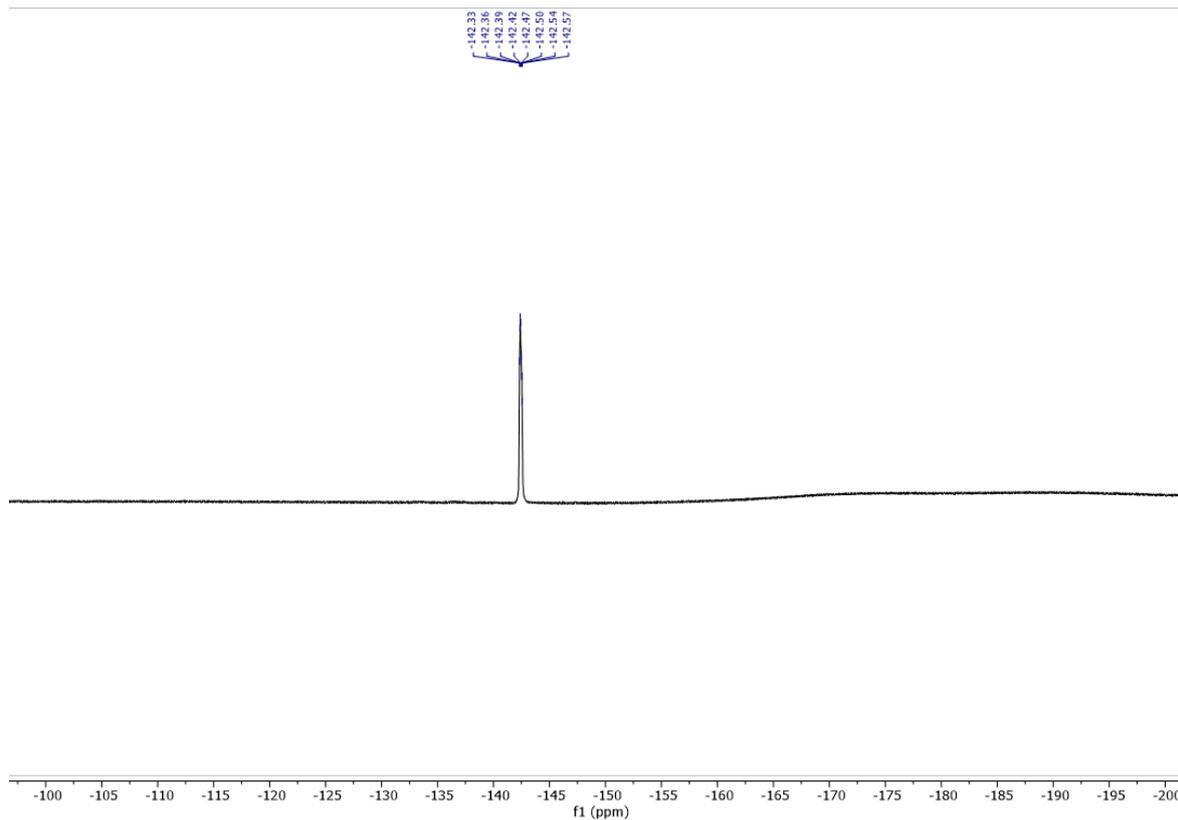
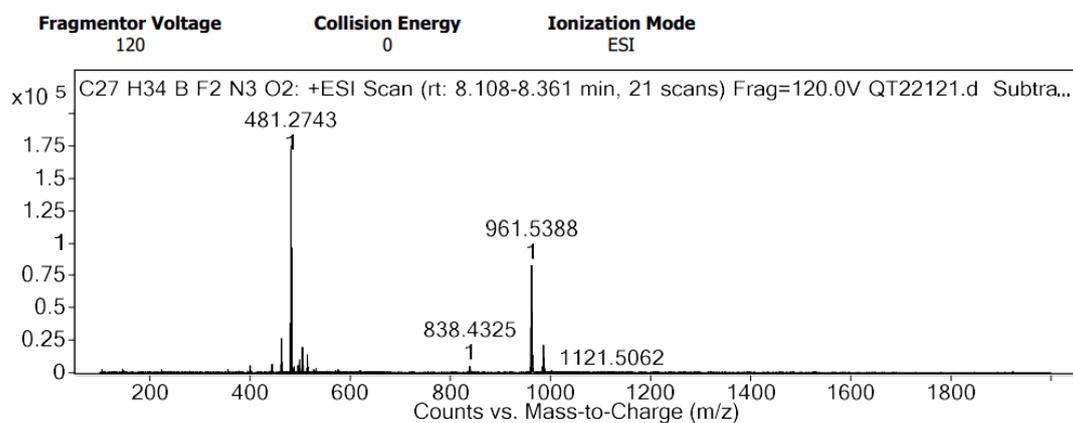
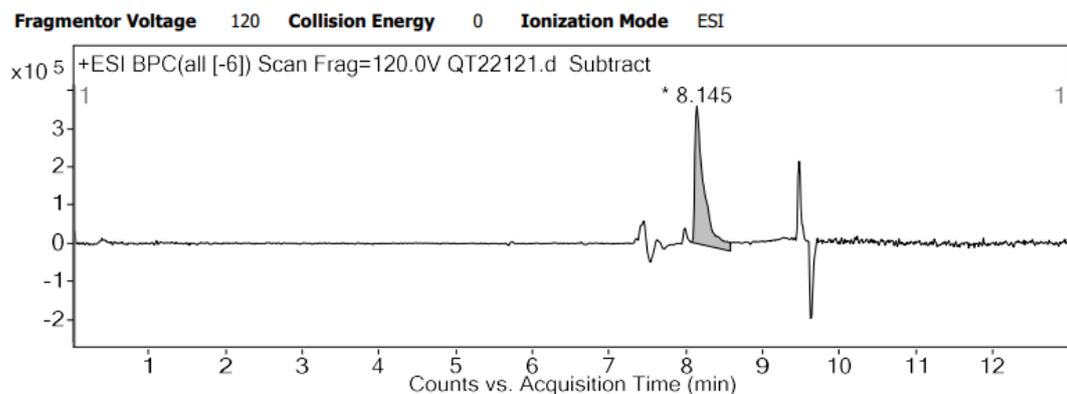
Figure VIII.72 ^1H NMR spectrum of **BODIPY-Ester**

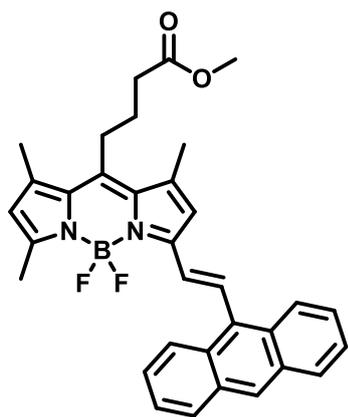
Figure VIII.73 ^{13}C NMR spectrum of BODIPY-EsterFigure VIII.74 ^{19}F NMR spectrum of BODIPY-Ester

Figure VIII.75 HRMS spectrum of **BODIPY-Ester**

BODIPY-Crypto. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and 4-Ethyl-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde (86.7 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/Heptane : 2/8) to give **BODIPY-Crypto** (11 mg, 4%). Rf = 0.5 (DCM/Heptane : 5/5). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (s, 1H, NH Pyrrole), 7.12 (d, J = 16.1 Hz, 1H, Alkene), 6.92 (d, J = 16.1 Hz, 1H, Alkene), 6.65 (s, 1H, ArH), 6.04 (s, 1H, ArH), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.01 – 2.97 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.53 (s, 3H, Methyl), 2.50 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.46 (s, 3H, Methyl), 2.41 (s, 3H, Methyl), 2.37 (q, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2 Ethyl), 2.21 (s, 3H, Methyl), 2.11 (s, 3H, Methyl), 1.96 (p, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 1.06 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH_3 Ethyl). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 173.11 (Ester), 154.58, 149.98, 140.94, 140.22, 136.62, 133.40, 130.80, 130.16, 125.65, 124.77, 124.31, 124.08, 120.50, 118.31, 108.73, 51.70 (OMe), 34.14 (Methyl BODIPY), 27.29 (Methyl BODIPY), 27.03 (Methyl BODIPY), 17.41 (Ethyl Pyrrole), 16.66 (Methyl Pyrrole), 16.09 (Methyl Pyrrole), 15.32 (Ethyl Pyrrole), 14.37 (Alkyl), 11.40 (Alkyl), 9.32 (Alkyl). ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl_3) δ -142.45 (ddd, J = 70.6, 31.6, 14.0 Hz). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 481.2712, found 481.2743.

Figure VIII.76 ^1H NMR spectrum of *BODIPY-Crypto*Figure VIII.77 ^{13}C NMR spectrum of *BODIPY-Crypto*

Figure VIII.78 ^{19}F NMR spectrum of **BODIPY-Crypto**Figure VIII.79 HRMS spectrum of **BODIPY-Crypto**



BODIPY-Anthra. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and 9-Anthraldehyde (118.4 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel from (Heptane/EtOAc : 9/1) to (Heptane/EtOAc : 6/4) to give **BODIPY-Anthra** (9 mg, 3%). Rf = 0.5 (Heptane/EtOAc : 6/4). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.43 – 8.34 (m, 3H, H Anthracene), 8.14 (d, J = 16.6 Hz, 1H, Alkene), 8.03 – 7.98 (m, 2H, H Anthracene), 7.58 (d, J = 16.8 Hz, 1H, Alkene), 7.53 – 7.45 (m, 4H, H Anthracene), 6.94 (s, 1H, ArH), 6.09 (s, 1H, Arh), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.07 (dd, J = 10.9, 6.3 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.58 – 2.52 (m, 5H, CH_2 Alkyl and Methyl), 2.48 (s, 3H, Methyl), 2.46 (s, 3H, Methyl), 2.07 – 1.97 (m, 2H, CH_2 Alkyl). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -141.43 – -143.59 (m). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 559,2344 found 559.2342.

