



HAL
open science

Développement de facteurs de régulation photoactivables

Pierre Neveu

► **To cite this version:**

Pierre Neveu. Développement de facteurs de régulation photoactivables. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00203671

HAL Id: tel-00203671

<https://theses.hal.science/tel-00203671v1>

Submitted on 10 Jan 2008

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

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



ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE
Laboratoire de Physique Statistique
DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE
et
DÉPARTEMENT DE CHIMIE



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Spécialité : **PHYSIQUE DE LA MATIÈRE CONDENSÉE**

présentée par

Pierre Neveu

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Sujet :

Développement de facteurs de régulation photoactivables

A soutenir publiquement le 2 Juillet 2007 devant le jury composé de :

M.	François Amblard	Examineur
M.	David Bensimon	Directeur de thèse
M.	Philippe Herbomel	Rapporteur
M.	Ludovic Jullien	Co-directeur de thèse
M.	Olivier Martin	Président
M.	David Ogden	Rapporteur
M.	Philippe Vernier	Examineur

Table des matières

Remerciements	vii
Avant-propos	xi
I Les composés cagés en biologie : champ d'action, état des lieux, contraintes	1
1 Présentation du décaageage	3
1.1 Principe du décaageage	3
1.2 L'absorption à deux photons	3
1.3 Les différents groupements utilisés pour l'excitation biphotonique	5
1.3.1 La série o-nitrobenzyle	5
1.3.2 La série coumarine	8
2 Le décaageage pour contrôler des fonctions biologiques	11
2.1 Des systèmes inductibles pour le contrôle de fonctions biologiques	11
2.2 Les molécules cagées en biologie : état des lieux	13
2.2.1 Autour des neurones	13
2.2.2 Systèmes d'induction génique	14
2.2.3 Divers	15
3 Le cahier des charges du décaageage en milieu biologique	17
3.1 Les contraintes de la chimie	17
3.2 Les contraintes photochimiques et cinétiques	18
3.2.1 Dommages photo-induits	18
3.2.2 Considérations géométriques	21
4 Quantification de la photoproduction de substrat	25
4.1 Contrôle de la quantité de molécules libérées	25
4.1.1 Décaageage en système ouvert	25
4.1.2 Décaageage en système fermé	25
4.2 Mesure de la quantité de molécules libérées	26

4.2.1	Constante de diffusion	27
4.2.2	Constante cinétique de décaage en système fermé	27
II	Mesure de sections efficaces à deux photons	29
5	Mesure de sections efficaces	31
5.1	Etat de l'art	31
5.2	Notre apport	33
5.3	La FCS pour mesurer des sections efficaces	33
5.3.1	Présentation de la FCS	33
5.3.2	FCS à deux espèces	34
5.4	1 ^{er} cas : la formation de l'espèce fluorescente est rapide	35
5.4.1	Mécanisme de déprotection des nitrobenzyles	36
5.4.2	Principe de la méthode de mesure de δ_u	36
5.5	2 ^{ème} cas : la formation de l'espèce fluorescente est lente	37
5.5.1	Présentation de la série cinnamate	37
5.5.2	Mécanisme de déprotection des cinnamates	37
5.5.3	Principe de la méthode de mesure de δ_u	38
III	Contrôle de la voie de signalisation acide rétinoïque	41
6	Contrôle de la transcription chez les vertébrés	43
6.1	La transcription par récepteurs nucléaires	43
6.1.1	La super-famille des récepteurs nucléaires	43
6.1.2	Les corégulateurs : des coactivateurs ou des corépresseurs	45
6.1.3	Recrutement des corégulateurs	47
6.2	Les MAP kinases	47
6.2.1	Intérêt en temps de réponse	48
6.2.2	Les différentes familles de MAP kinases	48
6.2.3	La famille de p38	49
6.2.4	Association des kinases avec la transcription	49
6.2.5	Le rôle de la famille p38 dans le développement	49
7	Le système acide rétinoïque	51
7.1	Le poisson zèbre comme organisme modèle	51
7.2	L'acide rétinoïque endogène	52
7.2.1	Métabolisme	52
7.2.2	Disponibilité de l'acide rétinoïque dans la cellule	52
7.2.3	Action biologique	53
7.2.4	Nécessité de corégulateurs pour la transcription sous contrôle AR	53

7.3	Rôle de l'acide rétinoïque dans l'embryogénèse	53
7.3.1	Axe antéro-postérieur	53
7.3.2	Symétrie gauche-droite	54
7.3.3	Segmentation du système nerveux central	54
7.3.4	Mise en place du cœur	54
7.3.5	Mise en place de la rétine	55
7.4	Rôle de l'acide rétinoïque dans des cellules adultes	55
8	Calibration du décaage dans les embryons	57
8.1	Fluorescence et cinétique dans les embryons	57
8.1.1	Age des embryons	57
8.1.2	Mesures de cinétiques de déprotection	59
8.1.3	Bruit	59
8.2	Choix d'un acide rétinoïque cagé	60
8.2.1	Les acides rétinoïques cagés disponibles	60
8.2.2	Propriétés en relation avec une application dans un embryon intact . .	60
8.2.3	Mesure de la section efficace de l'acide rétinoïque couplé à la coumarine	61
8.3	Mesure de la cinétique de décaage de l'acide rétinoïque <i>in vivo</i>	62
8.4	Expériences d'induction de bifurcation de rétine à deux photons	63
8.4.1	Protocole d'observation	63
8.4.2	Induction de bifurcation avec l'acide rétinoïque couplé à la coumarine	63
8.5	Résumé de l'article soumis à <i>PLoS Biology</i>	64
9	Conclusion et perspectives	65
9.1	Conclusion sur la thèse	65
9.2	Perspectives sur les groupements protecteurs	65
9.2.1	Propriétés nécessaires pour une application biologique	65
9.2.2	Utilisation de cages "améliorées"	66
9.3	Perspectives sur le modèle acide rétinoïque	66
9.3.1	Intérêt des systèmes de régulation utilisant des phosphorylations . . .	66
9.3.2	Intégration dans le temps de la réponse à un morphogène	67
9.3.3	Couplage de la libération d'acide rétinoïque avec du lignage cellulaire	68
9.3.4	Utilisation de rétinol cagé	68
9.3.5	Détermination du mode d'établissement du gradient d'acide rétinoïque	69
9.3.6	Conclusion	69
9.4	Conclusion générale	69
A	Montages	71
A.1	Montage de FCS	71
A.2	Microscope inversé de décaage	71
A.3	Microscope de décaage nouvelle génération	71

A.4	Autour du poisson : aquarium and co.	75
B	Système tamoxifène	77
B.1	Introduction	77
B.1.1	But de l'expérience	77
B.1.2	Le système d'induction Cre-lox	77
B.1.3	Choix d'un analogue du tamoxifène	79
B.1.4	Mise en place du système chez le poisson zèbre	80
B.1.5	Lignées transgéniques	80
B.2	Résultats	81
B.2.1	Expériences de recombinaison de plasmide <i>in vitro</i>	81
B.2.2	Démonstration de principe en transitoire	83
B.3	Conclusion et perspectives sur le système tamoxifène	84
B.4	Partie expérimentale	84
B.4.1	Purification de la Cre	84
B.4.2	Expérience de recombinaison de plasmide	86
B.4.3	Lignée Cre-ER	86
C	Acide nalidixique	87
C.1	Présentation de l'acide nalidixique	87
C.2	Evaluation de l'acide nalidixique cagé	88
C.2.1	Activité antibiotique	88
C.2.2	Activité inhibitrice de gyrase	89
C.3	Conclusion sur le système acide nalidixique	90
D	Molecular biology protocols	91
D.1	Phenol Chloroform extraction	91
D.2	Purification of DNA from Agarose gels : Freeze and Squeeze adapted	91
D.3	DNA transfert from polyacrylamide gel to agarose	92
D.4	Crush and soak method, Maxam and Gilbert adapted	92
D.5	Mini prep using boiling method (for DH5 α , Top Ten, DH1)	93
D.6	Transformation protocol for Top Ten strain	94
D.7	Transformation protocol for DH5 α	94
D.8	Protocol for chemical competent cells (Hanahan style)	94
D.9	Protocol for chemical competent cells (acetate style)	95
D.10	Whole embryo PCR	96
D.11	Recipes	96
D.12	Buffer recipes	97
D.13	Recipes for bacteria growth	98
D.14	Transformation media	99

D.15 Fish recipes	100
D.15.1 Hank's stock solutions	100
D.15.2 Embryo medium	100
D.15.3 Tricaine	101
E Publications	103
Bibliographie	105

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée au Laboratoire de Physique Statistique et au Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure. Je remercie leurs directeurs successifs respectifs Jacques Meunier puis Eric Pérez et Christian Amatore puis Ludovic Jullien de m'y avoir fait une petite place.

Je suis extrêmement reconnaissant à David Bensimon et Ludovic Jullien d'avoir pensé à moi pour monter la manip des molécules photoactivables. Même si on n'a fait rien de ce qu'ils m'avaient proposé au début (!!!), je crois qu'on s'en finalement plutôt pas mal sorti... David et Ludovic sont deux formidables scientifiques. Ce fut une chance d'apprendre à leurs côtés. Ils sont très différents dans leur approche de la science : alors que David est foisonnant et prêt à tout essayer tout de suite, Ludovic est beaucoup plus réfléchi et évalue finement la faisabilité d'une manip. J'ai bénéficié de ces deux approches. En particulier, les études photophysiques systématiques se sont révélées cruciales pour faire marcher la manip *in vivo*. Mais l'approche "à la David" sur la manip cinétique s'est révélée extrêmement payante alors qu'on était dans le brouillard total au niveau des résultats envisageables (à ce propos, c'est une discussion de DEA avec Ludovic sur l'analyse des réseaux qui m'a donnée envie de faire la manip).

J'avais deux directeurs de thèse officiels mais Sophie Vriza a été sans aucun doute le troisième. Je ne saurais trop la remercier pour avoir bien voulu prendre le risque de se lancer avec nous dans ce projet, sans elle, on n'aurait pas de modèle biologique sur lequel travailler. D'une gentillesse infinie, ce fut un réel plaisir de travailler avec elle.

J'ai eu la chance de pouvoir être au contact de la biologie, chimie et physique grâce à trois interlocuteurs toujours disponibles et d'un enthousiasme sans faille. Les discussions et les manips étaient ainsi possibles le week-end (c'est probablement une mauvaise chose mais vu la psychologie et la sexualité des poissons, je crois que c'était un mal nécessaire pour avoir des résultats au final). Je crois que cette approche multidisciplinaire et nos brainstormings réguliers ont été deux des clefs de l'excellent déroulement de ma thèse. J'ai aussi particulièrement aimé la liberté qu'ils m'ont laissée, j'en ai même peut-être trop abusé par moment. Je leur sais gré de m'avoir permis de continuer à travailler avec Boris Shraiman sur des projets qui n'avaient rien à voir avec mon sujet de thèse. Ces petits intermèdes m'ont permis de prendre du recul par rapport au sujet principal ce qui fut très important.

Jean-François Allemand a été mon maître pour l'optique et pour la programmation. Je lui dois de savoir aligner un montage. Tout aussi important (sinon plus!) : les discussions de

cuisine ont été une super source d'inspiration pour moi (surtout le homard à la Bras). Merci à Vincent Croquette pour ses conseils avisés lorsque je galérais sur le traitement de données et la programmation. Mais la D16 c'est aussi Gilles Charvin, Giuseppe Lia, Thimothée Lionnet, Grace Liou, Keir Neuman, Omar Saleh, Hiroaki Yokota, et ceux qui sont toujours là, Thomas Julou, Maria Mañ osas, Adrien Meglio, Francesco Mosconi et Elise Praly ; ils ont contribué à la super ambiance de la physique. Merci à Francesco avec qui j'ai partagé le deux photons en S13 : il s'est beaucoup plus battu que moi avec la bête et ça m'a beaucoup aidé. Special thanks to Keir for the exceptional "group meeting" at Roellinger's restaurant.

Je remercie particulièrement Nathalie Gagey. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir travailler avec elle. On aura galéré ensemble pendant trois ans sur les molécules cagées. La série cinnamate aura été pas mal récalcitrante (enfin beaucoup plus pour toi que pour moi). Le plot "babybel" restera un super truc. Malheureusement les danses hongroises de Brahms auront été sacrifiées sur l'autel de la dernière année de thèse...

André Estévez-Torrés, Thomas Barilero et Thomas Le Saux ont contribué à une très bonne ambiance sur la mezzanine du S13. André nous aura fait découvrir Pandora. Thomas travaillant souvent tard, le S13 était plus vivant les soirs et les nuits de "torture" de poissons. Isabelle Aujard, Chouaha Benbrahim et Odile Ruel ont synthétisé les molécules que j'ai utilisées. Certains substrats n'étaient pas marrants à utiliser mais elles s'en sont toujours très bien débrouillées. Grâce à elles, moi qui n'y connaissais rien en chimie organique, j'ai appris les subtilités de ces petites molécules et je sais presque en dessiner certaines. Merci à Hélène Berthoumieux : on aura été deux à défendre la cause du Sud dans l'équipe (André étant hors concours).

Je remercie Charlie Gosse, Didier Chatenay, Maxime Dahan, Pierre Desbiolles, François Heslot et Jérôme Robert pour les discussions que j'ai eues avec eux au cours de ma thèse. Merci à Jérôme pour les plasmides low copy.

Merci à Jérôme Wong Ng et Stéphane Ghozzi pour tous les cafés qu'on a pris ensemble à parler de l'avancée de nos manip respectives en particulier les samedis soirs et dimanches : on se sent moins seul face à la tyrannie horaire des systèmes biologiques.

Merci à Pascale Dufourcq pour sa bonne humeur communicative : c'est à elle que je dois une grande partie des hybridations *in situ*.

Je remercie Frédéric Rosa de m'avoir laissé utiliser l'animalerie poisson et tous ses équipements. Un grand merci à tout son labo et en particulier à Guillaume Pezeron et Guillaume Lambert qui ont été d'un immense secours pour initier patiemment le novice que j'étais au modèle zebrafish.

Je remercie Michel Volovitch qui a toujours été là pour me fournir plasmides et surtout des conseils toujours très avisés de biologie moléculaire. C'est grâce à lui que le physicien que j'étais a appris les bases de bio mol (et encore merci pour le super protocole de transformation avec les buffers acétate qui a changé mes clonages).

Je remercie José Da Silva Quintas et Olivier Himbert de l'atelier mécanique du LPS pour les pièces qu'ils m'ont faites : leurs suggestions étaient toujours dix fois mieux que les

miennes !!

Merci à Marie Gefflot, Annie Ribaudeau, Nora Sadaoui (pour la physique) et Anne Halloppé (pour la chimie) pour leur disponibilité pour tout le côté administratif.

During this PhD, I have also had the luck to have side projects with Boris Shraiman at UCSB (too bad about the technical issues but I definitely think we can work them out). I am very grateful for the many many enriching discussions we had, those have been a tremendous opportunity to broaden my scientific knowledge. I must confess that the Selex business we started so long ago now made me really learn molecular biology beyond all the commercial kits and protocols and it made me not to frighten in front of the erraticity of molecular biology experiments... Boris, I owe you a lot for that. In particular, I acknowledge the Kavli Institute for Theoretical Physics (UCSB) and its director David Gross for their superb hospitality. I acknowledge Marie-Anne Félix, Kenneth Kosik, Fabio Piano, Joel Rothman for the discussions we had there. I would like to thank Deborah Fygenon (UCSB), Anirvan Sengupta (BioMaPs Institute, Rutgers University), Kenneth Kosik (UCSB) for kindly providing some bench space in their labs. Many thanks to all their lab members for their friendliness. Very special thanks to Lars Hufnagel and Alberto Puliafito.

Je remercie François Amblard, Philippe Herbomel, Olivier Martin, David Ogden et Philippe Vernier d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je suis particulièrement reconnaissant à Philippe Herbomel et David Ogden de bien avoir voulu accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Merci à Elwood Linney pour la souche RGYn2, à Laure Bally-Cuif pour la lignée rapportrice des manips tamoxifène, à Pierre Chambon pour le plasmide de la Cre-ER, à Heinz Faulstich pour la phalloïdine cagée et à Frédéric Schmidt pour l'étoposide et autres inhibiteurs de Topo I.

Heureusement pendant une thèse, il n'y a pas que le labo dans la vie. Julien et Anne, Marc et Leticia, Vivien ont été d'un soutien sans faille. Je ne saurais trop les remercier pour leur amitié, les expériences culinaires (et les expérimentations pâtisseries avec Julien), musicales, littéraires... qu'on a eues.

Merci à tous les copains de Pasteur : Anne, Antoine, Gaëlle, Jorge, Lara, Léa, Ludmilla, Margot, Nicolas, Xénia. Courage à ceux qui vont finir cette année.

Tengo que graciarse a Marta por todas las discusiones que tuvimos, en particular tu eres responsable de lo que lee la literatura hispanofonia.

Enfin un grand merci à ma famille, en particulier à mes parents, mon frère et ma sœur pour leur soutien durant cette aventure.

Avant-propos

La formation d'un organisme multicellulaire à partir d'une seule cellule initiale est un phénomène fascinant. Ce processus développemental nécessite une succession d'étapes qui doivent être coordonnées à la fois spatialement et temporellement afin d'aboutir à un organisme viable. Une fois cet organisme adulte, les cellules de ce dernier doivent continuer à former un tout. Une partie de ces mécanismes est codée dans le génome de l'individu. Les génomes d'un grand nombre d'organismes sont séquencés à l'heure actuelle. Cependant, les informations obtenues ne permettent pas de répondre à la question : comment construire un organisme multicellulaire à partir d'une cellule ?

L'identification des fonctions de certains gènes a été largement élucidée grâce à l'étude de leurs mutants. Le séquençage des génomes permet maintenant d'avoir une approche bioinformatique et de prédire les fonctions de gènes avec un certain succès relatif [22, 141]¹. De plus, de nombreuses méthodes haut-débit se sont développées récemment. Quoique la fonction des protéines associées à de nombreux gènes demeure inconnue, des techniques de double-hybride [57] ont pu déterminer des réseaux d'interactions protéine-protéine pour la levure *S. cerevisiae* [202], le nématode *C. elegans* [126], la drosophile *D. melanogaster* [69] et une ébauche est établie pour l'homme [175]. La bioinformatique permet de prédire des interactions génétiques [223]. On peut obtenir le transcriptome d'un tissu donné et même d'une cellule unique [113]; il est aussi possible d'accéder au protéome d'une seule cellule [159]. Cependant toutes ces méthodes ne donnent généralement qu'une image statique de l'état dans lequel se trouvaient les cellules étudiées. Cela ne renseigne pas encore sur toutes les interactions, qui peuvent changer selon le contexte, et surtout leur force à un moment donné. En particulier, une étude très récente du groupe de Bastiaens a montré que la topologie d'une voie de transduction du signal peut changer selon le stimulus [180].

Pouvoir exercer une influence sur le système permet d'accéder à un niveau supérieur d'information. L'idéal est de pouvoir perturber une fonction biologique avec une résolution temporelle suffisante et surtout de pouvoir perturber le composant élémentaire de cette fonction. Les techniques d'électrophysiologie ont été parmi les premières à atteindre ce but : voir et pouvoir interagir avec un élément précis – les canaux ioniques des neurones [158]. Les systèmes spatialement et/ou temporellement inductibles ont été développés pour contrôler l'expression

¹Note sur l'organisation de la bibliographie : nous avons choisi de classer les références bibliographiques par ordre alphabétique.

des gènes ; ces techniques fournissant un assez bon contrôle spatial mais un contrôle temporel insuffisant de l'expression génique. De plus, les techniques utilisées sont souvent invasives ce qui est idéalement à éviter. L'utilisation d'une combinaison de molécules photoactivables (ces molécules sont dites "cagées") et d'excitation lumineuse a été imaginée comme pouvant remplir ce but. La résolution spatiale apportée par la lumière est la limite de diffraction, les dimensions des cellules étant largement plus grandes (les bactéries ont une taille de l'ordre de $1 \mu\text{m}$, les cellules eucaryotes de l'ordre de $10 \mu\text{m}$). La réaction de photodéprotection (ou décaage) étant une réaction chimique, sa constante cinétique peut *a priori* être du même ordre de grandeur que celle du phénomène à étudier. Cette approche de photocontrôle a été effectivement mise en œuvre en neurosciences en cageant du calicum [5, 103] et de nombreux neurotransmetteurs. Le décaage en utilisant une excitation à un photon est devenu un outil relativement usuel dans ce domaine [6, 28], avec des développements techniques récents permettant un décaage complexe [189]. L'utilisation de l'excitation biphotonique a aussi été utilisée avec succès pour photoactiver des neurotransmetteurs [150] ou du calcium [25] avec là aussi l'existence de travaux utilisant des schémas de décaage complexes [132]. Par contre, personne n'a encore réussi à mettre au point le décaage à deux photons dans un organisme entier et/ou pour contrôler l'expression génétique.

Au cours de cette thèse nous avons mis en place les techniques nécessaires au contrôle de la transcription à l'échelle de la cellule unique avec une résolution temporelle de la seconde. Ceci a été effectué dans des embryons de poisson zèbre intacts et de génotype sauvage de manière à être le plus proche possible des processus réels. Nous avons ainsi pu avoir accès à la dynamique d'une voie de signalisation dans des gammes de temps inaccessibles jusqu'à présent.

Dans une première partie, nous présentons le principe de la photodéprotection à deux photons et les différents groupements protecteurs disponibles. Nous brosons un rapide tour d'horizon de l'utilisation des molécules cagées en biologie puis nous détaillons les contraintes qu'une telle utilisation impose : la photodéprotection doit aboutir à la libération d'une quantité modulable de molécules biologiquement actives sans provoquer de dommages à la cellule ciblée. Un tel but requiert la caractérisation des propriétés d'absorption à deux photons des groupements photolabiles. C'est ce que nous exposons dans une deuxième partie. Deux séries ont été utilisées au cours de cette thèse : la série orthonitrobenzyle et la série cinnamate développée par Nathalie Gagey dans l'équipe de Ludovic Jullien. Des méthodes originales de détermination de section efficace de déprotection à deux photons ont été mises au point. Enfin dans une dernière partie, nous présentons l'utilisation de cet outil dans un contexte biologique. Nous avons pris comme modèle la voie de signalisation acide rétinoïque qui joue un rôle prépondérant dans l'embryogénèse des vertébrés. L'organisme choisi est le poisson zèbre. Nous replaçons d'abord ce modèle dans le cadre de la transcription sous contrôle des facteurs de transcription que sont les récepteurs nucléaires. Nous caractérisons ensuite la réaction de décaage à deux photons dans l'embryon en utilisant dans un premier lieu un fluorophore cagé puis l'autofluorescence des rétinoïdes. Cette calibration effectuée, nous avons montré

que nous pouvons libérer dans un embryon intact n'importe quelle concentration d'acide rétinoïque dans une seule cellule avec une résolution temporelle de la seconde. Nous avons pu étudier ainsi la dynamique de la voie de signalisation acide rétinoïque et mettre en évidence un contrôle négatif rapide, cellule autonome, complètement inattendu. Nous avons identifié la MAP kinase p38 comme étant nécessaire à ce phénomène. Enfin, comme preuve supplémentaire du lien entre cette kinase et la voie de signalisation acide rétinoïque, nous avons montré que l'inhibition de la synthèse endogène d'acide rétinoïque permet d'atténuer fortement les effets de l'absence de protéine p38.

Nous présentons aussi en annexes la démonstration de principe de l'utilisation de composés cagés pour générer des recombinaisons génomiques chez le poisson zèbre et inhiber une fonction enzymatique (en l'occurrence une topoisomérase).

Première partie

Les composés cagés en biologie : champ d'action, état des lieux, contraintes

Chapitre 1

Présentation du décageage

1.1 Principe du décageage

Les groupements protecteurs photocativables ont été introduits en synthèse organique dans les années 1960 comme alternative aux protections usuelles de fonctions. L'utilisation de la lumière pour la déprotection peut constituer une méthode plus douce pour la molécule à synthétiser que les déprotections à l'acide, aux bases, ...

Protéger une molécule consiste ici à y attacher de façon covalente par synthèse organique un groupement photolabile. L'illumination de la molécule obtenue à une longueur d'onde appropriée aboutit à une réaction de photodéprotection, c'est-à-dire à la rupture de cette liaison et à la libération de la molécule initialement protégée. Cette technique a été rapidement utilisée pour protéger des molécules biologiquement actives. La molécule protégée n'a pas d'activité biologique, cette dernière est restaurée après illumination à la lumière (voir Figure 1.1). Par abus de langage, les molécules ainsi protégées sont qualifiées de cagées bien qu'il ne s'agisse en aucun cas d'une cage physique. La réaction de photodéprotection est elle appelée réaction de décageage ou tout simplement décageage [20].



FIG. 1.1 – Principe de la réaction de décageage.

1.2 L'absorption à deux photons

Dès 1931, Maria Göppert-Mayer démontre théoriquement que deux photons d'énergie moindre peuvent induire ensemble une excitation qui résulterait normalement de l'absorption d'un seul photon de plus grande énergie [71]. Ce processus est appelé excitation biphotonique.

En général, deux photons de même énergie qui interagissent avec une molécule produisent une excitation équivalente à l'absorption d'un seul photon d'énergie double (voir Figure 1.2). La relaxation de l'état excité peut entraîner des processus photophysiques ou photochimiques comme de la fluorescence ou des réactions photoinduites.

L'évènement d'absorption biphotonique nécessite l'interaction quasi-simultanée des deux photons avec la molécule (environ 10^{-16} s). Les processus photoinduits dépendent de manière quadratique de l'intensité lumineuse, contrairement à la dépendance linéaire des processus photoinduits de manière plus conventionnelle à un photon. Le caractère non linéaire de l'absorption localise l'excitation biphotonique au point focal du laser dont le volume est de quelques femtolitres (le volume peut être décrit par une gaussienne 3D d'un diamètre inférieur à un micron et d'une hauteur de l'ordre du micron).

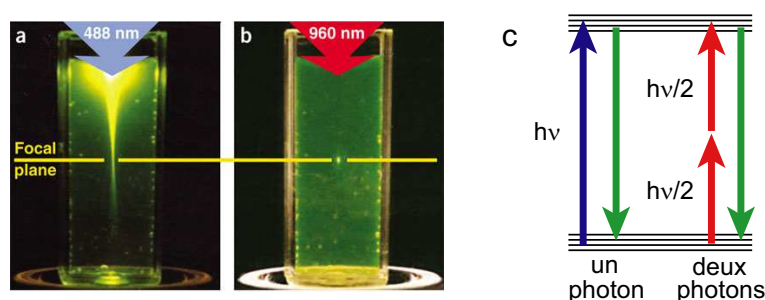


FIG. 1.2 – **a** : Excitation à un photon d'une solution de fluorescéine (488 nm, 0.16 NA) ; **b** : Excitation à deux photons utilisant des impulsions femtosecondes à 960 nm (0.16 NA) ; **a** et **b** tirés de [225] ; **c** : diagramme de Jablonski de l'absorption à un et deux photons.

L'excitation biphotonique n'a été mise au point pour la microscopie de fluorescence qu'en 1990 dans l'équipe de Webb [44] et la première application de décageage à deux photons mise en place par Denk, dans des cellules, date de 1994 [45]. Ce développement tardif résulte de la nécessité du recours à des lasers pulsés pour obtenir assez de photons de fluorescence après excitation biphotonique. Les premières expériences ont été effectuées avec des lasers pulsés à colorants, difficiles d'utilisation. L'introduction de lasers Titane:saphir mode-lockés a été l'élément déclencheur de l'essor de l'excitation biphotonique. Actuellement, Coherent et SpectraPhysics vendent des lasers Ti:sa pilotés par ordinateur où le laser pompe et le laser Ti:sa sont dans la même boîte (Chameleon et Mai Tai respectivement), rendant leur utilisation très simple notamment pour les plate-formes d'imagerie.

La section efficace d'absorption à deux photons exprimée en Göppert-Mayer ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4$), est employée pour mesurer la probabilité d'absorber deux photons. Les sections efficaces d'absorption biphotonique δ des fluorophores organiques courants sont dans la gamme 1-100 GM [218] (38 GM pour la fluorescéine à 780 nm). Il est possible d'augmenter ces valeurs largement mais au détriment de la taille des molécules [8]. Pour les nanocristaux, les sections efficaces d'absorption sont considérables : jusqu'à 47000 GM [121].

Dans le cas des groupements protecteurs, les sections efficaces d'absorption à deux pho-

tons sont du même ordre de grandeur que celles de fluorophores. Cependant le rendement quantique Φ de déprotection est souvent beaucoup plus faible que le rendement quantique de fluorescence. On obtient donc des sections efficaces de photodéprotection (qui sont égales au produit $\delta\Phi$) à deux photons beaucoup plus faibles : elles se situent dans la gamme 10 mGM-1 GM [13, 59, 60] alors que les sections efficaces de fluorescence sont plutôt dans la gamme 10-100 GM. Un gros effort de la part des chimistes porte sur l'amélioration de ces caractéristiques.

1.3 Les différents groupements utilisés pour l'excitation bi-photonique

Depuis 1970, l'introduction de nouveaux groupements protecteurs photoactivables à un photon est un défi pour les chimistes. Le but actuel est d'avoir des groupements aux performances suffisantes après excitation biphotonique pour permettre des utilisations originales en biologie. Actuellement, seulement deux grandes séries de groupements protecteurs photoactivables sont utilisées pour des applications biologiques après excitation biphotonique : la série o-nitrobenzyle et la série coumarine. Il est à noter qu'il existe un calcium cagé, azid-1 [7] qui possède une section efficace de photodéprotection très importante : 1,4 GM [25].

1.3.1 La série o-nitrobenzyle

Le groupement protecteur photolabile qui a été le plus utilisé pour cager des biomolécules est le groupement o-nitrobenzyle, sans doute autant pour des raisons historiques que pour ses propriétés photochimiques. Il a été introduit par Barltrop et al. [16]. Désormais, il existe de nombreuses molécules commerciales cagées avec ce groupement.

La réaction

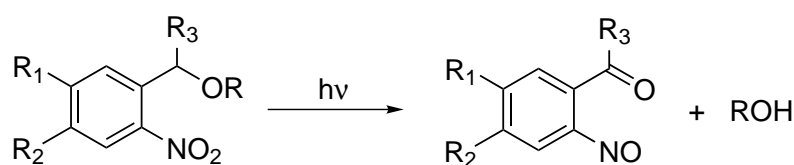


FIG. 1.3 – Bilan de la réaction de photodéprotection d'un alcool cagé par un groupement o-nitrobenzyle

Dès la première utilisation biologique d'un composé o-nitrobenzyle en 1978 [102], Kaplan avait déjà synthétisé deux groupements nitrobenzyles différents et mis en évidence leurs différences de réactivité vis-à-vis de la photolyse. Ces effets de substituants ont amené à synthétiser de très nombreux dérivés (Fig. 1.4).

Les fonctions chimiques à protéger

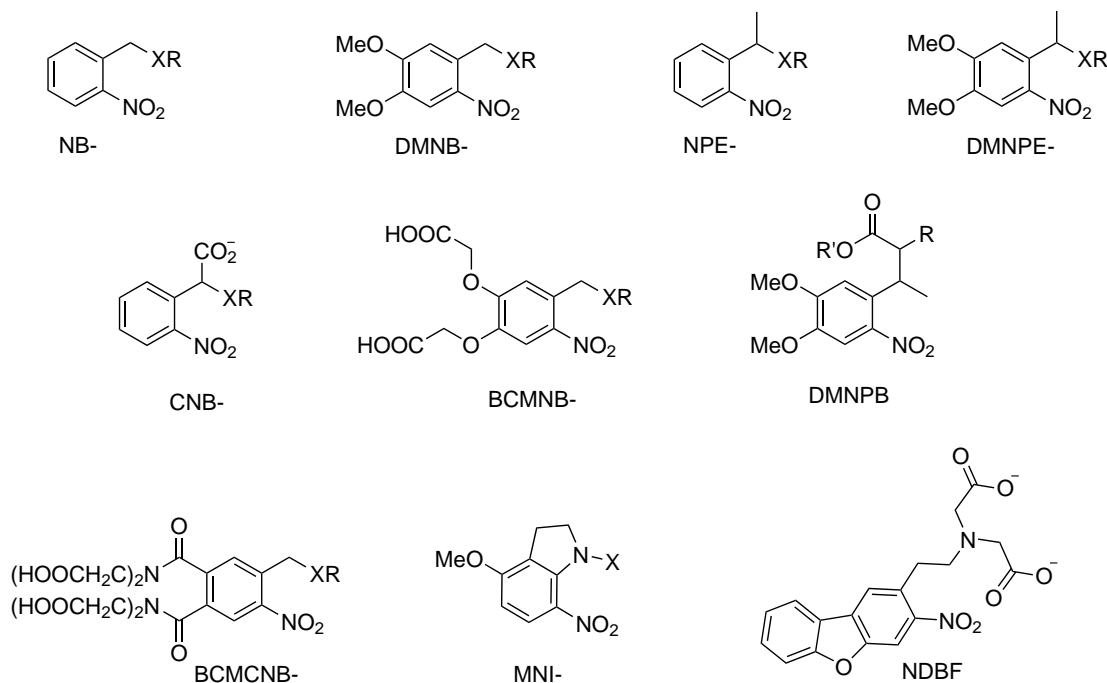


FIG. 1.4 – Les principaux groupements de la série ortho-nitrobenzyle et leurs abréviations.

Plusieurs fonctions chimiques peuvent être protégées avec les groupements o-nitrobenzyles : les phosphates, les carboxylates, les amines, les alcools et les phénols.

Solubilité

La solubilité des groupements o-nitrobenzyles est dépendante des substituants présents sur le cycle aromatique. La balance hydrophile/ hydrophobe peut être adaptée en fonction de l'utilisation biologique. Par exemple, BCMNB et BCMCNB sont très solubles dans l'eau grâce aux deux fonctions carboxylates (Figure 1.4).

L'absorption à deux photons

Certains composés ont fait l'objet d'études à deux photons [13, 101, 152, 193]. Les valeurs de section efficace de décageage sont faibles. Elles se situent autour de 0,1 GM. Seul le composé NDBF-EGTA qui cage le calcium a une bonne section efficace de décageage de 0,6 GM.

Le tableau 1 ci-dessous récapitule les propriétés d'absorption à un et deux photons pour les groupements protecteurs photoactivables étudiés à deux photons. Les sections efficaces d'un certain nombre de dérivés ont été mesurées au cours de cette thèse [13], elles sont toutes comprises entre 10 et 65 mGM.

o-nitrobenzyle en solution aqueuse s'effectue en passant par trois intermédiaires, l'intermédiaire transitoire aci-nitro ($\lambda_{max} = 400\text{nm}$) **A**, le dérivé 1,3-dihydrobenz[c]isoxazol-1-ol **B** et l'hémiacétal **C** (Fig. 1.5). L'absorption transitoire de **A** apparaît en 5ps après l'excitation de l'échantillon. La vitesse de formation de **B** dépend du tautomère considéré mais elle se situe autour de 10^3 s^{-1} . Il est à noter que dans l'eau pure, l'intermédiaire **A** est globalement sous sa forme ionisée puisque $\text{p}K_a(\text{A}/\text{A}^-) = 4$. Le composé ionisé A^- est donc transformé en B^- puis en hémiacétal **C**. La réaction photochimique n'est pas l'étape cinétiquement déterminante, les étapes thermiques qui lui succèdent imposant leur vitesse pour le relargage du substrat biologique. De plus, les valeurs des constantes de vitesse dépendent étroitement de la fonction chimique protégée.

1.3.2 La série coumarine

Les groupements protecteurs photoactivables de la série coumarine libèrent le substrat cagé selon le mécanisme général suivant (Fig. 1.6).

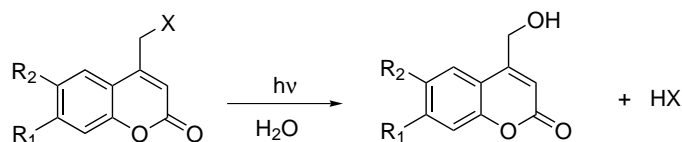


FIG. 1.6 – Bilan de la réaction de photodéprotection d'un substrat cagé par un groupement coumarin-4-yl.

Plusieurs groupements protecteurs photolabiles coumarines ont été synthétisés. Ils peuvent être classés suivant les quatre catégories : 7-alkoxy (I), 6,7-dialkoxy (II), 6-bromo-7-alkoxy (III), 7-dialkylamino (IV). La Fig. 1.7 présente les différentes structures de coumarines ainsi que leurs acronymes régulièrement utilisés.

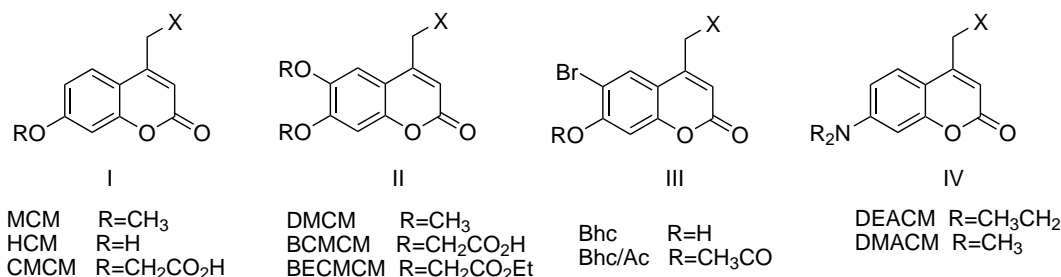


FIG. 1.7 – Structure des composés cagés de type coumarin-4-ylmethyl.

Les fonctions chimiques à protéger

Plusieurs fonctions chimiques peuvent être protégées avec les groupements coumarinyles : les phosphates, les carboxylates, les amines, les alcools, les cétones et les aldéhydes.

Solubilité

La solubilité des groupements coumarines dépend du motif de substitution sur le cycle. CMCM et BCMCM sont solubles dans l'eau du fait de la présence de fonctions carboxylates. BECMCM est plus hydrophobe, il traverse donc plus facilement les membranes lipidiques (Fig. 1.7). Dans cette série, la balance hydrophile/hydrophobe peut être finement adaptée aux contraintes biologiques.

L'absorption à deux photons

Certaines de ces coumarines ont été étudiées dans le contexte d'une excitation à deux photons : la coumarine 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl (Bhc), introduite par Furuta et Tsien [59] [195], la coumarine Bhc-diol introduite un peu plus tard par Dore [133] et une variante de type quinoline, également introduite par Dore [53] (Fig. 1.8).

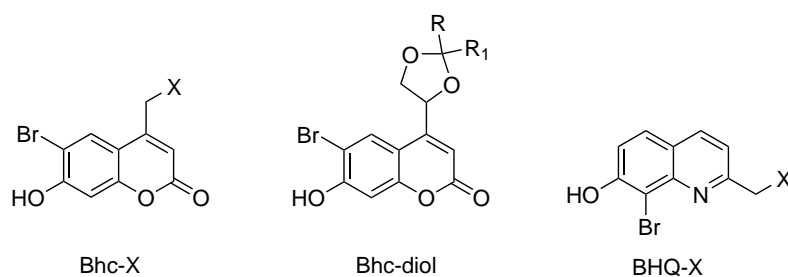


FIG. 1.8 – Les dérivés type coumarine étudiés à deux photons.

Chromophore	λ_{max} (nm)	$\varepsilon(\lambda_{max})$ ($M^{-1}cm^{-1}$)(nm)	$\varepsilon(365)\Phi_{photo}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\delta_u\phi_u^2$ (λ) (GM) (nm)
Bhc-glu [59]	368	17470	329	0.95 (740)
Bhc-diol ($R_1=H$, $R_2=Ph$) [133]	370	18500	1026	0.90 (740)
BHQ-OAc [53]	369	2600	748	0.59 (740)

Table 3. Les propriétés d'absorption à un photon et deux photons des groupements de la série coumarine dans l'eau étudiés à deux photons. Maximum d'absorption à un photon λ_{max} ; coefficient d'absorption molaire au maximum d'absorption $\varepsilon(\lambda_{max})$; figure de mérite à un photon à 365 nm $\varepsilon\phi$ et section efficace de décaage à deux photons $\delta_u\phi_u^2$.

Les groupements de la série coumarine présentent des sections efficaces de décaage à deux photons beaucoup plus satisfaisantes que ceux de la série ortho-nitrobenzyle.

Toxicité des sous-produits

La série coumarine ne présente pas de problème intrinsèque de toxicité des sous-produits.