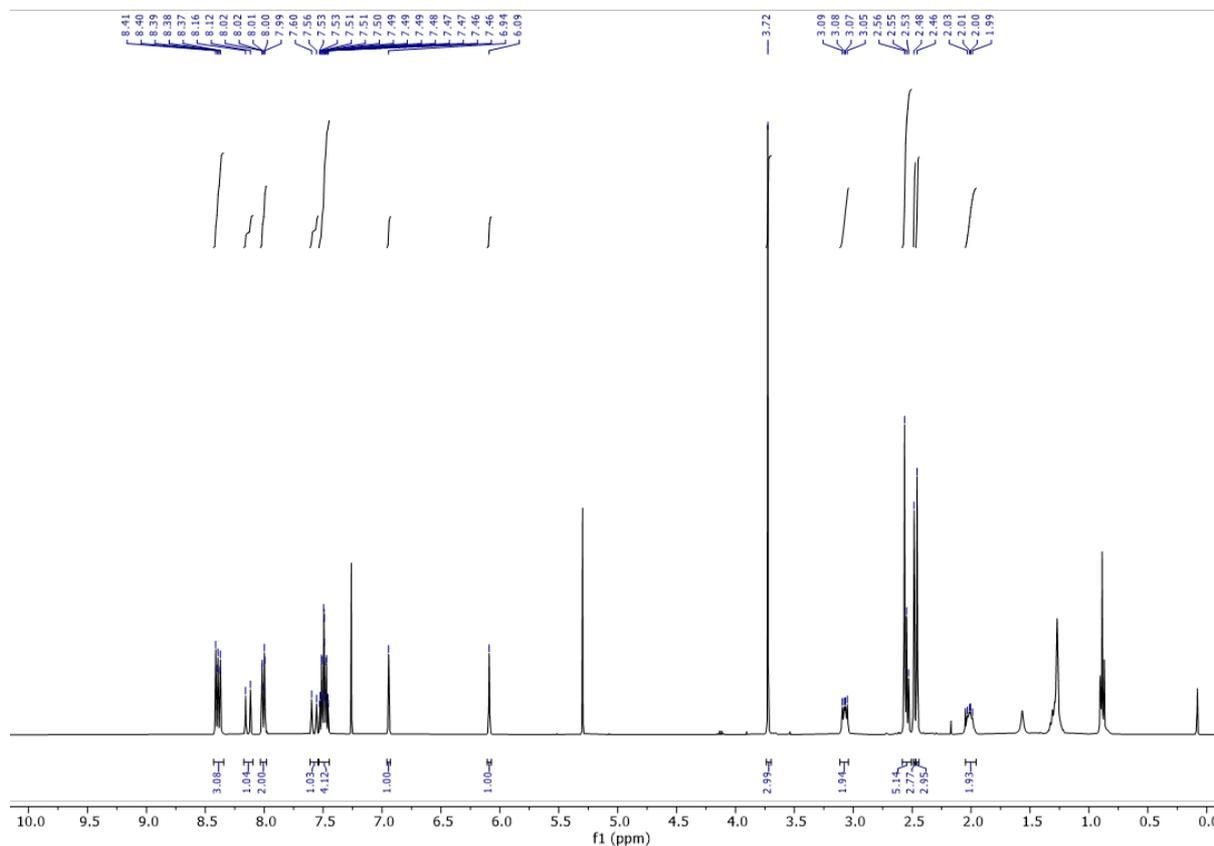
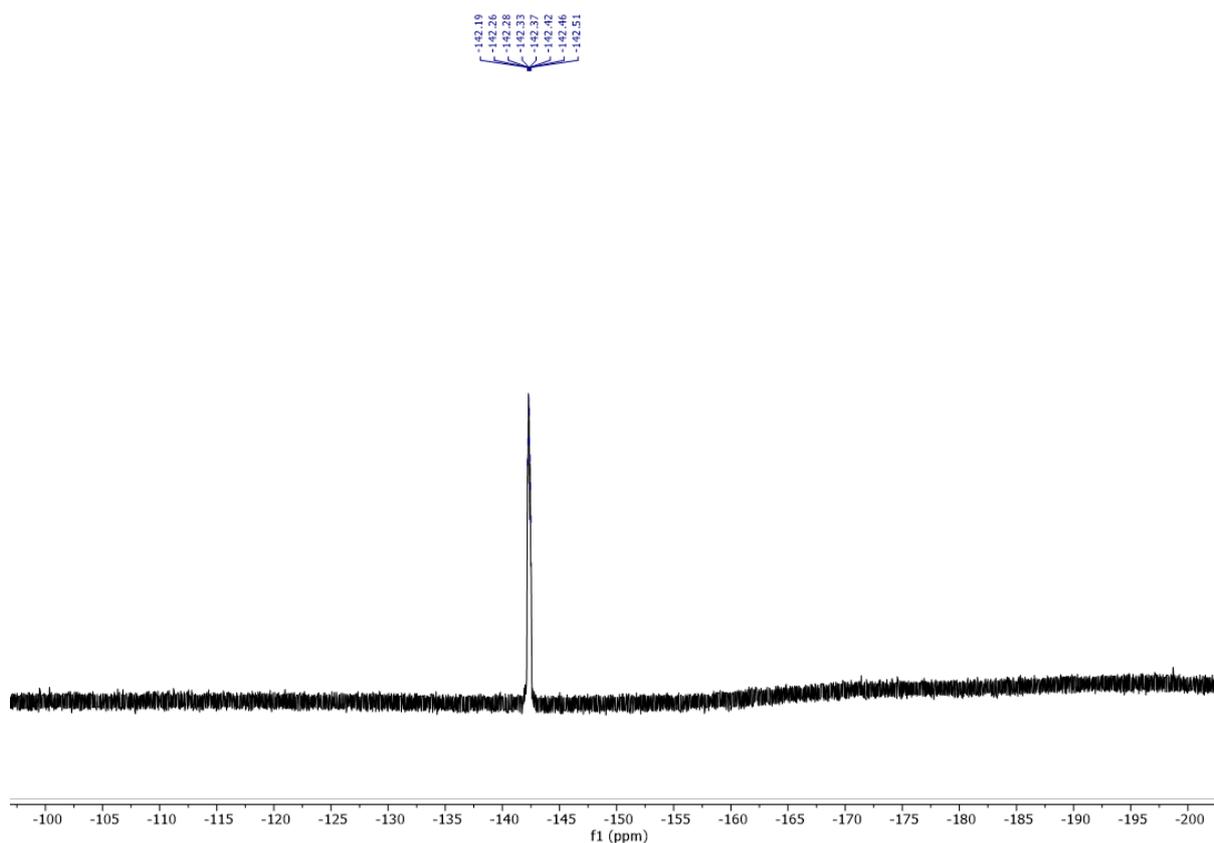
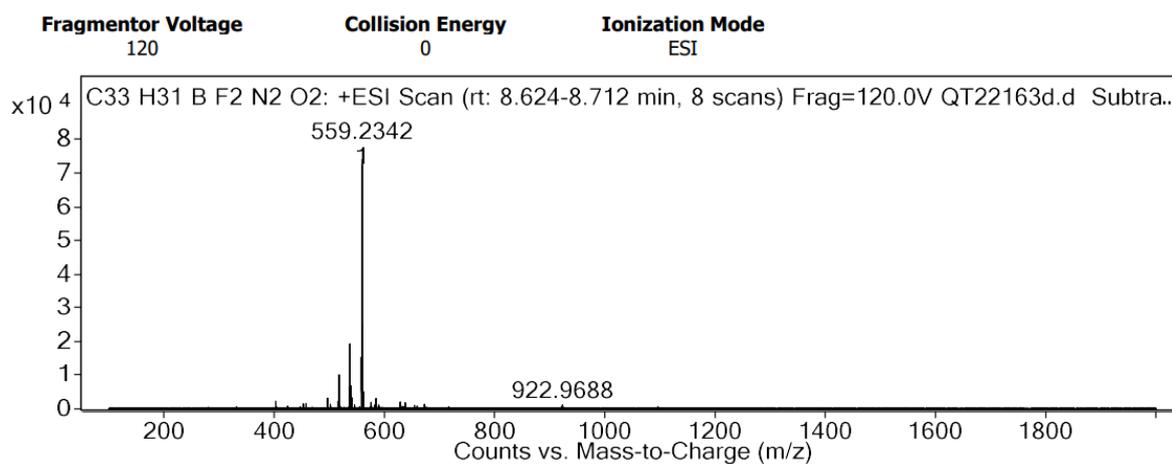
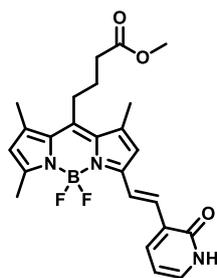


Figure VIII.80 ^1H NMR spectrum of **BODIPY-Anthra**

Figure VIII.81 ^{19}F NMR spectrum of **BODIPY-Anthra**Figure VIII.82 HRMS spectrum of **BODIPY-Anthra**

BODIPY-Pyri. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and 1,2-Dihydro-2-oxo-3-pyridinecarboxaldehyde (70 mg, 574 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel from (DCM/MeOH : 98/2) to (DCM/MeOH : 9/1) to give **BODIPY-Pyri** (23 mg, 9%). R_f = 0.5 (DCM/MeOH : 9/1). ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.90 (s, 1H, H Lactame), 8.04 (d, J = 16.1 Hz, 1H, Alkene), 7.69 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.44 (s, 1H, ArH), 7.37 (d, J = 16.3 Hz, 1H, Alkene), 6.97 (s, 1H, ArH),

6.33 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, ArH), 6.27 (s, 1H, ArH), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.01 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H, CH₂ Alkyl), 1.89 – 1.80 (m, 2H, CH₂ Alkyl). 3 methyls and one alkyl are missing, might be in DMSO's peak. HRMS (ESI+) calculated for C₂₄H₂₆BF₂N₃O₃Na [M+Na]⁺ 476.1933 found 476.1934.

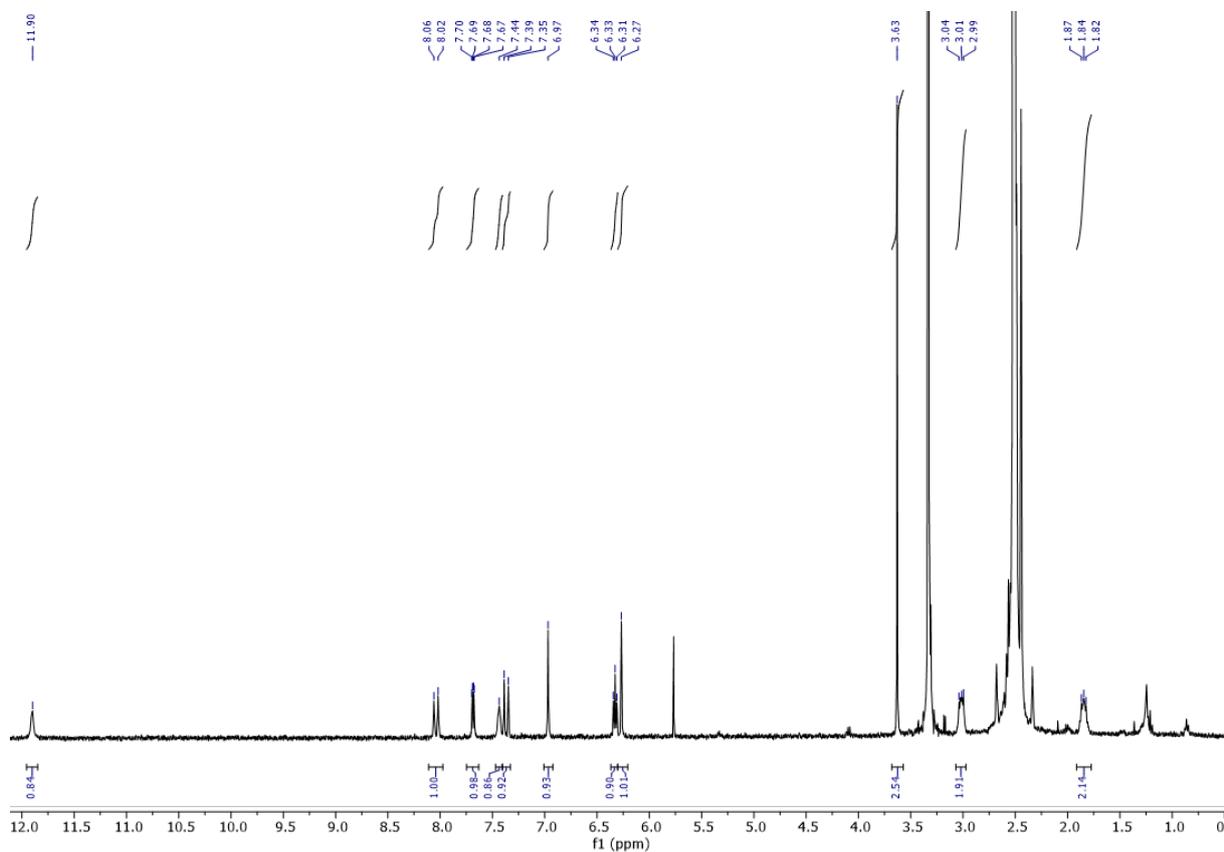
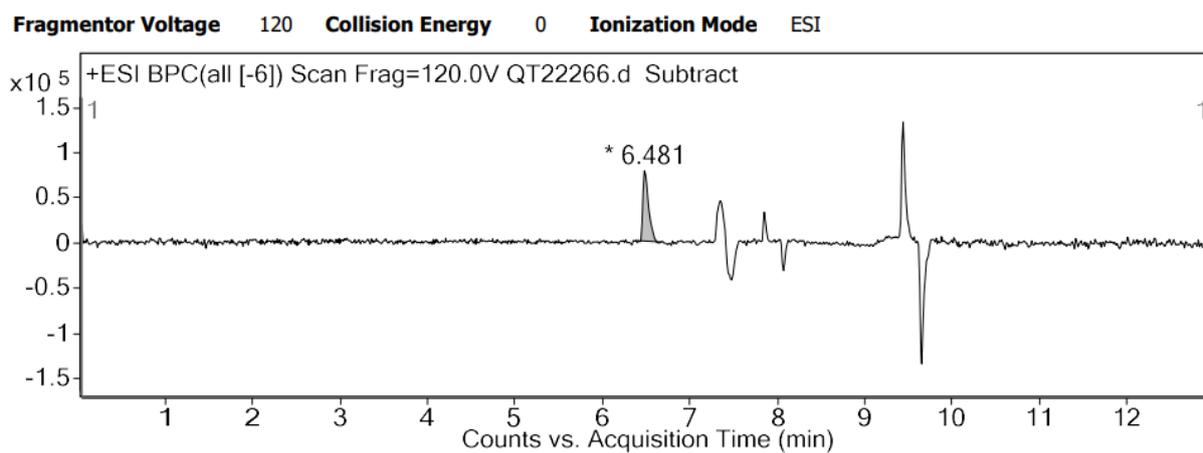
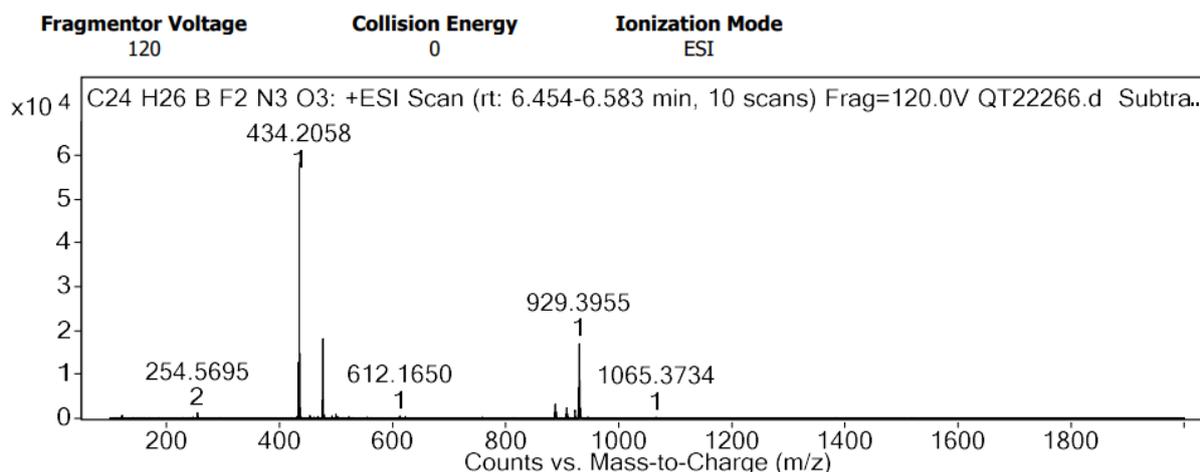
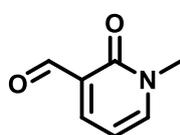
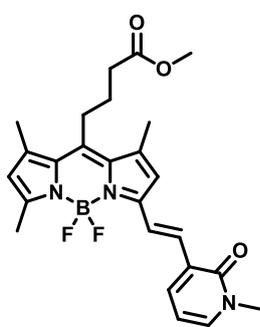


Figure VIII.83 ¹H NMR spectrum of **BODIPY-Pyri**

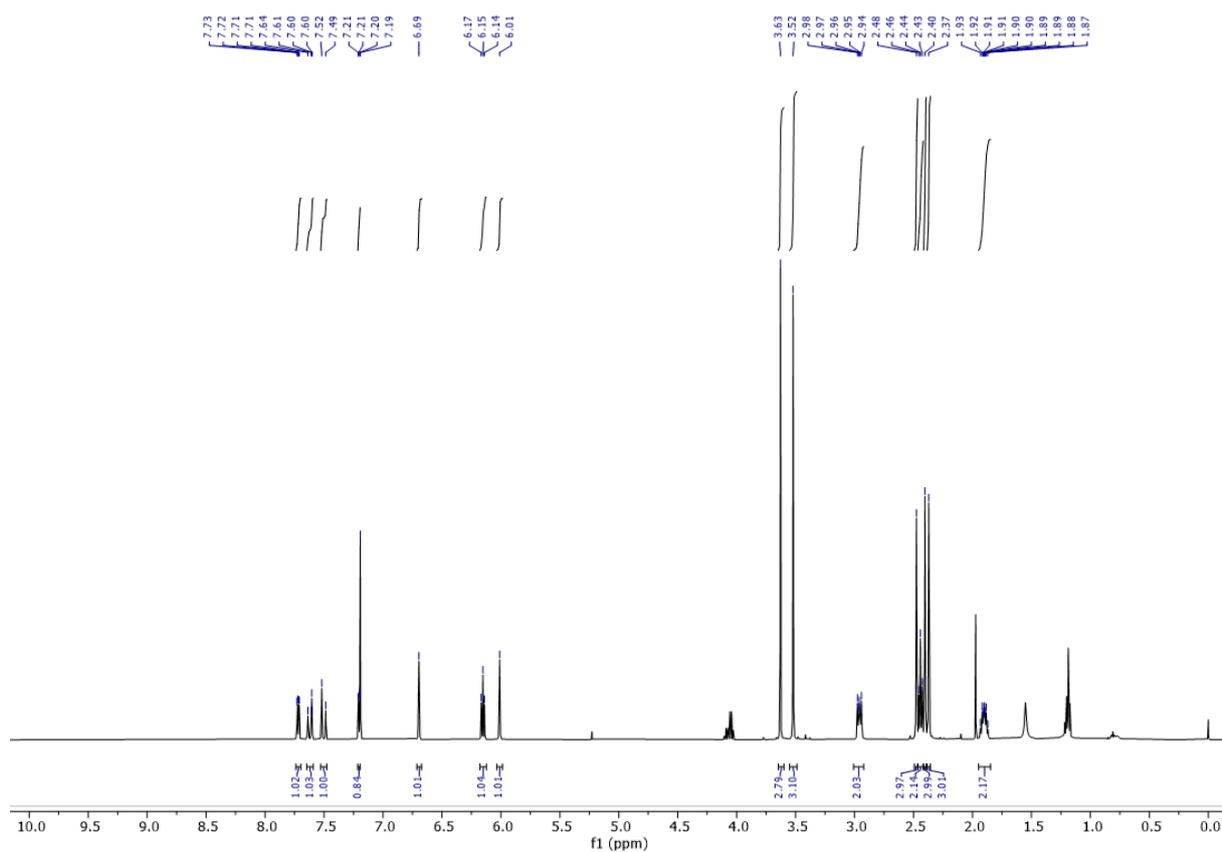
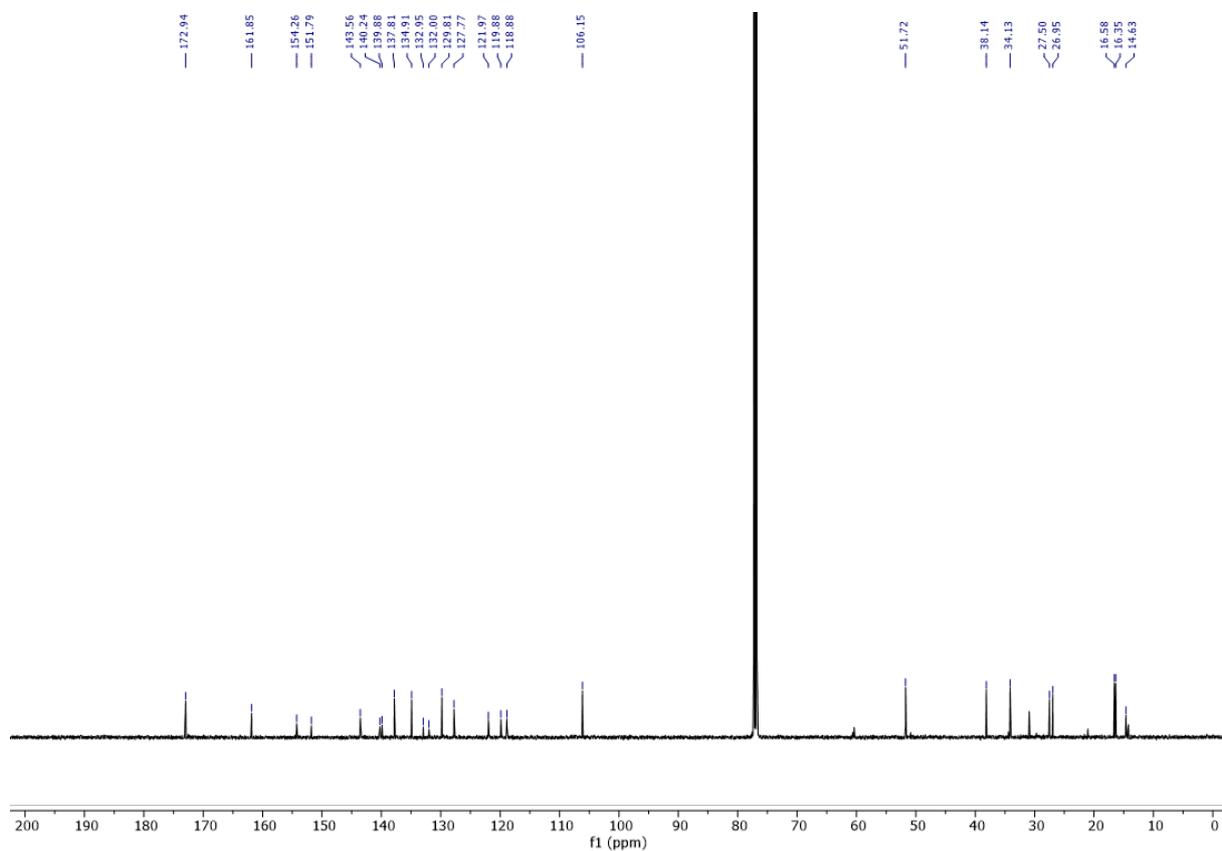


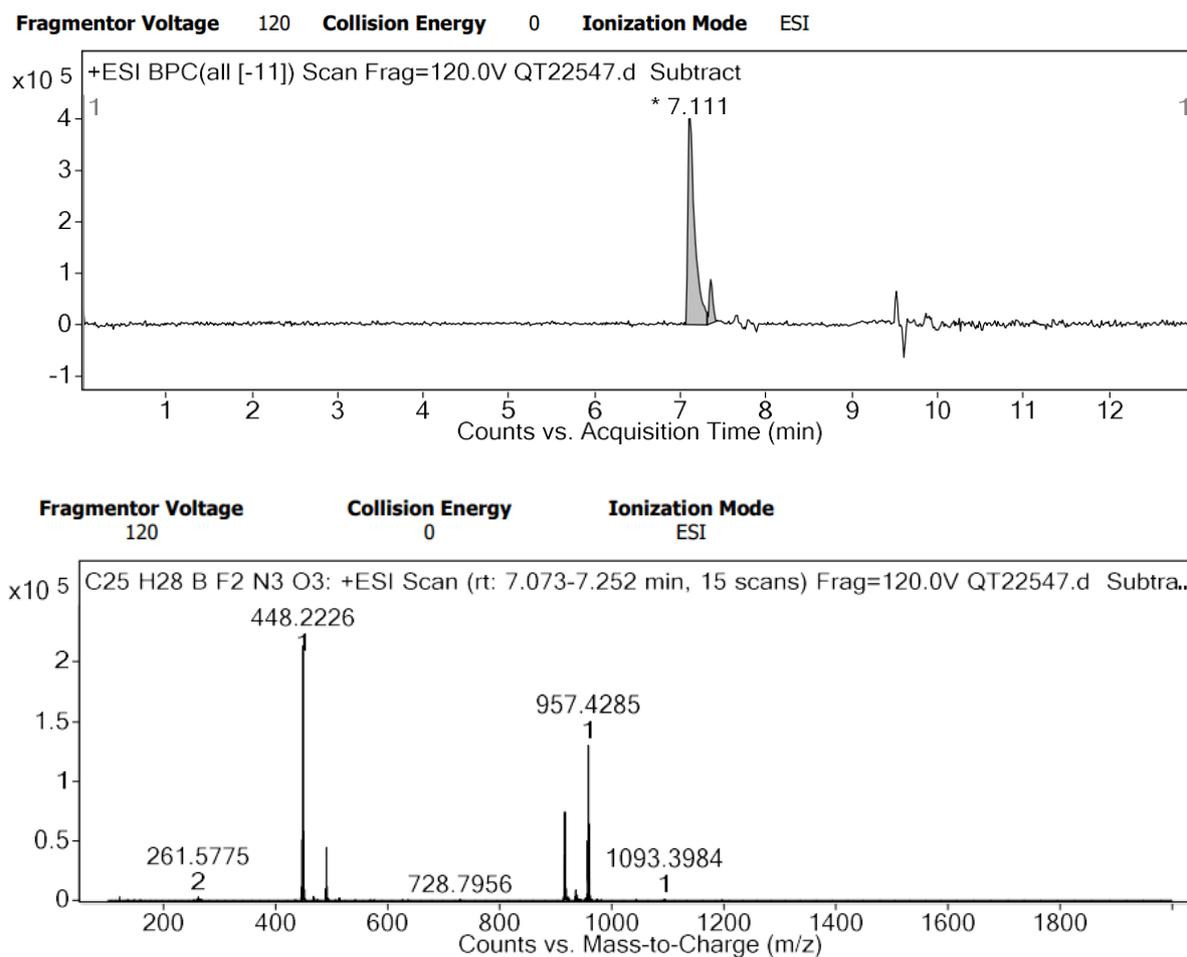
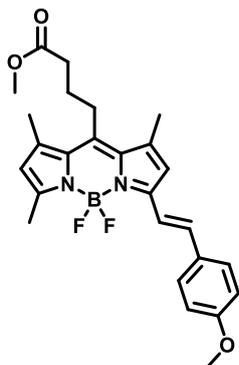
Figure VIII.84 HRMS spectrum of **BODIPY-Pyri**

14. To a mixture of 1,2-Dihydro-2-oxo-3-pyridinecarboxaldehyde (500 mg, 4 mmol, 1 eq) and methyl iodide (250 μ L, 4 mmol, 1 eq) in DMF (20 mL) was added K_2CO_3 (560 mg, 4 mmol, 1eq). The reaction mixture was left to stir at RT overnight. The product was extracted with DCM and washed with brine, dried over $MgSO_4$. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to give **14** (340 mg, 61%). $R_f = 0.64$ (DCM/MeOH: 9/1). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.35 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, CHO), 8.03 (dd, $J = 7.1, 2.3$ Hz, 1H, ArH), 7.62 (dd, $J = 6.5, 2.2$ Hz, 1H, ArH), 6.31 (dd, $J = 7.3, 6.6$, 1H, ArH), 3.62 (s, 3H, Methyl).