La cinétique

Moins d'études ont été effectuées dans la série coumarine que dans la série ortho-nitrobenzyle. Des études récentes ont montré que la cinétique de libération était rapide : de l'ordre de la nanoseconde pour de l'ATP [62] et 3 μ s pour de la glycine [188] en utilisant la même coumarine que celle qui a été couplée à l'acide rétinoïque au cours de cette thèse : DMACM (voir Figure 1.7).

Chapitre 2

Le décageage pour contrôler des fonctions biologiques

L'embryogénèse repose largement sur l'expression différentielle des gènes : ¹

- temporellement comme pour l'horloge de segmentation [171].
- spatialement, l'exemple de la segmentation d'un embryon de drosophile est peut-être l'exemple le mieux connu actuellement [66].

Il serait donc particulièrement intéressant de pouvoir contrôler le degré d'expression d'un gène de manière fine. Aucune technique à l'heure actuelle ne permet de faire cela de manière simple. La grande majorité des études est faite soit en surexprimant un gène soit en empêchant son expression (en utilisant des petits ARN interférants (siARN), des oligonucléotides antisens stabilisés (morpholinos) ou en inactivant ou enlevant physiquement le gène du génome). Ces approches ont prouvé leur puissance pour identifier les fonctions des gènes et leurs interactions principales. Cependant des perturbations bien connues de certains gènes permettraient d'avoir accès à la topologie du réseau d'interaction [108]. Théoriquement, le décageage permettrait d'atteindre ce but avec quelques précautions à prendre. Deux éléments sont à prendre en considération : le fait qu'on contrôle facilement la quantité de molécules décagées et la mesure de ce nombre de molécules dans son environnement biologique.

2.1 Des systèmes inductibles pour le contrôle de fonctions biologiques

Les systèmes inductibles forment un outil extrêmement puissant en biologie. Ils permettent d'activer ou de désactiver une fonction au moment choisi par l'expérimentateur s'affranchissant ainsi d'effets indésirables (knock-out conditionnel par exemple). La plupart des systèmes les plus couramment utilisés ne sont pas très spécifiques spatialement et temporellement.

¹Cette régulation se fait à différents niveaux : transcription, localisation et stabilité des ARN messagers, traduction, modifications post-traductionnelles.

Ils comprennent les systèmes inductibles par ligand, la recombinaison induite par la Cre recombinase et l'interférence ARN. D'autres systèmes permettent un contrôle spatial qui peut atteindre l'échelle cellulaire comme le choc thermique (heat shock), la phototransfection ou l'utilisation de ligands cagés.

Les systèmes inductibles par ligand

Les systèmes inductibles par ligand sont les plus populaires [68]. Ils sont fabriqués en détournant un système de contrôle d'un organisme pour l'amener à réaliser la fonction choisie par l'expérimentateur. Les performances de ces systèmes sont très variables. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des systèmes artificiels importés d'un autre organisme. Ainsi le ligand n'a généralement pas d'effet sur la physiologie cellulaire, n'est pas présent naturellement dans la cellule ce qui réduit les fuites du système. On peut avoir des niveaux d'expression du gène cible qui changent d'un facteur pouvant atteindre plusieurs milliers dans les cas les plus favorables.

Cre recombinase

La Cre recombinase est une intégrase impliquée dans le système de recombinaison du bactériophage P1 [2]. Elle catalyse la recombinaison entre deux séquences de 34 paires de bases appelées *loxP*. L'ADN entre les deux séquences est excisé avec une séquence *loxP* si les séquences sont orientées dans le même sens ou inversé si les séquences sont orientées tête-bêche. Grâce à cette technique, des souris knock-out peuvent être obtenues pour des gènes de développement embryonnaires létaux en les plaçant entre deux sites *loxP*. Le croisement de ces souris avec une souche de souris exprimant la Cre recombinase soit de manière ubiquitaire soit dans un tissu particulier permet l'excision du gène dans leurs descendants dans les cellules exprimant la Cre recombinase. Ce système a été modifié par Chambon et al. [55, 97, 149] pour le rendre inductible en présence d'œstrogène et ainsi avoir un contrôle temporel sur l'évènement de recombinaison (plus de détails peuvent être trouvés dans l'Appendice B).

Interférence ARN

L'interférence ARN est une réponse biologique à la présence d'ARN double-brin amenant leur dégradation en segments d'une dizaine de paires de bases [80]. Elle sert comme mécanisme de défense contre des acides nucléiques exogènes et régule l'expression des gènes de la cellule par l'intermédiaire de microARN [18]. Le travail de Mello et Fire [58] a lancé cette technique révolutionnaire qui permet d'avoir des approches expérimentales à l'échelle génomique [192].

Heat shock

Les systèmes heat shock reposent sur l'utilisation de promoteurs heat shock qui vont être induits grâce à un choc thermique. L'élévation de température peut être localisée à l'échelle cellulaire si elle est obtenue en focalisant un laser [79]. Cette méthode est très utilisée pour

avoir un contrôle temporel de l'expression de gènes, le contrôle spatial n'ayant été que très peu utilisé.

Phototransfection

La phototransfection est une méthode récente qui permet l'introduction d'ADN [198] ou d'ARN en perçant la membrane grâce à un faisceau laser. La résolution spatiale de cette méthode est la cellule unique ou même des régions sub-cellulaires dans le cas de neurones comme cellules cibles [17].

Composés cagés

Les composés cagés offrent un raffinement aux systèmes inductibles par ligand. Ils confèrent au système une résolution spatiale limitée par la diffraction (subcellulaire) et une résolution temporelle dépendant de la cinétique de la chimie de déprotection (pouvant être inférieure à l'échelle de la milliseconde). De plus la réaction de décaageage peut être complètement caractérisée, ce qui permet un contrôle fin de l'induction.

2.2 Les molécules cagées en biologie : état des lieux

2.2.1 Autour des neurones

La manipulation de l'activité neuronale est un moyen puissant pour collecter des informations sur les fonctions neuronales. Dans la plupart des cas, des stimulations électriques sont appliquées en utilisant des électrodes. Cependant cette technique est contraignante, invasive et a beaucoup de limitations. La lumière peut être un vecteur de stimulation particulièrement intéressant dans ce domaine [28]. Ceci explique sûrement le fait que les neurosciences utilisent largement des composés cagés.

Calcium

Le relargage d'ions Ca^{2+} a été une des premières applications du décaageage en neurosciences. Le principe repose sur l'utilisation de chélatants qui changent d'affinité [5] ou sont clivés [103] après excitation. Ces molécules sont disponibles commercialement et sont utilisées extrêmement couramment. L'utilisation d'excitation biphotonique est beaucoup moins répandue [25].

Neurotransmetteurs

De nombreux neurotransmetteurs ont été cagés : glutamate, dopamine [123], carbamoylcholine [150], sérotonine [23] et la plupart sont commercialisés par Invitrogen. Le glutamate a reçu un intérêt particulier ; couplé à plusieurs groupements protecteurs [54, 59, 214, 215], il a pu être décaagé *in vivo* par excitation biphotonique [54, 59, 146].

2.2.2 Systèmes d'induction génique

Contrairement à ce qui se fait aujourd'hui dans la communauté des neurosciences, les composés cagés sont très peu, voire pas du tout, utilisés pour contrôler l'expression génique, aucun des composés décrit ci-dessous n'étant disponible commercialement. Les divers groupes qui synthétisent des substrats cagés se bornent généralement à faire une démonstration de principe sans essayer de répondre à des questions biologiques. L'excitation lumineuse se fait toujours à un photon, les potentialités de l'excitation à deux photons en ce qui concerne la résolution spatiale étant pratiquement toujours évoquées.

GAL4VP16

Dans une approche pionnière [29], le groupe de Minden a cagé l'activateur transcriptionnel GAL4VP16 en empêchant sa fixation à l'ADN. Ce groupe a utilisé cette technique chez la drosophile pour répondre à des questions de destinée cellulaire.

Ecdysone

L'ecdysone est une hormone stéroïdienne impliquée dans la mue de *Drosophila melanogaster*. Elle se fixe sur l'hétérodimère constitué du récepteur à ecdysone et du produit du gène *ultraspiracle*, ce qui active le complexe qui se fixe sur les éléments de réponse à ecdysone et entraîne l'expression génique. Les avantages de ce système résident sa coévolution, la lipophilie des ligands ecdystéroïdiens, leur pénétration dans tous les tissus, leur absence de toxicité et d'action physiologique chez les mammifères. Au vu de ces propriétés, Evans et al. ont mis en œuvre ce système pour l'induction de gènes chez la souris [160]. L'ecdysone a ensuite été cagée par le groupe de Lawrence en utilisant le diméthoxynitrobenzyle [128]. Le principe d'utilisation de ce composé a été montré en utilisant des cellules transfectées transitoirement avec une construction luciférase rapportrice et de l'excitation à un photon. Cette molécule n'a pas été utilisée depuis.

Tétracycline

Le système d'induction basé sur la tétracycline a été introduit par Gossen et Bujard [72]. Ces derniers se sont basés sur l'opéron de résistance à la tétracycline d'*E. coli*. Deux constructions biologiques sont disponibles : le système Tet-on (induction du gène en présence de tétracycline) et le système Tet-off (induction du gène en absence de tétracycline). L'évolution T-REx du système a résolu certains points d'achoppement [221]. Ce système est maintenant très largement utilisé avec la doxycycline comme inducteur. La doxycycline a été cagée par Cambridge et al. en utilisant le diméthoxynitrobenzyle comme groupement protecteur photolabile [30]. Il faut noter que dans ces séries les substrats sont difficilement fonctionnalisables en raison de leur faible solubilité (observations de l'équipe de Ludovic Jullien).

Œstrogènes

Les œstrogènes sont responsables des caractères sexuels secondaires femelles. L'œstradiol a été cagé par le groupe de Koh [40]. Il agit comme agoniste sur le récepteur à œstrogène qui appartient à la super famille des récepteurs nucléaires. Le tamoxifène utilisé comme médicament contre le cancer du sein est quant à lui un antagoniste de ce récepteur. Il est surtout utilisé en coordination avec une Cre recombinase modifiée [55, 97, 149]. Il a été cagé par le groupe de Koh [129] et par notre groupe.

Activateurs de RAR

Des agonistes des récepteurs à acide rétinoïque (RAR) ont été cagés par le groupe de Koh [130]. Curieusement, l'acide rétinoïque lui-même ne semble pas avoir été cagé, sûrement en raison de son propre comportement photochimique. Notre groupe a cagé l'acide rétinoïque avec plusieurs groupements protecteurs en vue d'applications sur organisme entier.

2.2.3 Divers

ATP

L'ATP a été une des premières molécules couplées au groupement protecteur photolabile ortho-nitrobenzyle [102]. L'ATP cagé correspondant s'est révélé non métabolisable et l'ATP libéré après illumination aux UV a pu être utilisé par une enzyme. Dans l'article d'origine, les auteurs espèrent que cet outil facilitera les études de métabolisme de l'ATP en ayant un réservoir non hydrolysable et qu'il permettra de faire des études cinétiques grâce à la précision temporelle apportée par l'excitation lumineuse. Depuis ce composé est commercial.

Inhibiteurs de kinases

Des molécules destinées à la régulation de l'activité d'enzymes ont été cagées. Dans certaines études, la protéine elle-même a été cagée. L'effort s'est massivement porté sur les kinases en raison de leur intérêt thérapeutique. En effet, on peut faire état d'une activité kinase anormale dans toutes les maladies humaines. Ainsi des molécules cagées ont été développées par le groupe de Lawrence pour détecter l'activité de kinases [203], pour inhiber cette activité [217]. Les groupes de Bayley et Lawrence ont cagé une kinase à son site catalytique [41, 227].

ADN et ARN cagés

Les groupes de R.Y. Tsien et Okamoto ont cagé des acides nucléiques et ont appliqué cette méthode avec succès chez le poisson zèbre [10] cependant la méthode n'a pas été utilisée depuis.

Traceurs fluorescents

De la même façon que les GFP photoactivables ([165] et Dronpa [78]) ou les protéines changeant de longueur d'onde d'émission après excitation lumineuse (Kaede [11] et dérivés de la GFP [37, 77]) le permettent, les traceurs fluorescents cagés servent à individualiser des cellules. Couplés à du dextran, ils présentent néanmoins une stabilité bien supérieure. Ils servent à effectuer des études de lignage [106, 154]. Des traceurs cagés à base de fluorescéine et rhodamine sont commercialisées par Invitrogen. Certains groupes développent des traceurs basés sur des coumarines [222].

Contrôler des fonctions cellulaires

Dore a cagé un inhibiteur de la synthèse protéique [70]. La migration cellulaire, le cycle cellulaire, la polymérisation d'actine – entre autres – peuvent être contrôlés en utilisant des peptides ou des protéines cagés ([201] et [122] pour une revue). Des drogues agissant sur les microtubules ou l'actine ont aussi été cagées (phalloïdine et taxol [190]). La capsaïcine utilisée dans l'étude de la douleur a aussi été cagée récemment [67].

Molécule	Références	Utilisation à deux photon	Commercial
calcium	[5, 25, 103]	oui [25]	oui (Invitrogen)
glutamate	[54, 59, 214, 215]	oui [54, 59, 146]	oui (Invitrogen)
dopamine	[123]	non	non
carbamoylecholine	[150]	oui [150]	oui (Invitrogen)
sérotonine	[23]	non	non
GAL4VP16	[29]	non	non
ecdysone	[128]	non	non
tétracycline	[30]	non	non
œstradiol	[40]	non	non
tamoxifène	[129]	non	non
agoniste de RAR	[130]	non	non
ATP	[102]	non	oui (Invitrogen)
inhibiteurs de kinase	[41, 203, 217, 227]	non	non
fluorescéine et rhodamine	[106, 154]	non	oui (Invitrogen)

Table 1. Récapitulatif des principales molécules ayant été cagées, de leur utilisation couplée à une excitation biphotonique et de leur disponibilité commerciale.

Chapitre 3

Le cahier des charges du décaageage en milieu biologique

3.1 Les contraintes de la chimie

L'emploi de molécules cagées dans un contexte biologique impose que ces molécules soient inactives jusqu'à la libération du produit effectuée par l'expérimentateur grâce à une impulsion lumineuse. Pour le bon déroulement de l'expérience, toute fuite est à proscrire. Cela impose un certain nombre de contraintes à la molécule cagée qui doit :

- i) pouvoir entrer passivement dans les cellules ;
- ii) être stable chimiquement et dans des conditions physiologiques ;
- iii) être biologiquement inactive et non toxique ;
- iv) libérer des sous-produits de photodéprotection dénués d'activité biologique.

Le décaageage se voulant une technique non invasive, le premier point est crucial. Compte tenu de la nature des milieux biologiques, cela nécessite l'emploi de groupements protecteurs qui soient à la fois suffisamment hydrophiles et hydrophobes. D'ailleurs, pour certaines molécules comme la doxycycline [30] ou la phalloïdine (Heinz Faulstich, communication personnelle), leurs analogues cagés sont plus solubles que la molécule de départ. L'entrée passive de l'espèce cagée peut constituer un problème si on utilise des molécules très grosses comme des protéines ou des acides nucléiques qui, de toutes façons, ne peuvent pas traverser la membrane.

Le deuxième point est contraignant. En effet, la cellule contient un arsenal d'enzymes hydrolytiques susceptibles de catalyser la coupure de la molécule cagée. Par ailleurs, les conditions de salinité et de pH peuvent être assez diverses selon l'environnement cellulaire où se trouvent localisées les molécules cagées [131]. Du point de vue des contrôles, il faut donc évaluer à la stabilité des molécules en vérifiant qu'aucune réponse biologique induite par le substrat libéré ne se manifeste en l'absence d'illumination.

Le troisième point peut raisonnablement être prédit *a priori* si on connaît la structure du complexe molécule-récepteur. Dans notre cas, pour l'acide rétinoïque [172] et le tamoxifène

[183], la position des molécules dans la poche de leurs récepteurs laissent penser que l'ajout d'un groupement protecteur inactiverait certainement la fonction biologique de la molécule.

Le quatrième point ne doit pas être négligé. Notamment, l'utilisation de groupements protecteurs de la série nitrobenzyle peut entraîner la photolibération de sous-produits toxiques pour la cellule. Dans ces circonstances, il faut s'assurer de l'absence d'effets secondaires aux concentrations utilisées en pratique.

3.2 Les contraintes photochimiques et cinétiques

3.2.1 Dommages photo-induits

L'excitation biphotonique nécessite une densité de photons importante ce qui se traduit par l'utilisation de fortes intensités lumineuses. L'énergie disponible dans le point focal du laser induit cependant d'autres phénomènes que la seule photodéprotection, ce qui amène à limiter la puissance d'excitation pour ne pas endommager l'échantillon biologique. Deux processus physiques sont principalement à prendre en compte :

- les phénomènes d'absorption lumineuse qui entraînent une dissipation d'énergie sous forme de chaleur et qui pourraient provoquer des échauffements nocifs pour la cellule ;
- les phénomènes d'ionisation induits par le champ électrique intense régnant dans le point focal et qui pourraient provoquer la nucléation de bulles gazeuses.

Phénomènes d'absorption-dissipation

Deux types de chromophores peuvent être distingués dans les tissus biologiques : l'eau et les chromophores endogènes (voir Figure 3.1).

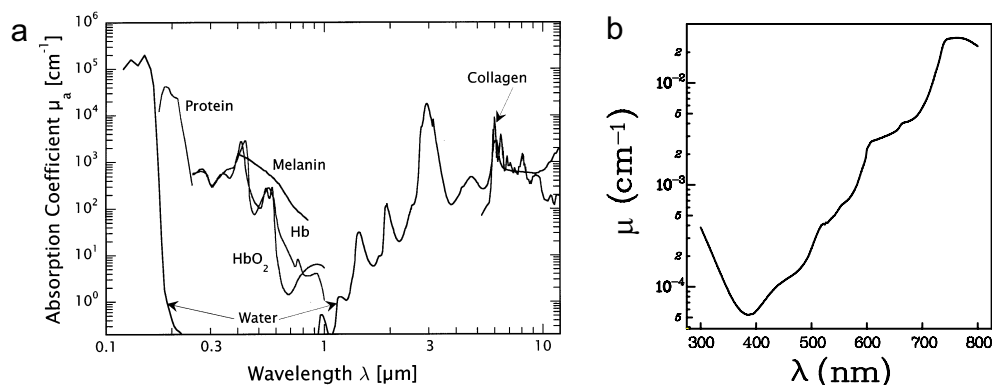


FIG. 3.1 – Coefficient d'absorption à un photon des principaux chromophores tissulaires (a; tiré de [206]) et de l'eau (b; données tirées de [27]) dans la gamme de longueurs d'onde de l'UV-IR.

Absorption de l'eau

En solution aqueuse, l'eau est en forte concentration (55 mol/l) mais son coefficient d'absorption molaire est négligeable : en effet seulement un millionième de l'énergie contenue dans l'impulsion laser sera déposée dans le point focal (distance de 1 μm avec un coefficient d'absorption de l'ordre de 10^{-2} cm^{-1} dans la gamme 700-800 nm utilisée pour le décageage [27]). Schönle et Hell [185] ont calculé que l'échauffement résultant est de l'ordre de 0,1 K pour une puissance de 100 mW à 850 nm et une durée d'illumination de 1 s. Ceci est largement négligeable, surtout aux puissances laser utilisées en pratique (inférieures à 5 mW).

Absorption des chromophores endogènes

Les chromophores endogènes sont présents en beaucoup plus faible concentration que l'eau. En revanche, ils peuvent présenter une absorption à un photon beaucoup plus importante que l'eau dans le proche infra-rouge. Ainsi les coefficients d'absorption de l'hémoglobine et de la mélanine sont importants dans cette gamme de longueurs d'onde (Figure 3.1a). Pour l'hémoglobine, le coefficient d'absorption molaire est de l'ordre de $4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ entre 700 nm et 800 nm et la concentration sanguine est de l'ordre de 1 mM [89]. Pour un trajet optique de 1 μm comme dans le point focal, l'hémoglobine absorbe 0,5 millièmes de l'intensité lumineuse soit 500 fois plus que l'eau à la même longueur d'onde. Le sang étant constitué en majorité d'eau, on peut mobiliser les résultats de Schönle et Hell [185] pour estimer l'augmentation de température dans le point focal. A une puissance de 10 mW, on attend un échauffement de 5 K. Les auteurs indiquent une dépendance logarithmique de l'augmentation de la température avec la durée de l'illumination (une augmentation cinq fois moindre de la température résulte d'une durée d'illumination 10000 fois plus courte soit 10 μs). En principe, une réduction de l'échauffement induite par ces chromophores peut être obtenues en modulant temporellement l'intensité du laser de manière à laisser au système le temps de dissiper la chaleur dégagée par le phénomène d'absorption.

Ionisation

Phénomènes induits par l'ionisation

Une autre source de dommages photo-induits réside dans la possibilité d'ioniser le milieu cellulaire en raison du champ électrique du laser [206] : il se forme alors un plasma dans le point focal. Ce phénomène est largement utilisé en chirurgie laser pour effectuer de l'ablation tissulaire. La formation de ce plasma émet des ondes de choc et crée une bulle de cavitation contenant les composés évaporés. L'onde de choc change la perméabilité de la membrane et exerce une influence sur la viabilité cellulaire sans altérer la morphologie. Ces effets mécaniques sont moins importants quand la durée des impulsions laser diminue [161].

Prédiction du seuil d'ionisation dans nos conditions expérimentales

Essayons d'évaluer la puissance du laser à laquelle le milieu s'ionise.

D'après Vogel et al. [205], le seuil d'ionisation varie exponentiellement (en première approximation) avec la durée des impulsions laser lorsqu'elles sont plus courtes que 10 ps. On obtient une puissance surfacique limite d'ionisation de 4.10^{16} W.m⁻² pour des impulsions de 200 fs dans l'eau [205]. Le champ électrique associé à toute puissance surfacique du laser se calcule :

$$E_0 = \sqrt{\frac{2P_s}{\epsilon c}} \quad (3.1)$$

où P_s désigne la puissance surfacique et ϵ la permittivité du milieu considéré.

Le champ électrique associé à la puissance seuil d'ionisation dans l'eau pure est ainsi de l'ordre de 6.10^9 V.m⁻¹. Sacchi a montré que la valeur de ce champ est diminuée d'un facteur 2 dans de l'eau contenant des impuretés (eau du robinet) [176]. Le champ électrique associé au seuil d'ionisation serait alors environ $1,5.10^9$ V.m⁻¹ avec une puissance surfacique associée de 10^{16} W.m⁻² si on considère que la permittivité du milieu intra-cellulaire est comparable à celle de l'eau pure ¹.

Le travail de Sacchi [176] montre que le logarithme de la probabilité de former un plasma varie linéairement avec l'inverse du champ électrique appliqué et la pente est d'autant plus grande que la durée des impulsions est brève. Pour des impulsions de 30 ps, la probabilité d'ionisation est de 1% quand on applique un champ égal à 60% de celui auquel on obtient 100% d'ionisation. Nos impulsions faisant 200 fs, nous pouvons raisonnablement penser que la probabilité de claquage est nulle si la puissance est suffisamment faible devant la puissance seuil (nous avons choisi des puissances deux fois plus faibles que la puissance seuil).

Observations expérimentales

Evaluons d'abord la puissance moyenne sur échantillon donnant la puissance de crête associée au seuil d'ionisation dans nos conditions expérimentales. Notre laser a une fréquence de répétition de 76 MHz et délivre des impulsions de 200 fs. Avec un objectif d'ouverture numérique 1,2, le point focal a un diamètre de $0,3 \mu\text{m}$. Nous pouvons ainsi convertir la puissance surfacique nécessaire à l'ionisation dans le point focal en puissance moyenne délivrée par le laser. Dans nos conditions, la valeur 10^{16} W.m⁻² donne 11 mW de puissance moyenne sur échantillon.

Au cours des expériences effectuées à des puissances supérieures à 10 mW (durée des impulsions : 200 fs), nous observons la formation d'une bulle de cavitation qui persiste tant que le point focal du laser est placé dans la cellule d'un embryon de poisson zèbre. Nous avons observé aussi une onde de choc au tout début du phénomène qui effectivement ne change pas

¹en prenant les concentrations ioniques intracellulaires données par Lodish [131] et les modifications de la permittivité en fonction des ions en solution données par Hasted et al. [82], on obtient une diminution de la permittivité de 1,5 par rapport à celle de l'eau pure.

la morphologie du tissu. Cette valeur est en excellent accord avec la valeur dérivée ci-dessus à partir des données de la littérature.

En pratique, nous n'avons jamais observé la formation de bulles de cavitation pour des puissances moyennes sur échantillon inférieures ou égales à 5 mW².

Conclusion sur les dommages photo-induits

Les phénomènes d'ionisation du milieu sont donc plus contraignants que l'échauffement thermique dû à l'absorption à un photon de l'eau et des chromophores endogènes. En pratique, aux stades embryonnaires avec lesquels nous avons travaillé, la seule molécule contribuant *a priori* significativement au phénomène est l'eau ; les échauffements associés sont largement négligeables. L'ionisation possible sous l'effet du champ électrique du laser devient donc la source principale de dommages pour les cellules. Il faut veiller à rester en dessous du seuil d'ionisation (10 mW pour notre laser Ti:sa).

3.2.2 Considérations géométriques

Décageage en milieu fermé

Modèle

Le point focal du laser est placé dans une cellule. Ce système peut être considéré comme fermé si la cinétique d'échange du réactif et des produits de la réaction de photodéprotection entre l'intérieur de la cellule et le milieu extra-cellulaire est lente par rapport à la cinétique de décageage dans cette cellule.

Partant du composé cagé \mathbf{cA} présent dans la cellule à une concentration initiale cA_0 , la réaction de décageage aboutit à la formation des espèces \mathbf{A} et \mathbf{G} qui désignent la molécule biologiquement active et le sous-produit de photodéprotection issu du groupement protecteur :



La réaction a lieu uniquement dans le point focal de volume V_{exc} .

Nous pouvons donc écrire l'évolution des concentrations en \mathbf{cA} et \mathbf{A} , cA et A :

$$\frac{\partial cA(r, t)}{\partial t} = D_{\mathbf{cA}} \frac{\partial^2 cA}{\partial r^2} - k_{unc} \delta(V_{\text{exc}}) cA \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial A(r, t)}{\partial t} = D_{\mathbf{A}} \frac{\partial^2 A}{\partial r^2} + k_{unc} \delta(V_{\text{exc}}) cA \quad (3.4)$$

où k_{unc} est la constante cinétique de décageage dans le point focal V_{exc} , δ est la distribution de Dirac, $D_{\mathbf{cA}}$ et $D_{\mathbf{A}}$ sont les coefficients de diffusion de \mathbf{cA} et \mathbf{A} .

²on ne peut pas éviter ici le phénomène par une modulation temporelle simple de l'intensité du laser contrairement à l'échauffement par absorption-dissipation. En effet, les phénomènes mécaniques s'établissent en des temps de l'ordre de la nanoseconde, inaccessibles aux modulateurs acousto-optiques

L'expression générale de la constante cinétique de décaage k_{unc} a été obtenue par Kiskin et al. [112] :

$$k_{unc} = 0.737\delta_u \frac{T}{\tau_P} \left(\frac{\lambda}{\pi h c \omega_{xy}^2} \right)^2 P^2 \quad (3.5)$$

où δ_u est la section efficace de décaage à deux photons, T et τ_P désignent respectivement la période et la durée des impulsions du laser, λ est la longueur d'onde d'excitation, ω_{xy} est le diamètre du point focal et P est la puissance des impulsions laser sur l'échantillon.

Dans une cellule eucaryote de taille $10 \mu\text{m}$, le rapport entre le volume de la cellule et celui du point focal ($\sim 1 \text{ fl}$) est de l'ordre de 1000; la photodéprotection est donc locale. Une première approche envisageable de photodéprotection consiste à ne pas s'appuyer sur la diffusion des molécules à l'intérieur de la cellule afin d'atteindre la résolution temporelle la plus élevée possible. Comme le décaage du substrat uniquement dans le point focal n'aboutit au plus qu'à une photodéprotection de $1/1000$ de la quantité en \mathbf{cA} , il faudrait que le point focal parcourt une centaine de points dans la cellule à une vitesse plus grande que celle de l'homogénéisation par diffusion pour que l'approche soit pertinente. Compte tenu que le temps d'homogénéisation τ_V des espèces par diffusion dans une cellule eucaryote standard de $10 \mu\text{m}$ est $\tau_V \simeq 20 \text{ ms}$ pour des "petites" molécules avec un coefficient de diffusion de $8.10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, cette première approche n'est donc pas réaliste.

Il est donc préférable d'explorer une seconde approche qui exploite l'homogénéisation par diffusion à l'intérieur de la cellule afin d'obtenir une concentration bien déterminée en substrat photoproduit. Dans ces conditions, l'équation (3.4) peut être résolue avec une hypothèse minimale sur la géométrie du volume fermé V à condition que le temps caractéristique associé au décaage moyenné sur le volume cellulaire $V/k_{unc}V_{exc}$ soit grand devant τ_V .

Si cette hypothèse est vérifiée, les concentrations des espèces peuvent être considérées comme homogènes dans l'ensemble de la cellule et le système d'équations (3.3–3.4) peut s'écrire :

$$\frac{dcA(t)}{dt} = -k_{unc} \frac{V_{exc}}{V} cA \quad (3.6)$$

$$\frac{dA(t)}{dt} = k_{unc} \frac{V_{exc}}{V} cA \quad (3.7)$$

En introduisant la constante cinétique de la réaction de décaage apparente

$$k = k_{unc} V_{exc}/V \quad (3.8)$$

on obtient les équations (3.9–3.10) :

$$\frac{dcA}{dt} = -k cA \quad (3.9)$$

$$\frac{dA}{dt} = k cA \quad (3.10)$$

dont la solution s'écrit :

$$A(t) = cA_0 \left(1 - e^{-kt}\right) \quad (3.11)$$

Implications sur la section efficace

La condition d'homogénéisation par diffusion plus rapide que le décaage s'écrit $1/(k_{unc}V_{exc}/V) \gg 20$ ms. Nous pouvons ainsi évaluer la plus petite section efficace de photodéprotection compatible avec l'homogénéité en substrat libéré pour des puissances d'excitation n'endommageant pas les cellules ($P < 5$ mW sur échantillon) : avec $k_{unc}V_{exc}/V = 20 \times \delta_u(\text{GM}) \text{ s}^{-1}$ ³, on obtient $\delta_u = 2$ mGM. Pour des sections efficaces plus grandes, il sera nécessaire réduire la puissance du laser pour préserver l'homogénéité en substrat photoproduit au cours du décaage.

Cas d'un décaage multiétapes

De manière générale, une étape photochimique et une succession d'étapes thermiques mènent au décaage de la molécule d'intérêt (constante cinétique de l'étape cinétiquement déterminante k_{th}). L'obtention d'une concentration bien définie en molécule cagée impose des contraintes sur les constantes cinétiques de ces réactions.

Dans le cas où le système est fermé, le confinement permet à k_{th} de pouvoir être assez petit. Néanmoins, il est souhaitable que k_{th} demeure plus grand que les constantes cinétiques associées aux phénomènes biologiques à contrôler afin de pouvoir considérer que l'induction est circonscrite dans le temps. Typiquement, dans des applications dans des neurones, l'échelle de temps relevante est la milliseconde. Pour l'induction de gène, il s'agit plutôt de la seconde-minute.

Décaage en milieu ouvert

Cette situation couplant la réaction de photodéprotection à la diffusion a été traitée par Kiskin et Ogden [111]. Ces auteurs considèrent que la réaction de photodéprotection est initiée dans le point focal modélisé par une sphère. Le point focal est soit placé dans un milieu infini, soit au centre d'une sphère (décaage intra-cellulaire). Dans le cas où le décaage n'implique qu'une seule étape photochimique, la concentration stationnaire en molécule décaagée dans le point focal est donnée par l'expression :

$$A = cA_0 \frac{k_{unc}\tau_D/2,5}{1 + k_{unc}\tau_D/2,5} \quad (3.12)$$

avec k_{unc} donné par l'équation (3.5).

En milieu ouvert, on cherche à décaager la fraction la plus grande possible de substrat cagé tout en conservant des puissances qui n'endommagent pas la cellule. La condition $P < 5$ mW

³hypothèse pour l'application numérique : utilisation d'un objectif d'ouverture numérique 1,2, d'un laser Ti:sa de fréquence de répétition 76 MHz, avec des impulsions de 200 fs à 750 nm

impose ici : $k_{unc} < 22000 \times \delta_u \text{ s}^{-1}$ où δ_u est exprimé en GM ⁴. Pour des petites molécules comme celles utilisées au cours de cette thèse, $\tau_D \sim 30 \mu\text{s}$. Grâce à l'équation (3.12), on peut ainsi calculer les sections efficaces minimales pour décager des quantités données de substrat. Pour décager 1% (respectivement 10%, 50%), la section efficace de décageage δ_u devra donc être plus grande que 38 mGM (respectivement 0,42 GM, 3,8 GM). Pour décager une fraction significative de molécules, la contrainte sur la section efficace est donc ici plus importante que dans le cas précédent : il faut typiquement que $\delta_u \sim 1 \text{ GM}$.

Kiskin et Ogden se sont intéressés aussi au cas où le décageage comporte une étape thermique [111]. Pour que la localisation des produits au niveau du point focal demeure satisfaisante, il faut que le temps caractéristique de formation des produits soit plus petit que le temps de diffusion des produits à travers le point focal, c'est-à-dire il faut que la cinétique globale soit plus rapide que $30 \mu\text{s}$ qui est le temps typique de diffusion dans le point focal des molécules que nous avons utilisées. En particulier l'étape thermique de temps caractéristique $1/k_{th}$ doit être rapide à cette échelle de temps. Il faut donc que $k_{th} > 1/\tau_D$ c'est-à-dire que $k_{th} > 10^5 \text{ s}^{-1}$.

⁴hypothèse pour l'application numérique : voir la note précédente.

Chapitre 4

Quantification de la photoproduction de substrat

En théorie, le décaage permet d'appliquer des perturbations maîtrisées dans un système biologique. La “maîtrise” implique ici cependant qu'on puisse contrôler facilement la quantité de molécules décaées et qu'on puisse mesurer ce nombre de molécules dans l'environnement biologique.

4.1 Contrôle de la quantité de molécules libérées

Comme pour les contraintes sur la section efficace et la constante cinétique de décaage, il faut distinguer deux configurations géométriques.

4.1.1 Décaage en système ouvert

Dans le cas d'un système ouvert, la diffusion contribue à la concentration maximale de produit pouvant être atteinte dans le point focal. Déterminée par Kiskin et Ogden [111], la fraction de produit décaé vaut $k_{unc}\tau_D/2,5/(1 + k_{unc}\tau_D/2,5)$ (voir l'équation 3.12) où k_{unc} est la constante cinétique de décaage dont l'expression dépend du carré de la puissance d'illumination et τ_D est le temps de diffusion de la molécule à travers le point focal. Dans cette expression, la puissance d'illumination est le seul paramètre accessible à l'expérimentateur pour fixer la concentration en substrat photoproduit une fois que le groupement protecteur a été choisi. Le fait de travailler dans un système biologique limite la puissance applicable sur échantillon (voir le paragraphe 3.2.1). Il est donc particulièrement important de bien choisir le groupement protecteur en fonction de la fraction maximale de produit souhaitée.

4.1.2 Décaage en système fermé

Nous avons déjà vu au paragraphe 3.2.2 que le temps caractéristique associé au décaage moyenné sur le volume cellulaire doit être grand devant le temps d'homogénéisation des

espèces par diffusion dans la cellule pour pouvoir contrôler facilement la concentration en molécules déca­gées.

Fonction de la constante cinétique associée à l'éventuelle étape thermique impliquée dans le relargage du produit k_{th} , deux cas sont à considérer :

- k_{th} est plus grand que la constante cinétique de déca­geage à l'intérieur de la cellule. On n'a pas à se préoccuper de l'existence d'une étape thermique. On peut utiliser l'équation (3.11) pour obtenir la concentration A en molécules déca­gées \mathbf{A} en fonction du temps d'illumination où la constante cinétique de déca­geage dans la cellule k est donnée par l'équation (3.5). Les paramètres expérimentalement accessibles pour changer la fraction en molécule déca­gée sont ici la durée et la puissance d'illumination (à travers la constante cinétique k). Dans le cas d'un système fermé, il est donc possible de déca­ger le substrat dans sa totalité ¹.

- k_{th} est plus petit que la constante cinétique de déca­geage à l'intérieur de la cellule. *A priori*, on ne peut plus déca­ger de manière continue si on veut obtenir une concentration en molécules ajustable. Les conditions d'éclairages sont à définir selon que les étapes photochimiques et thermiques sont réversibles ou non. Si la réaction de photoactivation et les étapes thermiques sont irréversibles, alors le traitement précédent est applicable. Cependant, si une au moins des conditions n'est pas remplie, il faut connaître les constantes cinétiques des réactions qui aboutissent au relargage de la molécule et recalculer l'évolution temporelle de la concentration de produit déca­gé pour adapter l'illumination à la concentration finale choisie.

4.2 Mesure de la quantité de molécules libérées

Nous venons de voir qu'il est relativement aisé de contrôler la fraction de molécules qui est déca­gée en jouant simplement sur la puissance d'illumination et/ou la durée d'illumination. Cependant les grandeurs associées à la réaction de déca­geage peuvent dépendre du milieu. Il est donc nécessaire de mesurer ces grandeurs *in situ* avant de pouvoir prédire exactement la concentration de molécules déca­gées. Deux grandeurs en particulier sont à examiner : la constante cinétique de déca­geage en milieu fermé qui fait intervenir le volume dans lequel a lieu la réaction de déca­geage et le temps de diffusion des molécules à travers le point focal. On néglige ici les phénomènes de diffraction potentiels pouvant intervenir dans un objet biologique ².

¹Ceci demeure impossible à l'heure actuelle dans un système ouvert. En combinant les plus grandes sections efficaces de déca­geage disponibles (3 GM [59]) et la puissance limite tolérée par l'échantillon biologique (5 mW, voir 3.2.1), on peut espérer au maximum déca­ger la moitié du substrat.

²Ces phénomènes pourraient affecter la géométrie du point focal et donc la constante cinétique de déca­geage et le temps de diffusion à travers le point focal. Tous les autres paramètres concernent les impulsions ne changent pas quel que soit le milieu.

4.2.1 Constante de diffusion

Si on considère des petites molécules relativement hydrophiles et n'interagissant *a priori* pas avec des composants de la cellule, on peut considérer que leur coefficient de diffusion sera égal à celui mesuré dans l'eau (Mastro et al. [144] rapportent un facteur 2 pour des petites molécules). En revanche, si les molécules sont susceptibles d'être piégées dans des membranes ou dans des protéines, leur coefficient de diffusion peut-être largement affecté. Ainsi, pour l'acide rétinoïque complexé, des coefficients de diffusion "macroscopiques" (c'est-à-dire avec changement de cellule) largement inférieurs à ceux attendus dans l'eau ont été mesurés : $D_{RA} = 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ [51] contre $D_{RA} \sim 3 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ attendu [144].

4.2.2 Constante cinétique de décaageage en système fermé

On peut considérer que si la section efficace de décaageage a été mesurée en milieu aqueux, sa valeur ne sera pas changée lors d'applications dans des milieux biologiques³. La constante cinétique de décaageage k en système fermé dépend du volume V du système $k \propto 1/V$ (voir l'équation 3.8). Comme *a priori* le volume des cellules cibles n'est pas connu, il est nécessaire de le mesurer. Cela peut être effectué de manière détournée en mesurant directement la valeur de la constante cinétique de décaageage dans la cellule cible (à condition que les paramètres évoqués précédemment ne changent pas, la valeur du volume sera alors simplement déduite car tous les autres paramètres intervenant dans k peuvent être déterminés par des mesures *in vitro*).

L'utilisation d'une stratégie appropriée comme par exemple la génération d'une espèce fluorescente lors du décaageage permet de suivre la réaction en temps réel et donc d'accéder à la constante cinétique k . Nous verrons dans la partie suivante comment ceci peut être réalisé.

³uniquement pour des petites molécules assez hydrophiles.

Deuxième partie

Mesure de sections efficaces à deux photons

Chapitre 5

Mesure de sections efficaces

5.1 Etat de l'art

Nous avons vu dans la partie précédente qu'il est possible théoriquement de contrôler avec précision la quantité de produit libéré au cours de la réaction de décaage. Cela nécessite néanmoins de connaître les caractéristiques d'absorption du groupement protecteur utilisé. Il est donc crucial d'avoir une valeur fiable de la section efficace de décaage de manière à exploiter toutes les possibilités de la technique.