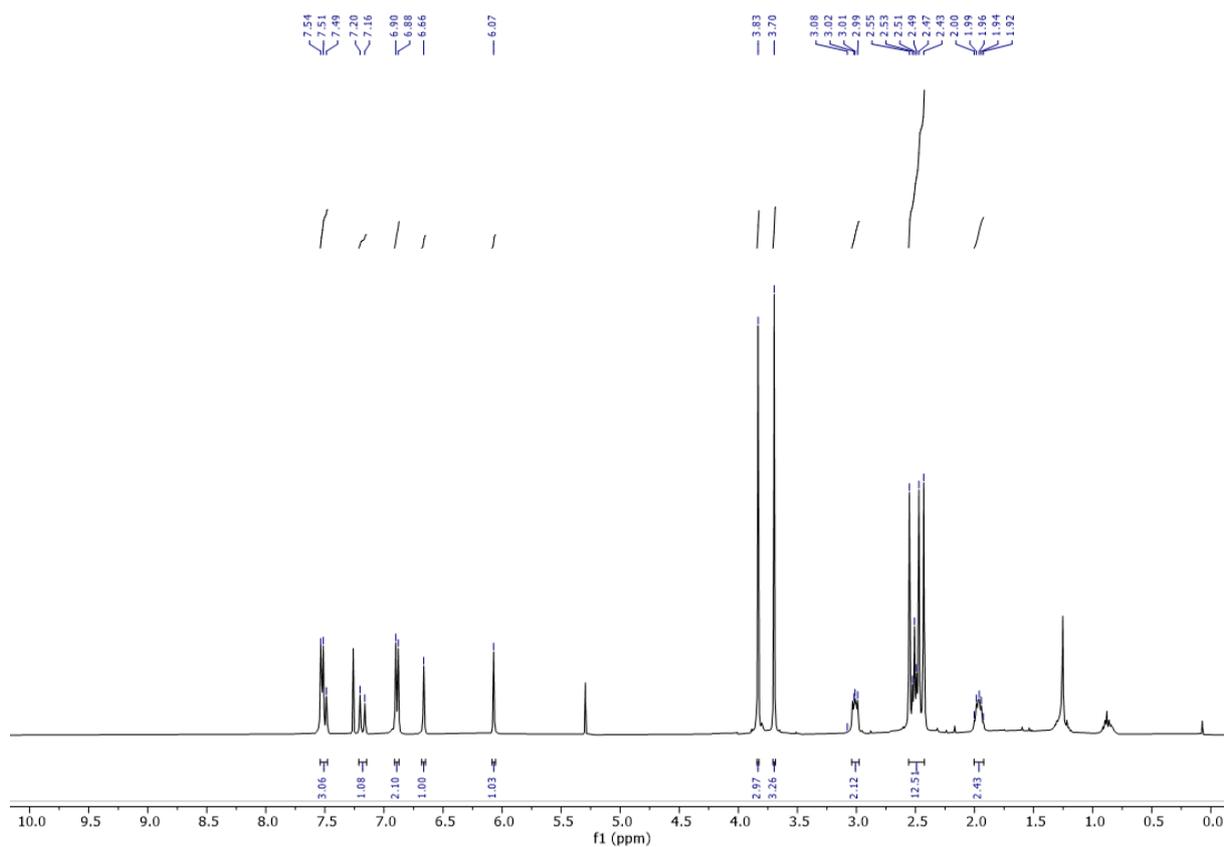
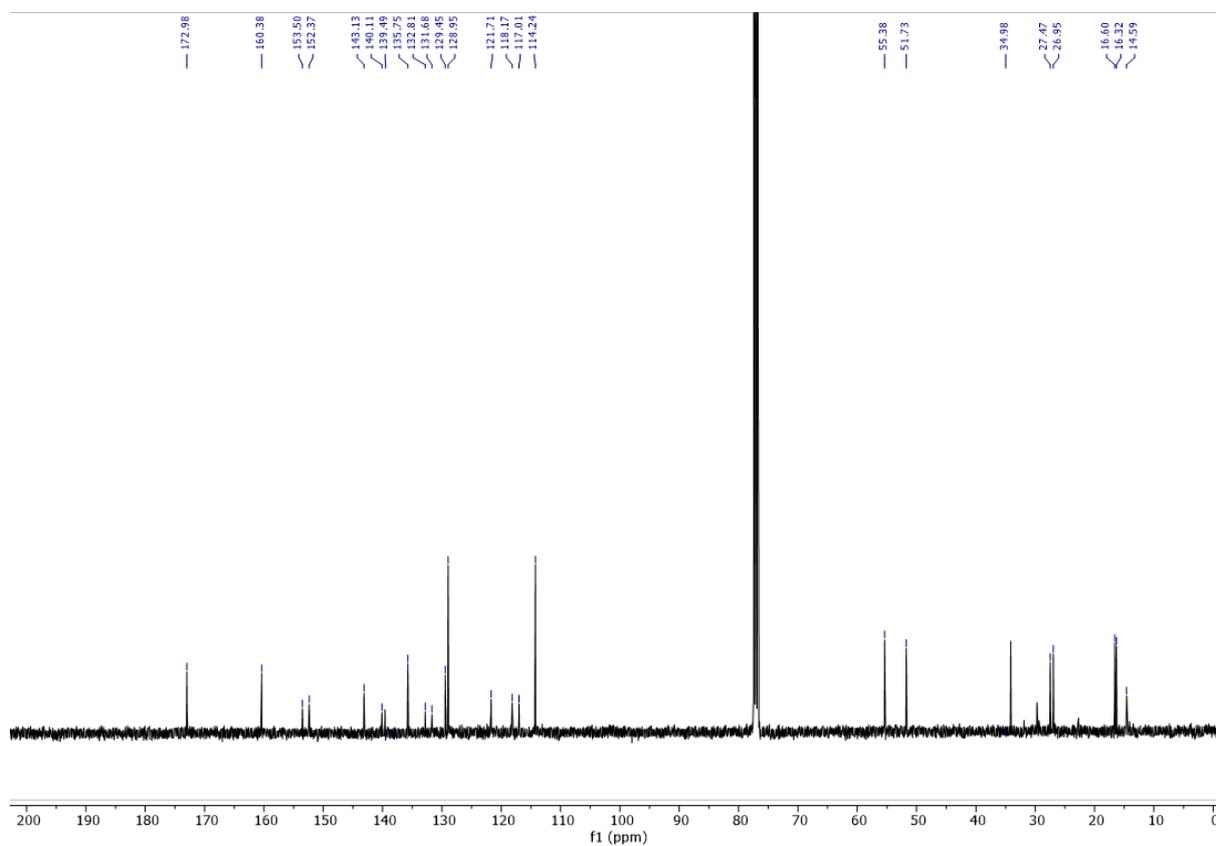


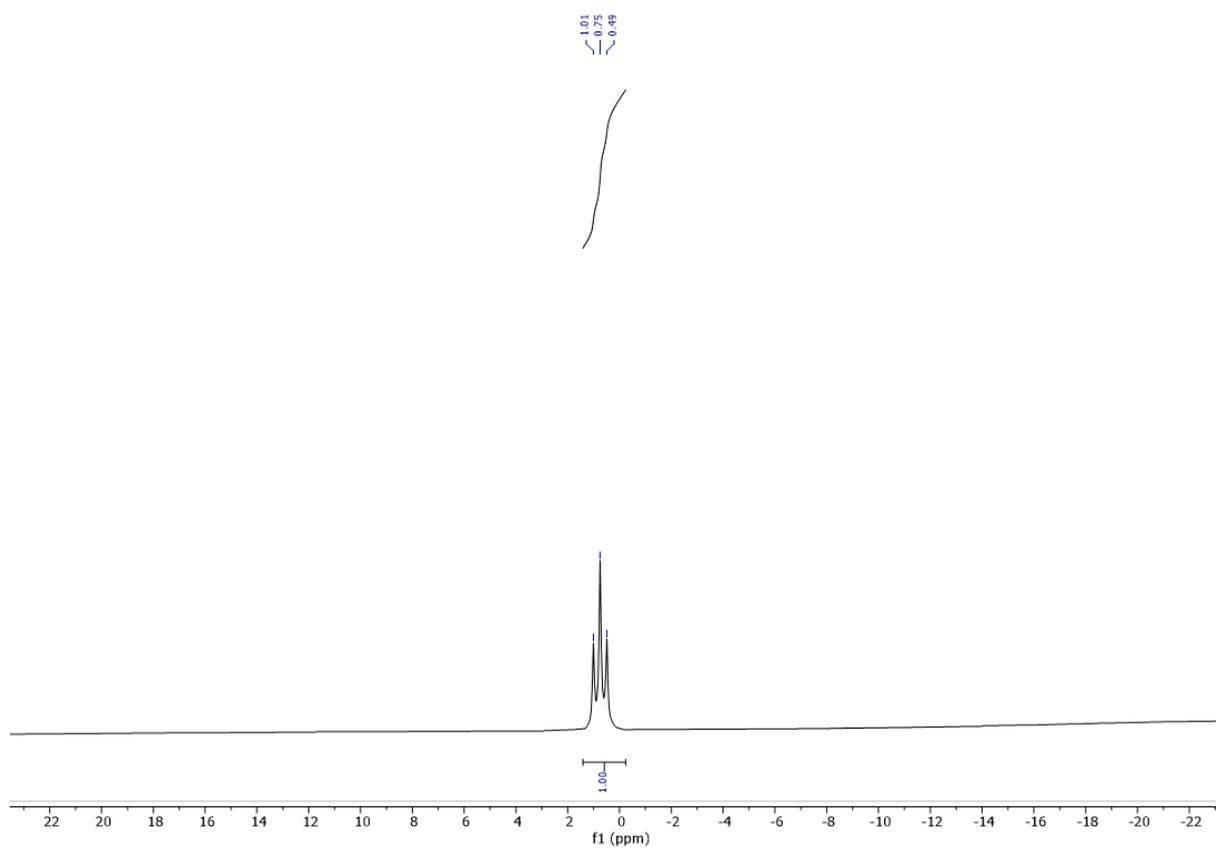
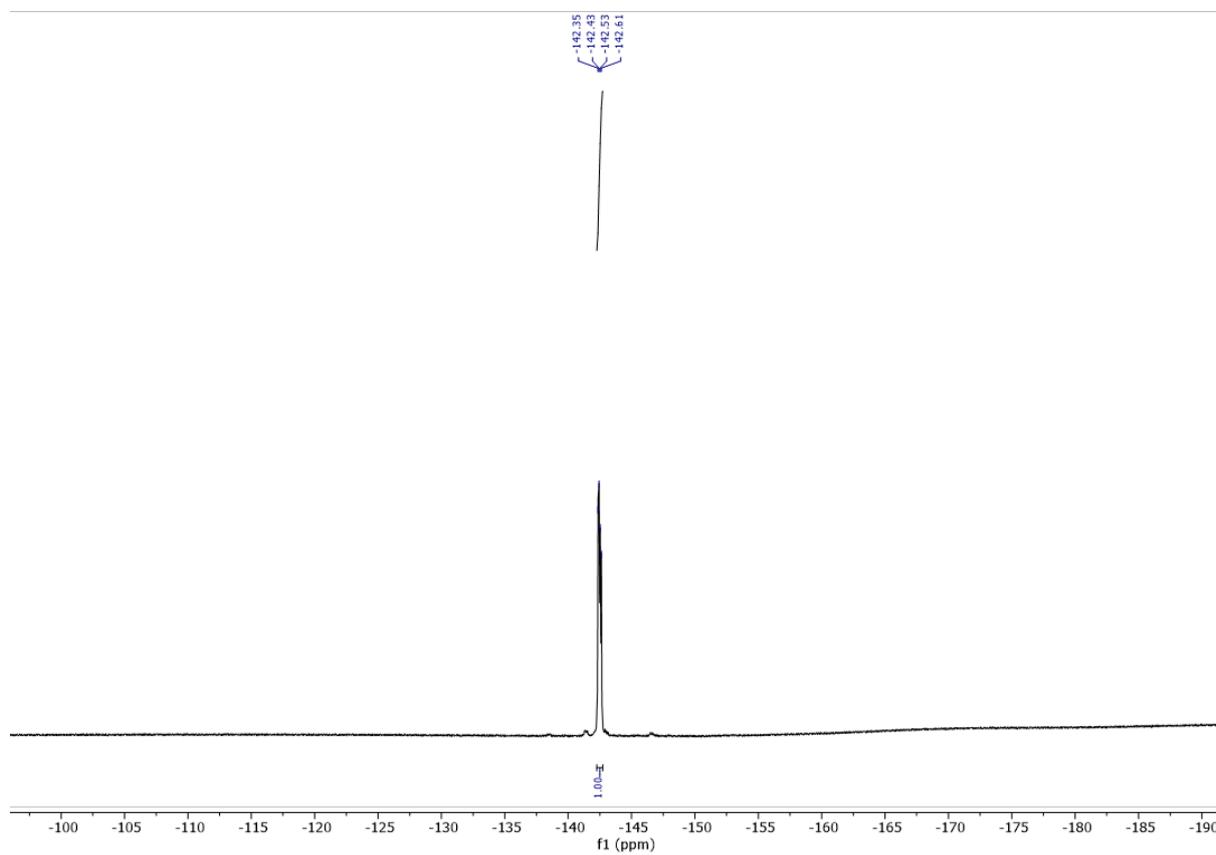
BODIPY-MePyri. A mixture of **14** (200 mg, 574 μ mol, 1 eq) 1,2-Dihydro-1-methyl-2-oxo-3-pyridinecarboxaldehyde (79 mg, 574 μ mol, 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at $140^\circ C$ until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel from (DCM/MeOH : 9/1) to (DCM/MeOH : 8/2) to give **BODIPY-MePyri** (3 mg, 1%). $R_f = 0.27$ (DCM/MeOH : 8/2). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72 (dd, $J = 7.2, 1.9$ Hz, 1H), 7.62 (dt, $J = 16.6, 1.8$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.15 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 2.99 – 2.92 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 1.90 (dq, $J = 11.7, 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 172.94 (Ester), 161.85 (NMe), 154.26, 151.79, 143.56, 140.24, 139.88, 137.81, 134.91, 132.95, 132.00, 129.81, 127.77, 121.97, 119.88, 118.88, 106.15, 51.72 (OMe), 38.14, 34.13 (Methyl BODIPY), 27.50 (Methyl BODIPY), 26.95 (Methyl BODIPY), 16.58 (Alkyl), 16.35 (Alkyl), 14.63 (Alkyl). HRMS (ESI+) calculated for $C_{35}H_{28}BF_2N_3O_3Na$ $[M+Na]^+$ 489.2126 found 489.2120.

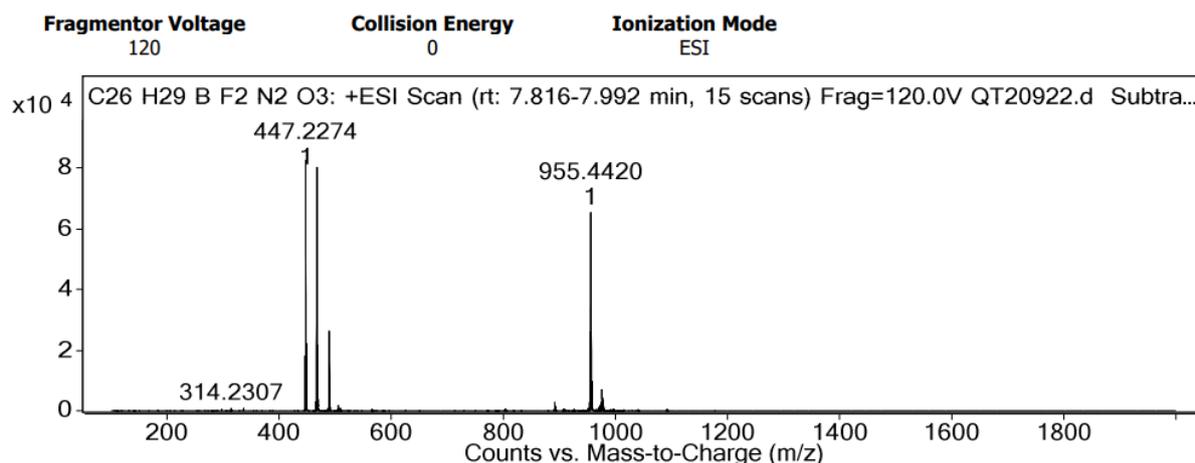
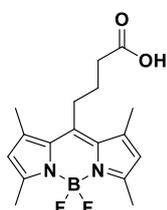
Figure VIII.85 ^1H NMR spectrum of *BODIPY-MePyri*Figure VIII.86 ^{13}C NMR spectrum of *BODIPY-MePyri*

Figure VIII.87 HRMS spectrum of **BODIPY-MePyri**

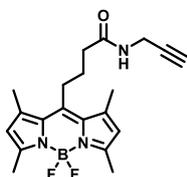
BODIPY-Anisole. A mixture of **13** (200 mg, 574 μmol , 1 eq) and 4-methoxybenzaldehyde (70 μL , 574 μmol , 1 eq) in piperidine (5 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Heptan/Acetone: 5/5) to give **BODIPY-Anisole** (9 mg, 3%). R_f = 0.59 (Heptan/Acetone: 5/5). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.56 – 7.46 (m, 3H, ArH and H alkene), 7.18 (d, J = 16.2 Hz, 1H, ArH), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ArH), 6.66 (s, 1H, H Pyrrole), 6.07 (s, 1H, H Pyrrole), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.05 – 2.96 (m, 2H, CH_2 alkyl), 2.57 – 2.41 (m, 11H, CH_2 Alkyl and Methyl), 1.96 (m, 2H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.98 (Ester), 160.38, 153.50, 152.37, 143.13, 140.11, 139.49, 135.75, 132.81, 131.68, 129.45, 128.95 (Aryl), 121.71, 118.17, 117.01, 114.24 (Aryl), 55.38 (Anisole OMe), 51.73 (Ester OMe), 34.98 (Methyl BODIPY), 27.47 (Methyl BODIPY), 26.95 (Methyl BODIPY), 16.60 (Alkyl), 16.32 (Alkyl), 14.59 (Alkyl). ^{11}B NMR (128 MHz, CDCl_3) δ 0.75 (t, J = 33.4 Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -142.43 (dd, 45Hz). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_2\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 489.2137 found 489.2149.

Figure VIII.88 ^1H NMR spectrum of *BODIPY-Anisole*Figure VIII.89 ^{13}C NMR spectrum of *BODIPY-Anisole*

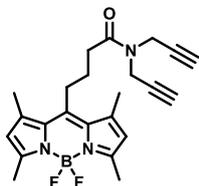
Figure VIII.90 ^{11}B NMR spectrum of *BODIPY-Anisole*Figure VIII.91 ^{19}F NMR spectrum of *BODIPY-Anisole*

Figure VIII.92 HRMS spectrum of **BODIPY-Anisole**

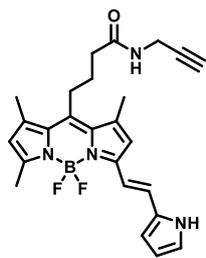
15. To a solution of **13** (1.12 g, 3.23 mmol, 1 eq) in THF (60 mL) was added 32 mL of a solution of NaOH (0.1M). The mixture was left to stir for 15 minutes and was then quenched with HCl 6M. The precipitate was filtered then washed with water to give **15** (934 mg, 87%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.06 (s, 2H, ArH), 3.07 – 2.99 (m, 2H, CH_2 alkyl), 2.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2 alkyl), 2.51 (s, 6H, Dimethyl), 2.43 (s, 6H, Dimethyl), 2.04 – 1.92 (m, 2H, CH_2 alkyl).



16. To a solution of **15** (100 mg, 300 μmol , 1 eq), propargylamine (29 μL , 450 μmol , 1.5 eq) and HATU (137 mg, 360 μmol , 1.2 eq) in DMF (2 mL) was added DIEA (153 μL , 900 μmol , 3 eq). The reaction was left to stir for 2 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to obtain **16** (78 mg, 70%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.05 (s, 2H, ArH), 5.62 (s, 1H, H Amide), 4.06 (dd, $J = 5.2, 2.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\equiv$), 3.07 – 2.98 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.51 (s, 6H, Dimethyl), 2.43 (s, 6H, Dimethyl), 2.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.24 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, CH Alkyn), 2.05 – 1.92 (m, 2H, CH_2 Alkyl).



17. To a solution of **15** (200 mg, 598 μmol , 1 eq), dipropargylamine (130 μL , 1.2 mmol, 2 eq) and HATU (272 mg, 718 μmol , 1.2 eq) in DMF (3 mL) was added DIEA (312 μL , 1.8 mmol, 3 eq). The reaction was left to stir for 1 hours. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 95/5) to obtain **17** (240 mg, 98%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.05 (s, 2H, ArH), 4.34 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\equiv$), 4.20 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\equiv$), 3.09 – 3.01 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.60 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.51 (s, 6H, Dimethyl), 2.45 (s, 6H, Dimethyl), 2.31 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, CH Alkyn), 2.24 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, CH Alkyn), 2.08 – 1.95 (m, 2H, CH_2 Alkyl).



18. A mixture of **16** (100 mg, 269 μmol , 1 eq) and pyrrole-2-carboxaldehyde (26 mg, 269 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Heptan/Acetone: 5/5) then by HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$: 5/5 to 5/95) to give **18** (12 mg, 20%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (s, 1H, H Pyrrole), 7.11 (s, 2H, H Alkene), 6.91 (m, 1H, H Pyrrole), 6.62 (s, 1H, ArH), 6.44 (m, 1H, H Pyrrole), 6.27 (m, 1H, H Pyrrole), 6.05 (s, 1H, ArH), 5.61 (s, 1H, H Amide), 4.06 (dd, $J = 5.2, 2.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\equiv$), 3.03 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.53 (s, 3H, Methyl), 2.48 (s, 3H, Methyl), 2.43 (s, 3H, Methyl), 2.37 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.27 – 2.20 (m, 1H, CH Alkyne), 2.01 (m, 2H, CH_2 Alkyl). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}]^+$ 448.2246, found 448.2256.