Deux techniques ont été utilisées dans la littérature pour mesurer des sections efficaces.

Etude par HPLC de la réaction de déprotection

La méthode la plus générale repose sur l'excitation à forte puissance (plusieurs centaines de mW) avec un laser Ti:sa d'une cuve contenant plusieurs dizaines de microlitres de molécule cagée ; des échantillons sont prélevés au cours du temps et sont analysés par HPLC [59, 152]. La section efficace de déprotection est calculée à partir de la cinétique d'apparition de la molécule décaagée. Les paramètres du laser sont calibrés en utilisant un fluorophore de section efficace et rendement quantique connu (typiquement la fluorescéine).

Limites de cette méthode

L'utilisation de la HPLC impose de décaager une fraction significative de la solution de départ pour pouvoir quantifier avec précision les produits formés. Nous allons estimer le temps caractéristique associé à la réaction de décaage dans ces conditions. Comme nous sommes en système fermé, utilisons l'expression (3.8) de la constante cinétique k déterminée dans la partie précédente. Pour le calcul de k , considérons une section efficace de décaage de 1 GM, un objectif d'ouverture numérique 1,2 (diamètre du point focal : $0,3 \mu\text{m}$ et volume du point focal : 1,6 fl), une longueur d'onde de 750 nm et une puissance sur échantillon de l'ordre de 100 mW (ordre de grandeur des puissances utilisées [59, 152]) et un volume de l'échantillon de $10 \mu\text{l}$. En utilisant les expressions 3.5 et 3.8, on obtient une constante

cinétique de décaage de $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ soit un temps caractéristique de décaage de l'ordre de 10 min.

Cependant si les puissances d'excitation sont trop importantes, l'excitation à deux photons n'est plus un processus quadratique à cause de processus non linéaires compétiteurs [50]. Le seuil est de l'ordre de $7 \cdot 10^7 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ [50] (puissance moyenne sur échantillon) ce qui correspond à une puissance sur échantillon de 40 mW environ avec les hypothèses que nous avons prises. Nous avons aussi vu dans la partie précédente (voir 3.2.1) que le champ électrique du laser peut provoquer l'ionisation du milieu pour des puissances de l'ordre de 10 mW. Si on garde cette dernière valeur (qui dépend du solvant dans lequel est effectué la mesure), on obtient un temps caractéristique de décaage de 20 h^{-1} ce qui n'est pas très raisonnable expérimentalement. On comprend mieux maintenant pourquoi de si fortes puissances d'illumination sont utilisées afin d'obtenir une quantité suffisante de produit. Les résultats sont donc à prendre avec le caveat que le régime d'excitation n'est peut-être pas quadratique.

Etude par fluorescence de la réaction de photodéprotection

Une autre approche basée sur la fluorescence a aussi été introduite [25, 112]. En effet la fluorescence est une méthode de détection beaucoup plus sensible que la HPLC, ce qui permet de rester dans le régime d'excitation quadratique en utilisant des puissances dans la gamme du mW ou de la dizaine de mW. La stratégie consiste à coupler la réaction de décaage avec l'apparition d'une espèce fluorescente soit en décaageant un fluorophore [112] soit en ayant une sonde fluorescente pour le produit libéré [25].

Lors de la libération d'un fluorophore, l'analyse temporelle de la variation de l'intensité de fluorescence à plusieurs puissances fournit la constante cinétique de déprotection et en utilisant l'expression 3.5, on peut en déduire la section efficace de décaage [112]. Un des inconvénients de cette méthode réside cependant dans la présence du fluorophore dont les propriétés photophysiques peuvent interférer avec le groupement protecteur photolabile et singulariser les propriétés photochimiques mesurées. Il faut donc s'assurer que ce n'est pas le cas en comparant la valeur trouvée à une valeur mesurée avec une autre molécule cagée avec le même groupement protecteur.

Dans un autre manuscrit, Brown et al. [25] déterminent la section efficace de cages calciques : le calcium libéré est détecté en utilisant une sonde fluorescente calcique. Là aussi, l'analyse temporelle de l'intensité de fluorescence permet de déterminer la section efficace de décaage. Comme dans le cas précédent mais de manière intermoléculaire cette fois-ci, les propriétés photophysiques du fluorophore peuvent interférer avec le groupement protecteur photolabile et singulariser les propriétés photochimiques mesurées.

¹on rappelle que ce temps dépend du carré de la puissance.

5.2 Notre apport

Nous avons retenu le principe de l'étude par fluorescence pour mesurer les sections efficaces de déprotection à deux photons des groupements protecteurs qui ont été synthétisés dans l'équipe. En effet, la priorité a été donnée à des mesures dans un régime d'excitation quadratique. Nous avons donc développé de nouvelles méthodes reposant largement sur la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) en retenant la stratégie suivante : un substrat cagé non fluorescent libère une espèce fluorescente après photoactivation.

Deux cas limites peuvent être distingués :

- le temps caractéristique associé à la formation de l'espèce fluorescente est inférieur au temps de diffusion des molécules à travers le faisceau laser. Dans ce régime, la composition de la solution illuminée dans le point focal diffère de la solution non illuminée. On extrait la section efficace de décadeage de la dépendance de cette composition locale avec la puissance d'excitation lumineuse ;

- le temps caractéristique associé à la formation de l'espèce fluorescente est supérieur au temps de diffusion des molécules à travers le faisceau laser. Pour suivre la cinétique de déprotection, il faut qu'elle soit plus lente que la cinétique d'homogénéisation dans le volume du système fermé contenant la solution de molécules cagées (voir paragraphe 3.2.2). La constante cinétique de décadeage donnée par l'expression 3.8 dans cette approximation dépend de la section efficace du groupement protecteur. Sa mesure nous donne donc accès à la section efficace.

Le premier cas s'applique à la série de groupements protecteurs nitrobenzyle et le second cas à la série cinamates, séries toutes deux étudiées au cours de cette thèse.

L'avantage de ces méthodes est qu'elles permettent de vérifier à tout moment que l'excitation est toujours en régime quadratique, condition nécessaire pour effectuer toute l'analyse. Cependant, cette stratégie n'est applicable qu'à des espèces non fluorescentes qui libèrent une espèce fluorescente après photoactivation.

5.3 La FCS pour mesurer des sections efficaces

5.3.1 Présentation de la FCS

L'analyse des fluctuations de grandeurs physiques dans un système ouvert remonte à Theodor Svedberg. L'utilisation d'une intensité de fluorescence comme grandeur fluctuante d'un volume ouvert illuminé a été introduite par Magde, Elson et Webb, qui ont nommé la technique Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), et en ont présenté la théorie et une première réalisation expérimentale [52, 138, 139]. Dans les premières expériences de FCS, le nombre de molécules dans le volume d'observation était d'environ 10000. Le niveau de bruit de fond était important et la collection des photons émis était très faible. De ce fait, la technique ne s'est développée que dans le courant des années 90 grâce à l'introduction de faibles volumes d'observation, l'illumination en épifluorescence, l'utilisation de photodiodes

à avalanches ultra-sensibles et des filtres de détection qui ont permis d'améliorer le rapport signal sur bruit de manière considérable.

Dans un système dynamique, l'amplitude relative des fluctuations varie en $1/\sqrt{N}$ où N est le nombre de molécules dans le point focal. La concentration en espèce fluorescente doit donc être la plus faible possible. Les montages actuels permettent de détecter des molécules uniques sans difficultés particulières.

La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) mesure les fluctuations d'intensité de la fluorescence émise dans un point focal. Ces fluctuations dépendent du comportement de molécules individuelles sous excitation continue. Ce comportement inclut l'entrée et la sortie du volume d'observation dues à la diffusion ou à un flux et d'autres processus qui affectent la brillance des molécules.

La grandeur physique exploitée est la fonction de corrélation. Dans un système purement diffusif à un seul composant fluorescent, la fonction de corrélation donne le nombre de molécules contenues dans le point focal N et le temps τ_D que ces molécules mettent pour parcourir par diffusion le point focal. Elle s'écrit alors [115] :

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (5.1)$$

Si d'autres processus ont lieu, la fonction de corrélation permet d'accéder à leurs caractéristiques cinétiques [33] si certaines contraintes sur les temps caractéristiques de ces processus sont remplies (temps caractéristiques plus grands que le temps d'échantillonnage et plus petits que le temps de diffusion au travers du volume d'observation).

5.3.2 FCS à deux espèces

La stratégie que nous avons choisie repose sur la génération d'une espèce fortement fluorescente A_1 après photoactivation ou décaageage d'une espèce non fluorescente A_2 . *A priori* nous avons donc deux espèces présentes dans le point focal qui contribuent à la fluorescence totale et donc à la fonction d'auto-corrélation. Dans ce cas, la fonction s'auto-corrélation s'écrit [115] :

$$G(\tau) = \frac{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2}{(Q_1 N_1 + Q_2 N_2)^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (5.2)$$

où Q_i et N_i désignent la brillance et le nombre de molécules dans le point focal de l'espèce A_i . On considère que les espèces A_1 et A_2 ont le même coefficient de diffusion.

Introduisons le rapport des brillances des espèces $\alpha = Q_2/Q_1$. On a $\alpha \gg 1$ vu que l'espèce formée A_2 est beaucoup plus fluorescente que l'espèce initiale A_1 .

Le nombre de molécules apparent N dans le point focal s'écrit :

$$\frac{1}{N} = \frac{N_1 + \alpha^2 N_2}{(N_1 + \alpha N_2)^2} \quad (5.3)$$

Conditions pour “voir” l'espèce A_2

Le but est de mettre en évidence la formation de l'espèce A_2 même en petite quantité. Si on forme très peu de molécules de A_2 , on voit que le nombre de molécule apparent va être dominé par le nombre de molécule de A_1 si A_2 n'est pas assez brillant. Idéalement, on peut par exemple se fixer de pouvoir détecter l'apparition de A_2 même si on ne dégage que 1/1000 du nombre de molécules initiales de A_1 . Il faut alors que les termes se rapportant à l'espèce A_2 ne soient pas négligeables devant les termes se rapportant à l'espèce A_1 dans le nombre apparent de molécules mesuré par la fonction d'auto-corrélation, ce qui fixe un rapport des brillances minimum en fonction de la fraction minimale de molécules de A_2 qu'on souhaite pouvoir détecter. Déterminons cette relation.

On pose $N_2 = \varepsilon N_{tot}$ avec $\varepsilon \ll 1$ ². $N_1 = N_{tot} - N_2 = N_{tot}(1 - \varepsilon)$ d'où le nombre de molécules apparent :

$$N = N_{tot} \frac{(1 - \varepsilon + \alpha\varepsilon)^2}{1 - \varepsilon + \alpha^2\varepsilon} \quad (5.4)$$

soit comme $\alpha \gg 1$:

$$N \simeq N_{tot} \frac{1 + \alpha^2\varepsilon^2 + 2\alpha\varepsilon}{1 + \alpha^2\varepsilon} \quad (5.5)$$

Pour faciliter la mesure, on veut N soit assez différent de N_{tot} : en pratique, on privilégie $N \ll N_{tot}$. Cette condition est remplie avec $\alpha^2\varepsilon \gg 1$.

On a alors bien

$$N = N_{tot} \left(\varepsilon + \frac{1}{\alpha^2\varepsilon} + \frac{2}{\alpha} \right) \ll N_{tot} \quad (5.6)$$

Par conséquent, si on souhaite mettre en évidence la formation de l'espèce A_2 dès qu'une infime fraction ε est décaagée, il faut avoir un rapport des brillances qui remplisse la condition $\alpha^2\varepsilon \gg 1$. Si on veut $\varepsilon \simeq 10^{-3}$, limite raisonnable quant à la pureté de l'échantillon de départ, la condition ci-dessus devient $\alpha^2 \gg 1000$, soit une espèce A_2 100 fois plus brillante que l'espèce de départ A_1 en pratique.

5.4 1^{er} cas : la formation de l'espèce fluorescente est rapide

On considère la réaction de formation de l'espèce A_2 à partir de l'espèce A_1 initiée par la lumière :



²On souhaite mettre en évidence la formation de A_2 dès que possible.

5.4.1 Mécanisme de déprotection des nitrobenzyles

Le mécanisme détaillé de la photodéprotection des composés o-nitrobenzyle a été largement étudié [39] [95] [96] [186] [211]. Le mécanisme qui a émergé de ces différentes études est représenté Figure 1.5.

Pour notre étude, les informations à retenir sont que :

- la photoréaction initiale des composés 2-nitrobenzyle produit des tautomères **A** aci-nitro en 5 ps.
- l'ionisation de **A** donnant la forme basique **A**⁻ a lieu avec une constante cinétique plus rapide que 10^6 s^{-1} [96].
- la formation de la forme acétal intermédiaire **B** ne devrait pas avoir une constante plus grande que 10^3 s^{-1} à pH=9 comme lors des expériences effectuées au cours de cette thèse [96].

En système ouvert, on ne voit en stationnaire dans le point focal que les espèces qui se forment plus rapidement que le temps que mettent les molécules à traverser le point focal ³. A cette échelle de temps, le mécanisme présenté dans la figure 1.5 peut se réduire simplement à : la molécule cagée de départ A_1 donne la forme basique **A**⁻ des tautomères aci-nitro, notée A_2 . Dans une expérience de FCS, le système se comporte donc comme un mélange de deux espèces non-réactives.

5.4.2 Principe de la méthode de mesure de δ_u

Le système considéré est un réservoir infini ⁴ de coumarine cagée A_1 . Dans le point focal, il existe les deux espèces A_1 et la forme aci-nitro A_2 de la coumarine cagée. De part la nature de l'espèce cagée (un fluorophore), la coumarine cagée est en grand excès mais elle fluoresce très peu ; par contre la forme aci-nitro fluoresce beaucoup. En régime stationnaire, la fraction de molécules de coumarine se trouvant dans le point focal peut être calculée en utilisant les résultats de Kiskin et Ogden [111] :

$$\frac{N_2}{N_{tot}} = \frac{k_{unc}\tau_D/2,5}{1 + k_{unc}\tau_D/2,5} \quad (5.8)$$

On rappelle l'expression de la fonction de corrélation dans le cas d'un mélange de deux espèces fluorescentes A_i de brillance Q_i :

$$G(\tau) = \frac{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2}{(Q_1 N_1 + Q_2 N_2)^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (5.9)$$

Le nombre de molécules apparent mesuré par la fonction de corrélation fait intervenir N_2 ainsi que le rapport des brillances des espèces A_1 et A_2 . L'équation (5.8) relie N_2 à la constante cinétique de photoactivation k_{unc} , qui dépend de la puissance du laser et de la section efficace de la molécule. En faisant varier la puissance d'excitation, on peut donc faire

³30 μs pour un diamètre de 0,3 μm dans le cas des coumarines cagées avec les composés nitrobenzyles.

⁴Approximation raisonnable vue les volumes utilisés.

varier ce nombre N_2 . La mesure du nombre apparent de molécules nous permet de remonter à la constante cinétique de photoactivation ainsi qu'au rapport de brillance des deux espèces en présence. On en déduit enfin la section efficace de décadeage à deux photons du groupement protecteur correspondant.

Les expériences et les résultats correspondants sur la série synthétisée par Isabelle Aujard peuvent être trouvés dans l'article publié dans *Chem. Eur. J.* [13].

Limites de la technique

On peut calculer un ordre de grandeur de la section efficace minimum qu'on peut mesurer avec cette méthode si le rapport des brillances entre la molécule libre et sa forme cagée est supérieure à 100^5 . Dans la plupart des cas rencontrés, l'absorption à deux photons reste dans le régime quadratique pour des puissances sur échantillon inférieures à 15 mW, nous imposant une limite supérieure sur la constante cinétique de déprotection à section efficace donnée et donc sur le nombre de molécules d'espèce A_2 pouvant être formées dans le point focal (voir équation 5.8). Pour les molécules que nous avons utilisées, on a $\tau_D \sim 30 \mu s$. Si on souhaite décaler au moins une molécule sur 1000, la constante cinétique est de l'ordre de $100 s^{-1}$ ce qui impose à une puissance de 3 mW ⁶ une section efficace de décadeage plus grande que 10 mGM. Cette valeur rend donc cette méthode utilisable dans la plupart des cas à condition que la formation de l'espèce fluorescente soit plus rapide que $10^5 s^{-1}$, ce qui est le cas pour les composés nitrobenzyles.

5.5 2^{ème} cas : la formation de l'espèce fluorescente est lente

Quand la formation de l'espèce fluorescente est plus lente que le temps que les molécules mettent à traverser le point focal, la stratégie utilisée précédemment n'est plus envisageable. On est alors obligé de travailler en système fermé.

5.5.1 Présentation de la série cinnamate

La série cinnamate a été introduite par Porter à la fin des années 1980 [169, 170, 200, 201]. La photochimie du système est basée sur une photoisomérisation d'un motif cinnamate (Fig. 5.1).

5.5.2 Mécanisme de déprotection des cinnamates

Dans le cas des groupements de la série cinnamate, la formation de la coumarine à partir de l'ester de départ est une réaction lente par rapport au temps de diffusion à travers le point focal : nous avons montré qu'elle se faisait à des vitesses de l'ordre de $10^{-3}-1 s^{-1}$ selon le solvant [61]. Nous avons donc utilisé un principe similaire à celui utilisé pour les mesures de

⁵Voir la discussion d'utilisation de la FCS lors d'un mélange à 2 espèces au paragraphe 5.3.2.

⁶Puissance minimale sur échantillon utilisée dans la référence [13].

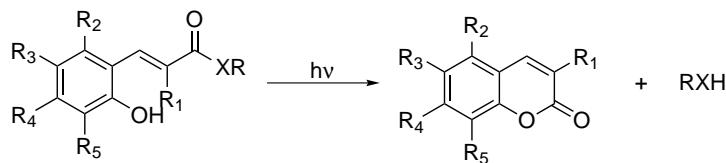


FIG. 5.1 – Photodéprotection d'un substrat RXH cagé par un groupement cinnamate.

sections efficaces effectuées dans la littérature à savoir la mise en évidence de l'espèce finale. Dans notre système, la coumarine finale A_2 fluoresce beaucoup plus que l'ester de départ A_1 : En se plaçant dans un système suffisamment petit, nous pouvons suivre l'avancement de la réaction en mesurant la fluorescence issue du point focal.

5.5.3 Principe de la méthode de mesure de δ_u

Première approche : suivi de la cinétique de photodéprotection

Notre approche repose sur l'utilisation d'un réservoir contenant quelques microlitres de solution de molécule cagée dans lequel est placé le point focal du laser conduisant au décageage. Le signal de fluorescence est enregistré ainsi que sa fonction de corrélation. Nous sommes dans le même cas de figure que celui traité au paragraphe 3.2.2. En milieu fermé, si le temps caractéristique de décageage est plus grand que le temps d'homogénéisation des espèces par diffusion dans le point focal, l'équation régissant l'évolution de la concentration en A_2 au cours du temps s'écrit :

$$A_2(t) = A_1^0 (1 - e^{-kt}) \quad (5.10)$$

Dans nos conditions expérimentales, le temps d'homogénéisation par diffusion dans la goutte de solution est d'environ 4 min, les temps caractéristiques de décageage sont de l'ordre de 5000 min. Notre mesure dure une dizaine d'heures tout au plus donc les conditions sont telles que la montée du signal de fluorescence est linéaire au cours du temps, la pente donnant accès à la section efficace du groupement protecteur. Pour dériver la valeur de la section efficace, il est nécessaire de disposer de la coumarine finale pour accéder à ses propriétés de fluorescence à deux photons.

Nous allons voir que la fonction de corrélation peut aussi nous donner le même résultat et ceci sans avoir besoin de la brillance de la coumarine finale.

Deuxième approche : mesure de la section efficace en utilisant la fonction de corrélation donnée par FCS

On considère que le nombre de molécules de coumarine dans le point focal N_2 augmente linéairement au cours du temps avec une pente $N_{tot}k$ où N_{tot} est le nombre initial de molécules de l'espèce A_1 dans le point focal. Le temps d'obtention d'une courbe de corrélation étant

important, on ne peut pas négliger le changement du nombre de molécules dans le point focal entre le début et la fin de l'expérience si ces nombres sont faibles. Le nombre de molécules apparent donné par la fonction de corrélation enregistrée entre les temps t_1 et t_2 est alors donné par l'expression :

$$\frac{1}{N_{t_1 \rightarrow t_2}} = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{N_{tot}kt + N_0} = \frac{1}{N_{tot}k(t_2 - t_1)} \ln \left(\frac{N_{tot}kt_2 + N_0}{N_{tot}kt_1 + N_0} \right) \quad (5.11)$$

où N_0 est le nombre de molécules de coumarine au temps $t = 0$.

En enregistrant la fonction de corrélation entre les temps t_1 et t_2 et entre les temps t_3 et t_4 , on a un système de deux équations qui permet de déterminer N_0 et k_1 . Ayant mesuré par ailleurs le rapport V_{exc}/V_{tot} , on peut en déduire k et ainsi la section efficace de décaageage.

Les expériences effectuées avec Nathalie Gagey et les résultats correspondants sur la série synthétisée par Nathalie Gagey peuvent être trouvés dans l'article soumis à *J. Am. Chem. Soc.*

Troisième partie

Contrôle de la voie de signalisation acide rétinoïque dans le poisson zèbre

Chapitre 6

Contrôle de la transcription chez les vertébrés

Cette partie sert d'introduction et de complément à l'article soumis à *PLoS Biology*. Elle a avant tout pour but de donner un rapide tour d'horizon des différents acteurs impliqués dans la transcription chez les eucaryotes supérieurs, en particulier les facteurs de transcription que sont les récepteurs nucléaires accompagnés de leur cohorte de corégulateurs et les MAP kinases utilisées généralement dans des voies de signalisation mais qui ont aussi un rôle crucial dans la régulation de la transcription. En effet, au delà de la démonstration de principe de l'utilisation de molécules cagées couplée à l'excitation biphotonique pour contrôler l'expression de gènes à l'échelle cellulaire, nous avons découvert un comportement dynamique du système à des échelles de temps très rapides (comparé à ce qui se fait par les techniques usuelles) qui n'est explicable qu'en faisant intervenir tous ces protagonistes.

6.1 La transcription par récepteurs nucléaires

6.1.1 La super-famille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires [140] regroupent des facteurs de transcription qui dépendent d'un ligand pour leur activation et se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques appelées éléments de réponse. Ils sont parmi les responsables de l'expression coordonnée de réseaux de gènes au cours du développement ou pour des fonctions physiologiques ou métaboliques.

La super-famille des récepteurs nucléaires comporte des récepteurs à hormones stéroïdiennes comme les récepteurs aux œstrogènes, les récepteurs aux androgènes, les récepteurs aux glucocorticoïdes, aux minéralocorticoïdes, à la vitamine D₃ ; des récepteurs à ligands non stéroïdiens comme le récepteur aux hormones thyroïdiennes et le récepteur à l'acide rétinique ; des récepteurs qui fixent des produits du métabolisme des lipides comme des acides gras et des prostaglandines. Il y aussi un grand nombre de récepteurs orphelins dont les ligands sont encore inconnus (voir Figure 6.1). Quarante huit gènes de récepteurs de ce type ont été identifiés dans le génome humain. Le génome de *C. elegans* en comprend plus de 200.

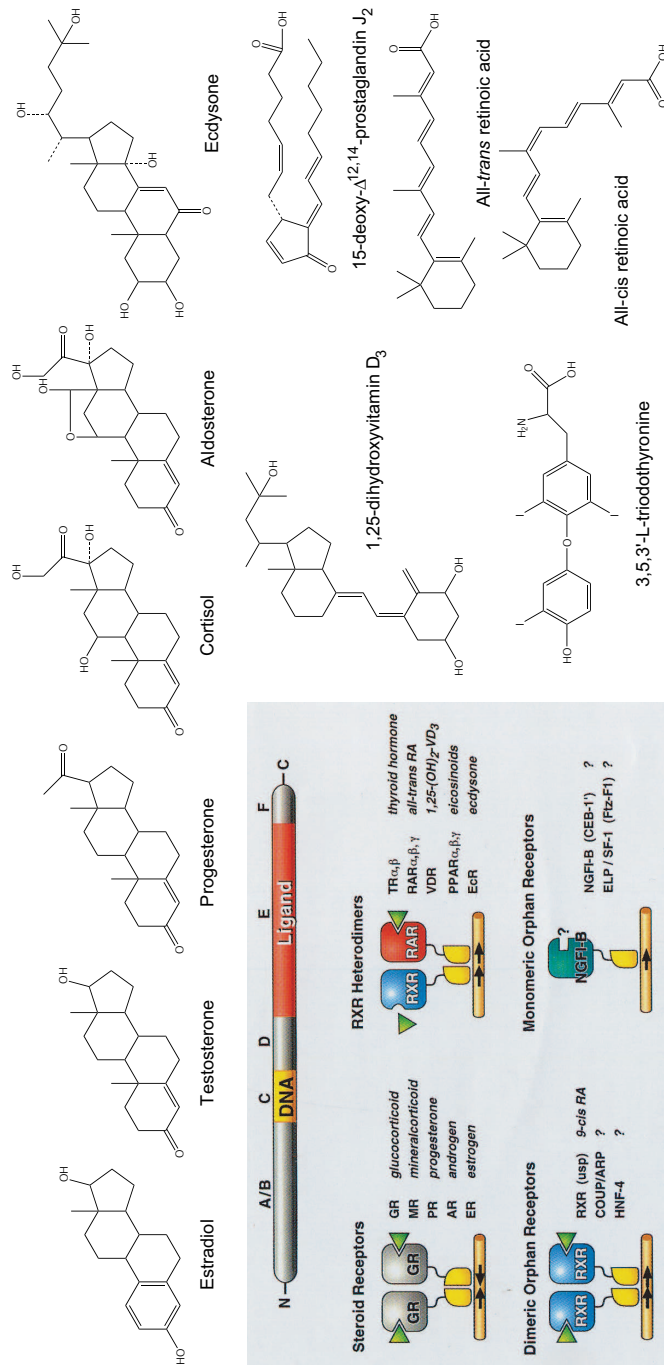
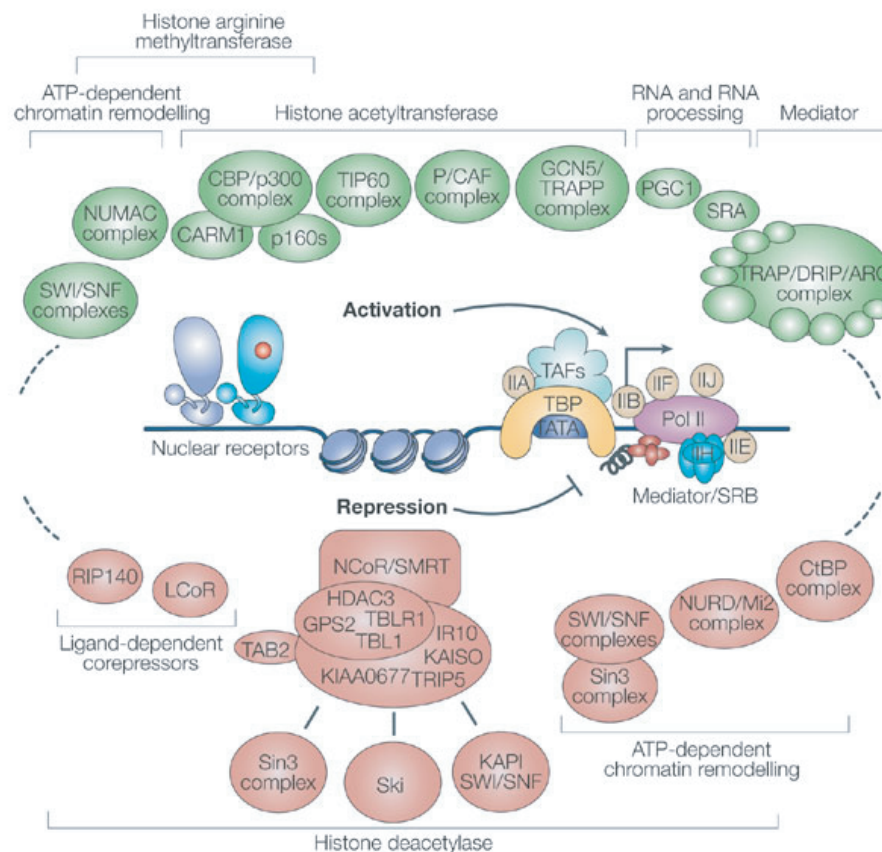


FIG. 6.1 – Structures des ligands connus des récepteurs nucléaires à hormone. Les récepteurs nucléaires ont des domaines structure/fonction communs. : une région N-terminale variable (A/B), une domaine de liaison à l'ADN conservé (C), un domaine de fixation du ligand conservé (E). Ils peuvent être regroupés en quatre classes selon le mode de fixation du ligand, leur fixation à l'ADN, et leur propriétés de dimérisation (schéma tiré de [140]).

Les récepteurs nucléaires ont une structure modulaire comprenant un domaine de fixation à l'ADN extrêmement bien conservé, un domaine de fixation du ligand et un ou plusieurs domaines effecteurs. Ils régulent la transcription de manière très variée. Ils peuvent se fixer directement sur des éléments régulateurs dans l'ADN sous la forme de monomères, homo- ou hétérodimères. A la manière des récepteurs à l'acide rétinoïque, ils peuvent aussi réprimer de manière active les gènes qu'ils régulent quand leur ligand est absent.

6.1.2 Les corégulateurs : des coactivateurs ou des corépresseurs



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

FIG. 6.2 – La régulation de la transcription par récepteur nucléaire a besoin de complexes de coactivateurs et corépresseurs. IIA, IIB, IIE, IIF, IIH, IIJ, facteurs de transcription généraux TFIIA, B, E, F, H, J ; HDAC, histone déacétylase ; LCoR, corépresseur de récepteur nucléaire ligand-dépendant ; NCoR, corépresseur de récepteur nucléaire ; RIP140, receptor-interacting protein-140 ; SMRT, médiateur de silencing des récepteurs à acide rétinoïque et hormone thyroïdienne ; TAF, facteur associé à TBP ; TBP, protéine se fixant à la TATA box. Figure tirée de [220].

Les différents rôles transcriptionnels des récepteurs nucléaires sont effectués par le recru-

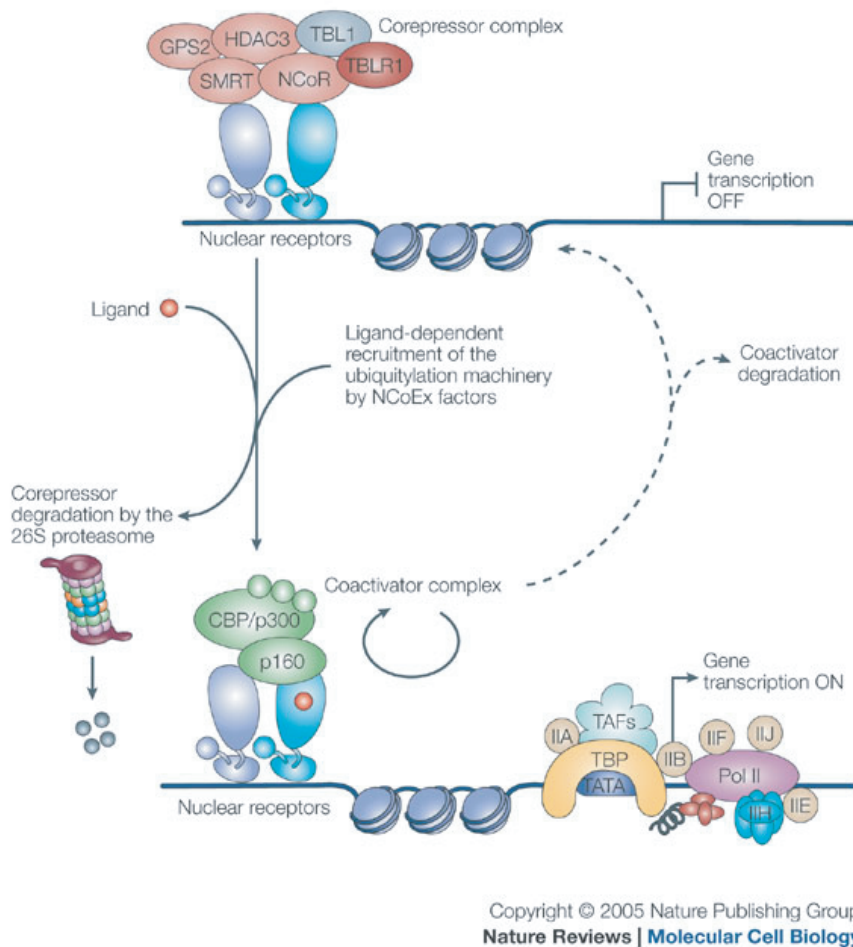


FIG. 6.3 – Pour activer l'expression du gène à la suite de la stimulation par un ligand, il s'effectue un changement nécessaire des complexes de cofacteurs. NCoEX : échange de corépresseur nucléaire; IIA, IIB, IIE, IIF, IIG, IIH, IIJ, facteurs de transcription généraux; CBP/p300; les coactivateurs se fixant à CREB et p300; GPS2, suppresseur -2 de la voie de signalisation par protéine G; HDAC, histone déacétylase; LCoR, corépresseur de récepteur nucléaire ligand-dépendant; NCoR, corépresseur de récepteur nucléaire; RIP140, receptor-interacting protein-140; p160, un coactivateur de la famille NCoA; pol II, ARN polymérase II; SMRT, médiateur silencing des récepteurs à acide rétinoïque et hormone thyroïdienne; TAF, facteur associé à TBP; TBP, protéine se fixant à la TATA box. Figure tirée de [220].

tement d'un certain nombre de protéines de régulation positive ou négative appelées respectivement coactivateurs ou corépresseurs [220] (voir Figure 6.2). L'existence de cofacteurs de régulation n'est pas propre aux récepteurs nucléaires et se retrouve pour de nombreux autres facteurs de transcription.

En général, les récepteurs nucléaires sans ligand recrutent des corépresseurs de manière à réprimer les gènes régulés. La fixation du ligand entraîne le recrutement de coactivateurs et ainsi initie le début de la transcription. Il existe des exceptions à cette règle et la fonction

d'un corégulateur peut dépendre de son contexte d'utilisation.

Les corégulateurs ont deux grands modes d'action. Un premier groupe modifie covalamment les histones (acétylation/désacétylation, méthylation/déméthylation, phosphorylation/déphosphorylation, ubiquitynation/désubiquitynation). Le second groupe inclut des facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants qui régulent l'accessibilité du promoteur aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle de base. Enfin certains corégulateurs n'appartiennent à aucune de ces deux classes et participent au recrutement, à l'assemblage et au relargage des complexes de corégulateurs.

6.1.3 Recrutement des corégulateurs

Les complexes de corégulateurs ont de nombreux domaines fonctionnels qui peuvent être modifiés et interagir pour activer, réprimer ou changer de fonction. Comme des centaines de protéines peuvent intervenir dans ces complexes, l'ensemble de leurs combinaisons permet d'effectuer des réponses spécifiques et modulables. Notamment, l'activation de la transcription peut dépendre de l'occupation du promoteur, de la phase du cycle cellulaire, de signaux régulateurs. L'implication d'acteurs qui interviennent à la fois dans des voies de signalisation et la modification de ces coactivateurs montre à quel point l'expression des gènes et les fonctions cellulaires sont intimement liées.

Le recrutement des corégulateurs se fait de manière ordonnée et séquentielle [148]. Les mêmes études ont montré que la fixation du récepteur à l'ADN se fait de manière cyclique [166]. La raison de ce phénomène est peu claire : elle pourrait servir à contrôler l'état de la cellule de manière régulière et ceci de façon à ajuster la transcription au mieux. Cette présence cyclique des récepteurs nucléaires est associée avec une activité de dégradation dépendante du protéasome.

Les expériences qui ont été effectuées au cours de cette thèse offrent un nouvel éclairage sur ces phénomènes.

6.2 Les MAP kinases

La réponse des cellules à des stimulus extracellulaires passe en particulier par des kinases et des phosphatases. Les kinases de protéine activées par des mitogènes (MAP kinases [32]) appartiennent à des cascades de signalisations qui répondent à des stimulus et régulent des processus cellulaires fondamentaux. Cette famille est conservée au cours de l'évolution et est impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation, la survie, l'immunité innée et le développement. Dans cette voie de signalisation, le système de relais par phosphorylation (voir Figure 6.4) est composé de trois kinases : une MAPK kinase kinase (MAPKKK), une MAPK kinase (MAPKK) et une MAP kinase (MAPK). La phosphorylation des MAP kinases intervient sur un domaine double conservé Thréonine-X-Tyrosine, cela active la protéine qui peut dimériser et transloquer dans le noyau pour activer ses cibles.

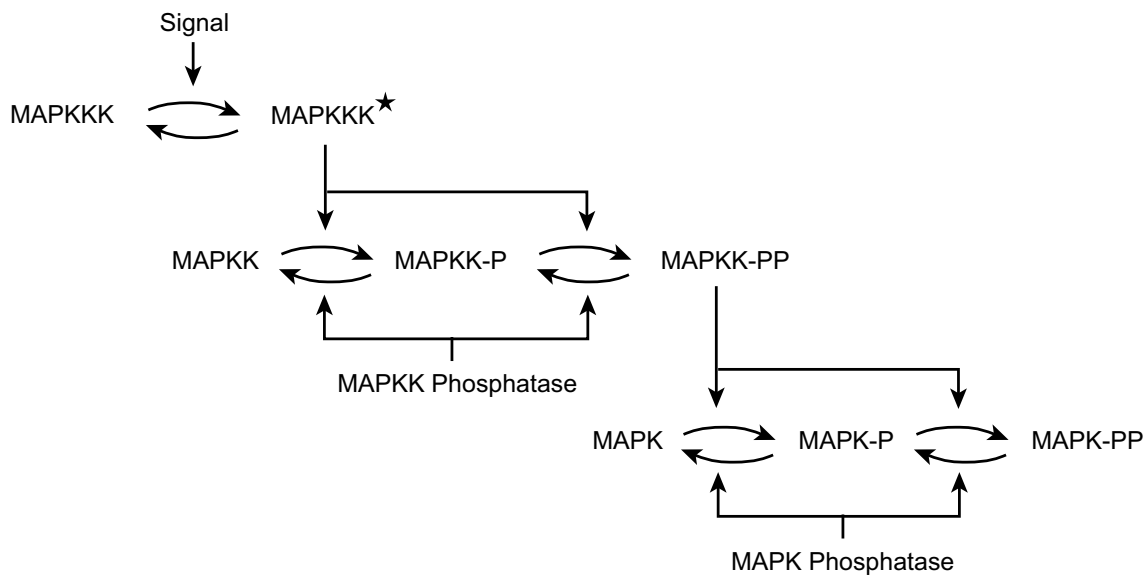


FIG. 6.4 – Schéma de la voie de signalisation par MAP kinase. Figure inspirée de [90].

6.2.1 Intérêt en temps de réponse

Schoeberl et al. [184] ont modélisé la dynamique de la voie de signalisation EGF de la fixation du ligand sur le récepteur à l'activation de la MAP kinase à la fin de la voie de signalisation. Le pic de phosphorylation de cette kinase est atteint au bout de quelques minutes (10 tout au plus, dépendant de la concentration en facteur de croissance). Ceci est à mettre en perspective avec la durée de réponse transcriptionnelle qui a été mesurée à une dizaine de minutes pour un promoteur heat shock particulièrement rapide [21]. L'obtention d'une protéine mature prendra donc un temps beaucoup plus grand. La phosphorylation des facteurs de transcription et de leurs corégulateurs est donc un moyen de contrôler la réponse transcriptionnelle dans des gammes de temps bien inférieure à ce qui serait nécessaire si la production de nouvelles protéines était nécessaire. Ce fait est particulièrement pertinent lors des processus développementaux qui peuvent être extrêmement rapides. La démonstration en a été donnée au cours de cette thèse.

6.2.2 Les différentes familles de MAP kinases

Il existe quatre sous-groupes dans la famille des MAP kinases : les kinases associées à des signaux extracellulaires (ERK)-1/2, les kinases N-terminal de Jun (JNK1/2/3), ERK5/big MAP kinase 1 (BMK1) et les kinases du groupe p38. Les MAP kinases sont activées par phosphorylation de tyrosine ou de thréonine.

Le groupe ERK joue un rôle essentiel dans les cascades de transduction du signal activées par des stimuli associés à la croissance. Le groupe JNK est activé en réponse à des stress cellulaires comme une forte osmolarité ou un stress oxydatif. La voie de signalisation

ERK5/BMK1 contrôle l'expression génique précoce induite par le sérum. Enfin la voie de transduction du signal p38 [163] joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la réponse inflammatoire, la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire et la mort.

6.2.3 La famille de p38

La sous-famille p38 comporte quatre membres : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . p38 α a été clonée comme une protéine de 38 kDa qui était rapidement phosphorylée sur une tyrosine en réponse à une stimulation lipopolysaccharide.

6.2.4 Association des kinases avec la transcription

Les MAP kinases sont associées de plusieurs façons à la transcription. Ainsi elles peuvent interagir avec la chromatine le long des régions transcrites des gènes cibles [36] avec une certaine préférence pour le promoteur (données pour l'homologue de p38 chez la levure Hog1p [168]). De plus p38 participe au recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine permettant la transcription des gènes cibles [191].

De manière plus classique [92, 199], les MAP kinases participent au contrôle de l'expression génique en interagissant avec les facteurs de transcription et leurs corégulateurs. Cette interaction permet d'intégrer des voies de signalisation à la transcription [173] : ceci est effectué de deux manières. La phosphorylation peut faciliter le recrutement des coactivateurs et de la machinerie de transcription aboutissant à une activation de la transcription. Elle peut aussi limiter la transcription en marquant les facteurs de transcription et leurs corégulateurs de manière à ce qu'ils soient dégradés [65]. Les événements de phosphorylation sont un moyen de coordonner la dynamique de recrutement des corégulateurs [174].

6.2.5 Le rôle de la famille p38 dans le développement

Les MAP kinases sont nécessaires à de nombreux processus développementaux [114]. Cependant, le lien avec la régulation de la transcription est rarement établi dans ces études, une grande partie de l'attention se focalisant sur les voies de signalisation elles-mêmes.

Divers invalidations par recombinaison homologue (appelées communément "knock-out" ou tout simplement "ko") de p38 α ont été effectuées chez la souris [4, 153, 196], ces invalidations sont létales à cause de défauts d'angiogénèse placentaire à des stades embryonnaires commençant à 10,5 jours après la fécondation (E10.5). A E10.5, les embryons commencent à être anémiés, ont des défauts divers de vascularisation et ont des retards de croissances variables. Les embryons qui survivent aux insuffisances placentaires ont des défauts d'érythropoïèse. Aucun embryon ne survit après 16,5 jours après la fécondation. En revanche, les ko de p38 β , p38 γ et p38 δ ne présentent pas de phénotypes évidents. La voie p38 est essentielle pour la différenciation des muscles squelettiques, la myogénèse chez le Xénope. Chez le poisson zèbre, p38a, l'orthologue de p38 α , est nécessaire au clivage symétrique et synchrone des

cellules dans la première phase de développement.

Chapitre 7

Le système acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est une molécule importante impliquée dans l'embryogénèse. Elle contrôle l'établissement de l'axe antéro-postérieur, le découpage gauche-droite et dorso-ventral et le développement de nombreux organes (cœur, système nerveux central, pancréas, . . .). De plus, la présence d'acide rétinoïque exogène au début du développement se traduit par des effets tératogènes spectaculaires et dose dépendants. En outre l'acide rétinoïque présente des avantages du point de vue de la physico-chimie. C'est la raison pour laquelle nous l'avons choisi.

7.1 Le poisson zèbre comme organisme modèle



FIG. 7.1 – Poisson zèbre adulte.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*, voir Figure 7.1) est un poisson téléostéen de la famille des cyprinidés [74]. Ce poisson tropical d'aquarium a été introduit dans les années 70 par George Streisinger de l'Université d'Oregon (USA) pour effectuer de l'analyse mutationnelle chez un vertébré. Ce poisson se reproduit extrêmement bien en captivité, chaque femelle pouvant produire plusieurs centaines d'œufs chaque semaine. Sa taille (4 cm) permet de maintenir de nombreux animaux dans un espace réduit. La fécondation est externe, ce qui permet de manipuler les conditions de ploïdie des embryons et surtout de micro-injecter l'œuf fécondé avec des macromolécules diverses (diamètre : 0,8–0,9 mm). Enfin, l'embryon est complètement transparent et se développe dans l'eau, ce qui permet aux chercheurs de suivre toutes les étapes du développement en direct sur des embryons vivants. La mise en place des organes [110] est extrêmement rapide (24 h) et les adultes arrivent à maturité sexuelle au bout de 12

semaines de développement.

Christiane Nüsslein-Volhard et Wolfgang Driever ont mené un crible génétique d'envergure pour identifier des mutations affectant le développement embryonnaire : les quelques 4000 mutations découvertes et caractérisées [46] ont établi le poisson zèbre comme organisme modèle en biologie du développement des vertébrés une vingtaine d'années après le choix de Streisinger.

De nombreux outils génétiques sont à disposition. Du fait de la taille importante des embryons, l'injection dans la première cellule est relativement facile. Des ARN messagers permettent d'exprimer de façon ubiquitaire et transitoire n'importe quelle protéine, les morpholinos (oligonucléotides à squelette neutre) suppriment l'expression des gènes contre lesquels ils sont dirigés [157]. La génération d'animaux transgéniques est aisée. Le génome du poisson zèbre est séquencé mais son annotation n'est malheureusement pas encore terminée.

Les travaux de Zon ont contribué à établir le poisson zèbre comme modèle de maladies humaines [49] et en particulier les cancers [9]. Comme les embryons sont transparents, se développent de manière externe, il devient un organisme de choix pour cribler des banques de médicaments de manière automatisée [167, 226].

7.2 L'acide rétinoïque endogène

7.2.1 Métabolisme

L'acide rétinoïque (AR, voir Figure 7.2) est synthétisé de manière endogène [156] en deux oxydations successives à partir de la vitamine A ou rétinol fourni par l'alimentation. Tout d'abord la rétinol déhydrogénase (RoDH) oxyde le rétinol en rétinol puis la rétinol déhydrogénase (RaDH) oxyde le rétinol en acide rétinoïque.

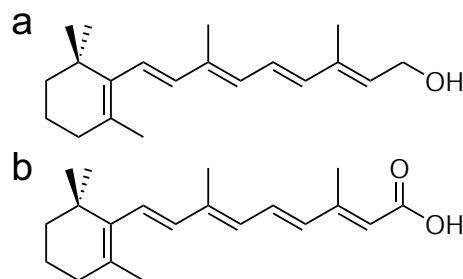


FIG. 7.2 – a : rétinol dans sa forme all-*trans* ; b : acide rétinoïque dans sa forme all-*trans*.

7.2.2 Disponibilité de l'acide rétinoïque dans la cellule

Il existe des protéines cytoplasmiques fixant le rétinol et l'acide rétinoïque : les CRBP (Cytoplasmic Retinol Binding Protein) et CRABP (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein) respectivement. Le rétinol est transporté dans le plasma par les RBP (Retinol Bin-

ding Protein). Toutes ces protéines se trouvent en concentration relativement importante : la concentration de CRBP est d'environ 7 μM dans le foie, ses ligands le rétinol et le rétinol sont en concentration de 5 μM et environ 100 nM respectivement. La concentration en CRABP est aussi plus grande que celle de son ligand mais d'un facteur vingt. Les affinités de ces protéines pour leurs ligands sont semblables aux affinités des récepteurs à ces mêmes ligands. Les affinités sont typiquement de l'ordre de 1 nM. Ces données montrent que les rétinoïdes sont séquestrés par les CRBP/CRABP en presque totalité.

L'acide rétinoïque est dégradé par Cyp26, une enzyme de la famille du cytochrome P450 pour former l'acide 4-hydroxyrétinoïque et l'acide 4-oxorétinoïque.

7.2.3 Action biologique

La cellule a développé une machinerie complexe pour contrôler précisément la concentration en acide rétinoïque libre susceptible de se fixer aux RAR (Retinoic Acid Receptor) et RXR (Retinoic Acid X Receptor) [31]. Ces récepteurs à rétinoïdes appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires à hormone, ce sont des facteurs de transcription régulés par ligand qui jouent un rôle essentiel dans l'embryogénèse et la physiologie de l'organisme adulte.

7.2.4 Nécessité de corégulateurs pour la transcription sous contrôle AR

Le mécanisme de base de l'activité transcriptionnelle des RAR repose sur leur capacité à recruter des coactivateurs après les changements conformationnels induits par la fixation d'acide rétinoïque [31]. La famille de coactivateurs de récepteur stéroïdien p160/SRC [219] et p300/CBP se distinguent parmi la multitude des coactivateurs identifiés. Dans les deux cas, la présence de coactivateurs est nécessaire à la transcription induite par l'acide rétinoïque ([65] pour p160 et [105] pour p300).

7.3 Rôle de l'acide rétinoïque dans l'embryogénèse

L'acide rétinoïque joue un rôle majeur à plusieurs stades de l'embryogénèse [76] : l'établissement de l'axe antéro-postérieur [177], la symétrie gauche-droite, dorso-ventrale et la mise en place de certains organes. Les paragraphes suivants, sans être exhaustifs, présentent les cas les plus marquants et ceux en relation avec le travail effectué au cours de la thèse.

7.3.1 Axe antéro-postérieur

L'acide rétinoïque joue un rôle important dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur. Chez les vertébrés, l'expression des gènes Hox homologues des gènes homéotiques de la drosophile [124] spécifie la polarité antéro-postérieure. Un gradient d'acide rétinoïque est établi au cours du développement, la concentration est grande dans les parties postérieures et faible dans les parties antérieures. Ce gradient est contrôlé par la synthèse ou la dégradation différentielles de l'acide rétinoïque dans les différentes parties de l'embryon (Raldh2 [73] et de

Cyp26 [3, 178]). De nombreux gènes Hox ont des sites de liaison pour RAR dans les éléments régulateurs de leurs promoteurs. Le code des gènes Hox constitué de différentes constellations de gènes Hox, activées par des concentrations différentes d'acide rétinoïque spécifie les caractéristiques des régions (vertèbres [107] et développement crano-facial [15]). Nous avons utilisé les effets tératogènes de l'acide rétinoïque exogène sur l'établissement antéro-postérieur pour les tests d'activité, de stabilité physiologique et de décaage à un photon de nos acides rétinoïques cagés.

7.3.2 Symétrie gauche-droite

Plusieurs études récentes ont montré l'importance de l'acide rétinoïque dans l'établissement de la symétrie gauche-droite [104, 204]. L'inhibition de la synthèse d'acide rétinoïque entraîne une désynchronisation de la formation des somites entre les deux côtés de l'embryon, conduisant à une région gauche segmentée plus longue que la droite. Ce défaut est dû à une perte de coordinations des oscillations de l'horloge de segmentation entre les deux côtés. Dans l'embryon de vertébré, les informations de latéralité sont acheminées au nœud et enfin au mésoderme de la plaque latérale par une cascade d'évènements génétiques et épigénétiques complexe, aboutissant à un organisme asymétrique gauche-droite. Le mésoderme paraxial est segmenté au même moment le long de son axe antéro-postérieur en somites de manière symétrique. La signalisation acide rétinoïque joue un rôle clef dans l'atténuation de l'information de latéralité sur la formation de manière symétrique des somites.

7.3.3 Segmentation du système nerveux central

Le rhombencéphale est divisé en sept segments appelés rhombomères le long de l'axe antéro-postérieur [137, 143]. L'identité de chaque rhombomère est spécifiée par des facteurs de transcriptions comme Krox-20, vHnf1, Val (Kreisler, Mafb) et des protéines Hox. La signalisation par l'acide rétinoïque joue un rôle clef dans la régulation de l'expression de ces protéines, les rhombomères postérieurs ayant besoin d'une concentration d'acide rétinoïque plus grande que les rhombomères antérieurs. On retrouve ainsi un gradient dans le même sens que celui qui est responsable de la formation des vertèbres. De plus, la voie de signalisation acide rétinoïque est impliquée dans la segmentation des régions intermédiaires du système nerveux central le long de l'axe dorso-ventral [134].

7.3.4 Mise en place du cœur

L'acide rétinoïque contrôle la spécification des progéniteurs cardiaques chez le poisson zèbre. Keegan et al. [106] ont en effet montré qu'une réduction de signalisation d'acide rétinoïque entraîne la formation d'un excès de cardiomyocytes par un changement de détermination qui augmente la densité des progéniteurs cardiaques à l'intérieur d'une région multipotente. La voie de signalisation par l'acide rétinoïque crée un équilibre entre identité cellulaire

cardiaque et non cardiaque, équilibre qui influe sur la taille du réservoir de progéniteurs cardiaques.

7.3.5 Mise en place de la rétine

Les identités dorsales et ventrales de la rétine sont gérées par un gradient d'acide rétinoïque [210] orchestré par les cellules de la crête neurale [145]. Nous nous sommes basés sur ce contrôle pour démontrer que le décaageage d'acide rétinoïque était possible à l'échelle cellulaire dans un embryon de poisson zèbre intact.

L'œil est un des organes les plus sensibles à un défaut de la voie de signalisation par l'acide rétinoïque. Un manque de rétinol entraîne des microphthalmies ou des anophthalmies, un excès entraîne des défauts majeurs chez le rat et chez l'homme. La formation du primordium optique est le stade le plus sensible à des perturbations de concentration d'acide rétinoïque. Un excès d'acide rétinoïque conduit à une duplication de la rétine due à une prolifération excessive des cellules de la partie dorsale de la rétine [94]. A l'opposé, l'inhibition de la synthèse endogène d'acide rétinoïque entraîne la formation d'yeux dont la rétine n'a pas de partie ventrale [142].

L'asymétrie dorso-ventrale de la rétine se retrouve au niveau de la synthèse d'acide rétinoïque et pas au niveau des RAR qui eux sont exprimés uniformément dans l'œil. Chez les vertébrés, la synthèse d'acide rétinoïque dans la partie dorsale est effectuée par une aldéhyde déhydrogénase de classe 1. Dans la partie ventrale, elle est effectuée par une enzyme beaucoup plus efficace. La concentration d'acide rétinoïque résultante est donc plus importante dans la partie ventrale par rapport à celle dans la partie dorsale. Hyatt et al. [93] ont montré qu'un excès d'acide rétinoïque au stade 4-14 somites chez le poisson zèbre entraîne une duplication de la rétine. De plus, la fixation de billes d'acide rétinoïque dans la partie dorsale de la rétine confère aux cellules adjacentes une identité ventrale [94]. Aux mêmes stades, le décaageage d'acide rétinoïque dans la partie dorsale de la rétine en développement reproduit ce phénomène.

7.4 Rôle de l'acide rétinoïque dans des cellules adultes

L'implication de l'acide rétinoïque dans les processus développementaux a attiré la majeure partie de l'attention. Cependant il joue aussi un rôle dans les organismes adultes. La voie de signalisation acide rétinoïque joue un rôle important dans le cerveau adulte [119]. Elle régule la plasticité synaptique [35] et les comportements associés d'apprentissage et de mémoire. Elle est aussi impliquée dans la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression.

L'acide rétinoïque joue un rôle essentiel dans les processus de régénération [136]. Un excès de rétinol peut entraîner des régénérations aberrantes : ainsi des pattes peuvent être régénérées à partir de la queue amputée d'un têtard [151].

Les rétinoïdes inhibent le développement des tumeurs et la croissance des cellules néoplastiques [43]. L'acide rétinoïque entraîne la différenciation des cellules cancéreuses dans de nombreux cas : les cancers impliquant des cellules épithéliales et la leucémie promyélocytaire

aigüe. Dans ce dernier cas, le traitement par acide rétinoïque entraîne une guérison complète [91]. Même si l'action anti-tumorale de l'acide rétinoïque était déjà connue, Strickland et Mahdavi [194] ont été les premiers à montrer l'induction par l'acide rétinoïque de la différenciation chez des cellules cancéreuses embryonnaires qui avaient perdu la capacité de se différencier.

Les rétinoïdes, plus particulièrement les formes *9-cis* et *13-cis* de l'acide rétinoïque, sont aussi utilisés dans la prévention des tumeurs [88].

Chapitre 8

Calibration du décageage dans les embryons

Nous avons établi dans le paragraphe 3.2.2 un modèle pour le décageage dans un système fermé qui peut être une cellule d'un embryon. En particulier, nous avons vu que la constante cinétique de photoactivation dépend du volume de ce système fermé. Il est donc nécessaire de mesurer cette constante cinétique dans les cellules d'un embryon de manière à pouvoir évaluer correctement la quantité de molécules formée (voir le paragraphe 4.2.2). Nous avons choisi tout au long de cette thèse des méthodes de mesure reposant sur la fluorescence : nous allons voir dans la suite avec quelles précautions elles doivent être adaptées à une utilisation dans un organisme vivant.

8.1 Fluorescence et cinétique dans les embryons

8.1.1 Age des embryons

L'âge des embryons est un paramètre critique pour la réussite des expériences impliquant l'enregistrement de l'intensité de fluorescence pendant de longues durées. Il faut avoir une certaine stabilité du point focal afin d'avoir une mesure exploitable. Plusieurs phénomènes sont à prendre en compte : les plus évidents sont les mouvements de l'organisme dus à l'activité musculaire. Deux catégories de muscles sont à prendre en compte : les muscles squelettiques et le cœur. Les premiers mouvements d'un embryon apparaissent 18 h après fécondation [56]. On peut contourner ce problème en anesthésiant les embryons à la tricaine. Le cœur se met à battre 24 heures après fécondation. Contrairement aux muscles somatiques, on ne peut pas arrêter le cœur des embryons si on souhaite qu'ils survivent. Nous allons voir dans le paragraphe suivant l'importance que peuvent avoir les mouvements du cœur sur des mesures d'intensité de fluorescence.

Des embryons de 30 h sont incubé dans une coumarine et l'évolution de l'intensité de fluorescence qu'elle émet est enregistrée dans l'organisme (voir Figure 8.1).

Les sauts dans l'intensité de fluorescence ont une fréquence de 1,5 Hz qui correspond bien

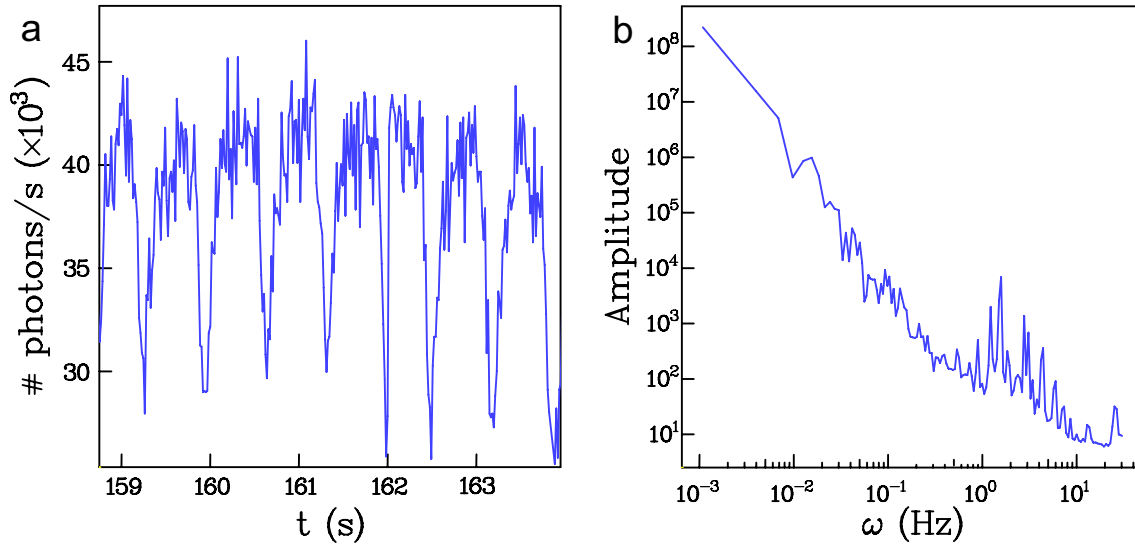


FIG. 8.1 – **a** : Evolution temporelle de l'intensité de fluorescence dans un embryon de 30 heures ; **b** : Spectre de puissance des modes de Fourier du signal précédent (échantillonné pendant 1383 s toutes les 16,3 ms). Les sauts dans l'intensité de fluorescence sont dûs aux battements du cœur (90 battements par minute).

à la fréquence attendue des battements cardiaques pour des embryons à ce stade [14]. La périodicité du phénomène est particulièrement visible dans le spectre de Fourier du signal. L'amplitude du signal varie de manière conséquente au cours d'un battement du cœur, ces mouvements contribuent de manière très importante à la fonction de corrélation (si on choisit de l'enregistrer). C'est donc complètement rédhibitoire pour espérer avoir des traces propres. Il faut donc travailler avec des embryons dont le cœur ne bat pas encore. Il est même souhaitable de prendre les embryons avant le début de l'activité musculaire (soit avant 19 somites).

Travailler avec un organisme se développant

Il existe un inconvénient intrinsèque au fait de travailler sur un organisme en développement : le mouvement des cellules pour former l'organisme final. Ainsi dans un organisme adulte, si la grande majorité des cellules ont une position relative fixe, ce n'est pas du tout le cas dans un embryon. Il y a des mouvements majeurs lors de l'épibolie et de la gastrulation [213]. Les cellules migrent sur plusieurs centaines de microns en l'espace de quelques heures. En outre, l'organisme croît : la longueur de l'embryon passe de 0,9 mm à 1,4 mm entre 16 hpf et 19 hpf soit un accroissement de 14 μm toutes les 5 minutes. Les mouvements intrinsèques dus au développement de l'embryon ne sont donc absolument pas négligeables à l'échelle de temps d'une expérience de FCS qui peut durer plusieurs dizaines de minutes, les mouvements contribuant de manière rédhibitoire à la fonction de corrélation. La stratégie est donc d'effectuer des acquisitions courtes qui sont rassemblées *a posteriori* en se débarrassant de toutes les acquisitions comportant des mouvements.

8.1.2 Mesures de cinétiques de déprotection

Pour effectuer une mesure de cinétique correcte, il faut que le point focal soit stable pendant une durée supérieure au temps caractéristique de la réaction.

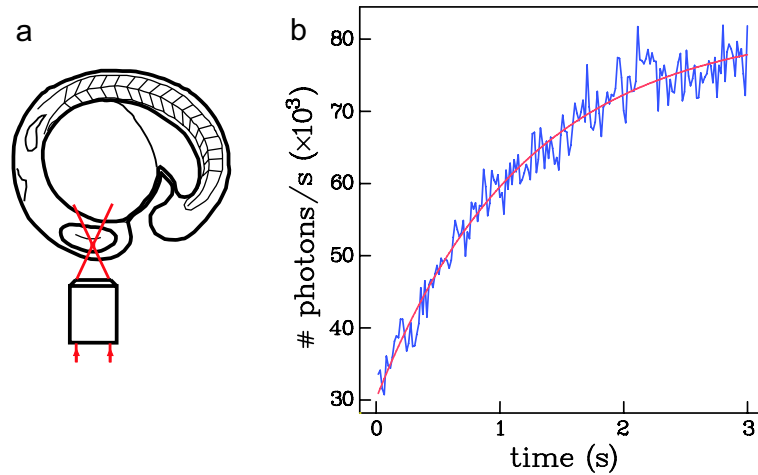


FIG. 8.2 – Mesure d’une cinétique de déprotection dans un embryon de poisson zèbre utilisant une coumarine cagée avec un groupement protecteur de type ortho-nitrobenzyle. Schéma de l’expérience (a) et variation de l’intensité de fluorescence au cours du temps dans le point focal (b). L’ajustement de la courbe expérimentale avec une loi exponentielle donne la constante cinétique de décaageage k (ici on trouve $k = 0,8 \text{ s}^{-1}$)

Dans la série des nitrobenzyles, les constantes de décaageage à l’intérieur des cellules sont de l’ordre de $0,1 \text{ s}^{-1}$. Il faut donc que le point focal reste à l’intérieur de la même cellule une dizaine de secondes au moins. Pour les cinnamates, les constantes cinétiques sont beaucoup moins favorables : elles sont plutôt de l’ordre de 10^{-2} s^{-1} donc le point focal doit être stable plusieurs minutes dans la même cellule (en pratique il faut qu’il bouge de moins de $10 \mu\text{m}$). C’est exactement la même contrainte pour la mesure de décaageage de l’acide rétinoïque *in vivo* en raison des cinétiques d’échanges des rétinoïdes avec les CRBP/CRBAP.

La stabilité mécanique est suffisante. Le problème vient du fait que les embryons continuent à se développer pendant la mesure (voir ci-dessus) : contrairement à une expérience de FCS, les conditions initiales sont importantes. En pratique, ces mesures sont réalisables sur des embryons jusqu’à 15 somites. L’anesthésie et l’inclusion des embryons ne sont pas nécessaires. L’anesthésie est obligatoire dès que les muscles sont fonctionnels.

8.1.3 Bruit

Les embryons présentent une certaine auto-fluorescence. Son niveau est de l’ordre de 1000 photons/s. Ce bruit ne pose pas problème pour mesurer la cinétique de décaageage dans une cellule en utilisant les coumarines cagées avec les dérivés du groupement ortho-nitrobenzyle ou les esters cinnamates. En effet, les signaux sont 100 fois plus importants. Cependant, la mesure

de la cinétique de décaage de l'acide rétinoïque dans les cellules d'un embryon de poisson zèbre présente un cas complètement différent. En effet, le principe de l'expérience repose sur cette auto-fluorescence. Les variations de l'intensité de fluorescence représentent environ un tiers de l'intensité nominale avec une amplitude de bruit de l'ordre de ces variations.

8.2 Choix d'un acide rétinoïque cagé

8.2.1 Les acides rétinoïques cagés disponibles

L'acide rétinoïque *all-trans* a été couplé avec plusieurs groupements photoactivables de la série du diméthoxynitrobenzyle (voir Figure 8.3). Un premier crible a été effectué pour déterminer le meilleur pour une utilisation biologique. Nous nous sommes d'abord intéressés à la stabilité physiologique des divers acides rétinoïques cagés. Les composés cagés ont été injectés dans des embryons au stade 32 cellules de manière à avoir une concentration finale de 10 μM . Le développement de ces embryons est tout à fait normal.

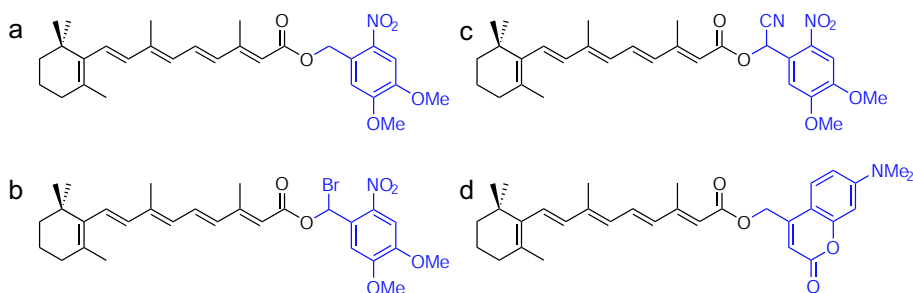


FIG. 8.3 – Les divers acides rétinoïques cagés. **a, b, c** : groupements protecteurs de la série diméthoxynitrobenzyle. **d** : groupement protecteur de la série coumarine.

8.2.2 Propriétés en relation avec une application dans un embryon intact

Nous avons testé les acides rétinoïques cagés avec les dérivés nitrobenzyle en utilisant comme phénotype l'établissement de l'axe antéro-postérieur.

Protocole

Les molécules cagées ne franchissent pas la barrière du chorion. Les embryons sont donc injectés avec les molécules cagées au stade blastula [110] pour obtenir une concentration finale de l'ordre de 10 μM à l'intérieur des cellules. Ces embryons sont ensuite illuminés pendant des durées variables (entre 0 et 4 min) avec une lampe 6W à 365 nm. Les défauts de formation de l'axe sont observés à 24 h (voir Figure 8.4).

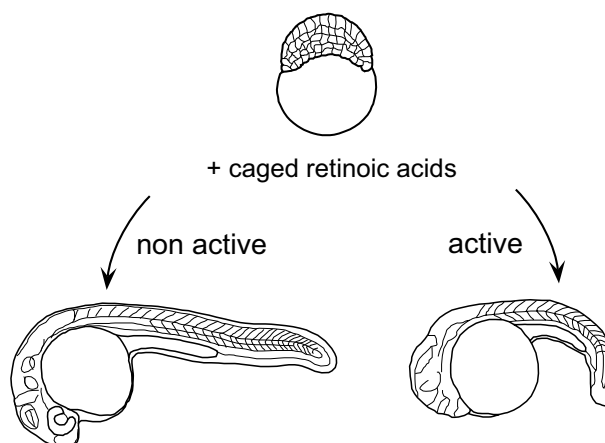


FIG. 8.4 – Test des différents acides rétinoïques cagés. Les embryons sont mis en présence au stade blastula d'acides rétinoïques cagés. Une activité biologique se traduit par des défauts dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur à 24 heures de développement.

Résultats

Les différents dérivés sont inactifs biologiquement, sont stables et peuvent être photoactivés à un photon à des doses d'UV qui seules n'entraînent aucun défaut. Cependant, les composés incorporant Br et CN (voir Figure 8.3b-c) sont moins solubles que l'acide rétinoïque couplé au diméthoxynitrobenzyle standard ¹. Nous avons donc conservé ce dernier pour toutes les expériences.

8.2.3 Mesure de la section efficace de l'acide rétinoïque couplé à la coumarine

D'après la littérature [59], les groupements coumarine ont des sections efficaces de déprotection à deux photons de l'ordre de 1 GM. La section efficace de la coumarine que nous avons choisie [187] n'a pas été mesurée dans la littérature. Cet acide rétinoïque cagé ne fluoresce pas, la photodéprotection aboutit à la libération de la coumarine qui est très fluorescente. Pour mesurer la section efficace, nous avons mesuré la cinétique de déprotection de la molécule dans une cellule d'embryon de poisson zèbre et nous avons comparé la constante cinétique obtenue à celle mesurée en utilisant un groupement protecteur nitrobenzyle dont la section efficace a été mesurée *in vitro* [13]. Nous obtenons ainsi une valeur de 3 GM à 750 nm dont l'ordre de grandeur est comparable aux valeurs données (jusqu'à 2 GM à 740 nm) par Furuta et al. [59]. Cette valeur place ce groupement protecteur parmi les meilleurs actuels, des valeurs plus grandes n'étant obtenues que pour les cinnamates [61].

¹Dans certains cas, le produit cristallise dans l'aiguille d'injection.

8.3 Mesure de la cinétique de décaage de l'acide rétinoïque *in vivo*

Le rétinol présente une section efficace de fluorescence à deux photons de $7 \cdot 10^{-2}$ GM à 700 nm [224]. Ceci est à comparer à la section efficace de la fluorescéine qui est de 38 GM à 780 nm [218]. On ne peut donc espérer détecter le rétinol *in vivo* de manière précise. Cependant, la fluorescence du rétinol est augmentée quand il est fixé aux CRBP ou RBP. Il en est de même pour l'acide rétinoïque et les CRABP. Ceci a été utilisé pour mesurer les affinités de ces protéines pour divers rétinoïdes [38]. Nous avons utilisé ce phénomène associé à la grande concentration cellulaire en CRBP/CRBAP pour mesurer la cinétique de décaage de l'acide rétinoïque dans un embryon de poisson zèbre. La cinétique de décaage doit être plus rapide que la sortie des rétinoïdes de la cellule qui est de l'ordre de $0,4 \text{ min}^{-1}$ [34].

La présence d'acide rétinoïque entraîne un déplacement de l'équilibre de liaison entre le rétinol et CRBP qui se traduit par une baisse de fluorescence d'environ 30% [135]. Ce mécanisme se fait à une vitesse constante k_{off} ne dépendant pas des conditions d'éclairage et de l'ordre de $0,01\text{-}1 \text{ s}^{-1}$ [84, 162].

Les CRABP se trouvent en excédent par rapport à la concentration d'acide rétinoïque naturelle dans la cellule. L'acide rétinoïque décaagé va donc pouvoir se fixer à ces protéines ; le temps de décomplexation des CRABP et l'acide rétinoïque étant de l'ordre de plusieurs minutes [48], on ne devrait pas observer ce phénomène si les vitesses de décaage sont assez grandes ($0,015 \text{ s}^{-1}$ comme mesuré ou plus). L'affinité étant dans la gamme du nanomolaires et la vitesse de décomplexation étant dans la gamme de la s^{-1} , la vitesse de complexation va donc être très rapide devant la vitesse de décaage qui est plus petite que $0,1 \text{ s}^{-1}$.

Ces différents phénomènes sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Phénomène	Temps caractéristique associé
sortie des rétinoïdes de la cellule	$< 0,01 \text{ s}^{-1}$
décomplexation de AR des CRBAP	$< 0,01 \text{ s}^{-1}$
décomplexation du rétinol des CRBP	$0,01\text{-}1 \text{ s}^{-1}$ ou plus rapide
vitesse de complexation de AR	$> 1 \text{ s}^{-1}$

Pour que la libération d'acide rétinoïque soit cinétiquement déterminante, il faut donc avoir une vitesse de décaage à l'intérieur de la cellule qui soit comprise entre $0,01$ et $0,1 \text{ s}^{-1}$. Cela impose donc des puissances sur échantillon de l'ordre de 1 mW ($0,013 \text{ s}^{-1}$ attendu avec les résultats de cinétique de décaage de la coumarine).

Remarque quant à la séquestration d'acide rétinoïque par les CRABP

Etant donné l'affinité de RAR pour l'acide rétinoïque et la quantité d'acide rétinoïque libérée au cours des réactions de décaage qui est environ 1000 fois plus grande que cette affinité, on s'attendrait à observer une réponse saturante ; le fait que l'on observe une réponse en Michaelis-Menten implique que la grande majorité de l'acide rétinoïque libéré est soit

séquestrée soit dégradée et qu'une infime fraction est active.

8.4 Expériences d'induction de bifurcation de rétine à deux photons

8.4.1 Protocole d'observation

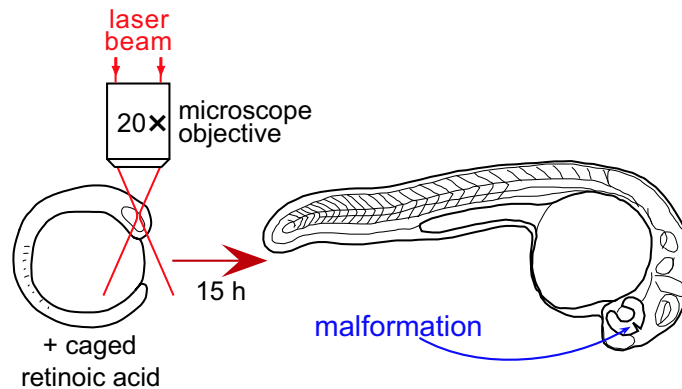


FIG. 8.5 – Principe de l'expérience d'induction de bifurcation de rétine à deux photons. Les embryons au stade 4-14 somites préalablement incubés avec un acide rétinoïque cagé sont soumis à une excitation biphotonique dans les cellules de la partie dorsale de la rétine en développement.

Les expériences de bifurcation de rétine sont effectuées sur un grand nombre d'embryons (voir Figure 8.5). Une façon d'observer la bifurcation est de fixer les embryons et de faire une hybridation *in situ* pour détecter l'expression de Pax6, un facteur de transcription jouant un rôle très important dans le développement de l'œil [12]. Cependant, un nombre non négligeable d'embryons est perdu au cours de ce procédé. Il est beaucoup plus pratique de compter directement les malformations sous loupe binoculaire sans utiliser de marquage.

8.4.2 Induction de bifurcation avec l'acide rétinoïque couplé à la coumarine

Nous avons évalué l'acide rétinoïque couplé à la coumarine (voir Figure 8.3d) en vue d'induire des bifurcations rétinienne après excitation biphotonique. Le protocole expérimental est identique à celui décrit dans l'article soumis à *PLoS Biology*. Nous avons effectués 4 illuminations de 0,57 s (4,5 mW sur échantillon, 750 nm) dans la partie dorsale de la rétine en développement. Compte tenu de la section efficace du groupement protecteur, nous attendions 100% de bifurcation. Cependant nous avons seulement observé 21/37 embryons présentant une invagination ($57 \pm 8\%$). Ce taux de bifurcation correspond à une concentration intracellulaire en acide rétinoïque cagé comprise entre 1,5 et 3 μM , assez éloigné des 10 μM de

la solution dans laquelle ont été incubés les embryons ². Nous n'avons donc pas utilisé cette molécule pour les expériences de bifurcation de rétine utilisant l'excitation biphotonique.

8.5 Résumé de l'article soumis à *PLoS Biology*

Le but initial était de mettre en place le décageage en utilisant l'excitation biphotonique dans un organisme intact avec une résolution spatiale à l'échelle cellulaire. Le système retenu est la voie de signalisation acide rétinoïque chez le poisson zèbre. Après une étude *in vitro* des réactions photochimiques pouvant affecter l'acide rétinoïque cagé sous illumination UV, nous avons montré que les acides rétinoïques synthétisés n'ont pas d'activité biologique, pénètrent passivement dans les cellules, sont stables en milieu physiologique, peuvent être photoactivés à un photon dans des embryons de poisson zèbre. Ces préliminaires effectués, nous nous sommes tournés vers le développement de la rétine pour tester la libération d'acide rétinoïque à deux photons. Nous avons d'abord fait un modèle simple de la réaction de décageage à l'intérieur des systèmes fermés que sont les cellules d'un embryon, nous avons vérifié la pertinence du modèle en utilisant une coumarine cagée qui nous a permis de déterminer la cinétique de la réaction de décageage à deux photons dans les cellules (cette méthode nous a en particulier permis de mesurer le volume de ces cellules, en bon accord avec les valeurs attendues). Nous avons fait de même en utilisant la fluorescence de l'acide rétinoïque et du rétinol. Nous avons ensuite montré que nous pouvions affecter le développement de la rétine en décageant de l'acide rétinoïque dans une seule cellule de la partie dorsale de cette rétine. Dans les embryons traités ainsi, seule la rétine illuminée présente des défauts, la rétine contrelatérale étant parfaitement normale. De plus, nous avons montré que nous pouvons délivrer une concentration précise d'acide rétinoïque avec une résolution temporelle de la seconde dans une cellule. Ces deux propriétés nous ont permis d'exciter dynamiquement la voie de signalisation acide rétinoïque dans une même cellule ou dans deux cellules différentes. Nous avons découvert un contrôle négatif rapide qui est cellule autonome de cette voie. Nous avons identifié la MAP kinase p38a (l'orthologue de p38 α) comme étant nécessaire à ce processus. Le lien entre la voie de signalisation acide rétinoïque et cette kinase est en outre appuyé en inhibant la synthèse endogène d'acide rétinoïque et en inactivant p38a simultanément.

Les résultats présentés dans cet article consistent en la première utilisation de l'excitation biphotonique à la fois pour décager dans un organisme vivant intact et pour contrôler l'expression de gènes. Cette technique donne accès à des gammes de temps inaccessibles par les méthodes classiques. Cette dernière propriété couplée à une résolution spatiale à l'échelle cellulaire nous a permis de mettre en évidence un processus insoupçonné.

²On rappelle que la constante de Michaelis-Menten pour le taux de bifurcation est de 1,6 μ M. Elle est calculée à partir des données de la référence [94].

Chapitre 9

Conclusion et perspectives

9.1 Conclusion sur la thèse

Au cours de cette thèse, nous avons démontré la puissance de la photoactivation à deux photons de molécules cagées pour exciter une voie de signalisation dans un organisme entier. Avant d'effectuer des applications biologiques, nous avons développé des méthodes pour caractériser complètement la réaction de photoactivation à deux photons. Ainsi, nous avons mesuré les sections efficaces de décaageage à deux photons des groupements photoprotecteurs utilisés au cours de cette thèse : les méthodes utilisées reposent largement sur l'utilisation de la fluorescence de manière à effectuer des mesures dans un régime d'excitation quadratique. Après une analyse des contraintes du décaageage dans le système fermé qui est la cellule, il s'avère que cette mesure n'est pas suffisante si le but visé est l'obtention d'une concentration bien définie en molécules biologiquement actives. Nous avons donc mesuré la constante cinétique de la réaction dans des cellules d'embryons intacts de poisson zèbre d'abord en utilisant une coumarine cagée. Ce dernier résultat a été vérifié pour l'acide rétinoïque cagé. Une fois ceci effectué, nous nous sommes focalisés sur la voie de signalisation par l'acide rétinoïque qui joue un rôle important dans l'embryogénèse. Nous avons montré que nous pouvons libérer une concentration bien définie d'acide rétinoïque de manière non invasive à l'échelle d'une seule cellule avec une résolution temporelle qui est la seconde. En excitant de manière dynamique cette voie, nous avons découvert un contrôle négatif rapide qui est cellule autonome : cinq minutes après un apport initial d'acide rétinoïque, les cellules ne répondent plus à d'autres stimulations de la voie. Nous avons enfin identifié la MAP kinase p38a comme étant nécessaire à ce phénomène.