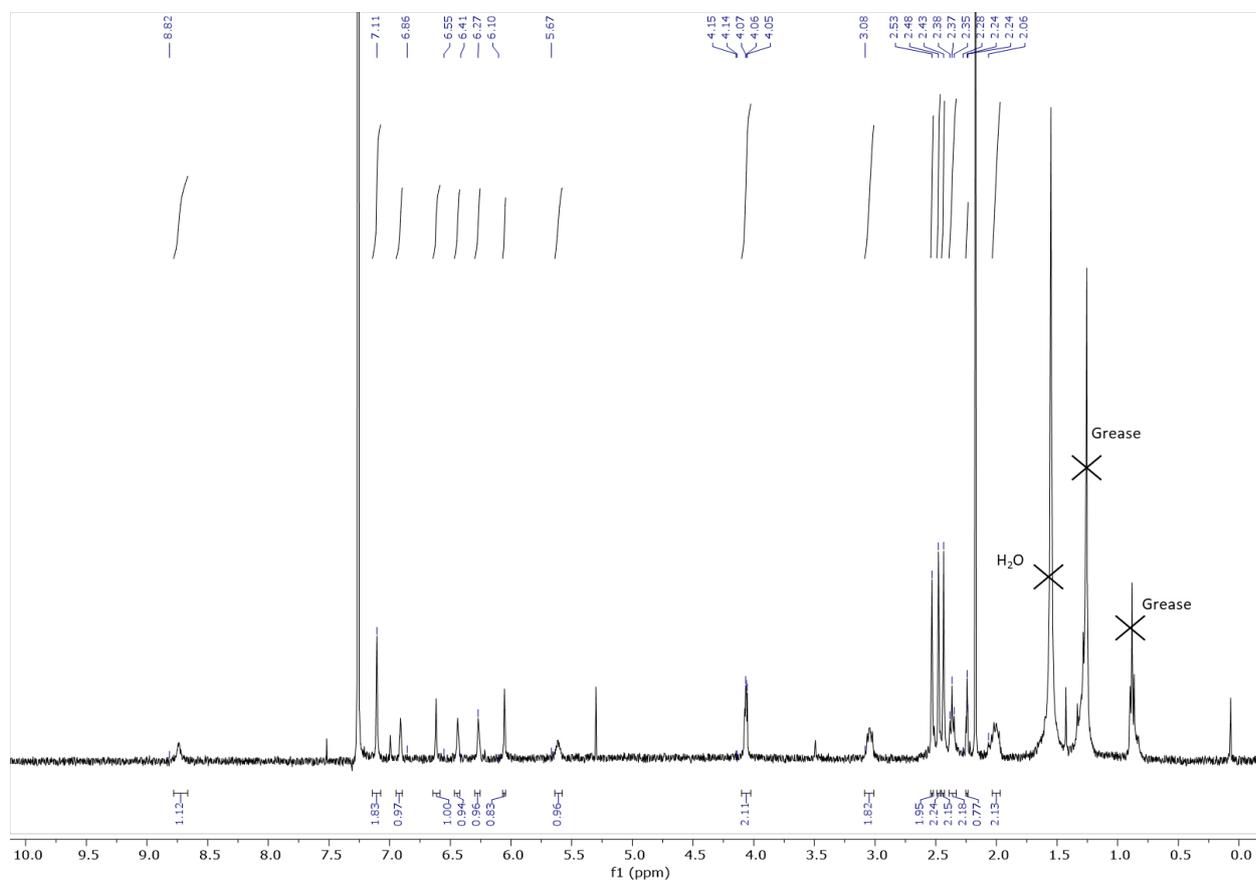
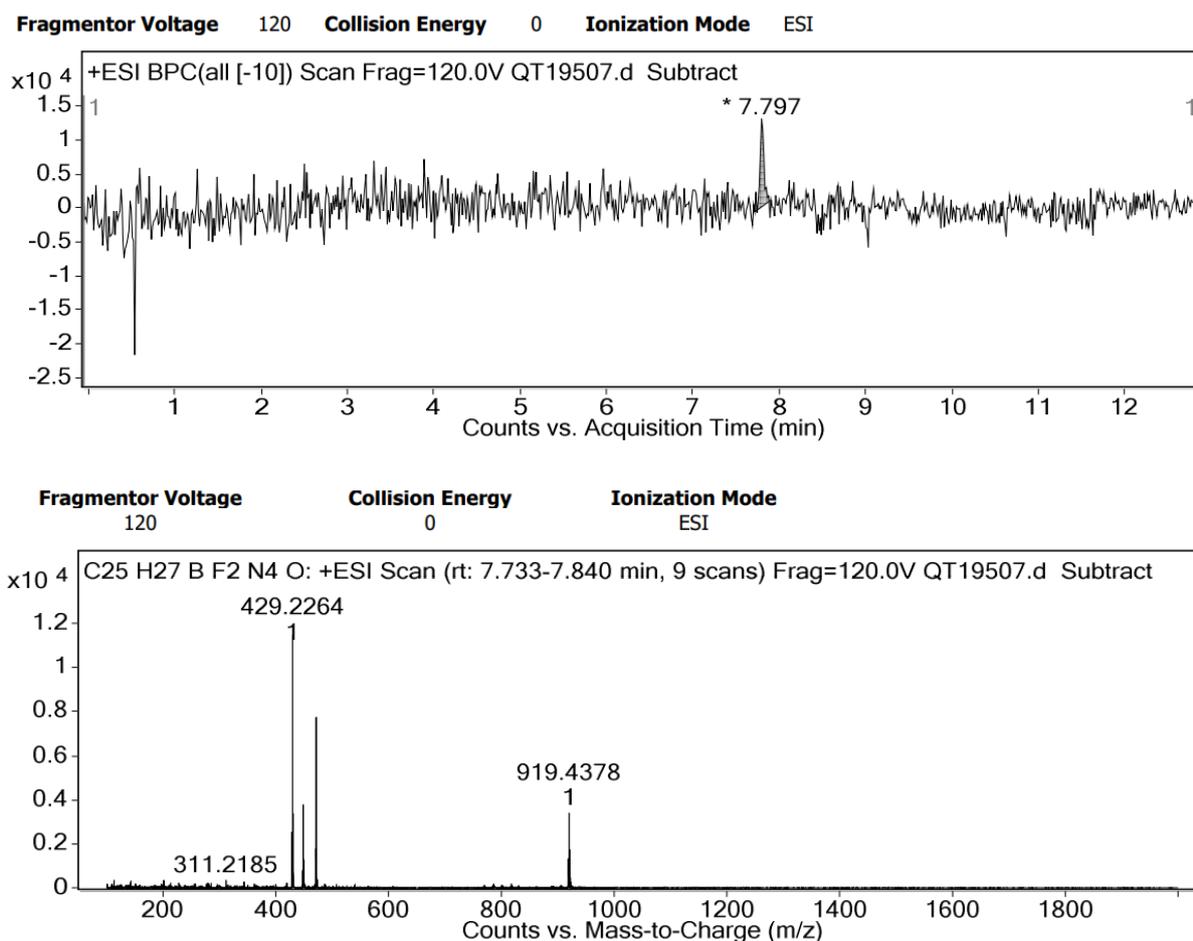
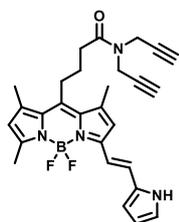
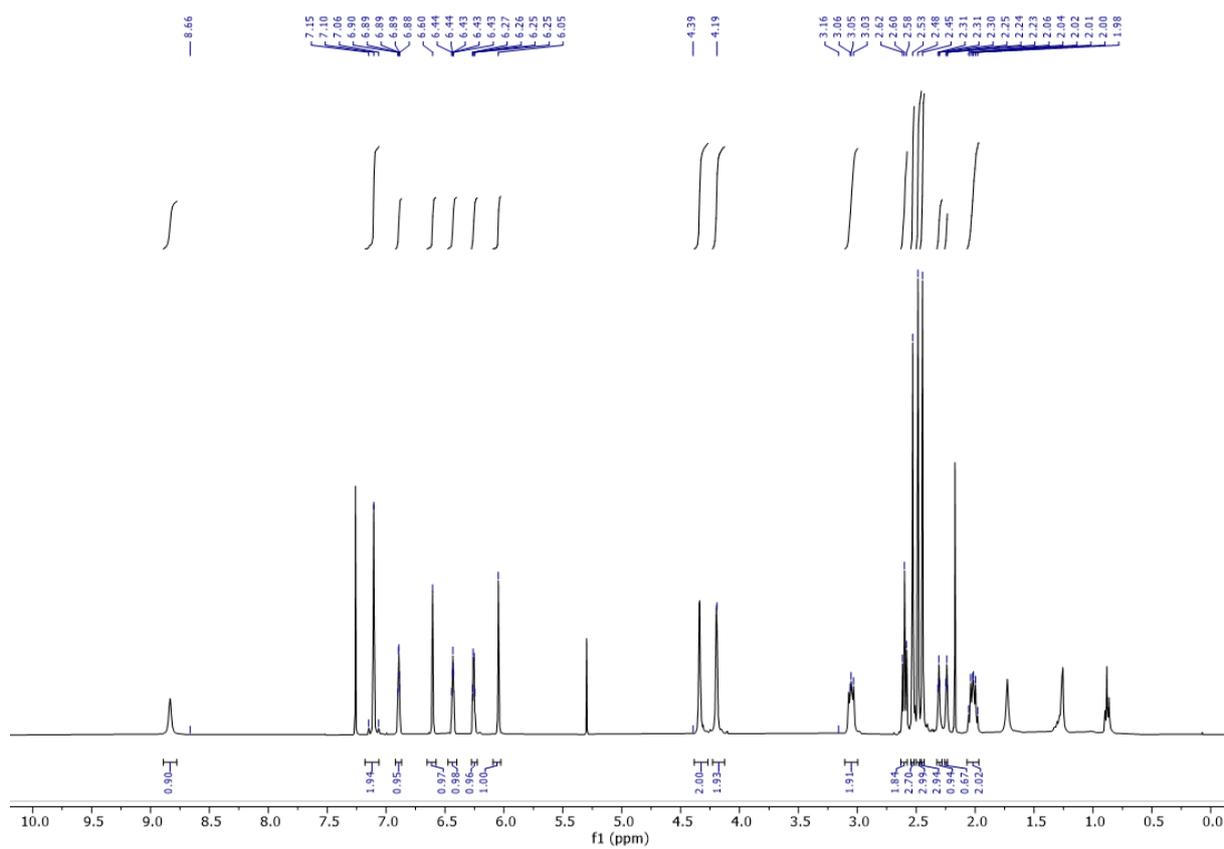
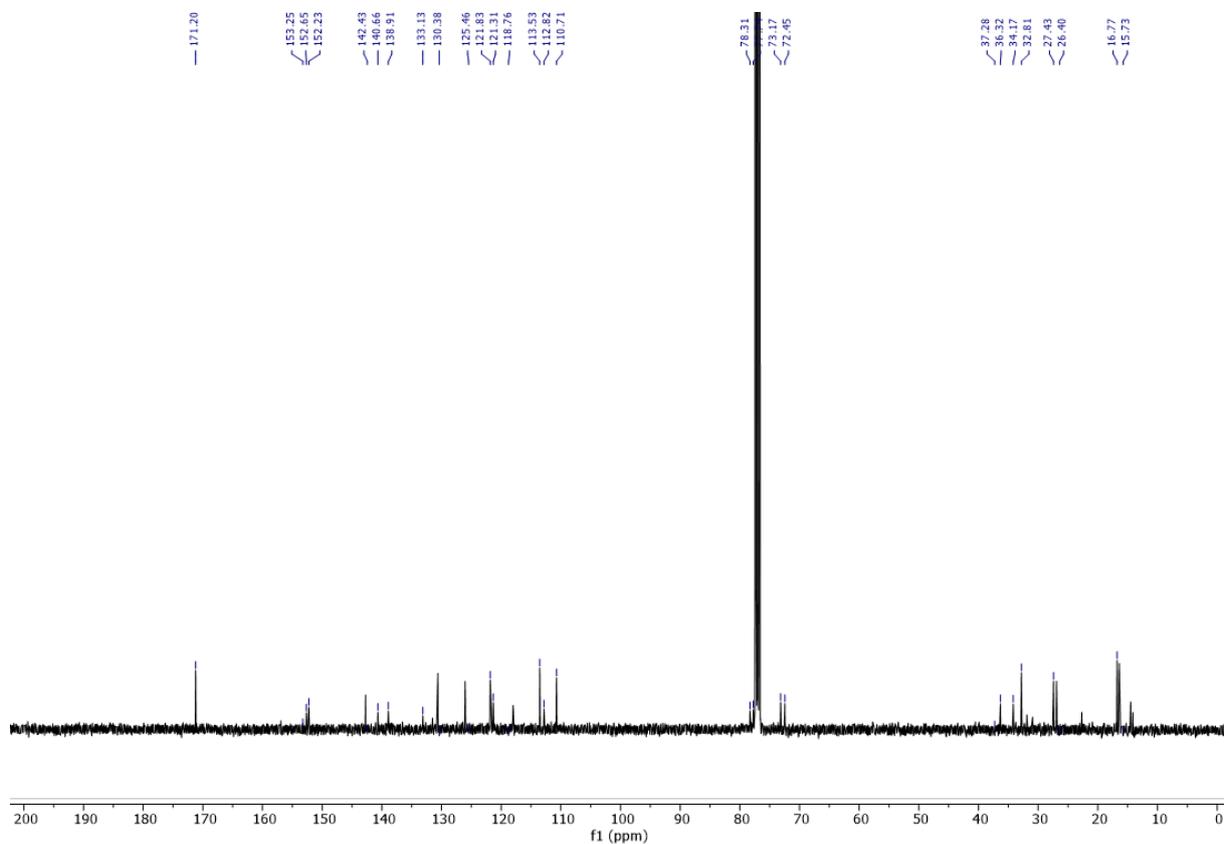
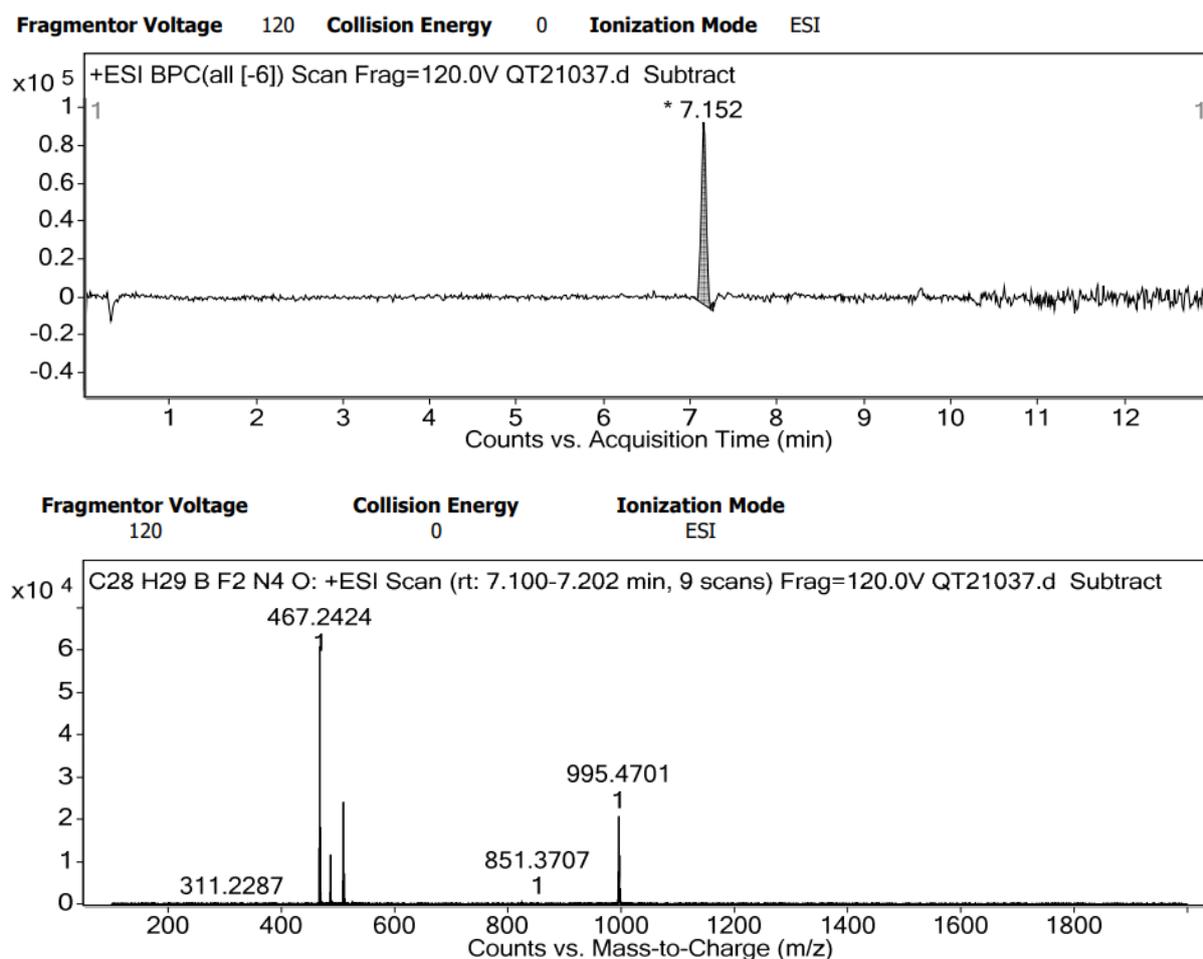
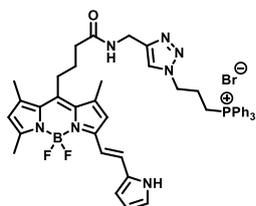