9.2 Perspectives sur les groupements protecteurs

9.2.1 Propriétés nécessaires pour une application biologique

Nous avons vu que les propriétés du groupement protecteur nécessaires pour une bonne utilisation biologique peuvent varier considérablement en fonction de cette dernière. Les

contraintes sur la section efficace de décaage à deux photons sont notamment particulièrement dépendantes des caractéristiques du système dans lequel a lieu la réaction de décaage. Les cinétiques de libération de la molécule biologiquement active doivent être adaptées au phénomène à étudier. Une très grande importance est donnée dans la littérature à la section efficace, la tendance dans la communauté des chimistes développant de nouvelles cages étant d’avoir des sections efficaces toujours plus grandes ; ceci est pertinent pour une utilisation en système ouvert mais dans le cas d’une utilisation en système fermé, même les groupements de faibles sections efficaces peuvent être utilisés avec succès. Une autre impression qui se dégage de la littérature est qu’on pourrait découvrir un groupement protecteur miracle pouvant être utilisable tout le temps. Au vu des expériences menées au cours de cette thèse et des résultats de Nathalie Gagey, il semble plutôt bénéfique de disposer d’un arsenal de groupements protecteurs et de choisir celui qui est le mieux adapté à l’expérience souhaitée : en effet la solubilité, la cinétique de libération et la section efficace peuvent être affectées par le substrat protégé. Ainsi, dans l’hypothèse d’une utilisation simultanée de plusieurs molécules cagées, disposer de groupements protecteurs aux propriétés très différentes peut être un outil particulièrement puissant.

9.2.2 Utilisation de cages “améliorées”

La fonction de base d’un groupement protecteur est de rendre inactive la molécule sur laquelle il est fixé. Cependant, il peut être judicieux de doter le groupement protecteur de fonctions supplémentaires. Ainsi, il peut être adapté de manière à optimiser son caractère hydrophile/hydrophobe [60] afin que la molécule cagée soit soluble en solution aqueuse mais aussi qu’elle puisse franchir facilement l’obstacle qu’est la membrane cellulaire. L’imagerie du décaage est la propriété qui a attiré le plus d’attention au cours de ce travail. La réaction de décaage aboutit alors non seulement à la libération de la molécule biologiquement active mais aussi à la création d’une espèce fluorescente qui permet de “voir” la réaction. La série des cinnamates dont le motif a été introduit par Ned Porter permet de remplir ce but.

9.3 Perspectives sur le modèle acide rétinoïque

Nous présentons ci-dessous quelques perspectives d’utilisation de l’acide rétinoïque cagé et des résultats obtenus sur ce modèle au cours de cette thèse.

9.3.1 Intérêt des systèmes de régulation utilisant des phosphorylations dans le développement

Le contrôle négatif que nous avons mis en évidence utilise des modifications post-traductionnelles de protéine, en l’occurrence une phosphorylation. Ce processus met en jeu des acteurs qui sont tous présents dans la cellule : il n’y a besoin ni de transcription, ni de traduction. Schoeberl et al. [184] ont montré que les voies de signalisation des MAP kinases sont des pro-

cessus beaucoup plus rapides que la production d'une nouvelle protéine à partir soit du gène, soit d'un ARN messager déjà transcrit. Ceci est dû au fait que le nombre de réactions chimiques impliquées est beaucoup moins important. L'utilisation de réactions de modifications post-traductionnelles (phosphorylation/déphosphorylation, méthylation/déméthylation, acétylation/désacétylation, ubiquitination/dés-ubiquitination et sumoylation/dés-umoylation) est donc appropriée si une réponse cellulaire rapide est nécessaire. Le développement du poisson zèbre est un processus très rapide. En 24 heures, la majorité des organes sont établis. Notamment les premiers somites apparaissent avec une période de 20 minutes à partir de 10 heures après fécondation. La somitogénèse [171] est un processus complexe faisant intervenir plusieurs voies de signalisation dont celle de l'acide rétinoïque [104, 204]. Pendant ces 20 minutes, la coordination gauche-droite, la polarité du somite, la délimitation du somite et sa position par rapport aux précédents doivent être gérées. Le temps de cinq minutes à partir duquel une cellule ne devient plus sensible à un nouvel apport d'acide rétinoïque semble donc particulièrement bien adapté dans ce contexte. On comprend alors tout l'intérêt, en terme de temps de réponse de contrôler cette inhibition grâce à une kinase.

Il serait particulièrement intéressant d'étudier d'autres voies de signalisation impliquées dans le développement de manière dynamique afin d'identifier les stratégies utilisées. Pour une voie donnée, des études comparées entre organismes ayant des temps de développement différents permettraient de voir comment les cinétiques de réponse varient par rapport à la cinétique de développement (manière coordonnée ou pas). Les techniques actuelles permettent d'avoir accès à ce genre de données. Ainsi une étude très récente a permis de déterminer la cinétique de mise en place d'un gradient de morphogène chez la drosophile [109].

9.3.2 Intégration dans le temps de la réponse à un morphogène

Produire un organisme multicellulaire à partir d'une seule cellule implique une cascade d'évènements qui vont assigner à chaque cellule une fonction bien particulière dans le futur organisme. La détermination de cette fonction s'effectue grâce à une combinaison de nombreux signaux que les cellules reçoivent de leur environnement et d'informations propres aux cellules, le but pour elles étant de répondre de façon adéquate et de manière synchronisée avec leurs congénères afin d'aboutir à un développement harmonieux. Les morphogènes forment une des classes de signaux impliqués [118]. Un morphogène est une substance produite par des cellules dont la présence dans d'autres cellules crée une organisation spatiale. Ce peut être une protéine ou une petite molécule (l'acide rétinoïque est communément considéré comme un morphogène bien que ce point soit discuté par certains auteurs). Les cellules cibles du morphogène vont généralement adopter un destin qui dépend de la concentration en morphogène reçue : le problème pour ces cellules est de répondre de façon précise, en particulier d'effectuer cette décision dans un certain intervalle de temps qui peut être fixé par d'autres processus. Deux possibilités sont envisageables :

- la source de morphogène engendre son signal pendant un temps bien déterminé qui est plus court que le temps pendant lequel la cellule cible doit répondre.

- la cellule cible a un processus cellule autonome qui détermine le temps de réponse, le signal de la source de morphogène n'a pas besoin d'être précis temporellement.

Comparons ces deux stratégies. La première possibilité implique que l'arrêt de la production de morphogène est effectuée indépendamment du fait que la cellule cible ait été en contact avec le morphogène. Il y a donc un risque que l'information transmise par le morphogène soit perdue. La deuxième possibilité permet de pallier ce défaut. En effet, si la cellule cible possède un mécanisme limitant temporellement sa réponse qui dépend de la présence du morphogène, l'information sera toujours transmise.

Dans le cas de la voie de signalisation acide rétinoïque, les travaux effectués au cours de cette thèse ont montré que la seconde stratégie était utilisée. La sécurité de la transmission d'information prime donc dans ce cas sur le coût métabolique.

Il serait intéressant de voir ce qu'il en est dans d'autres systèmes comme la signalisation hormonale. Les résultats de Métivier et al. [148] montrant des oscillations dans le recrutement au niveau du promoteur des acteurs impliqués dans la transcription laissent penser que la même stratégie que pour l'acide rétinoïque a été retenue. Il faudrait soit mettre en évidence le même type de contrôle négatif cellule autonome soit montrer que les concentrations de chaque protéine oscillent dans la cellule et pas uniquement leur présence au niveau du promoteur.

9.3.3 Couplage de la libération d'acide rétinoïque avec du lignage cellulaire

Nous avons montré que le décaageage d'acide rétinoïque dans une seule cellule de la partie dorsale de la rétine en développement était suffisant pour induire un effet clairement visible 15 heures après. Ce résultat montre que bien que cette cellule ait été individualisée par rapport à ses voisines, ces dernières n'ont pas résorbé son comportement aberrant. La question qui se pose donc est la suivante : cette cellule "contamine"-t-elle ses voisines et induit-t-elle chez elles un changement de destin ou prolifère-t-elle sans affecter les cellules non illuminées ? L'utilisation du système présenté dans l'Appendice B devrait nous permettre de répondre à cette question. En effet, en utilisant la lignée rapportrice décrite, le décaageage simultané de tamoxifène et d'acide rétinoïque marquera de manière irréversible la cellule illuminée et sa descendance et induira le processus de duplication de rétine. Le fait de pouvoir affecter de manière non invasive une cellule dans un tissu nous permettra donc de répondre à des questions comme : qu'est-ce qui contrôle la détermination tissulaire ? Quel est le nombre critique de cellules permettant d'influer la destinée de cellules non traitées ? Comment est gérée une aberration à l'intérieur d'un tissu ? Autant de questions qui demeurent sans réponses avec les techniques actuelles.

9.3.4 Utilisation de rétinol cagé

La voie de signalisation acide rétinoïque est une voie de signalisation fondamentale au cours de l'embryogénèse. Cependant même si la molécule biologiquement active se trouve être l'acide rétinoïque, l'acide rétinoïque est un métabolite cellulaire formé par la cellule à

partir de rétinol. Disposer d'un rétinol cagé serait particulièrement intéressant dans le sens où ce système permettrait de contrôler artificiellement l'apport en précurseur d'acide rétinoïque. L'utilisation simultanée d'acide rétinoïque cagé permettrait de mesurer des cinétiques enzymatiques dans des cellules d'un organisme intact et de les comparer à celles obtenues par des expériences plus classiques de biochimie *in vitro*.

9.3.5 Détermination du mode d'établissement du gradient d'acide rétinoïque

Deux modèles coexistent actuellement pour expliquer la mise en place du gradient d'acide rétinoïque le long de l'axe antéro-postérieur : un modèle de gradient "passif" et un modèle "actif". Le modèle passif comporte une source unique d'acide rétinoïque, le gradient de concentration étant obtenu par diffusion de l'acide rétinoïque à partir de cette source. Le modèle actif est basé sur le fait que chaque cellule génère son propre acide rétinoïque à des doses différentes selon sa position le long de l'axe antéro-postérieur. Les expériences exposées dans la littérature ne permettent pas de trancher de manière nette entre les deux possibilités. En outre, la réponse pourrait se situer à un niveau autre que la formation d'acide rétinoïque : une étude récente a montré l'implication des enzymes de dégradation de l'acide rétinoïque Cyp26 [83]. Le décageage d'acide rétinoïque est un moyen d'obtenir une réponse définitive à cette question. En effet, la génération d'acide rétinoïque dans une seule cellule permet de générer une source bien déterminée. Cette expérience peut être effectuée en choisissant d'inhiber ou pas la synthèse d'acide rétinoïque endogène. La comparaison des résultats entre ces deux dernières conditions permet d'établir si le gradient est généré de manière active ou pas.

9.3.6 Conclusion

Les perspectives sont donc multiples. Le décageage d'acide rétinoïque dans une cellule unique permettrait de répondre à de nombreux problèmes fondamentaux permettant d'éclairer l'établissement et le maintien d'un organisme multicellulaire. De plus, les possibilités de la technique exposées au cours de cette thèse dépassent clairement sa seule utilisation dans le cadre du modèle acide rétinoïque. Elle pourrait être adaptée au contrôle de n'importe quel gène moyennant une construction biologique adéquate ou au contrôle de réactions enzymatiques bien déterminées (des réactions de phosphorylation par exemple). La création de gradients de morphogènes de manière artificielle pourrait donc être possible.

9.4 Conclusion générale

Nous avons vu au cours de cette thèse que l'application de l'excitation biphotonique pour contrôler de manière précise un processus biologique à l'échelle cellulaire implique de nombreuses étapes de calibration assez lourdes. En effet, les caractéristiques d'absorption à deux photons des groupements protecteurs utilisés doivent d'abord être déterminées proprement *in*

vitro. Ensuite la constante cinétique de la réaction de décadeage doit être déterminée *in vivo* dans le système qui sera étudié. Cette calibration passe *a priori* par l'utilisation de molécules modèles (dans notre cas des fluorophores cagés) qui permettra de suivre la cinétique de la réaction de décadeage. Dans des cas favorables, cette calibration peut être effectuée directement avec la molécule biologiquement active mais cela peut être au prix d'un traitement complexe du signal.

L'utilisation d'une telle technique dans toute sa puissance en routine nécessite de rendre simples ces étapes de calibration. La série de groupements protecteurs développée par Nathalie Gagey est un moyen particulièrement élégant de se débarrasser de toutes ces calibrations préalables : en effet ces groupements sont tels qu'il est possible de mesurer en temps réel la quantité libérée de molécules biologiquement actives et donc d'ajuster les paramètres d'excitation de manière adaptée. Malheureusement, les temps caractéristiques associés au décadeage mesurés *in vivo* sont encore trop grand pour contrôler finement la majorité des fonctions biologiques. Néanmoins, tout laisse penser que ces temps peuvent être réduits de plusieurs ordres de grandeur et donc rendre possible toute application biologique imaginable. Ces considérations associées au fait que cette série de groupements protecteurs possèdent des propriétés photophysiques parmi les meilleures disponibles devraient rendre cette technique très accessible.

Annexe A

Montages

A.1 Montage de FCS

C'est un montage optique standard inversé (voir Figure A.1). La fluorescence émise dans le point focal est récoltée par une fibre optique qui est couplée la plupart du temps aux photodiodes à avalanche. Elle peut aussi être couplée à un spectromètre pour enregistrer le spectre d'émission du point focal.

A.2 Microscope inversé de décageage

Un Nikon Diaphot a été modifié pour rajouter une entrée entre l'entrée pour l'épifluorescence et l'arrière de l'objectif (voir Figure A.2). Pour minimiser les changements d'alignement lors de la mise au point (qui peut nécessiter plus d'1 mm quand l'objectif 20× est utilisé), le miroir qui amène le faisceau du laser Ti:sa sur le miroir chaud est solidaire de l'objectif.

Comme nous utilisons des objectifs corrigés à l'infini et pas des objectifs corrigés à 160 mm comme c'est le cas normalement avec un microscope Diaphot, nous avons enlevé la lentille correctrice de la tourelle à objectifs.

A.3 Microscope de décageage nouvelle génération

Il s'agit d'un microscope encore en construction (voir Figure A.3) avec trois entrées situées derrière l'objectif :

- une pour le laser Ti:sa de manière à faire du décageage à deux photons ;
- une pour un laser à 365 nm (ou une lampe UV) pour faire du décageage à un photon ou détruire les molécules cagées ;
- une pour une lampe Xénon pour faire de l'épifluorescence.

Ce microscope aura trois canaux de détection. L'imagerie est effectuée en lumière transmise dans le rouge. On peut faire de l'imagerie de fluorescence simultanément grâce à une caméra

refroidie plus sensible (type Hamamatsu ORCA) ou faire une étude précise de la fluorescence dans le point focal grâce à des photodiodes à avalanche.

Le montage sera entièrement pilotable par ordinateur.

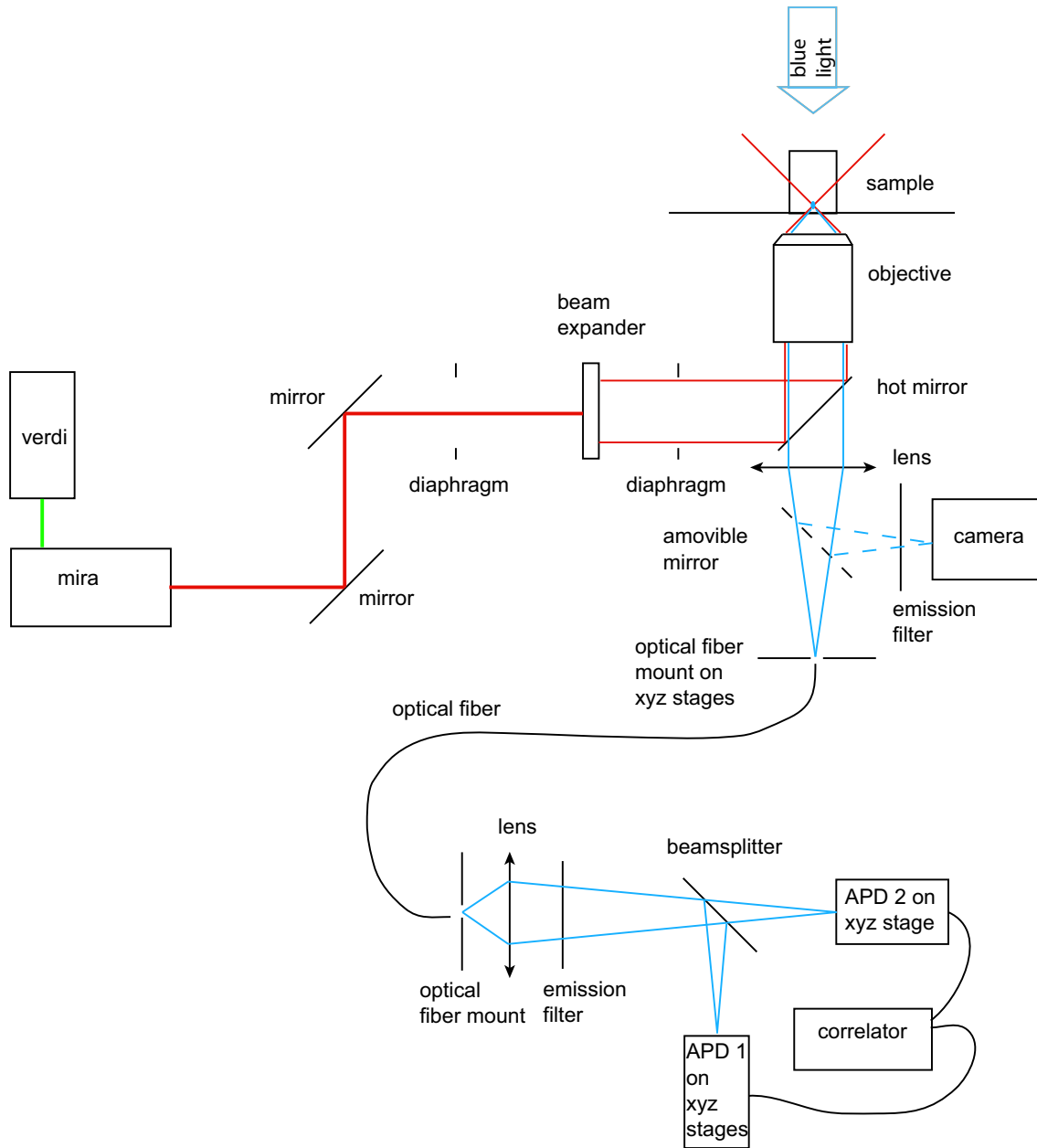


FIG. A.1 – Schéma du montage de FCS.

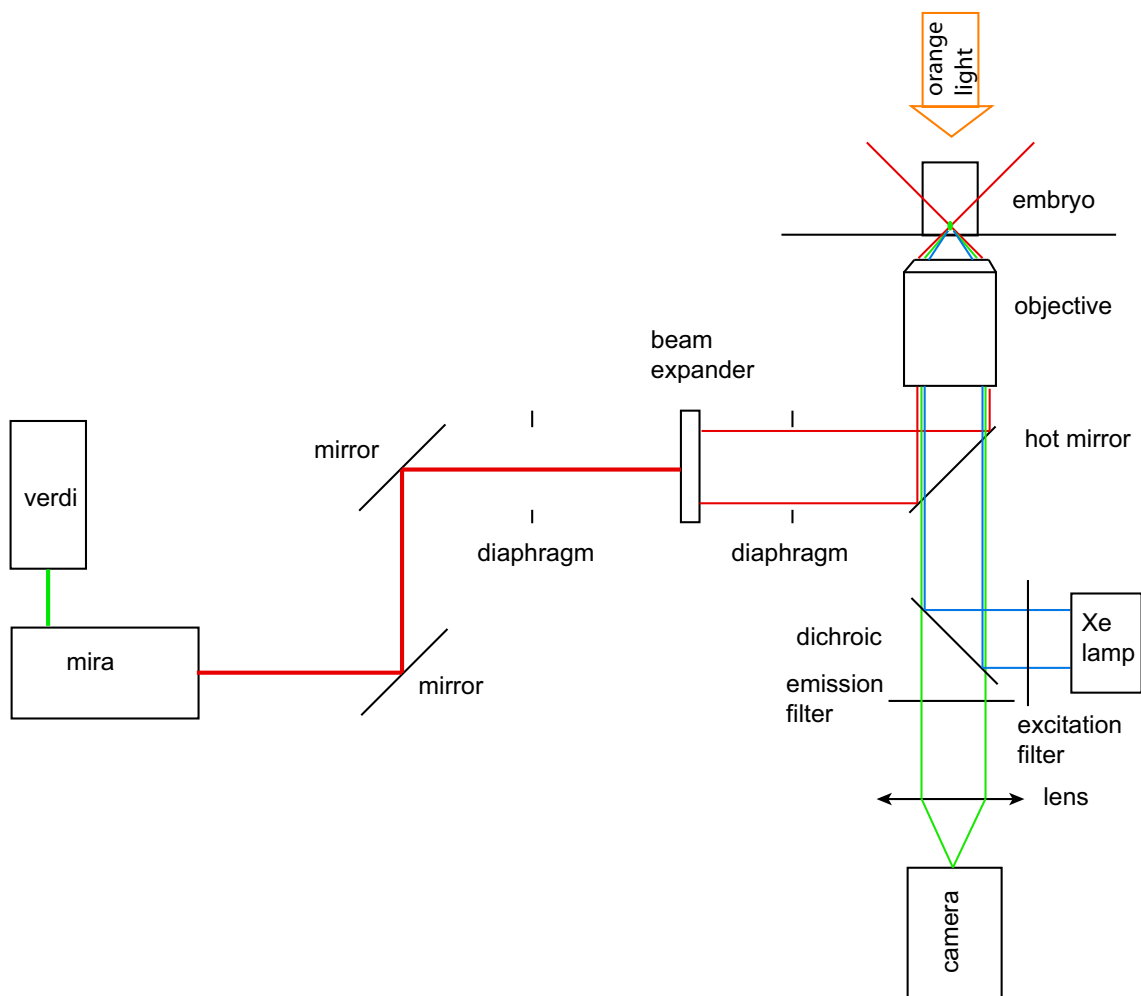


FIG. A.2 – Schéma du montage de décageage basé sur un Nikon Diaphot.

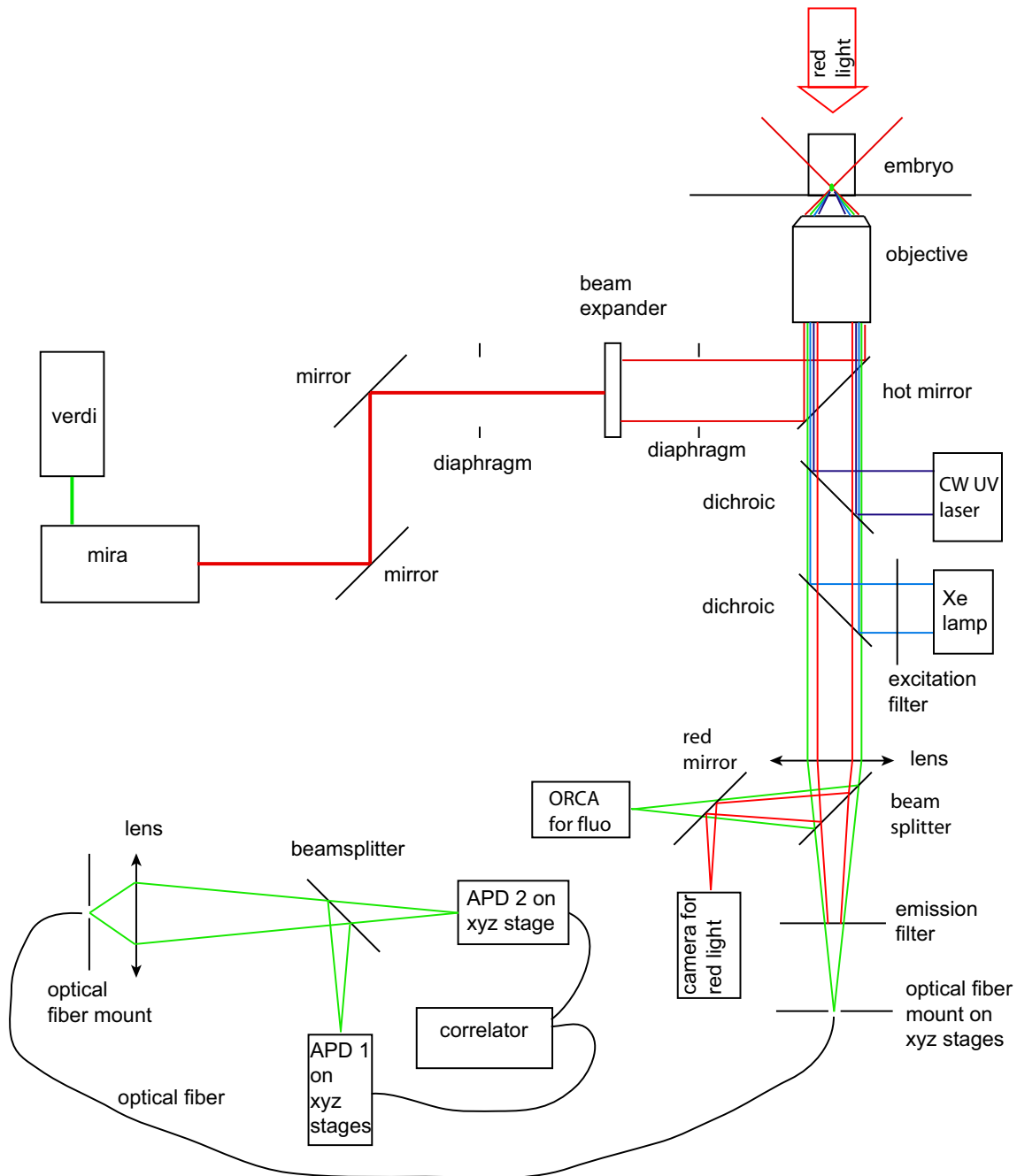


FIG. A.3 – Schéma du montage de déconvolution tout automatisé.

A.4 Autour du poisson : aquarium and co.

Toutes les expériences sont réalisées avec des microscopes inversés. Afin de pouvoir travailler avec des objectifs ayant l'ouverture numérique la plus grande possible (et donc des distances de travail courtes), il est nécessaire que l'échantillon soit le plus près possible de l'objectif. Cependant, il est aussi souhaitable de pouvoir accéder à l'échantillon. J'ai ainsi construit sur une lamelle de $170\ \mu\text{m}$ d'épaisseur de dimensions $24\times 65\ \text{mm}$ un puits assemblé avec des lamelles de $170\ \mu\text{m}$ d'épaisseur et de la paraffine pouvant contenir 5 ml de liquide et plusieurs dizaines d'embryons. Les embryons sont ainsi facilement accessibles, ils peuvent être triés et prélevés sur la platine du microscope sans perdre l'embryon présent dans le champ de vue.

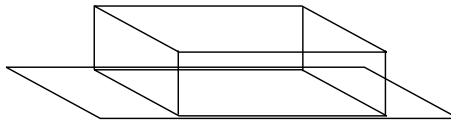


FIG. A.4 – Puits pour embryons

De plus, la grande capacité de l'“aquarium” permet de travailler avec plusieurs dizaines d'embryons à la fois et de sélectionner directement sur la platine les embryons qui n'auront pas été endommagés par les étapes de pipetage successifs. Cela garantit que tous les embryons éclairés n'ont aucun défaut, sont au stade requis pour l'expérience, et se développeront normalement hormis les défauts induits par la libération de la molécule biologiquement active.

Le montage est réaligné avant chaque utilisation de manière à avoir la plus grande reproductibilité possible. La position du point focal dans le champ de vue de la caméra est déterminée grâce à une solution de fluorescéine avant le début de l'expérience. Elle est vérifiée régulièrement au cours de l'expérience.

Les embryons sont prélevés immédiatement après traitement et triés par rétine éclairée (gauche ou droite).

Annexe B

Systeme tamoxifene

B.1 Introduction

B.1.1 But de l'experience

Avec le systeme acide retinoique, nous avons montre qu'il etait possible d'exciter une voie de signalisation a l'echelle de la cellule unique dans un embryon intact et ceci avec une resolution temporelle qui a permis de mettre en evidence un processus qui n'etait pas accessible avec les techniques usuelles de biologie. Nous nous sommes proposes de disposer du meme type de controle spatio-temporel pour induire des changements irreversibles dans le genome dont les cellules filles de la cellule cible puissent heriter. Le systeme de recombinaison Cre-lox sous controle de l'inducteur exogene tamoxifene nous a paru le candidat ideal pour effectuer ce type d'periences.

Le groupe de Thomas Look a montre recemment qu'il etait possible d'utiliser le systeme Cre/lox chez le poisson zebre en induisant une leucemie lymphoblastique severe grace a l'expression de l'oncogene *myc* apres recombinaison [120]. Nous projetons d'utiliser cette strategie pour induire un cancer, le but *in fine* etant de mener des experiences de lignage cellulaire et d'etudier les premiers stades du developpement d'une tumeur.

B.1.2 Le systeme d'induction Cre-lox

La Cre recombinase

La Cre recombinase est une proteine de 38 kDa issue du bacteriophage P1. Elle permet la recombinaison inter- et intramolculaire d'ADN. Cette recombinaison a lieu a des sites specifiques appeles *lox* et n'a besoin d'aucun autre facteur. Les sites *loxP* ont une longueur de 34 paires de bases (bp) et sont constitues de deux elements inverses de 13 bp separes par un espaceur de 8 bp non palindromique [85], la Cre se fixant de maniere cooperative sur les elements repetes (une proteine par site) [86]. L'espaceur central definit la direction du site. La recombinaison peut avoir lieu entre deux sites soit directement repetes sur la meme molecule d'ADN, entrainant l'excision du fragment entre les sites, soit entre deux sites

inversés, aboutissant à l'inversion du fragment compris entre les sites (voir Figure B.1).

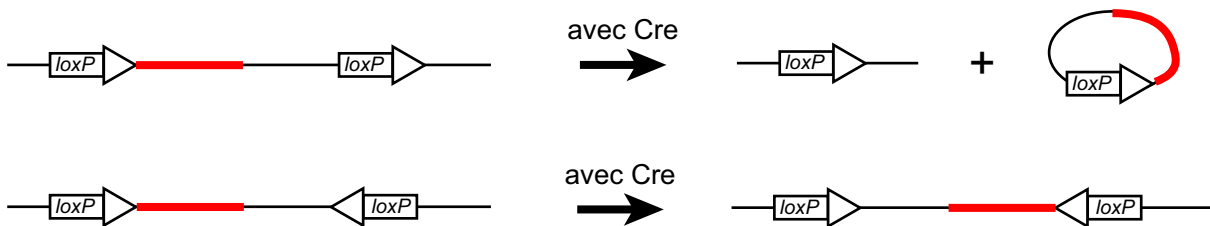


FIG. B.1 – Produits de la recombinaison d'une molécule d'ADN par la Cre selon l'orientation des sites *loxP*. Quand les sites ont la même orientation, le fragment d'ADN entre les sites est excisé. Quand les sites sont inversés, il y a inversion du fragment.

Cette recombinaison a été très utilisée pour étudier la biochimie de la recombinaison. C'est cependant en temps que moyen de générer des recombinaisons somatiques afin d'altérer le génôme de manière bien spécifique qu'elle a eu un impact considérable.

Le système Cre-lox comme moyen de générer des recombinaisons somatiques

De manière générale, les études des fonctions de gènes et la génération de modèles animaux pour des maladies humaines sont effectuées en mutant les gènes cibles. L'utilisation de la technique de la recombinaison homologe dans des cellules souches embryonnaires permet de cibler et de muter n'importe quel élément dans le génôme de la souris. On peut ainsi inactiver un gène (knock-out), altérer l'expression d'un gène en jouant sur son promoteur, ou introduire des mutations bien spécifiques comme modèle de maladie. Cependant cette technique présente l'inconvénient que la modification du génôme doit être réalisée dès la lignée germinale ce qui peut entraîner des conséquences sur la viabilité des animaux ou des réactions de compensations qui empêchent de réaliser les expériences prévues. Une méthode d'altération conditionnelle du génôme permettrait de contourner cette limitation. L'utilisation d'une recombinaison issue du bactériophage P1 a été la méthode choisie. A l'origine, cette technique avait été introduite pour étudier la recombinaison dans des cellules [181], la génération d'animaux transgéniques avec des mutations bien ciblées étant une technique encore en développement [98]. Cependant la méthode a été rapidement mise en œuvre pour générer des recombinaisons génomiques chez la souris [117], qui peuvent être tissu spécifiques [164]. Le groupe de Klaus Rajewsky a été le premier à utiliser la combinaison de ces deux stratégies pour générer des knock-outs viables et analyser ainsi l'impact de mutations qui sont létales en utilisant les approches traditionnelles [75]. Enfin le même groupe a raffiné la technique en utilisant un promoteur inductible pour contrôler l'expression de la Cre [116]; il devenait ainsi possible d'avoir les aspects spatial ou temporel du contrôle du déclenchement d'une mutation somatique. Le groupe de Pierre Chambon a modifié la Cre recombinaison de façon à pouvoir combiner contrôles spatial et temporel. Pour ce faire, la Cre a été fusionnée avec le domaine fixateur de ligand (LBD) du récepteur à œstrogène de manière à obtenir une

Cre active uniquement en présence d'œstrogène [149]. Le LBD a ensuite été muté pour ne plus reconnaître les œstrogènes endogènes mais uniquement un anti-œstrogène synthétique, le tamoxifène [55] ouvrant finalement la voie du contrôle spatio-temporel de la recombinaison [24]. Une des dernières améliorations du système Cre-lox est l'utilisation d'une Cre qui peut pénétrer dans les cellules et donc peut être administrée simplement par voie péritonéale [99].

Compte tenu que le groupe de Koh avait déjà montré que le système Cre/lox inducible au tamoxifène était adapté à l'utilisation de molécules cagées [129] nous avons finalement retenu le principe d'activation temporelle de la Cre grâce au dernier système développé par le groupe de Chambon [97] et souhaité l'utiliser en tandem avec un tamoxifène cagé chez le poisson zèbre.

B.1.3 Choix d'un analogue du tamoxifène

Le tamoxifène appartient à la famille des triphényléthylènes [100]. C'est un anti-œstrogène utilisé contre le cancer du sein. C'est l'anti-cancéreux le plus utilisé au monde. Comme pour l'acide rétinoïque dont les isomères ont des actions biologiques différentes, seul le stéréoisomère (*Z*) du tamoxifène est actif [81]. Au cours de ce travail, nous avons préféré travailler avec un analogue du tamoxifène qui ne présente pas de problèmes de stéréoisomérisation. Se basant sur les travaux du groupe de Katzenellenbogen [155], nous avons choisi d'utiliser un dérivé du cyclofénil sur lequel est greffé la chaîne éthylamino du tamoxifène (voir Figure B.2), nécessaire au caractère anti-œstrogénique de la molécule au vu de la structure cristallographique du récepteur à œstrogène complexé avec l'œstradiol et les antagonistes raloxifène et tamoxifène [26, 183].

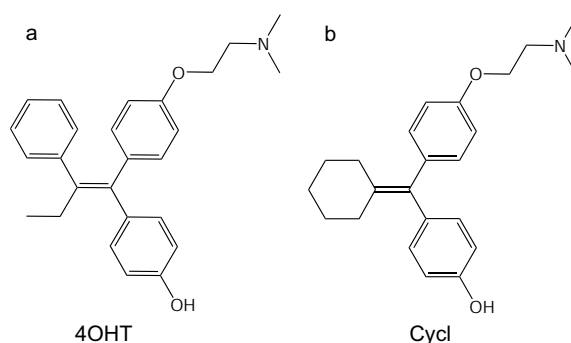


FIG. B.2 – **a** : 4-hydroxytamoxifène dans sa forme (*Z*) biologiquement active ; **b** : dérivé du cyclofénil retenu pour l'étude.

En outre l'irradiation aux UV du tamoxifène génère des phénanthrènes qui n'ont pas d'activité biologique [179]. Comme pour l'acide rétinoïque, on peut donc "laver" l'organisme des molécules cagées restantes en les irradiant une fois que l'action biologique photoinduite souhaitée a eu lieu dans la cellule cible.

B.1.4 Mise en place du système chez le poisson zèbre

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de photocontrôler l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 qui est muté dans 50% des cancers humains [125]. La protéine p53 a de nombreuses fonctions : arrêt du cycle cellulaire, sénescence et différenciation. En particulier, elle contrôle l'apoptose entraînant la destruction des cellules stressées ou anormales et empêche ainsi le développement de cancers [208]. La plupart des changements génétiques dans les cellules cancéreuses consiste en une substitution d'acide aminé sur un des allèles. Il en résulte la production d'une protéine non fonctionnelle qui est présente en grande concentration dans ces cellules, une perte d'hétérozygotie s'ensuit. De manière plus rare, une mutation non-sens ou des délétions dans le gène *p53* indiquent que l'absence de gène prédispose au cancer comme le modèle murin l'a montré : l'absence de gène ne provoque aucun défaut de développement mais les souris n'ayant pas le gène sont sujettes à l'apparition spontanée de cancers [47].

La voie de signalisation p53 est activée en présence de dommages dans l'ADN (une rupture d'un des deux brins de l'ADN est suffisante pour augmenter le niveau d'expression de p53), de signaux de croissance aberrants comme ceux dus à l'expression des oncogènes Ras et Myc et enfin par des médicaments utilisés en chimiothérapie, les UV et des inhibiteurs de kinases de protéines [207].

B.1.5 Lignées transgéniques

Le principe que nous avons retenu est d'avoir une protéine fluorescente exprimée constitutivement de manière ubiquitaire et d'exprimer simultanément après recombinaison le gène de notre choix et une protéine fluorescente rapportrice d'une autre couleur. Les cellules activées seront donc facilement repérables. Le but est d'avoir des poissons qui ont donc dans leur génome cette construction biologique et qui expriment aussi la Cre-ER. L'administration de tamoxifène cagé suivie d'une excitation lumineuse va rendre la Cre-ER active pour permettre la recombinaison (voir Figures B.3 et B.4).

Nous avons enfin choisi de construire une lignée transgénique exprimant une forme dominante négative de p53 tp53^{R248W}¹ fusionnée à la GFP. En effet, il a été montré qu'on peut fusionner p53 avec la GFP et conserver une protéine fonctionnelle [127]. En outre, il a aussi été montré que des poissons zèbres avec un gène p53 muté développent des tumeurs malignes [19]. De plus, le système de recombinaison Cre/lox a été utilisé très récemment pour induire des mutations de p53 de manière mosaïque dans l'organisme et ainsi avoir un modèle plus proche de la réalité [212]. Une lignée avec une protéine p53 sauvage est aussi en cours d'élaboration de manière à étudier l'effet de la concentration de p53.

¹La mutation de l'arginine du codon 248 est la plus fréquente [209]. Elle est située dans le domaine de fixation à l'ADN de la protéine.

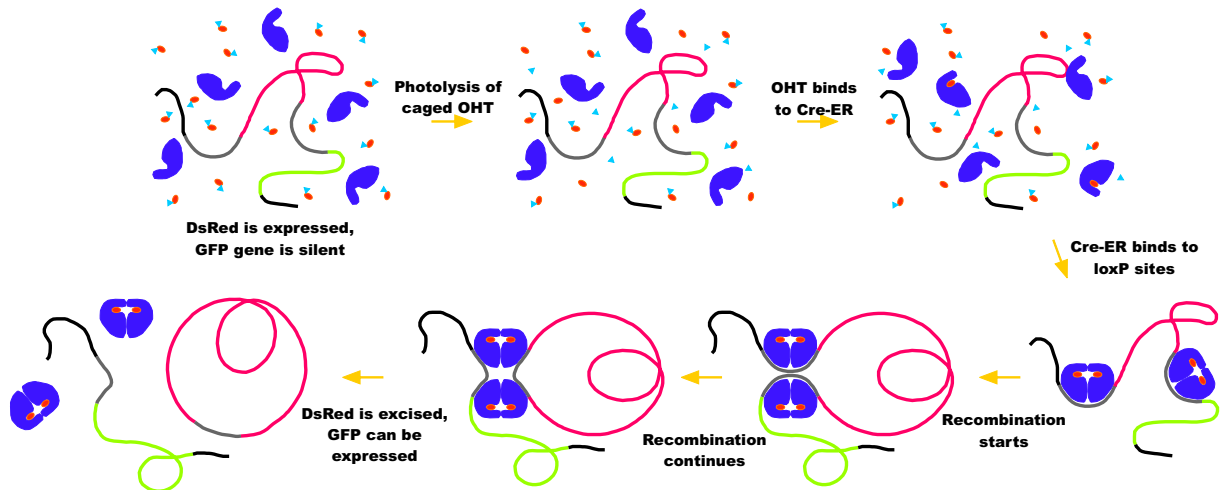


FIG. B.3 – Recombinaison du génome induite par la libération de tamoxifène (OHT).

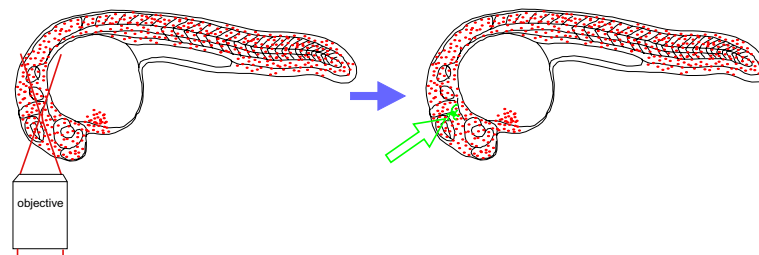


FIG. B.4 – Principe de l'expérience de marquage d'une cellule.

B.2 Résultats

B.2.1 Expériences de recombinaison de plasmide *in vitro*

Avant de tester l'activité du dérivé du cyclofénil et des produits cagés dans un système *in vivo*, nous avons décidé d'effectuer des tests préliminaires *in vitro*. Les expériences sont effectuées sur un plasmide linéarisé contenant deux sites *loxP* ayant la même orientation. Ce plasmide est mis en présence de la protéine purifiée, de 4-hydroxytamoxifène, du dérivé du cyclofénil (cagé ou pas). Les résultats de la réaction sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Sur le gel de la Figure B.5, on n'observe pas le comportement attendu - à savoir l'excision du fragment d'ADN compris entre les deux sites *loxP* - mais plutôt une multimérisation. Ce phénomène, observé aussi en cas d'utilisation d'une Cre recombinase commerciale, disparaît si on travaille dans des conditions très diluées. Il pourrait être dû à des intermédiaires de recombinaison [87] ou à des dimérisations déjà observées lors d'une des premières études *in vitro* de recombinaison avec la Cre [1]².

²Pour éviter ce phénomène, la méthode de choix pour tester l'activité de la Cre est la transformation dans

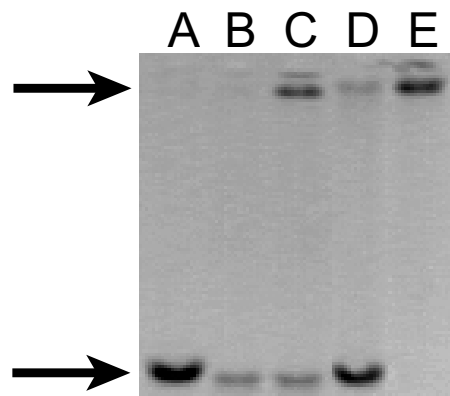


FIG. B.5 – Mise en évidence de l'activation de la CreER^{T2} par le dérivé du cyclofenil cagé. **A** : plasmide seul; **B** : plasmide + CreER^{T2}; **C** : plasmide + CreER^{T2} + 1 μ M 4-hydroxytamoxifène; **D** : plasmide + CreER^{T2} + 160 μ M dérivé du cyclofenil cagé; **E** : plasmide + CreER^{T2} + 160 μ M dérivé du cyclofenil cagé + 80 s illumination à 365 nm. En présence d'hydroxytamoxifen, la CreER^{T2} est active. En présence de cyclofenil cagé, elle n'est pas active. En revanche, après décadeage aux UV, l'activité de la CreER^{T2} est restaurée.

Ces résultats montrent que la Cre-ER purifiée est bien fonctionnelle. De plus, elle n'est pas active en présence du dérivé du cyclofenil cagé.

Plusieurs lignées de poisson transgéniques sont en cours de construction. Elles reposent sur l'utilisation du système Cre/lox en utilisant une Cre inductible au tamoxifène.

Lignée Cre-ER

Nous avons besoin d'une lignée exprimant la Cre-ER de manière ubiquitaire.

Nous avons d'abord essayé de contrôler le gène Cre-ER par le promoteur CMV. Les embryons possèdent le transgène au stade 64 cellules mais le perdent très rapidement au cours de leur développement (début de perte au stade tail bud et perte totale à 24 h).

Nous avons donc décidé de changer de promoteur : le gène a été placé par Sophie Vríz sous contrôle d'un promoteur heat shock. L'établissement de ces lignées est en cours.

Lignée rapportrice DsRed-GFP

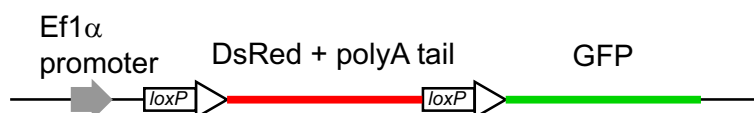


FIG. B.6 – Lignée rapportrice DsRed-GFP.

des bactéries d'un plasmide adéquat une fois la réaction de recombinaison effectuée [64]

Nous avons d'abord construit une lignée rapportrice DsRed-GFP (voir Figure B.6 pour la construction) sous contrôle d'un promoteur $Ef1\alpha$ ³. Les poissons obtenus exprimaient la DsRed nucléaire dans la lignée hématopoïétique, les cellules nerveuses et les cellules musculaires. Cependant les embryons de la deuxième génération présentaient une expression très faible du transgène.

Comme pour la Cre, nous avons décidé de reprendre la construction désormais placée par Sophie Vríz sous contrôle d'un promoteur heat shock.

Lignées cancer

La construction de la lignée transgénique exprimant une forme dominante négative de p53 $tp53^{R248W}$ fusionnée à la GFP est identique à celle de la lignée rapportrice, sauf que la GFP est remplacée par la fusion p53-GFP.

B.2.2 Démonstration de principe en transitoire

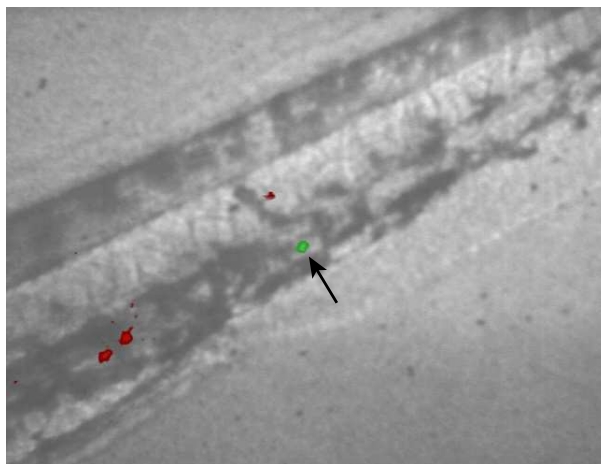


FIG. B.7 – Embryon injecté avec l'ADN de la construction rapportrice et de la Cre-ER, incubé à 24 h dans 5 μM du dérivé du cyclophénil et observé à 48 h. Il y a eu un événement de recombinaison génomique induit par la présence du dérivé du cyclophénil dans la cellule indiquée par une flèche.

Pour montrer la pertinence du principe de photodéprotection de l'expression génétique que nous avons retenu, des embryons ont été injectés au stade une cellule avec la construction rapportrice et le gène de la Cre-ER. Seuls les embryons qui n'expriment pas la GFP ont été conservés et déchorionnés manuellement. Le 4-hydroxytamoxifène ou le dérivé du cyclophénil ont été ajoutés au milieu à 24 hpf (concentration 5 μM). A 48 hpf, les embryons ont été examinés pour détecter des recombinaisons potentielles.

³Comme pour la lignée transgénique avec la Cre, la construction a été placée entre deux sites I-SceI pour faciliter la transgénèse.

La Figure B.7 met en évidence des cellules exprimant la GFP à 48 h indiquant que des évènements de recombinaison se sont effectivement produits ⁴.

Une expérience similaire a été conduite en utilisant le dérivé cagé du cyclofénil pour induire la recombinaison. Comme dans les expériences *in vitro*, on n'observe pas de recombinaison quand les embryons ne sont pas éclairés. Après 80 s d'illumination à 365 nm pour décager le cyclofénil à 24 hpf, on observe des cellules exprimant la GFP à 48 hpf.

B.3 Conclusion et perspectives sur le système tamoxifène

Nous avons démontré la pertinence du projet :

- l'analogue du tamoxifène choisi active bien la Cre-ER *in vitro* ;
- le dérivé cagé du cyclofénil n'a pas d'action biologique. Après illumination aux UV, la molécule devient biologiquement active et active la Cre-ER *in vitro* ;
- des expériences modèles utilisant une construction rapportrice ont fourni des résultats encourageants chez le poisson zèbre.

La prochaine étape est d'utiliser l'excitation biphotonique pour décager les substrats afin de montrer que la recombinaison peut être déclenchée dans de telles conditions.

B.4 Partie expérimentale

B.4.1 Purification de la Cre

Clonage du gène CreER^{T2}

Le gène de la Cre est extrait du plasmide pCre-ER^{T2} (fourni par le labo de Pierre Chambon) de manière à lui rajouter un tag biotine pour la purification en l'insérant dans le vecteur de clonage PinPoint (Promega).

pCre-ER^{T2} est digéré par EcoRI. Le fragment correspondant au gène est extrait sur gel d'agarose et est purifié par extraction phénol-chloroforme et précipitation éthanol. Les extrémités cohésives sont remplies en utilisant la Klenow exo(-) polymérase. Le milieu réactionnel est purifié par extraction phénol-chloroforme et précipitation éthanol. On obtient un gène avec bouts blunt.

PinPoint Xa1 est digéré avec PvuII. Les extrémités sont déphosphorylées en utilisant la Calf Intestinal Phosphatase de manière à réduire le taux d'auto-ligation. Le milieu réactionnel de déphosphorylation est purifié par extraction phénol-chloroforme et précipitation éthanol.

Les deux fragments (vecteur et gène) sont ligués. Le produit de la ligation est transformé dans des DH5 α chimiquement compétentes. On obtient 34 colonies. 18 sont testées par mini prep et les plasmides extraits sont digérés par BamHI pour vérifier l'insertion du gène et

⁴Les embryons étant mosaïques à la fois pour la construction rapportrice et pour le gène de la Cre (phénomène intrinsèque à l'injection d'ADN), seulement une faible fraction des cellules aura à la fois la construction et exprimera la Cre. La recombinaison n'est possible, et visible, que dans ces cellules.

son sens vu qu'on faisait une ligation blunt. Une colonie contient le plasmide souhaité. Le plasmide correspondant est appelé pXa1CreErT. Il est transformé dans des BL21(DE3)Codon Plus chimiquement compétentes. La présence du plasmide dans les colonies obtenues est testée par mini prep. Une colonie est alors conservée en stock glycerol.

Purification de la Cre

La composition des tampons a été fixée par Abremski et Hoess [2]. La purification de la protéine CreER^{T2} est effectuée en conditions natives sur colonne d'affinité en utilisant le tag biotine de la protéine.

2 × 200 ml de LBA dans des erlenmeyers de 500 ml sont inoculés avec 2 × 1,5 ml d'une culture saturée de pXa1CreErT. La culture est incubée à 37 °C à 225 rpm d'agitation jusqu'à obtenir une DO₆₀₀=0,5. Les bactéries sont induites à l'IPTG pour surexprimer le gène. La culture est de nouveau incubée à 37 °C à 225 rpm d'agitation pendant 2 h. Les bactéries sont culotées.

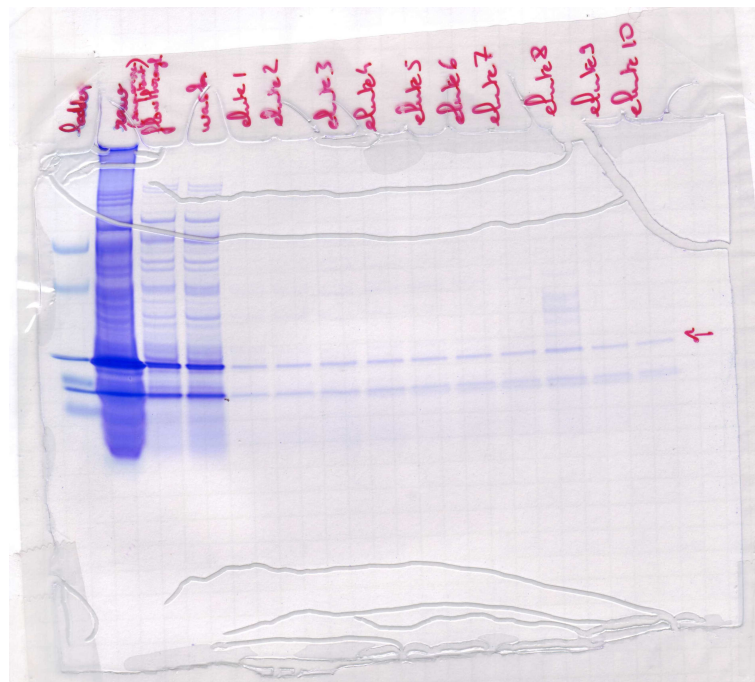


FIG. B.8 – Résultat de la purification de la Cre-ER^{T2} recombinase.

La purification est réalisée sur une colonne avidin SoftLink Soft Release Avidin Resin (Promega). **Toutes les étapes qui suivent sont effectuées soit sur glace, soit en chambre froide.** On choisit un tampon d'équilibration identique au tampon de resuspension des bactéries : 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl.

On resuspend 1 g de bactéries dans 5 ml de tampon.

On sonique les cellules avec une micro-tip réglée au maximum de sa puissance : 10 impul-

sions de 15 s avec 15 s entre les impulsions.

La solution est centrifugée 90 min à 12000 g à 1 °C. On récupère le surnageant. La purification sur la colonne est effectuée en suivant le protocole donné par Promega. L'élution est réalisée par fractions de 1 ml en ajoutant 5 mM biotine au tampon d'équilibration. Enfin, on ajoute du glycerol de manière à atteindre une concentration finale de 10%. Tous les produits sont stockés à -80 °C.

La présence de la protéine est testée sur un gel d'acrylamide 8%. La protéine CreER^{T2} est bien présente, avec une autre protéine biotinylée produite endogènement par *E. coli*. Nous ne nous sommes pas préoccupés de séparer ces deux protéines.

B.4.2 Expérience de recombinaison de plasmide

L'activité de la Cre-ER^{T2} est testée en comparaison avec celle d'une Cre commerciale (NEB et Stratagene) sur le plasmide pXΔII2loxP (fourni par Jean-François Allemand).

50-100 ng de plasmide linéarisé est incubé pendant 30 min à 37 °C. La Cre est inactivée thermiquement à 70 °C pendant 10 min. Du SDS est ajouté pour avoir une concentration finale de 1%. Le mélange est précipité à l'isopropanol.

B.4.3 Lignée Cre-ER

La construction promoteur CMV-gène de la Cre-ER (faite par Sophie Vríz) est insérée entre deux sites de la méganucléase I-SceI qui favorisent l'insertion de l'ADN dans le génome [197]. Les plasmides sont digérés avec EagI et SalI. Le fragment promoteur-gène est inséré dans le plasmide avec les sites I-SceI et le produit de ligation est transformé dans des Top 10 et des DH5α. On obtient une colonie avec le plasmide souhaité qui est utilisé pour injecter des embryons au stade une cellule afin d'obtenir des transgéniques. Les poissons obtenus sont croisés et on teste les pontes pour le transgène en faisant une PCR sur les embryons entiers avec des amorces adaptées. Le produit de PCR est un fragment de 780 bp du gène de la Cre.

Annexe C

Acide nalidixique

Nous avons effectués quelques tests sur un inhibiteur d'activité enzymatique, en l'occurrence un inhibiteur de topoisomérase, l'acide nalidixique. L'intérêt d'une telle molécule pourrait résider dans des expériences de molécules uniques où il serait possible d'avoir une inhibition de l'enzyme localisée dans l'espace.

C.1 Présentation de l'acide nalidixique

L'acide nalidixique [216] est un antibiotique de la famille des quinolones affectant principalement les bactéries Gram négatives (comme *E. coli* et le genre *Salmonella*). C'est un inhibiteur extrêmement spécifique de la gyrase, une topoisomérase procaryote de type II qui génère le super-enroulement négatif dans le chromosome bactérien [63]. L'acide nalidixique se fixe sur l'ADN de manière non intercalée, et l'affinité est augmentée par le taux de super-enroulement de la molécule [182]. Cette interaction empêche l'activité de la gyrase.

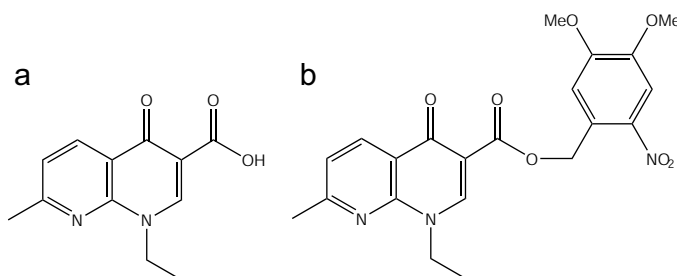


FIG. C.1 – Structures de l'acide nalidixique (a) et de sa forme cagée cN (b)

L'acide nalidixique a été cagé dans l'équipe de Ludovic Jullien avec le groupement protecteur photolabile diméthoxynitrobenzyle (voir Figure C.1). Nous avons effectué quelques tests pour évaluer l'intérêt d'une telle molécule cN.

C.2 Evaluation de l'acide nalidixique cagé

Pour tester l'acide nalidixique cagé, nous avons utilisé à la fois son activité comme antibiotique et comme inhibiteur de gyrase.

C.2.1 Activité antibiotique

L'acide nalidixique est bactériostatique à faible concentration et bactéricide à forte concentration. Les conditions pour la létalité ont été déterminées par Deitz et al. [42].

Protocole

1 ml de LB est inoculé avec 2 μl de *E. coli* de souche Top 10 en présence ou en absence de cN (concentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). On fait entrer les bactéries en phase exponentielle en les incubant pendant 2 h à 37°C avec agitation.

5 μl de chaque culture sont étalés sur des boîtes de Petri (milieu LB) en ajoutant 50 μl de LB pour étaler (concentration finale en cN : 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les boîtes sont illuminées pendant diverses durées avec une lampe UV (6W, 365 nm) puis sont incubées à 37°C pendant la nuit. Les colonies sont comptées le lendemain.

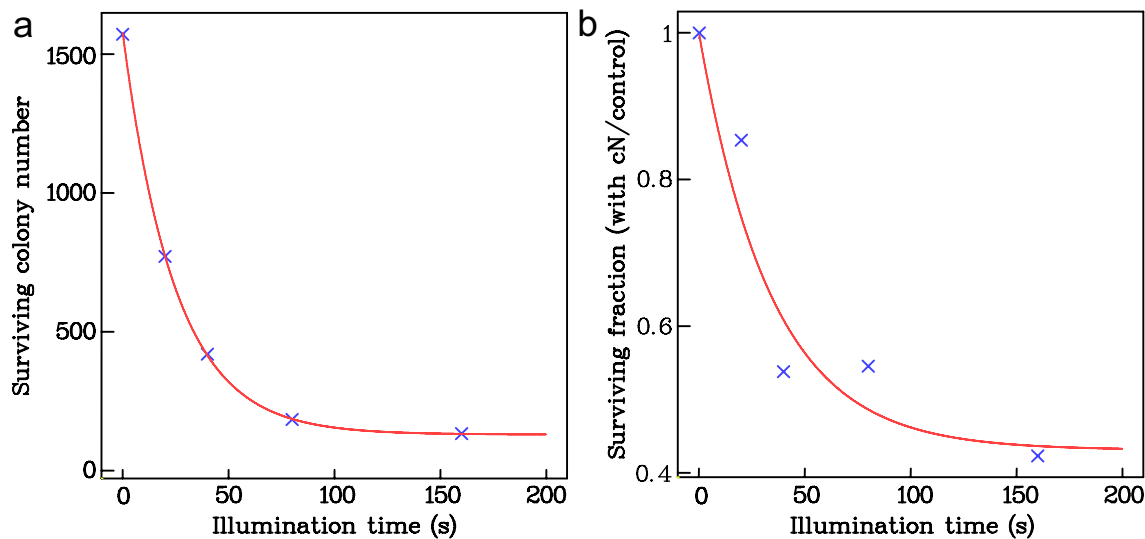


FIG. C.2 – **a** : Nombre de colonies survivantes de bactéries illuminées pendant des temps variés à 365 nm (les points sont ajustés avec une exponentielle en considérant qu'une fraction des bactéries est résistante). **b** : Survie comparée des bactéries traitées avec 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cN et illuminées à 365 nm pendant des durées variées par rapport à des bactéries seulement illuminées aux UV ; l'ajustement des points donne une constante cinétique de décaillage de $0,03 \text{ s}^{-1}$ dont l'ordre de grandeur se compare de manière satisfaisante avec celui trouvé pour l'acide rétinoïque cagé (voir les Supplemental Data de l'article soumis à PLoS Biology "Uncovery of Cell Autonomous Fast Negative Control of Retinoic Acid Signaling").

Résultats

On observe d'abord que **CN** ne provoque aucune mortalité bactérienne en absence d'illumination. L'exposition aux UV entraînent une mortalité chez les bactéries (20 s d'éclairage engendrent 50 % de mortalité). Nous avons donc comparé le taux de survie des bactéries traitées avec **cN** et illuminées aux UV avec celui des bactéries seulement illuminées aux UV. Les résultats sont présentés dans la Figure C.2.

D'après Deitz et al. [42], on attend un taux de survie de 66% à une concentration d'acide nalidixique de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Le taux de survie trouvé dans notre cas est de 45%, en assez bon accord avec ce dernier. Ces résultats suggèrent que l'acide nalidixique cagé peut effectivement être décagé et exercer une activité antibiotique.

C.2.2 Activité inhibitrice de gyrase

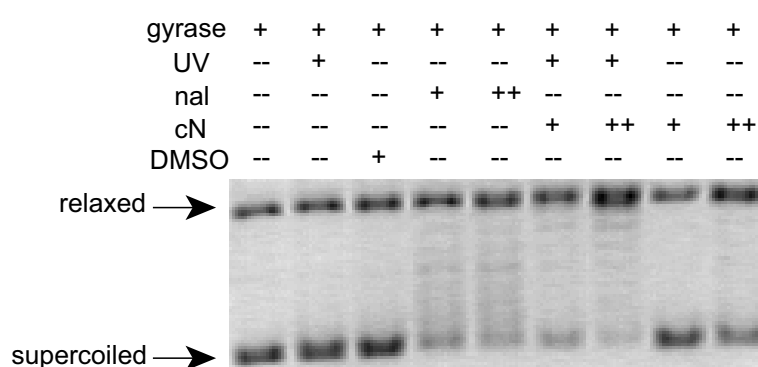


FIG. C.3 – Activité inhibitrice de gyrase de l'acide nalidixique. Du pBlueScript relaxé est incubé pendant 30 min à 37°C avec une unité de gyrase, du DMSO (solvant de l'acide nalidixique et de **cN**; concentration : 5%), de l'acide nalidixique (nal; concentrations : + : 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ++ : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou **cN** (concentrations : + : 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ++ : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Certains milieux réactionnels sont illuminés pendant 80 s à 365 nm (UV) avant d'ajouter l'ADN et la gyrase. La gyrase seule, en présence de DMSO et de **cN** non illuminé est active (obtention de plasmide surenroulé). En revanche, en présence d'acide nalidixique et après illumination de **cN**, la gyrase n'arrive plus à générer de super-enroulement. Ce gel montre que **cN** n'a pas d'activité inhibitrice de gyrase et qu'après illumination à 365 nm, on libère de l'acide nalidixique qui inhibe ainsi la gyrase.

L'activité inhibitrice de gyrase de l'acide nalidixique est testée sur les plasmides pUC19 ou pBlueScript relaxés avec la Topo I en utilisant la gyrase commerciale de John Innes Enterprises.

Protocole

pUC19 ou pBlueScript sont relaxés avec la Topo I (commercialisée par Topogen ; tampon de réaction : 10 mM Tris pH 7.9, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% BSA, 0,1 mM spermidine, 5% glycerol). L'ADN est purifié par une extraction phénol-chloroforme suivie par une précipitation éthanol.

La réaction avec la gyrase est réalisée dans le tampon suivant : 50 mM Tris pH 7.5, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0,5 mM ATP, 70 mM NaCl, 5 mM spermidine. Elle est interrompue par ajout d'EDTA (concentration finale : 50 mM), incubation de la solution 1 min à 37°C, de SDS (concentration finale : 1%) et de protéinase K (concentration finale : 50 $\mu\text{g/ml}$), incubation de la solution 15 min à 37°C. Les produits de la réactions sont mis en évidence sur un gel d'agarose 2% en TAE (voir Figure C.3). L'électrophorèse est effectuée à faible différence de potentiel (40 V pour un minigel) afin de séparer les topoisomères.

Résultats

Les expériences de super-enroulement *in vitro* montrent donc qu'on peut contrôler l'activité enzymatique de la gyrase grâce à l'acide nalidixique cagé : inactif en absence d'illumination, il devient inhibiteur après exposition lumineuse

C.3 Conclusion sur le système acide nalidixique

Avec les actions bactéricide et inhibitrice sur l'activité de la gyrase, nous avons montré la pertinence de la stratégie de photodéprotection de l'acide nalidixique cagé dont l'illumination UV restaure l'action.

Annexe D

Molecular biology protocols

D.1 Phenol Chloroform extraction

Add an equal volume of phenol :chloroform 1 :1 to the aqueous solution (alternatively phenol :chloroform :isoamyl alcohol 25 :24 :1). Mix to have an emulsion. Centrifuge 14000g 15s. Pipet aqueous phase in a clean tube. Reextract once.

Optional : Rinse with pure chloroform.

Proceed with ethanol precipitation.

D.2 Purification of DNA from Agarose gels : Freeze and Squeeze adapted

Use this protocole when you have to purify from agarose oligos (length ≤ 50 bp) which would be melted by the chaotropic salts used in QiaexII protocol. Yield of this method is $\sim 30\%$ recovery.

Run an agarose gel using TAE (boric acid inhibits ligase and other enzymes).

Excise the agarose slice containing the DNA sample. Minimize the size of the slice

Poke a hole at the bottom of a 0.5 μ l tube using an hypodermic needle.

Put the agarose slice in this tube (if the agarose slice is too big, use several tubes).

Freeze the tube containing the slice in liquid nitrogen for at least 20 minutes.

Place a 1.5 ml tube in a microcentrifuge.

Remove the 0.5 ml tube from liquid nitrogen and as fast as you can, remove condensation on the outer side of the tube, place it in the 1.5 ml tube and spin at max speed for 2.5-3 minutes.

When spin is done, put the 0.5 ml tube in a clean 1.5 ml tube. Spin for 1 minute.

Pipet the liquid part of the flow-through and spin for another minute. Repeat this step while significant amount of liquid is in the flow-through (usually 1 or 2 steps)

Concentrate the flow-through on a Microcon filter. Add 300 μ l of water to desalt the DNA.
Spin following Microcon protocole
Recover your purified DNA sample.
Check the yield on a gel.

D.3 DNA transfert from polyacrylamide gel to agarose

Prepare an agarose gel using \sim 45 ml of buffer. Agarose percentage should be adapted to the DNA size.

Excise the polyacrylamide slice containing the DNA. Minimize its size.

Load the polyacrylamide slice in the wells of the agarose gel. Try to put it as deep as you can. If the slice is small enough, put it vertically as it will minimize lateral dimension of the DNA spot in agarose.

Fill the wells with the buffer used to make the agarose gel. Remove the excess buffer.

Mix the appropriate amount of agarose to 30 ml of buffer to make a gel of same percentage.

Dissolve agarose and let the solution cool down to \sim 40°C and pour it on top of the other gel to make an extra layer. This prevents you from losing your sample in the electrophoresis tank : it will get trapped in this extra layer. Cooling the solution prevents denaturation of small DNA fragments.

Let the gel set.

D.4 Crush and soak method, Maxam and Gilbert adapted

Excise the slice of polyacrylamide containing the DNA band of interest and put it in a pre-weighed 1.5 ml tube

Weigh the slice.

Crush it using a 200 μ l tube which cap has been removed.

Add 1-1.5 volume of elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS). I usually use 300 μ l of elution buffer without regarding the size of the polyacrylamide slice. It is a lot easier to pipet back the supernatant (see next steps) without pipetting any crushed polyacrylamide. The yield appears to be slightly higher too.

Incubate at 37°C on a shaking incubator (\sim 225 rpm) or on a rotary wheel. Small fragments are eluted in 3-4 hours, fragments $>$ 500 bp are eluted in 12-16 hours.

Let the centrifuge cool to 4°C.

Centrifuge at 4°C at 12000 g for 1 minute. The centrifuge really needs to be equilibrated to 4°C before this step. If it isn't, the yield would be reduced (separation of elution buffer from polyacrylamide fragments works better at low temperatures).

Carefully pipet supernatant (try to avoid pipeting polyacrylamid).

Add 0.5 volume of elution buffer to the crushed gel. Vortex briefly and recentrifuge (4°C, 12000g, 1minute). There I use 100 μ l of elution buffer.

Carefully pipet supernatant and combine both supernatants.

At this step, if having a little polyacrylamide doesn't really matter, you can concentrate the supernatant on a microcon in order to have $\sim 10 \mu\text{l}$, then add $300 \mu\text{l}$ of H₂O and concentrate again. You end up with a desalted solution which can be used for further restrictions, ligations, etc. This method doesn't remove the polyacrylamide you may have in solution.

Removing polyacrylamide :

Poke a hole with a needle at the bottom of a $500 \mu\text{l}$ tube. Place a GFC filter in it. Place this tube in a 1.5 ml tube. Load supernatant in the 0.5 ml tube and spin for 1 min at maximum speed. The polyacrylamide pieces remain on the filter whereas the DNA goes through it.

Proceed with ethanol precipitation.

D.5 Mini prep using boiling method (for DH5 α , Top Ten, DH1)

Pre-heat a water bath at 90°C and allow lysozyme stock (concentration 25mg/ml) to thaw.

Harvesting cells

Pour 2 ml of cell culture in a 2 ml eppendorf.

Pellet the cell by spinning for 30 s at 8000 rpm in a microcentrifuge.

Decant supernatant. Remove any remaining trace of supernatant with a vacuum pump.

Cell lysis

Resuspend the pellet in $200 \mu\text{l}$ STET pH 8.0 by vortexing.

Add $10 \mu\text{l}$ of lysozyme 25 mg/ml. Mix gently.

Let the solution sit for 10 minutes.

Make a hole with a needle in the the cap.

Neutralization

Incubate for 45s at 100°C and spin immediately at maximum speed (13000 rpm) for 15 minutes.

Remove the pellet with a sterile toothpick.

DNA precipitation

Add $5 \mu\text{l}$ of NaCl 5 M. Vortex the unclosed tube.

Add $200 \mu\text{l}$ isopropanol. Vortex.

Spin for 5 minutes at maximum speed.

Decant supernatant.

Wash with $500 \mu\text{l}$ 70% ethanol. Spin again for 5 minutes at maximum speed.

Decant the supernatant.

Dry the pellet in a speedvac for 5 min (if no speedvac is available, air dry the pellet for approximately the same duration).

Resuspend in 50 μl H_2O with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase.

Load 5 μl on an agarose gel for analysis or use 5 μl for restriction (usually final concentration is ~ 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

D.6 Transformation protocol for Top Ten strain

Thaw competent cells on ice.

Prepare a water bath at 42°C.

Cool down transformation solution and pipet tips.

Add no more than 10 μl of transformation solution (~ 10 ng of DNA) to the cell. Mix by flicking the tube. Do not pipet up and down.

Incubate on ice for 20 minutes.

Heat shock : incubate at 42°C for 1 minute.

Incubate on ice for 1 minute.

Add 450 μl SOC.

Incubate at 37°C on a shaking incubator (~ 225 rpm) for 1 hour.

Spread on plates.

D.7 Transformation protocol for DH5 α

Thaw competent cells on ice.

Prepare a water bath at 42°C.

Cool down transformation solution and pipet tips.

Add no more than 10 μl of transformation solution (10-100 ng of DNA) to the cell. Mix by flicking the tube. Do not pipet up and down.

Incubate on ice for 30 minutes.

Heat shock : incubate at 42°C for 90s.

Incubate on ice for 2 minutes.

Add 200 μl LB.

Incubate at 37°C on a shaking incubator (~ 225 rpm) for 45 minutes.

Spread on plates.

D.8 Protocol for chemical competent cells (Hanahan style)

For DH1, DH5, MM294, Top Ten.

Growth of cells

Grow cells overnight on a LB plate at 37°C.

Inoculate 5 ml of SOB medium with one colony.

Grow overnight (12-16 hours) in a shaking incubator (200-225 rpm) at 37°C.

Inoculate 250 ml of fresh SOB medium in a 500 ml flask with 2.5 ml of the overnight culture.

Grow at 37°C at 200-225 rpm in a shaking incubator until $OD_{550nm} \sim 0.55 - 0.65$ (2-3 hours).

Divide the culture between two cold (0-4°C) sterile 250 ml centrifuge bottles and place on ice for 30 minutes.

Centrifuge at 2000 g for 10-15 min at 4°C.

Decant the medium (place the bottle in an inverted position for one minute to drain) and resuspend each pellet in 10 ml cold FSB and transfer to two cold sterile 50 ml centrifuge tubes. Incubate on ice for 15 min.

Centrifuge the tubes at 2000 g for 10-15 min at 4°C.

Decant the buffer (place the tube in an inverted position for one minute to drain) and resuspend each pellet in 1.8 ml cold FSB.

While gently swirling the tubes, slowly add 65 μ l of DMSO drop by drop to each tube. Incubate on ice for 15 minutes.

Add an additional 65 μ l of DMSO and combine the cell suspensions from both tubes into one and incubate on ice for 15 minutes.

Make 50 μ l aliquots in cold 1.5 ml tubes. Quick freeze the tubes in liquid nitrogen or in a dry ice-ethanol bath and store at -80°C.

D.9 Protocol for chemical competent cells (acetate style)

Growth of cells

Grow cells overnight on a LB plate at 37°C.

Inoculate 2.5ml of LB+10 mM MgCl₂ with one colony.

Grow overnight (12-16 hours) in a shaking incubator (200-225 rpm) at 37°C.

Inoculate 100ml of LB+10 mM MgCl₂ in a 500ml flask with the 2.5ml of the overnight culture.

Grow at 37°C at 200-225 rpm in a shaking incubator until $OD_{550nm} \sim 0.45 - 0.55$ (2-3 hours; 2h15 at 200 rpm).

Divide the culture between two cold (0-4°C) sterile 50ml Falcon and place on ice for 5 minutes.

Centrifuge at 3500g for 10 min at 4°C.

Decant the medium (place the bottle in an inverted position for one minute to drain) and resuspend the pellets in total 20 ml cold TfbIA. Combine pellets. Incubate on ice for 5-10 min (for RecA(-) strains 60-90 min; RecA(-) strains : DH1-DH5).

Centrifuge at 3500g for 10 min at 4°C.

Decant the buffer (place the tube in an inverted position for one minute to drain) and resuspend carefully each pellet in 2 ml cold TfbIIA.

Incubate on ice for 15 minutes.

Make 50 μ l aliquots in cold 1.5 ml tubes. Quick freeze the tubes in liquid nitrogen or in a dry ice-ethanol bath and store at -80°C .

D.10 Whole embryo PCR

Put the embryos in Tail-Fin buffer (Tris, NaCl, 0.2% SDS). 50 embryos per 500 μ l.

Supplement with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K.

Incubate for 2-3 hours at 55°C . Vortex every 30 min.

Precipitate SDS. Add 12.5 μ l/100 μ l 3M potassium acetate. Incubate for 2 hours at 4°C . Centrifuge 15 min at maximum speed.

Inactivate protease : incubate for 5 min at 95°C .

Ethanol precipitate the DNA. Resuspend in 10-20 μ l.

Proceed with PCR (30-35 cycles).

D.11 Recipes

10 M Ammonium acetate

Dissolve 770 g of ammonium acetate in 100 ml of H_2O . Adjust the volume to 1 liter with water. Sterilize by filtration.

1 M Dithiothreitol (DTT)

Dissolve 3.09 g of DTT in 20 ml of 0.01 M sodium acetate (pH 5.2). Sterilize by filtration. Dispense into 1 ml aliquots and store at -20°C .

0.5 M EDTA

Add 186.1 g of disodium ethylenediaminetetraacetate- $2\text{H}_2\text{O}$ to 800 ml of H_2O . Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH (\sim 20 g of NaOH tablets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

1 M Magnesium acetate

Dissolve 214.46 g of magnesium acetate- $4\text{H}_2\text{O}$ in 800 ml of H_2O . Adjust the volume to 1 liter with water. Sterilize by filtration.

1 M Potassium acetate pH 7.5

Dissolve 9.82 g of potassium acetate in 90 ml of pure H₂O. Adjust the pH to 7.5 with 2 M acetic acid. Add pure H₂O to 100 ml. Divide the solution into aliquots and store them at -20°C.

3 M sodium acetate pH 5.2

Dissolve 408.1 g of sodium acetate·3H₂O in 800 ml of H₂O. Adjust the pH to 5.2 with glacial acetic acid. Adjust the volume to 1 liter with water. Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

5 M NaCl

Dissolve 282.2 g of NaCl in 800 ml of H₂O. Adjust the volume to 1 liter with water. Sterilize by autoclaving.

1 M Tris

Dissolve 121.1 g of Tris base in 800 ml of H₂O. Adjust the pH to the desired value by adding concentrated HCl. Allow the solution to cool to room temperature before making the final adjustments to the pH. Adjust the volume of the solution to 1 liter with water. Sterilize by autoclaving.

D.12 Buffer recipes

TE (Tris EDTA)

pH 7.4

10 mM Tris·Cl (pH 7.4)

1mM EDTA (pH 8.0)

pH 7.6

10 mM Tris·Cl (pH 7.6)

1mM EDTA (pH 8.0)

pH 8.0

10 mM Tris·Cl (pH 8.0)

1mM EDTA (pH 8.0)

TAE

Tris-Acetate (TAE)

Working solution : 1× 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA

50× stock solution (per liter) : 242 g Tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

TBE

Tris-Borate (TBE)

Working solution : 0.5× 0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA

5× stock solution (per liter) : 54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0). 10× stock solution can be made as well.

STET (Salt Tris EDTA Triton)

0.1 M NaCl

10 mM Tris·Cl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

5 % Triton X-100

D.13 Recipes for bacteria growth

Low salt LB (Luria Bertani)

1% Tryptone

0.5% Yeast extract

0.5% NaCl

Dissolve 10 g tryptone, 5 g yeast extract and 5 g NaCl in 950 ml H₂O. Adjust pH to 7.5 with 5 M NaOH. Adjust volume to 1 liter and autoclave.

SOB

2% Tryptone

0.5% Yeast extract

0.05% NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

Dissolve 10 g tryptone, 5 g yeast extract and 0.5 g NaCl in 950 ml H₂O. Add 4 ml of 1 M KCl. Adjust pH to 7.5 with 5 M NaOH. Adjust volume to 1 liter and autoclave. Let the solution cool down to ~ 55°C and add 10 ml of sterile MgCl₂.

SOC

Add 20 mM glucose to SOB. Sterile filter the solution. As this medium is very rich, it gets polluted very easily.

D.14 Transformation media

FSB

10 mM Potassium acetate pH 7.5

45 mM $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

10 mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

100 mM KCl

3 mM hexaaminocobalt chloride

10% glycerol

for 100 ml :

1 ml 1 M Potassium acetate pH 7.5

890 mg $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

150 mg $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

750 mg KCl

80 mg hexaaminocobalt chloride

10 ml glycerol

80 ml H_2O

Adjust pH with 0.1 N HCl.

Bring volume to 100 ml.

Sterile filter and store at 4°C.