Figure VIII.93 ^1H NMR spectrum of **18**

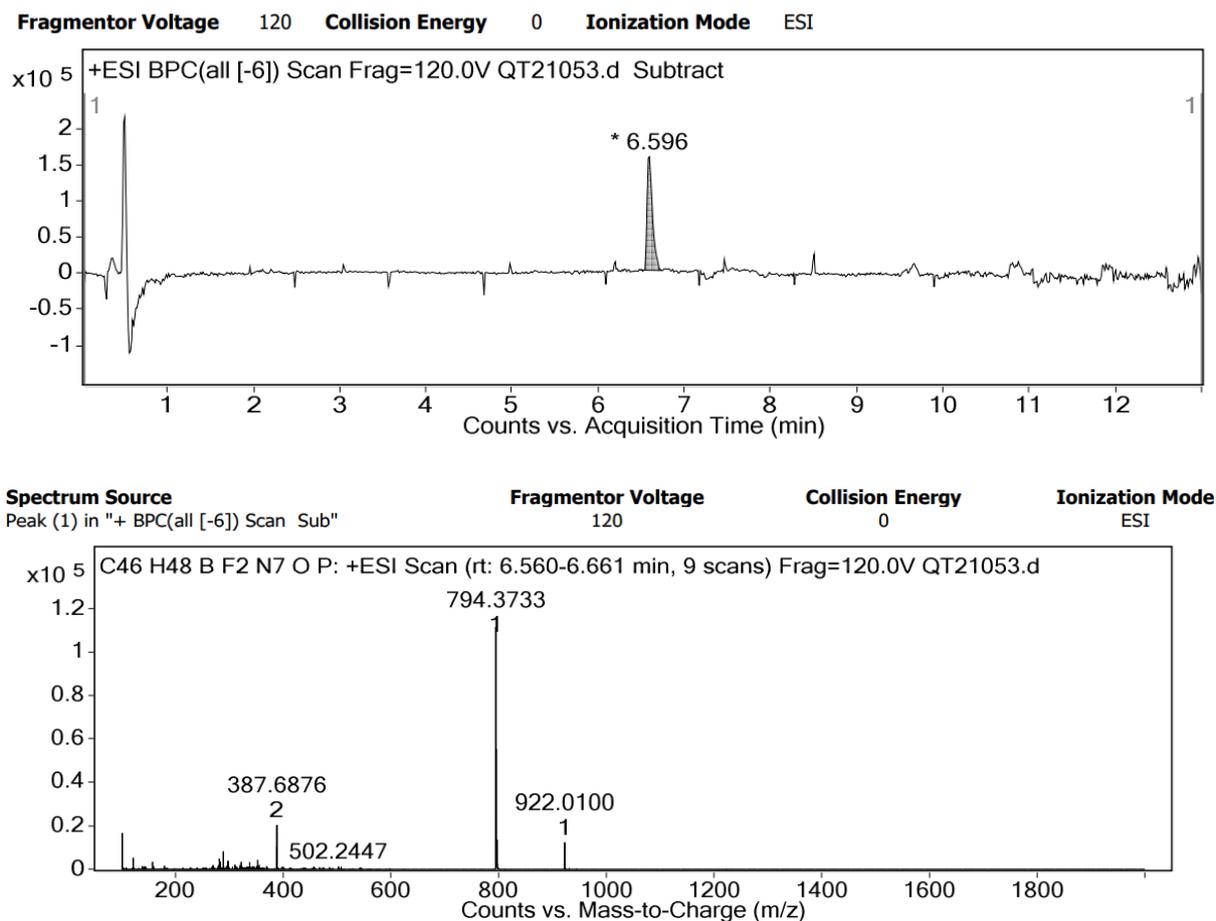
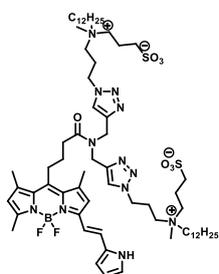
Figure VIII.94 HRMS spectrum of **18**

19. A mixture of **17** (100 mg, 269 μmol , 1 eq) and pyrrole-2-carboxaldehyde (26 mg, 269 μmol , 1 eq) in piperidine (3 mL) was heated at 140°C until dryness. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Heptan/Acetone: 5/5) then by HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$: 5/5 to 5/95) to give **19** (12 mg, 20%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (s, 1H, NH Pyrrole), 7.10 (s, 2H, H Alkene), 6.92 – 6.86 (m, 1H, H Pyrrole), 6.60 (s, 1H, ArH), 6.47 – 6.40 (m, 1H, H Pyrrole), 6.26 (q, J = 2.5 Hz, 1H, H Pyrrole), 6.05 (s, 1H, ArH), 4.34 (s, 2H, $\text{CH}_2\equiv$), 4.19 (s, 2H, $\text{CH}_2\equiv$), 3.10 – 3.01 (m, 2H, CH_2 Alkyl), 2.60 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2 Alkyl), 2.53 (s, 3H, Methyl), 2.48 (s, 3H, Methyl), 2.45 (s, 3H, Methyl), 2.31 (t, J = 2.5 Hz, 1H, CH Alkyne), 2.24 (t, J = 2.6 Hz, 1H, CH Alkyne), 2.08 – 1.96 (m, 2H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.20, 153.25, 152.65, 152.23, 142.43, 140.66, 138.91, 133.13, 130.38, 125.46, 121.83, 121.31, 118.76, 113.53, 112.82, 110.71, 78.31, 77.74, 73.17, 72.45, 37.28, 36.32, 34.17, 32.81, 27.43, 26.40, 16.77, 15.73. HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}]^+$ 486.2402, found 486.2402.

Figure VIII.95 ^1H NMR spectrum of **19**Figure VIII.96 ^{13}C NMR spectrum of **19**

Figure VIII.97 HRMS spectrum of **19**

BODIPY-2 Mito. To a solution of **18** (6 mg, 13 μmol , 1 eq) and **11** (6.3 mg, 15 μmol , 1.1 eq) in DMF (2 mL) 200 μL of an aqueous solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4.3 mg, 17 μmol , 1.3 eq) and ascorbic acid (3.5 mg, 20 μmol , 1.5 eq) was added. The reaction mixture was left to stir at 50°C for 1 hour. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH: 9/1 then DCM/MeOH/H₂O/DMF: 1/1/1/1) to give **BODIPY-2 Mito** (360 μg , 3%). HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{BF}_2\text{N}_7\text{OP}$ $[\text{M}]^+$ 794.3719, found 794.3733.

Figure VIII.98 HRMS spectrum of **BODIPY-2 Mito**

BODIPY-2 Memb. To a solution of **19** (17 mg, 35 μmol , 1 eq) and (34 mg, 83 μmol , 2.4 eq) in DMF (3 mL) 200 μL of an aqueous solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 20 μmol , 0.5 eq) and ascorbic acid (5 mg, 28 μmol , 0.8 eq) was added. The reaction mixture was left to stir at 60°C for one hour. The solvent was evaporated and the crude was purified by size exclusion column using DCM/MeOH, 1/1 to give **BODIPY-2 Memb** after evaporation (20 mg, 66%).

HRMS (ESI+) calculated for $\text{C}_{66}\text{H}_{109}\text{BF}_2\text{N}_{12}\text{NaO}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1317.7342, found 1317.7320.

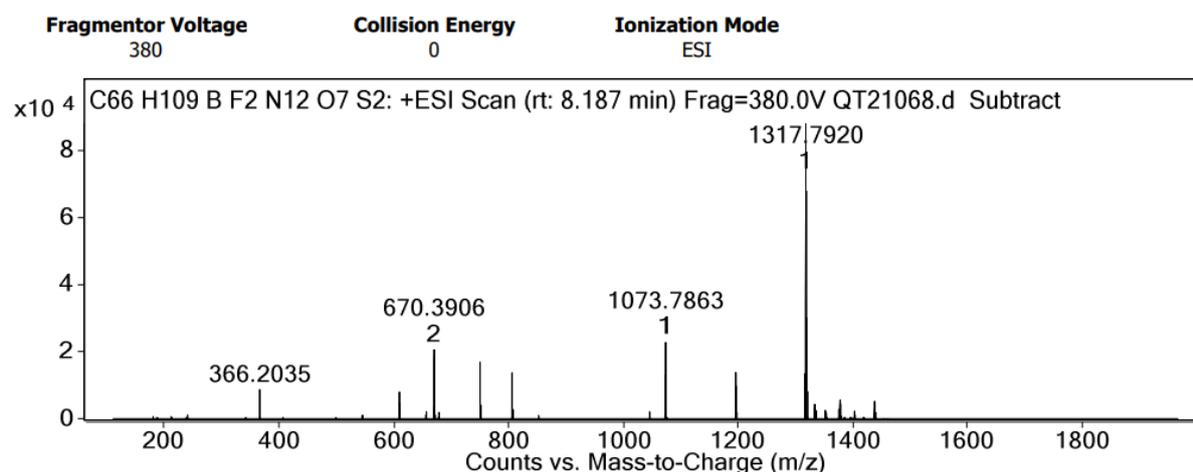


Figure VIII.99 HRMS spectrum of **BODIPY-2 Memb**

VIII.2. Spectroscopy

Absorption and emission

Absorption spectra were recorded on a Cary 4000 spectrophotometer (Varian). Fluorescence spectra were recorded on a Fluoromax-4 (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Emission measurements were systematically done at 20°C, unless indicated otherwise. All the spectra were corrected from the wavelength-dependent response of the detector.

The fluorescence quantum yields φ_F were determined following the following equation:

$$\varphi_F = \varphi_{ref} \times \frac{I_{f_{tuo}}^{sample} d\lambda}{I_{f_{tuo}}^{ref} d\lambda} \times \frac{OD_{ref}}{OD_{sample}} \times \frac{n_{sample}^2}{n_{ref}^2}$$

With OD the optical density at the excitation wavelength, and n refraction index of the solvent.

Photo-conversion studies.

Laser spectroscopy and conversion were performed using 3 × 3 mm optical path length quartz cuvettes of 45 μ L. Excitation was provided by a cw laser diode (638 nm, 532 nm, 488 nm and 405 nm, Oxxius, Lannion, France) and photons were detected by a QE pro spectrometer from Ocean Optics. All measurements were performed at room temperature. The kinetic rate of bleaching was determined by fitting the emission decrease (integrated spectra) of the photo-converting dye over time as described in Moerner's method^[139] and according to the following equation:

$$A(t) = A_\alpha e^{(-k_\alpha t)} + A_\beta e^{(-k_\beta t)}$$

Where $A(t)$ is the emission signal over time of the photo-converting dye.

The kinetic rate is given as an average of the two kinetic constants of the two-exponential fit:

$$k_{Pt} = \frac{\frac{A_\alpha}{k_\alpha} + \frac{A_\beta}{k_\beta}}{\frac{A_\alpha}{k_\alpha^2} + \frac{A_\beta}{k_\beta^2}}$$

Then the quantum yield of photobleaching ϕ_{Bl} is given by:

$$\phi_{Pt} = \frac{k_{Pt} N_a}{I \cdot 2303 \cdot \varepsilon}$$

Where I is the irradiance at the sample ($\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$), ε the molar-absorption coefficient of the dye at the excitation wavelength ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) and N_a the Avogadro's constant (mol^{-1}).

Irradiance is defined as:

$$I = \frac{P\lambda}{Shc}$$

Where S is the surface irradiated ($S = 0.15 \text{ cm}^2$), h the Planck's constant, c is the speed of light ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), P the power of the laser (in W) and λ the wavelength of the laser used for conversion (m).

Based on our model, we hypothesized that **cSC** was similar to **SC-V**. The chemical yield (η) is obtained by comparing the fluorescence intensity of **SC** before conversion (Fl_A) and after conversion (Fl_B) knowing Irradiance of the sample (I) and the Brightness (B) defined as $\varepsilon \times \phi_F$ at the laser's wavelength of each dye:

$$\eta = \frac{Fl_B \cdot B_A \cdot I_A}{Fl_A \cdot B_B \cdot I_B}$$

Finally, the quantum yield of photoconversion (ϕ_{Pc}) was obtained by multiplying the quantum yield of photobleaching by the chemical yield.

$$\phi_{Pc} = \phi_{Pt} \eta$$

$$\phi_{Pt} = \phi_{Bl} + \phi_{Pc}$$

Consequently, when the dye is not convertible $\phi_{Pt} = \phi_{Bl}$

The photobleaching of the converted forms (**cSC**) was performed at 405 nm ($237 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) (after the photoconversion step) and the quantum yield of photobleaching was determined as described above.

Singlet oxygen quantum yield

A solution of DPBF ($100 \mu\text{M}$) and the fluorophore or reference ($5 \mu\text{M}$) in MeOH were irradiated over few seconds with continuous wave laser. The emission spectra are acquired to obtain the

slope of the decrease of DPBF fluorescence intensity. The singlet oxygen quantum yield is give by the following equation:

$$\varphi_{\Delta Fluorophore} = \varphi_{\Delta Reference} \frac{p_{Fluorophore} F_{Reference}}{p_{Reference} F_{Fluorophore}}$$

With p_x the decrease slope avec the compound x and F_x the corrected absorption given by the following equation:

$$F_x = 1 - 10^{-OD}$$

MTT assay

Bromide (MTT) assay, HeLa cells were incubated with the dye (1 μ M) in a 96 wells plate. The conversion was performed by irradiating each well using a 5 \times objective and a green LED (475/40 nm LED from X-cite 110 Led illumination system) for 1 min. The cells were then incubated at 37°C. After one hour the medium was removed and MTT (Sigma Aldrich) at 0.5 mg/mL in PBS was added to cells and incubated 3 hours. After the formation of the subtract to a chromogenic product by metabolically active cells, the medium was removed and 100 μ L of DMSO was added to solubilized the crystals. The absorbance of each samples was measured with a plate reader (TECAN) spectrometer at 570 nm. Cell viability was reported as relative decrease compared to the absorbance of the positive control (Cells without the dye and light) considered as 100% of viable cells and negative control (Cells with Tryton 0.1%) considered as 0% of viable cells. Data are presented as mean \pm standard error of the mean of five independent experiments. ns: non-significative, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Single molecule sample preparation

The coverslips were cleaned using argon plasma for 20 minutes followed by acidic clening using a solution of sulphuric acid and ammonium persulfate (100:1) under sonication for 30 minutes. Then, the coverslips were rinsed with MeOH three times and then incubated with a solution of MeOH, AcOH and APTES (20:1:0.6) for 30 minutes. The pegylation was performed by incubating the coverslips in a solution of NaHCO₃ 0.1M with 10% of MeO-PEG-NHS (MW 5000 Da) and 0.2% of biotin-PEG-NHS (MW 5000 Da) overnight. Finally, the biotinated dye was added in solution a MeOH (1 pM) for 5 minutes and the coveslips were rinsed three times with a solution of MeOH.