TfbIA

30 mM Potassium Acetate pH 6.0

100 mM KCl

10 mM CaCl_2

15% Glycerol

Add 50 mM MnCl_2

TfbIIA

10 mM MOPS pH 7.0

10 mM KCl

75 mM CaCl_2

15% Glycerol

D.15 Fish recipes

D.15.1 Hank's stock solutions

Hank's Stock #1

8.0 g NaCl
0.4 g KCl
in 100 ml dd H₂O

Hank's Stock #2

0.358 g Na₂HPO₄ anhydrous
0.60 g KH₂PO₄
in 100 ml dd H₂O

Hank's Stock #4

0.72 g CaCl₂
in 50 ml dd H₂O

Hank's Stock #5

1.23 g MgSO₄ × 7H₂O
in 50 ml dd H₂O

Hank's Stock #6

0.35 g NaHCO₃
10.0 mls dd H₂O

D.15.2 Embryo medium

Embryo Medium :

1.0 ml Hank's Stock #1
0.1 ml Hank's Stock #2
1.0 ml Hank's Stock #4
95.9 ml dd H₂O
1.0 ml Hank's Stock #5
1.0 ml fresh Hank's Stock #6
Use about 10 drops 1 M NaOH to pH 7.2

D.15.3 Tricaine

also called 3-amino benzoic acid ethyl ester or ethyl m-aminobenzoate.

400 mg tricaine powder

97.9 ml dd H₂O

≈ 2.1 ml 1 M Tris (pH 9)

Adjust pH to 7.

Dilute 25× to use

Annexe E

Publications

- 1 Aujard I, Benbrahim C, Gouget M, Ruel O, Baudin JB, Neveu P, Jullien L. o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption : syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- 2 Gagey N, Neveu P, Jullien L. Reporting two-photon uncaging with the efficient 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging group. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2467–2469.
- 3 Gagey N, Neveu P, Benbrahim C, Goetz B, Aujard I, Baudin JB, Jullien L. Two-Photon Uncaging with Fluorescence Reporting : Evaluation of the ortho-Hydroxy Cinnamic Platform. submitted to *J. Am. Chem. Soc.*
- 4 Neveu P, Vríz S, Aujard I, Benbrahim C, Le Saux T, Allemand JF, Bensimon D, Jullien L. Uncovery of Cell Autonomous Fast Negative Control of Retinoic Acid Signaling. submitted to *PLoS Biology*.

Bibliographie

- [1] Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination : evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **1983**, *32*, 1301–11.
- [2] Abremski K, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 1509–14.
- [3] Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 226–240.
- [4] Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. Essential role of p38 α MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 109–116.
- [5] Adams SR, Kao JPY, Gryniewicz G, Minta A, Tsien RY. Biologically useful chelators that release Ca²⁺ upon illumination. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3212–3220.
- [6] Adams SR, Tsien RY. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–84.
- [7] Adams SR, Lev-Ram V, Tsien RY. A new caged Ca²⁺, azid-1, is far more photosensitive than nitrobenzyl-based chelators. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 867–78.
- [8] Albota M, Beljonne D, Bredas JL, Ehrlich JE, Fu JY, Heikal AA, Hess SE, Kogej T, Levin MD, Marder SR, McCord-Maughon D, Perry JW, Rockel H, Rumi M, Subramaniam G, Webb WW, Wu XL, Xu C. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science* **1998**, *281*, 1653–6.
- [9] Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 229–31.
- [10] Ando H, Furuta T, Tsien RY, Okamoto H. Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [11] Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, Mizuno H, Miyawaki A. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 2651–6.
- [12] Ashery-Padan R, Gruss P. Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2001**, *13*, 706–714.

- [13] Aujard I, Benbrahim C, Gouget M, Ruel O, Baudin JB, Neveu P, Jullien L. o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption : syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [14] Baker K, Warren KS, Yellen G, Fishman MC. Defective “pacemaker” current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4554–9.
- [15] Balling R, Mutter G, Gruss P, Kessel M. Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice. *Cell* **1989**, *58*, 337–47.
- [16] Barltrop JA, Plant PJ, Schofield P. Photosensitive protective groups. *Chem. Commun.* **1966**, *22*, 822–823.
- [17] Barrett LE, Sul JY, Takano H, Van Bockstaele EJ, Haydon PG, Eberwine JH. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 455–60.
- [18] Bartel DP. MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**, *116*, 281–97.
- [19] Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD, Morris JP, Liu TX, Schulte-Merker S, Kanki JP, Plasterk R, Zon LI, Look AT. *tp53* mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 407–12.
- [20] Bochet CG. Photolabile protecting groups and linkers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, 125–142.
- [21] Boehm AK, Saunders A, Werner J, Lis JT. Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 7628–7637.
- [22] Bork P, Koonin EV. Predicting functions from protein sequences—where are the bottlenecks? *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 313–8.
- [23] Breiting HG, Wieboldt R, Ramesh D, Carpenter BK, Hess GP. Synthesis and characterization of photolabile derivatives of serotonin for chemical kinetic investigations of the serotonin 5-HT(3) receptor. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5500–8.
- [24] Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14559–63.
- [25] Brown EB, Shear JB, Adams SR, Tsien RY, Webb WW. Photolysis of caged calcium in femtoliter volumes using two-photon excitation. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489–99.
- [26] Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **1997**, *389*, 753–8.
- [27] Buiteveld H, Hakvoort JMH, Donze M. The optical properties of pure water. *SPIE Proceedings on Ocean Optics XII*, edited by J. S. Jaffe **1994**, *2258*, 174–183.

- [28] Callaway EM, Yuste R. Stimulating neurons with light. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 587–92.
- [29] Cambridge SB, Davis RL, Minden JS. *Drosophila* mitotic domain boundaries as cell fate boundaries. *Science* **1997**, *277*, 825–8.
- [30] Cambridge SB, Geissler D, Keller S, Curten B. A caged doxycycline analogue for photoactivated gene expression. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 2229–2231.
- [31] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **1996**, *10*, 940–54.
- [32] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **2001**, *410*, 37–40.
- [33] Charier S, Meglio A, Alcor D, Cogne-Laage E, Allemand JF, Jullien L, Lemarchand A. Reactant concentrations from fluorescence correlation spectroscopy with tailored fluorescent probes. An example of local calibration-free pH measurement. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15491–505.
- [34] Chen CC, Heller J. Uptake of retinol and retinoic acid from serum retinol-binding protein by retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5216–5221.
- [35] Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM. An essential role for retinoid receptors RAR β and RXR γ in long-term potentiation and depression. *Neuron* **1998**, *21*, 1353–61.
- [36] Chow CW, Davis RJ. Proteins kinases : chromatin-associated enzymes? *Cell* **2006**, *127*, 887–890.
- [37] Chudakov DM, Verkhusha VV, Staroverov DB, Souslova EA, Lukyanov S, Lukyanov KA. R Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1435–9.
- [38] Cogan U, Kopelman M, Mokady S, Shinitzky MR. Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *65*, 71–78.
- [39] Corrie JE, Barth A, Munasinghe VR, Trentham DR, Hutter MC. Photolytic cleavage of 1-(2-nitrophenyl)ethyl ethers involves two parallel pathways and product release is rate-limited by decomposition of a common hemiacetal intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8546–54.
- [40] Cruz FG, Koh JT, Link KH. Light-Activated Gene Expression, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777–8778.
- [41] Curley K, Lawrence DS. Photoactivation of a Signal Transduction Pathway in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8573–8574.
- [42] Deitz WH, Cook TM, Goss WA. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. 3. Conditions required for lethality. *J. Bacteriol.* **1966**, *91*, 768–73.
- [43] De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2924–33.

- [44] Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **1990**, *248*, 73–6.
- [45] Denk W. Two-photon scanning photochemical microscopy : mapping ligand-gated ion channel distributions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6629–33.
- [46] *Development* **1996**, *123*.
- [47] Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **1992**, *356*, 215–221.
- [48] Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23695–23698.
- [49] Dooley K, Zon LI. Zebrafish : a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10*, 252–6.
- [50] Eggeling C, Brand L, Seidel CAM. Laser-induced fluorescence of coumarin derivatives in aqueous solution : photochemical aspects for single molecule detection. *Bioimaging* **1997**, *5*, 105–115.
- [51] Eichele G, Thaller C. Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retinoid in the chick limb bud. *J. Cell. Biol.* **1987**, *105*, 1917–1923.
- [52] Elson EL, Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **1974**, *13*, 1–27.
- [53] Fedoryak OD, Dore TM. Brominated hydroxyquinoline as a photolabile protecting group with sensitivity to multiphoton excitation. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–22.
- [54] Fedoryak OD, Sul JY, Haydon PG, Ellis-Davies GC. Synthesis of a caged glutamate for efficient one- and two-photon photorelease on living cells. *Chem. Commun. (Camb)* **2005**, *29*, 3664–6.
- [55] Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10887–90.
- [56] Felsenfeld AL, Walker C, Westerfield M, Kimmel C, Streisinger G. Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development* **1990**, *108*, 443–59.
- [57] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **1989**, *340*, 245–6.
- [58] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806–11.
- [59] Furuta T, Wang SS, Dantzker JL, Dore TM, Bybee WJ, Callaway EM, Denk W, Tsien RY. Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls : photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193–2000.

- [60] Gagey N, Neveu P, Jullien L. Reporting two-photon uncaging with the efficient 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging group. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2467–2469.
- [61] Gagey N, Neveu P, Benbrahim C, Goetz B, Aujard I, Baudin JB, Jullien L. Two-Photon Uncaging with Fluorescence Reporting : Evaluation of the ortho-Hydroxy Cinnamic Platform. submitted to *J. Am. Chem. Soc.*
- [62] Geissler D, Kresse W, Wiesner B, Bendig J, Kettenmann H, Hagen V. DMACM-caged adenosine nucleotides : ultrafast phototriggers for ATP, ADP, and AMP activated by long-wavelength irradiation. *Chembiochem* **2003**, *4*, 162–70.
- [63] Gellert M, Mizuuchi K, O’Dea MH, Nash HA. DNA gyrase : an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3872–6.
- [64] Ghosh K, Van Duyne GD. Cre–*loxP* biochemistry. *Methods* **2002**, *28*, 374–83.
- [65] Gianni M, Parrella E, Raska I Jr, Gaillard E, Nigro EA, Gaudon C, Garattini E, Rochette-Egly C. P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RAR α -mediated transcription. *EMBO J.* **2006**, *25*, 739–751.
- [66] Gilbert SF. *Developmental Biology* 7th edition **2003**. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- [67] Gilbert D, Funk K, Dekowski B, Lechler R, Keller S, Mohrlen F, Frings S, Hagen V. Caged capsaicins : New tools for the examination of TRPV1 channels in somatosensory neurons. *Chembiochem* **2007**, *8*, 89–97.
- [68] Gingrich JR, Roder J. Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu. Rev. Neurosci.* **1998**, *21*, 377–405.
- [69] Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamodar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrola S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley RL Jr, White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J, Rothberg JM. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **2003**, *302*, 1727–36.
- [70] Goard M, Aakalu G, Fedoryak OD, Quinonez C, St Julien J, Poteet SJ, Schuman EM, Dore TM. Light-mediated inhibition of protein synthesis. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 685–93.
- [71] Göppert-Mayer M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [72] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5547–51.
- [73] Grandel H, Lun K, Rauch GJ, Rhinn M, Piotrowski T, Houart C, Sordino P, Kuchler AM, Schulte-Merker S, Geisler R, Holder N, Wilson SW, Brand M. Retinoic acid signalling in

- the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* **2002**, *129*, 2851–65.
- [74] Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 717–24.
- [75] Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **1994**, *265*, 103–6.
- [76] Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15399–15402.
- [77] Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Lukyanov S, Lukyanov KA. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 461–5.
- [78] Habuchi S, Ando R, Dedecker P, Verheijen W, Mizuno H, Miyawaki A, Hofkens J. Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9511–6.
- [79] Halfon MS, Kose H, Chiba A, Keshishian H. Targeted gene expression without a tissue-specific promoter : creating mosaic embryos using laser-induced single-cell heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6255–60.
- [80] Hannon GJ. RNA interference. *Nature* **2002**, *418*, 244–51.
- [81] Harper MJ, Walpole AL. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature* **1966**, *212*, 87.
- [82] Hasted JB, Ritson DM, Collie CH. Dielectric Properties of Aqueous Ionic Solutions. Parts I and II. *J. Chem Phys.* **1948**, *16*, 1–21.
- [83] Hernandez RE, Putzke AP, Myers JP, Margaretha L, Moens CB. Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development* **2007**, *134*, 177–87.
- [84] Herr FM, Li E, Weinberg RB, Cook VR, Storch J. Differential mechanisms of retinoid transfer from cellular retinol binding proteins types I and II to phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9556–9563.
- [85] Hoess RH, Ziese M, Sternberg N. P1 site-specific recombination : nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3398–402.
- [86] Hoess RH, Abremski K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site *loxP*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1026–9.
- [87] Hoess R, Wierzbicki A, Abremski K. Isolation and characterization of intermediates in site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6840–4.
- [88] Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **1997**, *278*, 1073–7.

- [89] Horecker BL. The absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in the visible and near infra-red regions. *J. Biol. Chem.* **1943**, *148*, 173-183.
- [90] Huang CY, Ferrell JE Jr. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10078-83.
- [91] Huang M, Ye Y, Chen S, Chai J, Lu J, Zhao L, Gu L, Wang Z. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **1988**, *72*, 567-72.
- [92] Hunter T, Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **1992**, *70*, 375-87.
- [93] Hyatt GA, Schmitt EA, Marsh-Armstrong NR, Dowling JE. Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8293-8297.
- [94] Hyatt GA, Schmitt EA, Marsh-Armstrong N, McCaffery P, Drager UC, Dowling JE. Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* **1996**, *122*, 195-204.
- [95] Il'ichev YV, Wirz J. Rearrangements of 2-Nitrobenzyl Compounds. 1. Potential Energy Surface of 2-Nitrotoluene and Its Isomers Explored with ab Initio and Density Functional Theory Methods. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 7856-7870.
- [96] Il'ichev YV, Schwörer MA, Wirz J. Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds : methyl ethers and caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581-4595.
- [97] Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis : comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4324-7.
- [98] Jaenisch R. Transgenic animals. *Science* **1988**, *240*, 1468-74.
- [99] Jo D, Nashabi A, Doxsee C, Lin Q, Unutmaz D, Chen J, Ruley HE. Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 929-33.
- [100] Jordan VC. Tamoxifen : a most unlikely pioneering medicine. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 205-13.
- [101] Kantevari S, Hoang CJ, Ogradnik J, Egger M, Niggli E, Ellis-Davies GC. Synthesis and two-photon photolysis of 6-(ortho-nitroveratryl)-caged IP3 in living cells. *Chembiochem* **2006**, *7*, 174-80.
- [102] Kaplan JH, Forbush 3rd B, Hoffman JF. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue : utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929-1935.
- [103] Kaplan JH, Ellis-Davies GCR. Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6571-6575.

- [104] Kawakami Y, Raya A, Raya RM, Rodriguez-Esteban C, Belmonte JC. Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* **2005**, *435*, 165–71.
- [105] Kawasaki H, Eckner R, Yao TP, Taira K, Chiu R, Livingston DM, Yokoyama KK. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* **1998**, *393*, 284–9.
- [106] Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science* **2005**, *307*, 247–249.
- [107] Kessel M, Gruss P. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **1991**, *67*, 89–104.
- [108] Kholodenko BN, Kiyatkin A, Bruggeman FJ, Sontag E, Westerhoff HV, Hoek JB. Untangling the wires : a strategy to trace functional interactions in signaling and gene networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12841–6.
- [109] Kicheva A, Pantazis P, Bollenbach T, Kalaidzidis Y, Bittig T, Julicher F, Gonzalez-Gaitan M. Kinetics of morphogen gradient formation. *Science* **2007**, *315*, 521–5.
- [110] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253–310.
- [111] Kiskin NI, Ogden D. Two-photon excitation and photolysis by pulsed laser illumination modelled by spatially non-uniform reactions with simultaneous diffusion. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 571–587.
- [112] Kiskin N, Chillingworth R, McCray JA, Piston D, Ogden D. The efficiency of two-photon photolysis of a “caged” fluorophore, o-1-(2-nitrophenyl)ethylpyranine, in relation to photodamage of synaptic terminals. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 588–604.
- [113] Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmuller G. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 387–92.
- [114] Krens SF, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4984–90.
- [115] Krichevsky O, Bonnet G. Fluorescence correlation spectroscopy : the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.*, **2002**, *65*, 251–297.
- [116] Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* **1995**, *269*, 1427–9.
- [117] Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**, *89*, 6232–6.
- [118] Lander AD. Morpheus unbound : reimagining the morphogen gradient. *Cell* **2007**, *128*, 245–256.

- [119] Lane MA, Bailey SJ. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* **2005**, *75*, 275–93.
- [120] Langenau DM, Feng H, Berghmans S, Kanki JP, Kutok JL, Look AT. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 6068–73.
- [121] Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, Clark SW, Bruchez MP, Wise FW, Webb WW. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*. *Science* **2003**, *300*, 1434–6.
- [122] Lawrence DS. The preparation and *in vivo* applications of caged peptides and proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 570–5.
- [123] Lee TH, Gee KR, Ellinwood EH, Seidler FJ. Combining ‘caged-dopamine’ photolysis with fast-scan cyclic voltammetry to assess dopamine clearance and release autoinhibition *in vitro*. *J. Neurosci. Methods* **1996**, *67*, 221–31.
- [124] Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* **2006**, *313*, 1918–22.
- [125] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **1997**, *88*, 323–31.
- [126] Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **2004**, *303*, 540–3.
- [127] Liang SH, Hong D, Clarke MF. Cooperation of a single lysine mutation and a C-terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19817–21.
- [128] Lin W, Albanese C, Pestell RG, Lawrence DS. Spatially discrete, light-driven protein expression. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1347–53.
- [129] Link KH, Shi Y, Koh JT. Light activated recombination. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13088–13089.
- [130] Link KH, Cruz FG, Ye HF, O’reilly KE, Dowdell S, Koh JT. Photo-caged agonists of the nuclear receptors RAR γ and TR β provide unique time-dependent gene expression profiles for light-activated gene patterning. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5949–59.
- [131] Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. *Molecular Cell Biology* 5th edition **2004**. W.H. Freeman and Company, New York.
- [132] Losonczy A, Magee JC. Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* **2006**, *50*, 291–307.

- [133] Lu M, Fedoryak OD, Moister BR, Dore TM. Bhc-diol as a photolabile protecting group for aldehydes and ketones. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–22.
- [134] Lupo G, Harris WA, Lewis KE. Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 103–14.
- [135] MacDonald PN, Ong DE. Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, type II. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10550–10556.
- [136] Maden M. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc. Nutr. Soc.* **2000**, *59*, 65–73.
- [137] Maden, M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 843–53.
- [138] Magde D, Elson E, Webb WW. Thermodynamics fluctuations in a reacting system - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705–711.
- [139] Magde D, Elson E, Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* **1974**, *13*, 29–61.
- [140] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell* **1995**, *83*, 835–9.
- [141] Marcotte EM, Pellegrini M, Thompson MJ, Yeates TO, Eisenberg D. A combined algorithm for genome-wide prediction of protein function. *Nature* **1999**, *402*, 83–6.
- [142] Marsh-Armstrong N, McCaffery P, Gilbert W, Dowling JE, Drager UC. Retinoic acid is necessary for development of the ventral retina in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7286–90.
- [143] Marshall H, Morrison A, Studer M, Popperl H, Krumlauf R. Retinoids and Hox genes, *FASEB J.*, **1996**, *10*, 969–978.
- [144] Mastro AM, Babich MA, Taylor WD, Keith AD. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3414–8.
- [145] Matt N, Dupe V, Garnier JM, Dennefeld C, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* **2005**, *132*, 4789–800.
- [146] Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **2004**, *429*, 761–6.
- [147] McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **2002**, *108*, 465–74.
- [148] Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **2003**, *115*, 751–763.

- [149] Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6991–5.
- [150] Milburn T, Matsubara N, Billington AP, Udgaonkar JB, Walker JW, Carpenter BK, Webb WW, Marque J, Denk W, McCray JA, et al. Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand. *Biochemistry* **1989**, *28*, 49–55.
- [151] Mohanty-Hejmadi P, Dutta SK, Mahapatra P. Limbs generated at site of tail amputation in marbled balloon frog after vitamin A treatment. *Nature* **1992**, *355*, 352-3.
- [152] Momotake A, Lindegger N, Niggli E, Barsotti RJ, Ellis-Davies GCR. The nitrodibenzofuran chromophore : a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [153] Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM. Essential role for p38 α mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10454–10459.
- [154] Murayama E, Kissa K, Zapata A, Mordelet E, Briolat V, Lin HF, Handin RI, Herbomel P. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* **2006**, *25*, 963–75.
- [155] Muthyala RS, Sheng S, Carlson KE, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Bridged bicyclic cores containing a 1,1-diarylethylene motif are high-affinity subtype-selective ligands for the estrogen receptor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1589–602.
- [156] Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* **1996**, *10*, 993-1001.
- [157] Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 216–20.
- [158] Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **1976**, *260*, 799–802.
- [159] Newman JR, Ghaemmaghami S, Ihmels J, Breslow DK, Noble M, DeRisi JL, Weissman JS. Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* **2006**, *441*, 840–6.
- [160] No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3346–51.
- [161] Noack J, Hammer DX, Noojin GD, Rockwell BA, Vogel A. Influence of pulse duration on mechanical effects after laser-induced breakdown in water. *J. App. Phys.* **1998**, *83*, 7488–7495.
- [162] Noy N, Blaner WS. Interactions of retinol with binding proteins : studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein. *Biochemistry* **1991**, *30*, 6380–6386.

- [163] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway : activation and function. *Cell. Signal.* **2000**, *12*, 1–13.
- [164] Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6861–5.
- [165] Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* **2002**, *297*, 1873–7.
- [166] Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors : the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2005**, *6*, 542–54.
- [167] Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR, Love DR. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 879–883.
- [168] Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, Young RA. Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* **2006**, *313*, 533–6.
- [169] Porter NA, Bruhnke JD. Acyl thrombin photochemistry : kinetics for deacylation of enzyme cinnamate geometric isomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7616–7618.
- [170] Porter NA, Thuring JW, Li H. Selective Inhibition, Separation, and Purification of Serine Proteases : A Strategy Based on a Photoremovable Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7716–7717.
- [171] Pourquie O. The segmentation clock : converting embryonic time into spatial pattern. *Science* **2003**, *301*, 328–30.
- [172] Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-*trans* retinoic acid. *Nature* **1995**, *378*, 681–9.
- [173] Rochette-Egly C. Nuclear receptors : integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 355–66.
- [174] Rochette-Egly C. Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32565–8.
- [175] Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **2005**, *437*, 1173–8.
- [176] Sacchi CA. Laser-induced electric breakdown in water. *J. Opt. Soc. Am. B* **1991**, *8*, 337–345.
- [177] Schier AF, Talbot WS. Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39*, 561–613.

- [178] Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterior-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 213–225.
- [179] Salamoun J, Macka M, Nechvatal M, Matousek M, Knesel L. Identification of products formed during UV irradiation of tamoxifen and their use for fluorescence detection in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1990**, *514*, 179–87.
- [180] Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat. Cell. Biol.* **2007**, *9*, 324–30.
- [181] Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5166–70.
- [182] Shen LL, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid : the target of the drugs is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 307–11.
- [183] Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **1998**, *95*, 927–37.
- [184] Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G. Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 370–5.
- [185] Schönle A, Hell SW. Heating by absorption in the focus of an objective lens. *Opt. Lett.* **1998**, *23*, 325–327.
- [186] Schwörer M, Wirz J. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds in Solution. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, *84*, 1441–1457.
- [187] Shembekar VR, Chen Y, Carpenter BK, Hess GP. A protecting group for carboxylic acids that can be photolyzed by visible light. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7107–14.
- [188] Shembekar VR, Chen Y, Carpenter BK, Hess GP. Coumarin-Caged Glycine that Can Be Photolyzed within 3 μ s by Visible Light. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5479–84.
- [189] Shoham S, O'Connor DH, Sarkisov DV, Wang SS. Rapid neurotransmitter uncaging in spatially defined patterns. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 837–43.
- [190] Skwarczynski M, Noguchi M, Hirota S, Sohma Y, Kimura T, Hayashi Y, Kiso Y. Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4492–6.
- [191] Simone C, Forcales SV, Hill DA, Imbalzano AN, Latella L, Puri PL. p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 738–43.
- [192] Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E, Hewitson M, Holz C, Khan M, Lazik S, Martin C,

- Nitzsche B, Ruer M, Stamford J, Winzi M, Heinkel R, Roder M, Finell J, Hantsch H, Jones SJ, Jones M, Piano F, Gunsalus KC, Oegema K, Gonczy P, Coulson A, Hyman AA, Echeverri CJ. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2005**, *434*, 462–9.
- [193] Specht A, Thomann JS, Alarcon K, Wittayanan W, Ogden D, Furuta T, Kurakawa Y, Goeldner M. New photoremovable protecting groups for carboxylic acids with high photolytic efficiencies at near-UV irradiation. Application to the photocontrolled release of L-glutamate. *ChemBiochem* **2006**, *7*, 1690–5.
- [194] Strickland S, Mahdavi V. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **1978**, *5*, 393–403.
- [195] Suzuki AZ, Watanabe T, Kawamoto M, Nishiyama K, Yamashita H, Ishii M, Iwamura M, Furuta T. Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as phototriggers for alcohols and phenols. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867–70.
- [196] Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38 α in erythropoietin expression : a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* **2000**, *102*, 221–231.
- [197] Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS. I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* **2002**, *118*, 91–8.
- [198] Tirlapur UK, Konig K. Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* **2002**, *418*, 290–1.
- [199] Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1996**, *8*, 205–15.
- [200] Turner AD, Pizzo SV, Rozakis G, Porter NA. Photochemical activation of acylated α -thrombin. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1274–1275.
- [201] Turner AD, Pizzo SV, Rozakis G, Porter NA. Photoreactivation of irreversibly inhibited serine proteinases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 244–50.
- [202] Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **2000**, *403*, 623–7.
- [203] Veldhuyzen WF, Nguyen Q, McMaster G, Lawrence DS. A light-activated probe of intracellular protein kinase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13358–9.
- [204] Vermot J, Pourquie O. Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature* **2005**, *435*, 215–20.
- [205] Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *App. Phys. B* **2005**, *85*, 1015–1047.

- [206] Vogel A, Venugopalan V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 577–644.
- [207] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* **2000**, *408*, 307–10.
- [208] Vousden KH. p53 : Death Star. *Cell* **2000**, *103*, 691–694.
- [209] Vousden KH, Lu X. Live or let die : the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 594–604.
- [210] Wagner E, McCaffery P, Drager UC. Retinoic acid in the formation of the dorso-ventral retina and its central projections. *Dev. Biol.* **2000**, *222*, 460–470.
- [211] Walker JW, Reid GP, McCray JA, Trentham DR. Photolabile 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Phosphate Esters of Adenine Nucleotide Analogues. Synthesis and Mechanism of Photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7170–7177.
- [212] Wang W, Warren M, Bradley A. Induced mitotic recombination of *p53 in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4501–5.
- [213] Warga RM, Kimmel CB. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* **1990**, *108*, 569–80.
- [214] Wieboldt R, Ramesh D, Carpenter BK, Hess GP. Synthesis and photochemistry of photolabile derivatives of gamma-aminobutyric acid for chemical kinetic investigations of the γ -aminobutyric acid receptor in the millisecond time region. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1526–33.
- [215] Wieboldt R, Gee KR, Niu L, Ramesh D, Carpenter BK, Hess GP. Photolabile precursors of glutamate : synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8752–6.
- [216] Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones : structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *28*, 581–6.
- [217] Wood JS, Koszelak M, Liu J, Lawrence DS. A Caged Protein Kinase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7145–7146.
- [218] Xu C, Webb WW. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481–491.
- [219] Xu J, Li Q. Review of the *in vivo* functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 1681–92.
- [220] Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1999**, *9*, 140–7.
- [221] Yao F, Svensjo T, Winkler T, Lu M, Eriksson C, Eriksson E. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 1939–50.

- [222] Zhao Y, Zheng Q, Dakin K, Xu K, Martinez ML, Li WH. New caged coumarin fluorophores with extraordinary uncaging cross sections suitable for biological imaging applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–63.
- [223] Zhong W, Sternberg PW. Genome-wide prediction of *C. elegans* genetic interactions. *Science* **2006**, *311*, 1481-4.
- [224] Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7075–7080.
- [225] Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–77.
- [226] Zon LI, Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 35–44.
- [227] Zou K, Cheley S, Givens RS, Bayley H. Catalytic subunit of protein kinase A caged at the activating phosphothreonine. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8220–9.

Article

o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption : syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation.

Aujard I, Benbrahim C, Gouget M, Ruel O, Baudin JB, Neveu P, Jullien L.

Chem. Eur. J. **2006**, *12*, 6865–6879.

Contribution : conception des expériences de mesure de section efficace de décaage à deux photons, mesures et exploitation des résultats.

o-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation

Isabelle Aujard,^[a] Chouaha Benbrahim,^[a] Marine Gouget,^[a] Odile Ruel,^[a] Jean-Bernard Baudin,^[a] Pierre Neveu,^[a, b] and Ludovic Jullien*^[a]

Abstract: We evaluated the *o*-nitrobenzyl platform for designing photolabile protecting groups with red-shifted absorption that could be photolyzed upon one- and two-photon excitation. Several synthetic pathways to build different conjugated *o*-nitrobenzyl backbones, as well as to vary the benzylic position, are reported. Relative to the reference 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl group, several *o*-nitrobenzyl derivatives exhibit a large and red-shifted one-photon absorption within the near-UV range. Uncaging after one-photon excitation was studied by measuring UV-visible absorption and steady-state fluorescence emission on model caged ethers and esters. In the whole series investi-

gated, the caged substrates were released cleanly upon photolysis. Quantum yields of uncaging after one-photon absorption lie within the 0.1–1% range. We observed that these drop as the maximum wavelength absorption of the *o*-nitrobenzyl protecting group is increased. A new method based on fluorescence correlation spectroscopy (FCS) after two-photon excitation was used to measure the action uncaging cross section for two-photon

excitation. The series of *o*-nitrobenzyl caged fluorescent coumarins investigated exhibit values within the 0.1–0.01 Goeppert–Mayer (GM) range. Such results are in line with the low quantum yields of uncaging associated with cross-sections of 1–50 GM for two-photon absorption. Although the cross-sections for one- and two-photon absorption of *o*-nitrobenzyl photolabile protecting groups can be readily improved, we emphasize the difficulty in enlarging the corresponding action uncaging cross-sections in view of the observed trend of their quantum yield of uncaging.

Keywords: acidity • basicity • cage compounds • donor–acceptor systems • fluorescence correlation spectroscopy

Introduction

Photolabile protecting groups have numerous applications in chemistry.^[1–3] The removal of this category of protecting groups is “clean”: in contrast to most other protecting strategies, release of the protected (“caged”) substrate requires no added reagent, only light. This feature is particularly fa-

vorable if access to the reaction site is difficult, or if chemical reagents are of restricted use. This is, for instance, the case with living organisms. In such systems, addressing biological issues often requires delivery of biologically active species at a given time and to a given location. This may be achieved by manipulating microsyringes. A noninvasive alternative involves adding to the biological medium caged compounds that reveal their biological activity only upon illumination. A pulse of a focussed laser beam provides temporal and spatial control over the delivery of the biologically active substrates.^[4]

To be useful in biological experiments, a caging group must fulfil various requirements. Some of these deal with nonphotophysical aspects, such as access of the caged substrates to the biological targets, or the absence of any “dark” biological activity. Others depend directly on photo-physics and photochemistry: photolysis of the caging group must be nondetrimental to the biological system, and it must occur faster than the process under investigation. The large number of engineering constraints has led to the con-

[a] Dr. I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, Dr. O. Ruel, Dr. J.-B. Baudin, P. Neveu, Prof. Dr. L. Jullien
Département de Chimie (C.N.R.S. U.M.R. 8640)
École Normale Supérieure
24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05 (France)
Fax: (+33)144-323-325
E-mail: ludovic.jullien@ens.fr

[b] P. Neveu
Département de Physique (C.N.R.S. U.M.R. 8550)
École Normale Supérieure
24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05 (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemeurj.org/> or from the author.

tinuous introduction of new types of photolabile protecting groups.^[2,3,5–12]

Most caging groups absorb ultraviolet (UV) light. This is a major drawback if substrate release is induced by one-photon excitation. Indeed, the ubiquitous presence of UV light is damaging to cells as it is absorbed by intrinsic biological chromophores, especially DNA. A less-damaging release approach relies on two-photon infrared (IR) excitation. In addition to the better transparency of biological media to IR light, two-photon excitation confines substrate activation to the focal point of a laser beam, and the three-dimensional resolution achieved is higher than that with one-photon excitation. The efficiency of a protecting group that is photolabile upon two-photon excitation is evaluated by its action uncaging cross-section for two-photon excitation, $\delta_u\Phi_u^{(2)}$. This value is the product of the cross-section for two-photon absorption that leads to uncaging, δ_u , and the quantum yield of uncaging after two-photon excitation, $\Phi_u^{(2)}$. Although highly desirable for biological applications, improving the efficiency of a photolabile protecting group upon two-photon excitation remains difficult. Indeed, there

are no reliable rules for predicting the cross-section for two-photon absorption of a chromophore from its structure. In addition, it is difficult to predict the quantum yield of uncaging after two-photon excitation, even if the corresponding quantum yield of uncaging after one-photon excitation, $\Phi_u^{(1)}$, is known. Indeed, the mechanism leading to uncaging could depend on the excitation mode. According to biological applications, $\delta_u\Phi_u^{(2)}$ should exceed 0.1 Goeppert–Mayer (GM)^[7] or 10 GM,^[13] for which one GM unit is defined as $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1}$. The 1 GM range has already been obtained.^[7,8,14] In principle, 10–100 GM ranges in wavelength available from current-pulsed IR laser sources could be reached for reasonably “small” molecules by combining the largest ever observed values for the cross-section for two-photon absorption^[15,16] with the uncaging quantum yields.

Among the available photoremovable protecting groups, the 2-nitrobenzyl functionality has gained wide acceptance and most of the caged biologically active compounds that have been synthesized belong to this series.^[13,17–23] The mechanism leading to the photolytic release of the protected substrate has been extensively investigated both experimentally^[24–26] and theoretically.^[27] In contrast, 2-nitrobenzyl caged compounds have not attracted considerable attention regarding biological applications that rely specifically on two-photon excitation. In fact, the most widely used 2-nitrobenzyl protecting moieties require the blue edge of the wavelength range that is available with the laser sources commonly used for two-photon excitation. In addition, they exhibit rather small action uncaging cross-sections for two-photon absorption. For instance, $\delta_u\Phi_u^{(2)} \approx 0.01$ GM within the 700–750 nm range for the most popular 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl group.^[7,28]

The present paper examines the 2-nitrobenzyl platform to conceive photolabile protecting groups with improved performances relying on both one- and two-photon excitation. The syntheses of two series of 2-nitrobenzyl alcohols is described. In the first series, we modified the backbone conjugated to the nitro group, with the aim of enlarging the maximum wavelength of absorption as well as the corresponding molar absorption coefficient.^[29] We evaluated independently the significance of a benzylic substituent in the second series.^[5,10,30] We then synthesized two series of caged model compounds that result from the protection of a phenol or a carboxylic acid group, respectively, and report the linear absorption and emission properties of these synthesized species. The action uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation were measured. The latter were obtained by a new method based on fluorescence correlation spectroscopy (FCS) after two-photon excitation.

Design

Protecting groups: We designed two independent series of protecting groups based on the 2-nitrobenzyl platform. In principle, these were conceived to facilitate the design of improved protecting groups of second generation by combining the information collected from each series.

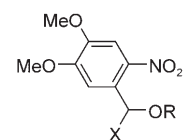
Abstract in French: *Cet article évalue le squelette o-nitrobenzyle pour définir des groupements protecteurs photolabiles possédant une absorption déplacée vers le rouge qui peuvent être photolysés après excitation à un ou à deux photons. Nous décrivons plusieurs voies d'accès pour synthétiser différents squelettes o-nitrobenzyle conjugués, ainsi que pour modifier la position benzylque. Vis-à-vis du groupement protecteur de référence 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle, plusieurs dérivés o-nitrobenzyle présentent une forte absorption déplacée vers le rouge se situant dans le proche UV. La photodéprotection après excitation à un photon a été étudiée par absorption UV-visible et par émission de fluorescence stationnaire sur des éthers et esters modèles cagés. L'intégralité des substrats cagés est efficacement déprotégée par photolyse. Les rendements quantiques de déprotection après excitation à un photon sont d'environ 0.1–1 %. Ils semblent diminuer lorsque la longueur d'onde d'absorption maximum du groupement protecteur o-nitrobenzyle augmente. Une nouvelle méthode reposant sur l'utilisation de la spectroscopie de corrélation de fluorescence après excitation biphotonique a été employée pour mesurer les sections efficaces de photodéprotection après excitation à deux photons. Celles de la série de coumarines fluorescentes cagées par nos groupements protecteurs o-nitrobenzylques se situent dans la gamme 0.1–0.01 GM. Ces résultats sont en accord avec les faibles valeurs des rendements quantiques de photodéprotection associées à des sections efficaces d'absorption biphotoniques d'environ 1–50 GM. Alors qu'il est aisé d'augmenter les sections efficaces d'absorption à un et deux photons dans cette série, cette étude démontre qu'il est difficile d'améliorer les sections efficaces de photodéprotection correspondantes du fait de l'évolution des rendements quantiques de déprotection mise en évidence dans cet article.*

In view of the wavelength range currently available with the common IR pulsed-laser sources, we were first concerned with red-shifting the UV absorption of the parent chromophore. Taking into account the presence of the electron-attracting nitro substituent on the aromatic ring, we grafted several conjugated electron-releasing moieties on the cycle.^[29] In addition, we introduced different conjugated paths between the donor and the acceptor groups. Beyond the anticipated red-shift, the corresponding donor–acceptor conjugated chromophores were expected to exhibit improved cross-sections for absorption at one- and two-photon.^[31,32] Scheme 1 displays the different backbones that were evaluated in the present study.

In parallel, we were also concerned with a possible drop in the quantum yield of uncaging that could be associated

dimethoxy-2-nitrobenzyl group. Scheme 2 shows the second series of molecules that were synthesized.

Caged model compounds: The design of the caged substrates was first governed by the nature of the groups to be protected. We chose to cage alcohol/phenols as well as carboxylic acids in view of the presence of both functions in many biologically active molecules. We additionally favored absorption



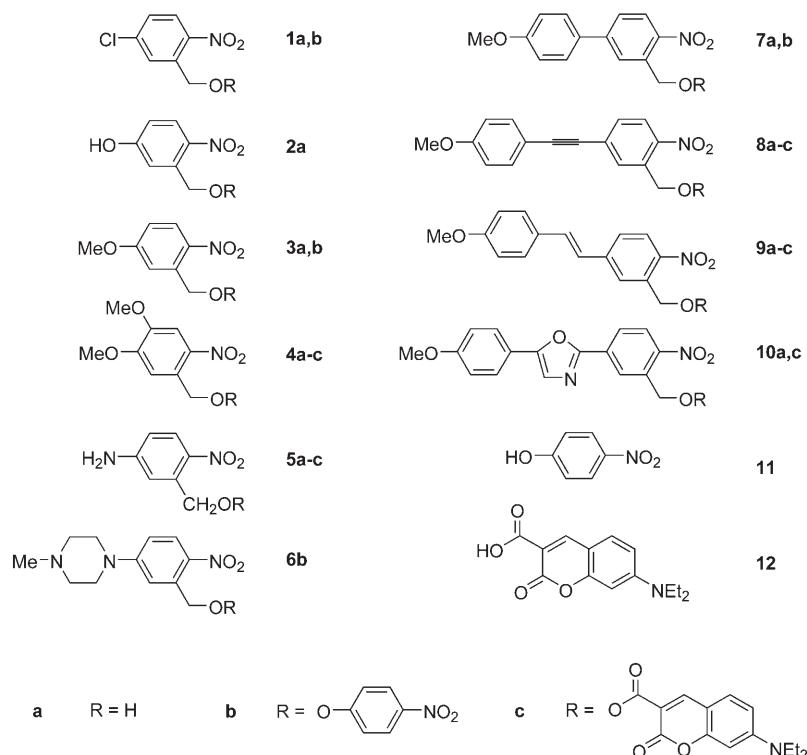
X=CF₃ **4Fa,c**

X=CCl₃ **4Cla,c**

X=CBr₃ **4Bra,c**

X=CN **4CNa,c**

Scheme 2. Generic structures of the second series of caging agents and caged model compounds.