VIII.3. Imaging

Cellular imaging general procedure

Hela cells were incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose) supplemented with 10% fetal bovine solution, 1% L-glutamine, and 1% antibiotic solution (penicillin–streptomycin) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 .

KB cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco Invitrogen) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% non-essential amino acid solution (Gibco-Invitrogen), and 1% MEM vitamin solution (Gibco-Invitrogen) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in a humidified 5% CO_2 atmosphere.

Before imaging, cells were incubated with **SCP-Boc** ($1 \text{ } \mu\text{M}$) in opti-MEM for 1 h. The cells were then washed with opti-MEM before being imaged.

For mitochondrial and HaloTag probes, cells were incubated with the probe (200 nM) in opti-MEM for 30 minutes. The cells were then washed with opti-MEM before being imaged.

For membrane probes, the probe (200 nM) was added 5 minutes before imaging in opti-MEM without washing step.

Cells were imaged with a Leica TSC SPE laser scanning confocal microscope with a $63\times$ objective.

Cells fixation

The cells were covered with 4% of paraformaldehyde for 15 minutes. The paraformaldehyde was removed and the cells washed with PBS. Then Tryton (0.1%) was added for 10 minutes. Then the cells were washed with PBS.

Transfection

KB cells have been transfected 24 h after being seeded in Ibidi chambers. Transfection mix have been prepared by preparing extemporaneously solution A containing lipofectamine 2000 ($4 \text{ } \mu\text{L}$, invitrogen) in warmed OptiMEM ($100 \text{ } \mu\text{L}$) and solution B of pDNA ($1.6 \text{ } \mu\text{g}$) in warmed OptiMEM ($100 \text{ } \mu\text{L}$). After 5 min at room temperature, solutions A and B were mixed thoroughly and stayed 20 min at room temperature. Cells were washed with warmed PBS once and placed in 1 mL of warmed OptiMEM. Transfection mix was added on cells that were gently swirled to ensure even distribution. Cells were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h. Then, transfection media was removed and cells were washed with complete growing media twice and incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ under 5% CO_2 atm for 24 h before imaging.

Photo-conversion

The conversion was triggered in dedicated region of interest using a laser line. The photo-conversion was stop when the intensity histogram showed that 90% of the form disappeared.

Cell Culture of SC-P

Hela cells were grown on poly-D-ornithine (Sigma Aldrich, P8638) coated #1.5 18 mm glass coverslips in DMEM (4.5 g/L -1 D-Glucose) supplemented with 10% fetal bovine solution (Gibco™) 1% antibiotic solution (penicillin Streptomycin) and 1% Glutamax. They were incubated in humidified incubator with 5% CO₂. Astrocytes were prepared from embryonic day 18 (E18) Sprague Dawley rat embryos. Brains were extracted from the embryos and hippocampi were dissociated in 0,25% trypsin solution at 37°C for 15 min and then seeded in MEM medium (Gibco™) supplemented with 10% horse serum, 1% Glutamax, 3% Glucose (0.2 g.L-1) and 1% antibiotic at 37 °C at an approximate humidity of 95–98% with 5% CO₂. 25 × 10³ cells were seeded in 12 well plates on polyD-ornithine (Sigma Aldrich, P8638) coated #1.5 (18 mm) glass coverslips (Menzel-Gläser, Thermo Scientific). After 4 h the medium was removed and replaced with the same initial medium. Cultures were kept at 37 °C for up to 14 days.

Cellular imaging of SC-P

Conversion and confocal imaging have been performed on a Zeiss LSM880 – ElyraPS1 microscope equipped with a 63x (1.4 NA)/ Oil immersion objective. **SC-P** was excited with a 488 nm laser line and emission was collected between 496 and 602 nm. **cSC-P** was excited with a 405 nm laser line and emission was collected between 407 and 448 nm. SMCy5.5 or Membright Cy5.5 were excited with a 633 nm laser line and emission was collected between 640 and 750 nm. 488 nm laser line 23 is from an argon laser (458, 475, 488, 496, 514 nm) and 405 nm and 633 nm wavelengths were from a laser diode and a Helium-Neon laser.

Cells were incubated with **SC-P**, SMCy5.5 or Membright Cy5.5 in Krebs-Ringer solution at pH 7.42 at 37°C. SC-P was used at 5 μM, SM Cy5.5 at 0.2 μM and Membright Cy5.5 was used at 0.05 μM. We used a mixture containing all the probes (**SC-P** and SMCy5.5 or **SC-P** and Membright Cy5.5). Cells were incubated for 2 hours with the labelling mixture, washed three times in a row with Krebs-Ringer solution pre-warmed at 37°C and then imaged in Krebs-Ringer solution during imaging.

Acquisition were done with Zen Black software. Image size were fixed using ideal sampling mode. In order to follow the dynamic intensity over time, images were neither averaged in line nor in frame to speed up the process. Imaging was performed using low laser power: between 0.5% for Hela and 2% for astrocytes with both 488 nm and 405 nm laser line, 2% of 633 nm laser line for SMCy5.5 and 15% for MemBright. To convert **SC-P** into **cSC-P**, we used the FRAP module on Zen

Black software: dwell time during conversion were twice shorter than during image acquisition and acquired 5 times before acquisition. Conversion was done between frame 1 and 2.

Photo-conversion in cells of SC-P

Imaging was done using 0.5 percent of 488 nm laser line, and conversion was triggered in dedicated region of interest using 3 repeated scans at low speed using 100 percent 488 nm laser line. Non-converted form and converted form were then image at fastest rate using sequential acquisition with 0.5% of 488 nm laser line (for non-converted form) and 0.3% of 405 nm laser line for converted form for each time point.

Conversion yield in cells of SC-P

To evaluate conversion yield we performed lipid droplet segmentation using Wavelet Icy spot detector plugin in both 405 and 488 channels. We identify spots in both channels before and after conversion. The yield of conversion was calculated as the proportion of 488 Lipid droplets spots evaluated just before stimulation that give rise to 405 positive lipid droplets in the following frame after conversion. Over 3 independent stimulated cells we evaluated the conversion yield as 91.6 ± 8.0 %. We also evaluate the proportion of 488 spots that totally disappeared from 488 channel after conversion as 80.5 %, the remaining 19.5% being the brightest lipid droplets that were only partially converted and that had residual 488 signal.

Image Quantifications of SC-P

For each condition, batch of images used for quantification (Intensity profile, Colocalization analysis and tracking analysis) were analysed using the same parameters of segmentation. Image analysis was done on Icy software (Icy spot detector plugin).^[153]

Intensity profile of SC-P

Intensity profile of **SC-P** and **cSC-P** were done with Icy plugin ROI Intensity Evolution. ROIs were determined by fusing **SC-P** and **cSC-P** mask using Spot Detector plugin and merge function. Intensity were then tracked over time.

Colocalization analysis of SC-P

In order to determinate the percentage of association of **SC-P** and **cSC-P** with SMCy5,5 we used Icy SODA plugin.^[154] First, we used Spot Detector plugin to detect **SC-P**, **cSC-P** and SMCy5.5. Spots detection of **SC-P** and SMCy5,5, **SC-P** and **cSC-P** or **SC-P** and **cSC-P** were then used in the SODA plugin to obtain the percentage of association whenever they are associated.

Tracking analysis of SC-P

Spot tracking of **SC-P**, **cSC-P** and SMCy5.5 were done using Icy spot tracking plugin, showing that they indeed follow the same trajectory with the same speed. To track **SC-P**, **cSCP** and SMCy5.5 we use the spot detector and then spot tracking plugin in Icy (with parameter for target motion re-estimated online). The data were exported in excel and the quantification was performed in PRISM software. Average speeds were compared using ANOVA (with Dunn's correction).

Liste des communications

MiFobio (Functional Microscopy For Biology) 5 – 12 novembre 2021 à Hyères

BrightSwitch®: A New Family of Dual Emissive Photoconvertible Fluorescent Probes for Bioimaging

L. Saladin, O. Dal-Pra, P. Didier, A. Klymchenko, M. Collot

Poster

JCI (Journées Campus Ilkirch) 23 – 24 mai 2022 à Ilkirch

BrightSwitch®: A New Family of Dual Emissive Photoconvertible Fluorescent Probes for Bioimaging

L. Saladin, O. Dal-Pra, V. Breton, A. Klymchenko, L. Danglot, P. Didier, M. Collot

Oral

SMLMS (Single Molecule Localization Microscopy Symposium) 29 – 31 août 2022 à Paris

New Mechanisms of Photoconversion (DPIC) and Photoswitching (DPIS) based on Directed Photooxidation for Advanced Microscopy

L. Saladin, V. Breton, A. Klymchenko, L. Danglot, P. Didier, M. Collot

Poster (prix du meilleur poster)

MAF (Methods and Applications in Fluorescence) 11 – 14 septembre 2022 à Göteborg

New Mechanisms of Photoconversion (DPIC) and Photoswitching (DPIS) based on Directed Photooxidation for Advanced Microscopy

L. Saladin, V. Breton, A. Klymchenko, L. Danglot, P. Didier, M. Collot

Poster

Journées ChiMi 9 – 10 janvier 2023 à Lyon

BrightSwitch®: A New Family of Dual Emissive Photoconvertible Fluorescent Probes for Bioimaging

L. Saladin, O. Dal-Pra, V. Breton, A. Klymchenko, L. Danglot, P. Didier, M. Collot

Oral

Liste des publications

K. T. Fam, L. Saladin, A. S. Klymchenko, M. Collot, *Chem. Commun.* **2021**, 57, 4807–4810.

L. Saladin, V. Breton, O. Dal Pra, A. S. Klymchenko, L. Danglot, P. Didier, M. Collot, *Angewandte Chemie* **2022**, ange.202215085

Lazare SALADIN

Développement de nouvelles sondes photo-modulables basées sur la photo-oxydation dirigée et leurs applications en bioimagerie.

Résumé

Ces travaux de thèse ont porté sur la synthèse et la caractérisation de nouvelles sondes fluorescentes photo-modulables pour des applications en bioimagerie. Un nouveau mécanisme de photo-conversion a été décrit, la Conversion Induite par Photo-oxydation Dirigée (DPIC en Anglais), basé sur l'incorporation d'un groupement aromatique sensible à l'oxygène singulet (ASORM en Anglais) conjugué à un fluorophore. Sous irradiation, le fluorophore génère de l'oxygène singulet, oxydant l'ASORM et entraînant une rupture de la conjugaison, menant donc à un effet hypsochrome du fluorophore. Ce mécanisme a été appliqué et caractérisé à deux familles de fluorophores, les coumarines et les BODIPYs, menant à l'obtention de sondes présentant une photo-conversion du proche infrarouge vers le rouge, du rouge vers le vert et du vert vers le bleu. Ces sondes ont également pu être fonctionnalisées par des groupes ciblant permettant l'application du DPIC au sein de différentes organelles comme la membrane plasmique, les mitochondries, les gouttelettes lipidiques, mais également sur des protéines à l'aide de ligand HaloTag, élargissant ainsi la palette de sondes moléculaires photo-convertibles.

Mots-clefs : Sondes fluorescentes, microscopie, photo-conversion, photo-commutation, membrane plasmique, mitochondries, gouttelettes lipidiques, HaloTag, coumarines, BODIPYs

Abstract

During this thesis, the synthesis and the characterization of new fluorescent photoconvertible probes for bioimaging were carried out. A new mechanism of photoconversion was described, the Directed Photooxydation Induced Conversion (DPIC). This mechanism is based on the conjugation of an Aromatic Singlet Oxygen Reactive Moiety (ASORM) with a fluorophore. Under irradiation, the fluorophore generates singlet oxygen, oxidizing the sensitive aromatic leading to a disruption of the conjugation and thus to a hypsochromic shift of the fluorophore. This mechanism was applied and characterized on two families of fluorophores, the coumarins and BODIPYs, enabling to obtain several probes displaying photo-conversion probes from near infrared to red, red to green and green to blue. Those probes were functionalized with targeting moieties allowing their use in various organelles such as plasma membrane, mitochondria, lipid droplets as well as proteins thanks to a HaloTag ligand expanding the diversity and versatility of molecular photoconvertible probes.

Keywords: Fluorescent probes, microscopy, photoconversion, photoswitch, plasma membrane, mitochondria, lipid droplets, HaloTag, coumarins, BODIPYs