Scheme 1. Generic structures of the first series of caging agents and caged model compounds.

with a red-shift of the absorption of the 2-nitrobenzyl protecting group. In fact, it was already known that the typical quantum yield of uncaging after one-photon absorption, $\Phi_u^{(1)}$, is reduced by more than one order of magnitude upon going from the 2-nitrobenzyl ($\Phi_u^{(1)} \approx 0.1$) to the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl group ($\Phi_u^{(1)} \approx 0.005$).^[7] Therefore, we also examined the effect of introducing a substituent at the benzylic position of the 2-nitrobenzyl protecting group. In fact, different reports suggested using this strategy to provide significant improvements over the parent compounds.^[5,10,30] In view of the nature of the substituents used in the latter studies, we chose to introduce electron-attracting substituents at the benzylic position of the popular 4,5-

and fluorescence emission of the caged substrates to access the action uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. This method requires consideration of the corresponding quantum yields of uncaging, as the photochemistry leading to substrate release may depend on the caged substrates (see below). At the same time, physicochemical experiments are facilitated, especially if two-photon excitation is used.

We first screened the series displayed in Scheme 1 by investigating the photolysis after one-photon absorption of caged derivatives of *p*-nitrophenol **11** (series **nb**). In its acidic state or as an alkyl ether, *p*-nitrophenol absorbs light of around 300 nm wavelength. In contrast, above its pK_a , *p*-nitrophenol exhibits a strong absorption that is red-shifted relative to the caged phenol ethers **nb**, as well as to

the subproducts that originate from the protecting group after photolysis. Thus, the action uncaging cross-section for one-photon excitation can be readily evaluated from the UV-visible absorption spectra.

We subsequently designed caged fluorescent compounds to measure the action uncaging cross-section for two-photon absorption for these protecting groups with sufficiently large molar-absorption coefficients above 350 nm. In fact, such donor–acceptor chromophores generally exhibit maxima of two-photon absorption, $\lambda_{\max}^{(2)}$, at wavelengths close to twice the corresponding maxima of one-photon absorption, $\lambda_{\max}^{(1)}$.^[31,32] In addition, the currently accessible excitation wavelength range for most femtosecond pulsed-laser sources

that are used for two-photon applications is 700–1000 nm. We chose to cage a fluorescent coumarin carboxylic acid **12** (series **nc**; Schemes 1 and 2). Its favorable photophysical features made it possible 1) to investigate its release by monitoring UV-visible absorption and fluorescence emission during the experiments relying on one-photon absorption; 2) to develop a new protocol for measuring the action uncaging cross-section for two-photon absorption that relies only on the observation and analysis of fluorescence emission from the focal point of the laser.

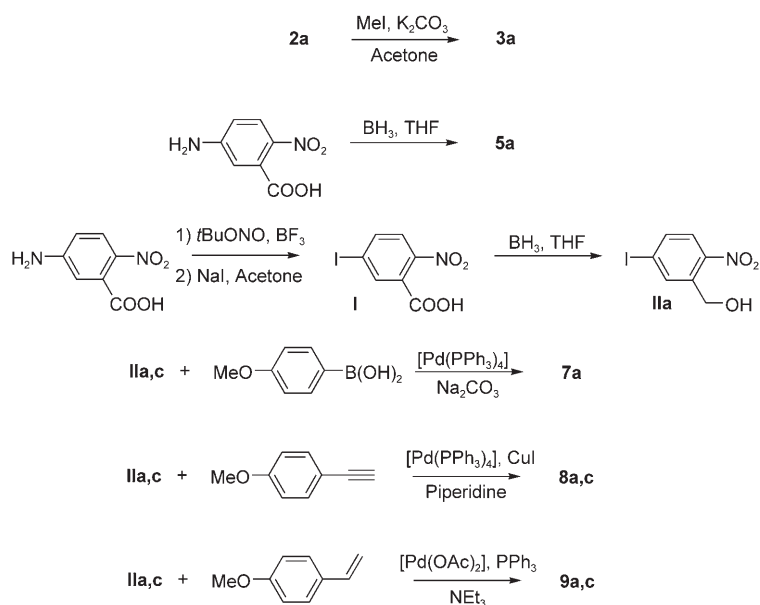
Syntheses

Photolabile protecting groups: 2-Nitrobenzyl alcohols were chosen as synthetic entries for the protecting groups based on the 2-nitrobenzyl platform (Scheme 3).

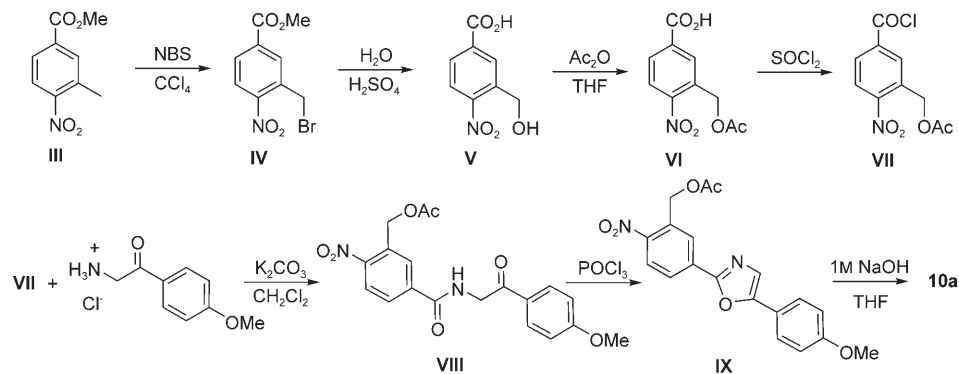
The 5-chloro-2-nitrobenzyl **1a**, 5-hydroxy-2-nitrobenzyl **2a**, and 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl **4a** alcohols were commercially available. 5-Methoxy-2-nitrobenzyl alcohol **3a** was obtained by alkylation of the phenol **2a** with methyl iodide in the presence of dry potassium carbonate in acetone in 50% yield. The reduction of the commercially available 5-amino-2-nitrobenzoic acid with borane in THF gave 5-amino-2-nitrobenzyl alcohol **5a** in 83% yield.^[33] The 2-nitrobenzyl alcohols **7a**, **8a**, and **9a** were obtained from reaction of appropriate synthons with the 5-iodo-2-nitrobenzoic acid with borane in THF gave 5-amino-2-nitrobenzyl alcohol **5a** in 83% yield.^[33] The 2-nitrobenzyl alcohols **7a**, **8a**, and **9a** were obtained from reaction of appropriate synthons with the 5-iodo-2-nitrobenzoic acid by 1) diazotation with *tert*-butyl nitrite followed by nucleophilic substitution with iodide to provide 5-iodo-2-nitrobenzoic acid **I** (yield: 65%);^[34] 2) reduction by borane in THF (yield: 90%).^[33] Compounds **7a**, **8a**, and **9a** were synthesized by coupling **IIa** with 4-methoxyphenylboronic acid, 4-ethynylanisole, and 4-methoxystyrene, respectively, in the presence of a palladium catalyst to give yields of 78, 89, and 34%, respectively.

The synthesis of {5-[5-(4-methoxyphenyl)oxazol-2-yl]-2-nitrophenyl}methanol (**10a**) relied on the condensation between 4-methoxy-2'-aminoacetophenone and acetic acid 5-

chlorocarbonyl-2-nitrobenzyl ester **VII** (Scheme 4). The latter was obtained in five steps from 3-methyl-4-nitrobenzoic acid: 1) esterification with methanol gave 3-methyl-4-nitrobenzoic acid methyl ester **III** (yield: 79%);^[35] 2) the ester **III** was brominated by *N*-bromosuccinimide (NBS) to afford 3-bromomethyl-4-nitrobenzoic acid methyl ester **IV** (yield: 12%);^[35] 3) **IV** was subsequently hydrolyzed to provide 3-hydroxymethyl-4-nitrobenzoic acid **V** (yield: 84%); 4) the benzylic alcohol **V** was esterified by acetic anhydride in THF to give the corresponding acetate, 3-acetoxymethyl-4-nitrobenzoic acid **VI** (yield: 92%); 5) **VI** was eventually treated by thionyl chloride to yield **VII** in quantitative yield. Acetic acid 5-[2-(4-methoxyphenyl)-2-oxo-ethyl carbamoyl]-2-nitrophenyl ester **VIII** was prepared from **VII** and 4-methoxy-2'-aminoacetophenone in 71% yield. Then **VIII** was dehydrated in phosphoryl chloride to give acetic acid 5-[5-(4-methoxyphenyl)-2-oxazol-2-yl]-2-nitrobenzyl ester **IX** (yield: 36%) that was eventually hydrolyzed to provide **10a** in 13% yield.

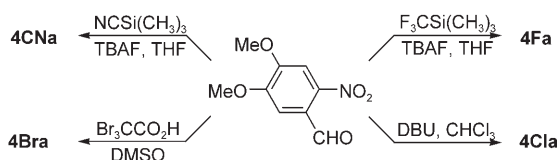


Scheme 3. Syntheses of the caging agents of the first series.



Scheme 4. Synthesis of **10a**.

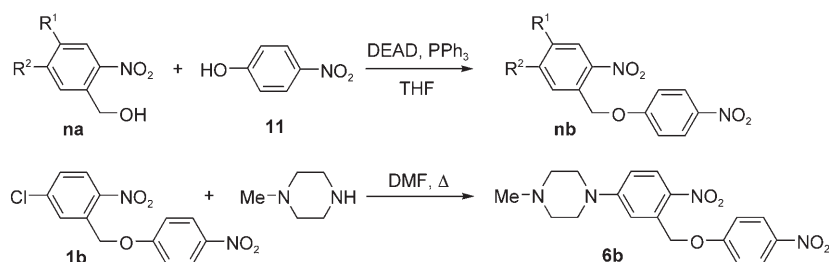
The syntheses of the 2-nitrobenzyl alcohols substituted in the benzylic position: **4Fa**, **4Cla**, **4Bra**, and **4CNa**, proceeded via the same 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde intermediate (Scheme 5). 2,2,2-Trifluoro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4Fa** and hydroxy(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)acetonitrile **4CNa** were prepared by reaction of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde with (trifluoromethyl) trimethylsilane^[36] and trimethylsilane cyanide, respectively, in THF in 80 and 90% yield. Condensation of chloroform on 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde in the presence of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) gave 2,2,2-trichloro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4Cla** in 98% yield.^[37] Eventually, 2,2,2-tribromo-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4Bra** resulted from the decarboxylative condensation of tribromoacetic acid on 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde, in 88% yield.^[38]



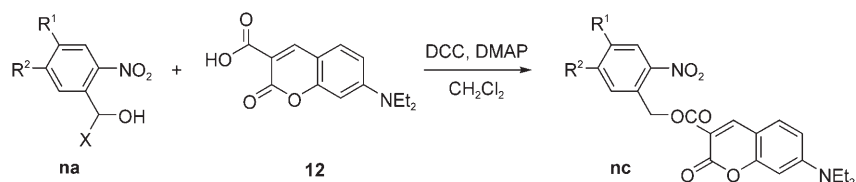
Scheme 5. Syntheses of the caging agents of the second series. TBAF = tetrabutylammonium fluoride, DMSO = dimethyl sulfoxide.

Caged model compounds: With the exception of **6b**, the 2-nitrobenzyl ethers of *p*-nitrophenol, **nb**, were obtained from the Mitsunobu reaction^[39,40] between *p*-nitrophenol **11** and the corresponding 2-nitrobenzyl alcohols, **na**, in moderate to good yields (Scheme 6). In contrast, 1-(4-nitrophenoxymethyl)-5-(*N*-methylpiperazine)-2-nitrobenzene **6b** was prepared directly from the nucleophilic substitution of 1-methylpiperazine on 1-(4-nitrophenoxymethyl)-5-chloro-2-nitrobenzene **1b** (78% yield).^[29]

The 2-nitrobenzyl esters of the coumarine **12**^[41] were obtained by condensation between **12** and the corresponding 2-nitrobenzyl alcohols **na** (**n** = **II**, **4**, **4F**, **4Cl**, **4Br**, **4CN**, **5**, **10**) in the presence of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Scheme 7).



Scheme 6. Syntheses of the caged derivatives of the model phenol **11**. DEAD = diethyl azodicarboxylate.



Scheme 7. Syntheses of the caged derivatives of the model carboxylic acid **12**. DMAP = 4-dimethylaminopyridine.

Results

Linear absorption and emission properties

One-photon absorption: Here, we focus on the absorption properties of the 2-nitrobenzyl alcohols **na**. In fact, many substrates of biological interest do not absorb light of wavelengths within the range of absorption of the present 2-nitrobenzyl protecting groups.

The series of 2-nitrobenzyl alcohols **na** displayed in Scheme 1 exhibits one-photon absorptions within the UV range (Figure 1 and Table 1). The longest maximum wavelengths of absorption were observed for **9a** and **10a** ($\lambda_{\text{max}}^{(1)} \approx 370$ nm). In fact, the absorption band of both compounds extends up to 450 nm, as shown in Figure 1. Their molar absorption coefficients at the wavelength of maximum absorption are significantly larger than that of the reference derivative **4a**: $\epsilon(\lambda_{\text{max}}^{(2)}) \approx 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ versus $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In addition, it remains larger than $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 400 nm (Table 1). The maximum wavelength of absorption, as well as the molar absorption coefficient, of the 5-amino-2-nitrobenzyl alcohol **5a** are also noticeably larger than those of **4a**. As shown in Figure 1 and in Table 1, the triple-bond-containing alcohol **8a** absorbs within the same range of wavelengths as **4a**, albeit more intensively. As anticipated from the lower donating power of the donor conjugated to the nitro group, the other alcohols essentially absorb light at significantly shorter wavelengths than **4a**.

Except for some possible hypochromic or hyperchromic effects, the absorption spectra of the caged compounds compare satisfactorily with the sum of the respective absorption spectra of the *o*-nitrobenzyl moiety **na** and of the caged substrate. The absorption properties of these caged substrates can be compared to those of **3a** (**nb** series), or to the acidic state of **12** (**nc** series). In particular, we did not observe any alteration of band shape that could evidence a regime of strong coupling between the two chromophores that are present in both **nb** and **nc** series.^[42] Chromophore coupling was already invoked to account for a rather singular uncaging behavior in a 2-nitrobenzyl ester of a coumarine.^[43]

Steady-state fluorescence emission: The fluorescence emission

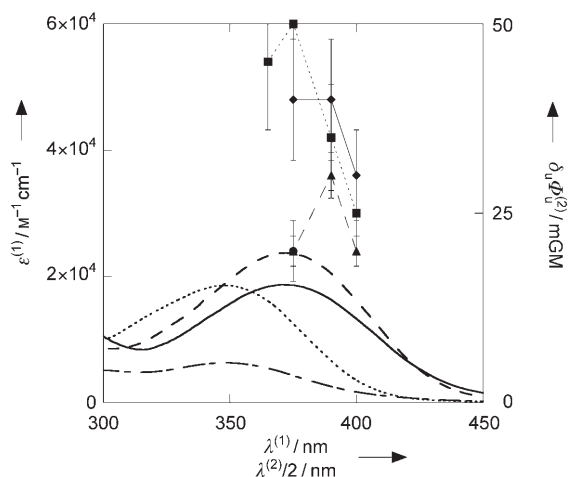


Figure 1. Photophysical properties of **4** (--- and ●), **8** (..... and ■), **9** (--- and ▲), and **10** (— and ◆) at 293 K. Single-photon absorption (**na** series; molar absorption coefficient ϵ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; lines) and action uncaging cross-section for two-photon excitation (**nc** series; $\delta_u\Phi_u^{(2)}$ in mMGM; symbols). Solvent: acetonitrile (one-photon excitation) and acetonitrile/Tris pH 9 buffer (20 mM) 1:1 (v/v) (two-photon excitation).

Table 1. Absorption and emission properties of the caging agents **na** and of the caged model compounds **nb** and **nc**. Maxima of single-photon absorption $\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ and of steady-state fluorescence emission after one-photon excitation $\lambda_{\text{em}}^{(1)}$, molar absorption coefficients for single-photon absorption at $\lambda^{(1)}$, $\epsilon(\lambda^{(1)})$ ($\pm 5\%$), quantum yields of fluorescence after one-photon excitation $\Phi_F^{(1)}$ ($\pm 10\%$). Solvent: acetonitrile for measurements for **na**; acetonitrile/Tris pH 9 buffer (20 mM) 1:1 (v/v) in all other cases.

n	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ (na) [nm]	$\epsilon(\lambda_{\text{max}}^{(1)})$, $\epsilon(350)$, $\epsilon(400)$ (na) [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ [$\epsilon(\lambda_{\text{max}}^{(1)})$](nb) [nm] [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ [$\epsilon(\lambda_{\text{max}}^{(1)})$](nc) [nm] [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	$\lambda_{\text{em}}^{(1)}$ [$\Phi_F^{(1)}$](nc) [nm] [%]
1	272	6, 0.4, 0.03	300 [14]	—	—
2	310	9, 3, 2	—	—	—
3	310	8, 2, 0.07	309 [21.9]	—	—
4	348	6, 6, 2	311 [17.9]	421 [18]	472 [0.4]
4F	342	5, 5, 1	—	433 [28]	473 [0.1]
4Cl	345	6, 6, 1	—	433 [29]	473 [0.1]
4Br	343	6, 6, 1	—	433 [27]	473 [0.2]
4CN	346	5, 5, 1	—	434 [20]	475 [0.2]
5	367	16, 14, 6	374 [14.5]	426 [23]	472 [0.4]
6	—	—	394 [16.3]	—	—
7	336	14, 12, 1	317 [29.0]	—	—
8	348	19, 19, 4	320 [19.2]	427 [49]	472 [0.2]
9	370	24, 20, 16	375 [23.4]	424 [47]	469 [0.05]
10	371	19, 16, 13	—	425 [46]	467 [0.02]
11	—	—	403 [16] ^[a]	—	—
12	—	—	—	405 [27] ^[a,b]	463 [8.5] ^[a,b]

[a] Values obtained in acetonitrile/Tris pH 9 buffer (20 mM) 1:1 (v/v) for **11** and **12**. [b] In acetonitrile/Tris pH 2 buffer (20 mM) 1:1 (v/v) in which the acidic state is present, we observed $\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ [$\epsilon(\lambda_{\text{max}}^{(1)})$] = 422 [35] and $\lambda_{\text{em}}^{(1)}$ [$\Phi_F^{(1)}$] = 474 [2].

of caged compounds may be significant for diverse applications. For instance, in biology, it may be essential to avoid any interference between the fluorescence emission from the starting caged molecule and that from the released substrate (tracer applications) or from any species produced after substrate release (detection of a biological response to a stimulus).

As shown in Table 1, the fluorescence emission of the 2-nitrobenzyl esters **nc** occurs at wavelengths similar to those for the case of the acidic state of **12**, which is a good photo-

physical model for esters of **12**. In contrast, the quantum yields of fluorescence emission from the **nc** caged coumarins are about one order of magnitude lower than the quantum yield of fluorescence of the acidic form of **12**. This observation probably reflects the quenching of the coumarin emission by the nitro group.^[43] Beyond its relevance to the applications mentioned above, this latter feature is favorable in the application of the method of measurement of the action uncaging cross-section for two-photon excitation that we introduce below.

Irradiation experiments with one-photon excitation: The model that was used to analyze the kinetics of uncaging of the **nb** and **nc** caged derivatives is detailed in the Experimental Section. In principle, the analysis is much simplified if excitation is performed at an isosbestic point in the absorption spectrum during the photoconversion of a caged compound into the released substrate. Nevertheless, the excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}^{(1)}$ plays no significant role as long as the total absorbance at the corresponding wavelength remains significantly lower than a value of one.^[44] We paid attention to fulfil the preceding condition for the present experiments.

All irradiations with one-photon excitation that are reported were performed at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)} = 325$ nm in acetonitrile/20 mM Tris pH 9 buffer 1:1 (v/v).

Figures 2a and 3a display typical evolutions of the absorbance of solutions of **8b** and **8c**, respectively, as a function of time upon illumination at 325 nm. In Figure 2a, one observes the continuous drop in the absorption of **8b** and an increase in absorbance within the 400 nm range that is in line with the absorption properties of the released 4-nitrophenate anion originating from **11** (see Table 1). In Figure 3a, the absorbance of **8c** decreases as a function of time and the absorbance that progressively increases at around 400 nm is in

agreement with the formation of the released basic state of the coumarin **12**. In the case of **8c**, it is also possible to follow the evolution of the system by monitoring fluorescence emission. Irradiation is associated here with an increase and a blue-shift of fluorescence emission, both of which are expected upon releasing the basic state of the coumarin **12**.

As shown in Figure 2b, the temporal evolutions of the absorbances within the respective wavelength ranges of absorption for **8b** and for the 4-nitrophenate anion were fitted

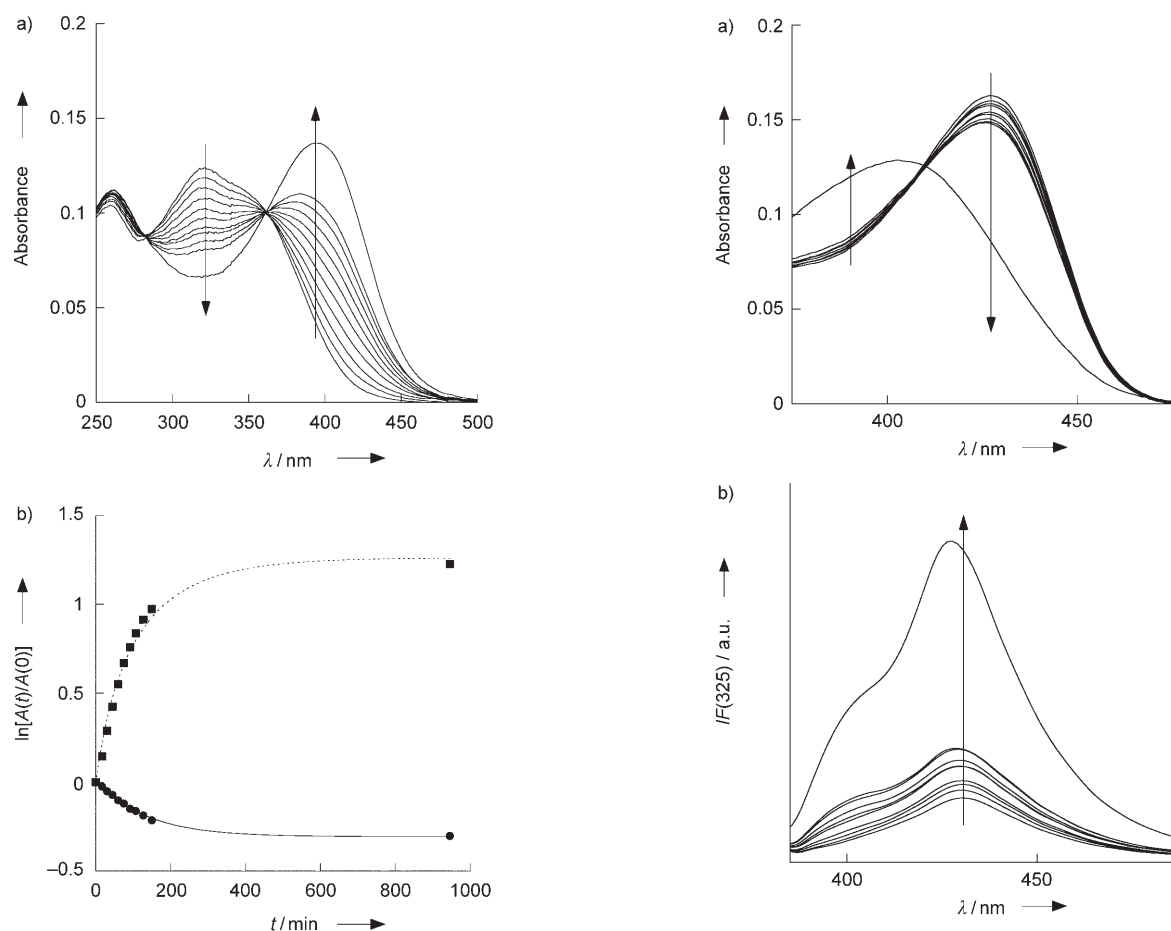


Figure 2. One-photon irradiation ($\lambda_{\text{exc}}^{(1)}=325$ nm) of a $4.9 \mu\text{M}$ solution of **8b** in acetonitrile/20 mM Tris pH 9 buffer 1:1 (v/v) at 293 K. a) Evolution of the UV-visible absorption spectra of the solution as a function of time ($t(\text{min})=0, 17, 30, 45, 60, 75, 92, 107, 127, 150, 946$); b) logarithmic plot of the total absorbance at 348 nm (\bullet , —) and at 395 nm (\blacksquare ,), as a function of time. Symbols: experimental points; lines: fits according to Equation (8), to give $k=7.9 \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (348 nm) and $k=6.2 \pm 0.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (395 nm).

satisfactorily with Equation (8) derived from the kinetic model (see Experimental Section). We calculated the following respective rate constants for photolysis: $7.9 \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (analysis at 348 nm) and $6.2 \pm 0.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (analysis at 395 nm). These values were in reasonable agreement and the average was accordingly used for further treatments. Similar behaviors were observed for the whole series of irradiation experiments performed on the **nb** caged ethers. Table 2 summarizes the values of the action uncaging cross-section for one-photon excitation at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)}=325$ nm in the **nb** series, $\epsilon_u(325)\Phi_u^{(1)}(\text{nb})$. Photolysis rates that were too low rendered it impossible to measure reliably the corresponding action uncaging cross-section for one-photon excitation for the amino caged ethers **5b** and **6b**, as well as for the double-bond-containing derivative **9b**.

As illustrated in Figure 3c, the evolution of the absorbance and the fluorescence emission as a function of time were also accounted for satisfactorily by Equations (8,9) in

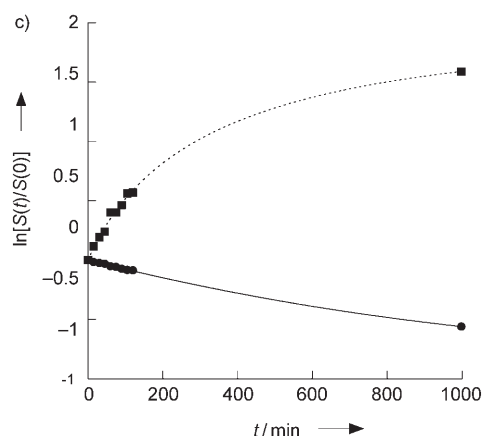


Figure 3. One-photon irradiation ($\lambda_{\text{exc}}^{(1)}=325$ nm) of a $3.3 \mu\text{M}$ solution of **8c** in acetonitrile/20 mM Tris pH 9 buffer 1:1 (v/v) at 293 K. a) Evolution of the UV-visible absorption spectra of the solution as a function of time ($t(\text{min})=0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 998$); b) evolution of the fluorescence emission spectra of the solution as a function of time ($t(\text{min})=0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 998$) ($\lambda_{\text{exc}}^{(1)}=325$ nm); c) logarithmic plot of the total absorbance at 425 nm (\bullet , —) and of the fluorescence emission at 460 nm (\blacksquare ,), as a function of time. Symbols: experimental points; lines: fits according to Equations (8,9) to give $k=1.4 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ from both fits.

the series of caged coumarin **nc**. The rate constants that were obtained from the analysis of the absorbance and of the fluorescence emission were in good agreement. For in-

Table 2. Action uncaging cross-section for one-photon excitation at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)} = 325 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{u}}(325)\Phi_{\text{u}}^{(1)} (\pm 5\%)$, and estimate of the quantum yields of uncaging after one-photon excitation $\Phi_{\text{u}}^{(1)} (\pm 10\%)$ for the caged model compounds **nb** and **nc**; estimate of the action uncaging cross-section for one-photon excitation of the present *o*-nitrobenzyl protecting groups at $\lambda^{(1)}$, $\epsilon_{\text{u}}(\lambda^{(1)})\Phi_{\text{u}}^{(1)}$; action uncaging cross-section for two-photon excitation at $\lambda_{\text{exc}}^{(2)} = 750 \text{ nm}$, $\delta_{\text{u}}(750)\Phi_{\text{u}}^{(2)} (\pm 20\%)$ ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} (\text{photon})^{-1}$), for the caged model compounds **nc**; relative brightness of **ncA**⁻ with respect to **nc** after two-photon excitation at the two-photon excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}^{(2)} = 750 \text{ nm}$, $\alpha(750) = \delta(750, \text{ncA}^-) / \delta(750, \text{nc})\Phi_{\text{F}}^{(2)}(\text{ncA}^-) / \delta(750, \text{nc})\Phi_{\text{F}}^{(2)}(\text{nc}) (\pm 20\%)$. Solvent: acetonitrile/Tris pH 9 buffer (20 mM) 1:1 (v/v). See text and Experimental Section for details.

n	$\epsilon_{\text{u}}(325)\Phi_{\text{u}}^{(1)}(\text{nb})$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\epsilon_{\text{u}}(325)\Phi_{\text{u}}^{(1)}(\text{nc})$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\Phi_{\text{u}}^{(1)}(\text{nb})^{[a]}$ [%]	$\Phi_{\text{u}}^{(1)}(\text{nc})^{[a]}$ [%]	$\epsilon_{\text{u}}(350)\Phi_{\text{u}}^{(1)}$, $\epsilon_{\text{u}}(400)\Phi_{\text{u}}^{(1)[b]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\delta_{\text{u}}(750)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\text{nc})$ [mGM]	$\alpha(750)$
1	76	–	10	–	40, 3	–	–
3	46	–	0.7	–	14, 0.5	–	–
4	39	14	0.8	0.6	48, 16	20	150
4F	–	12	–	0.4	–	15	1000
4Cl	–	29	–	1.1	–	20	800
4Br	–	42	–	1.3	–	65	– ^[c]
4CN	–	7	–	0.3	–	20	–
5	– ^[d]	– ^[d]	–	– ^[d]	–	35	450
6	– ^[d]	–	–	–	–	–	–
7	70	–	0.5	–	65, 4	–	–
8	76	16	0.5	0.1	59, 12	50 ^[e]	1200
9	– ^[d]	11	–	0.1	–	20 ^[f]	800
10	–	10	–	0.1	–	40 ^[g]	2500

[a] $\Phi_{\text{u}}^{(1)} = \frac{\epsilon_{\text{u}}(325)\Phi_{\text{u}}^{(1)}}{\epsilon(325)\text{[na]}}$, see text. [b] $\epsilon_{\text{u}} = \epsilon(\text{na})$ and $\Phi_{\text{u}}^{(1)} = \Phi_{\text{u}}^{(1)}(\text{nb})$. [c] The precision of α is too low to be reliable for the caged compounds with the largest $\delta_{\text{u}}(750)\Phi_{\text{u}}^{(2)}$ values. [d] Under our experimental conditions, uncaging was too slow to derive reliable values. [e] $\delta_{\text{u}}(730)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{8c}) = 45 \text{ mGM}$; $\delta_{\text{u}}(780)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{8c}) = 35 \text{ mGM}$; $\delta_{\text{u}}(800)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{8c}) = 25 \text{ mGM}$. [f] $\delta_{\text{u}}(780)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{9c}) = 30 \text{ mGM}$; $\delta_{\text{u}}(800)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{9c}) = 20 \text{ mGM}$. [g] $\delta_{\text{u}}(780)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{10c}) = 40 \text{ mGM}$; $\delta_{\text{u}}(800)\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\mathbf{10c}) = 30 \text{ mGM}$.

stance, we calculated the same value for the rate constant for uncaging after one-photon excitation: $1.4 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ from both analyses in the case of **8c**. Table 2 displays the values of the action uncaging cross-section for one-photon excitation at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)} = 325 \text{ nm}$ in the **nc** series, $\epsilon_{\text{u}}(325)\Phi_{\text{u}}^{(1)}(\text{nc})$. The larger variation in the signal in the irradiation experiments made analysis possible during even the slowest evolutions.

Irradiation experiments with two-photon excitation: Two approaches have been used already to determine the action uncaging cross-section for two-photon absorption, $\delta_{\text{u}}\Phi_{\text{u}}^{(2)}$. In the most general approach,^[7,8,43] the caged compound at a typical concentration of $100 \mu\text{M}$ is submitted continuously to the rather large power input (300–600 mW) of the focussed beam of a Ti:sapphire laser. Microliter aliquots from the irradiated solution are analyzed by HPLC as a function of time. The action uncaging cross-section for two-photon excitation of the caging group is eventually calculated from analysis of the release kinetics of the caged substrate after calibration of the laser pulse parameters by recording the fluorescence emission from a standard. The other approach is restricted to caged fluorescent compounds or to caged species that can be detected by using a fluorescent indicator.^[13,28] The measurements are typically performed at millimolar concentrations in caged compounds at an input laser power less than 100 mW. The latter approach relies on the analysis of the kinetic evolution, as well as of the steady-state value of the fluorescence intensity that arises from the focal volume illuminated by the beam. The action uncaging

cross-section for two-photon excitation of the caging group is derived from the dependence of the photolysis rate constant on the average laser power after calibration of the excitation volume with a fluorescence standard.

Here, we developed a new protocol to measure the action uncaging cross-section for two-photon excitation of fluorescent caged compounds. In principle, this is related to the second approach described above, however, here, fluorescence analysis is based on FCS after two-photon excitation.^[45–54] We observed and analyzed the large fluctuations in the fluorescence emission from the illuminated volume at the focus of a Ti:sapphire laser beam upon irradiation of a micromolar or submicromolar solution of a caged fluorescent compound. We computed the autocorrelation

function of fluorescence emission defined in Equation (1):

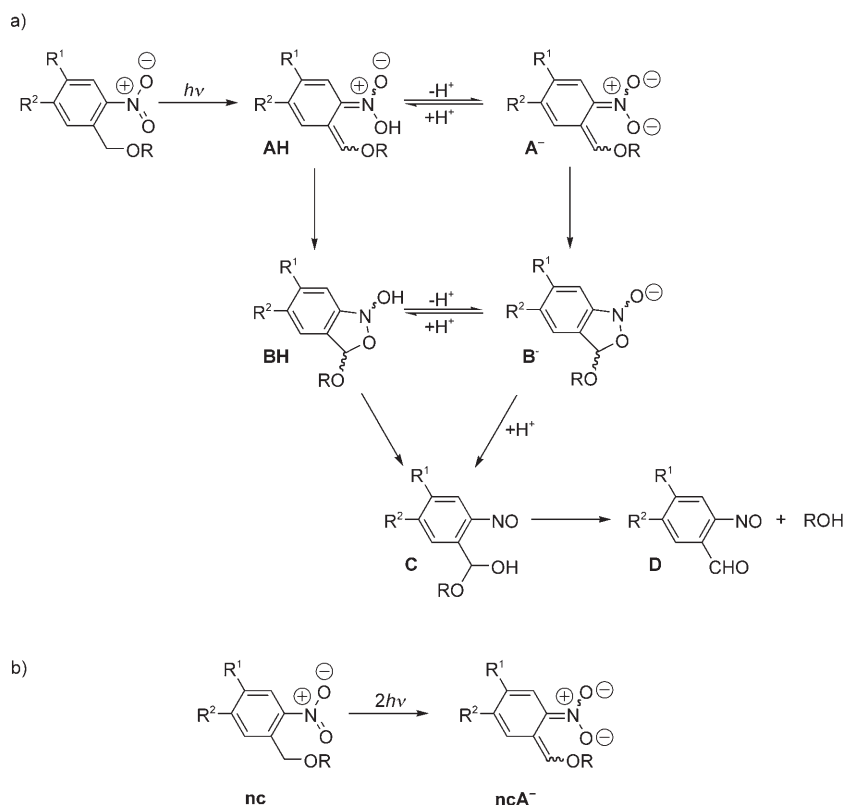
$$G\tau = \frac{\langle \delta n(\vec{r}, 0) \delta n(\vec{r}, \tau) \rangle}{n(\vec{r}) n(\vec{r})} \quad (1)$$

This gives the time-average of the products of the fluctuations of the number of photons $n(\vec{r}, t)$ collected from the illuminated volume, normalized by the product of the average number. In principle, $G(\tau)$ contains the desired kinetic information leading to $\delta_{\text{u}}\Phi_{\text{u}}^{(2)}$. In practice, $G(\tau)$ analysis is generally rather demanding in a reactive system that contains more than three reactants.^[45–47,55,56] In the present system, the FCS analysis is facilitated by 1) the limited kinetic window that is accessible by FCS after two-photon excitation and by 2) the knowledge of the mechanism/typical rate constants that are involved in releasing 2-nitrobenzyl caged compounds.

Both the temporal resolution of the autocorrelator and the characteristic diffusion time τ_{D} for a freely-moving fluorescent molecule to cross the focussed beam cause the kinetic window that can be accessed by FCS to be fixed.^[56] In the case of two-photon excitation of “small” molecules, such as the present caged compounds, kinetic information can be calculated typically within the 1–50 μs range. Thus, for the present purpose, one is interested in all events taking place within 50 μs after the primary photoreaction of the caged compounds.

The mechanism of uncaging of *ortho*-nitrobenzyl ethers that emerged from extensive studies is displayed in

Scheme 8a.^[24,25] For FCS analysis, the most significant information is that: 1) the primary photoreaction of 2-nitrobenzyl compounds provides aci-nitro tautomers **AH** within 5 ps; 2) **AH** ionization giving the basic state **A⁻** occurs above $pK_a(\text{AH}/\text{A}^-) \approx 4$ at a rate faster than $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$; ^[25] 3) the formation of the acetal intermediate state **{BH, B⁻}** should not occur at a rate much faster than $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ at the pH of 9 that was used throughout the present experiments.^[25]



Scheme 8. a) Mechanism of uncaging of *ortho*-nitrobenzyl ethers, adapted from reference [25]; b) reduced mechanism that was used in this study to analyze the FCS data.

On the relevant timescale of analysis of the experimental autocorrelation function $G(\tau)$, the full mechanism displayed in Scheme 8a can be reduced consequently to the mechanism displayed in Scheme 8b: the caged species **nc** provides in a single step the basic state of the corresponding intermediate aci-nitro tautomers **ncA⁻**. In addition, one anticipates that conversion of the excited molecules of caged compound leading to photolysis is complete within 1 μs . In principle, the present illuminated reactive system should behave as a nonreactive mixture of two fluorescent species, **nc** and **ncA⁻**, upon observation by FCS after two-photon excitation. Under such conditions, $\delta_u \Phi_u^{(2)}$ can be calculated, as explained in the Experimental Section, from the dependence on the laser power input of the **ncA⁻/nc** proportions in the illuminated volume.

Figure 4a displays typical experimental FCS autocorrelation functions $G(\tau)$ that were recorded on a 1 μM **10c** solu-

tion in $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM Tris pH } 9$ buffer 1:1 (v/v) that was submitted to increasing input-laser powers. Throughout this study, we always obtained satisfactory fits of the experimental points by using Equation (14) that is associated with a nonreactive mixture of two fluorescent species. As anticipated from the similar sizes of the caged derivatives and the released substrates, the calculated diffusion times τ_D were essentially independent of laser powers below 15 mW at the sample level. In addition, they were in line with expectations. For instance, we calculated $\tau_D = 27 \pm 5 \mu\text{s}$ for **10c**. In fact, we obtained typically $\tau_D = 25 \mu\text{s}$ in a similar solvent for a closely related molecule.^[56]

Information regarding the composition of the **ncA⁻/nc** mixture that leads to $\delta_u \Phi_u^{(2)}$ is contained in the $G(0)$ value in the FCS autocorrelation curve. A typical example of dependence of $G(0)$ on the laser power at the sample is shown in Scheme 8b. The experimental points can be fitted satisfactorily with Equation (15) that originates from the theoretical derivation by using the mechanism shown in Scheme 8b (see Experimental Section). In the case of **10c** at $\lambda_{\text{exc}}^{(2)} = 750 \text{ nm}$, the fit provides a relative brightness of **10cA⁻** to **10c** of 2500 ± 200 , and $\delta_u \Phi_u^{(2)} = 0.04 \text{ GM}$ for the uncaging cross-section for two-photon excitation. Table 2 summarizes the corresponding parameter values that were measured for the series of caged coumarins investigated.

Discussion

We first evaluated whether choosing caged substrates that absorb light within the range of the excitation wavelength for uncaging 1) perturbs the analyses of the measured action uncaging cross-sections to calculate the corresponding quantum yields of uncaging and 2) makes the latter representative of uncaging quantum yields even if the caged substrate is nonabsorbing. Two different issues must be addressed. Firstly, one has to examine whether it is only the light that is absorbed by the *o*-nitrobenzyl moiety that leads to uncaging. Secondly, one must evaluate whether supplementary relaxation pathways may compete with the photo-release of the caged substrate after light absorption by the *o*-nitrobenzyl chromophore due to the presence of another chromophore within the caged substrate.

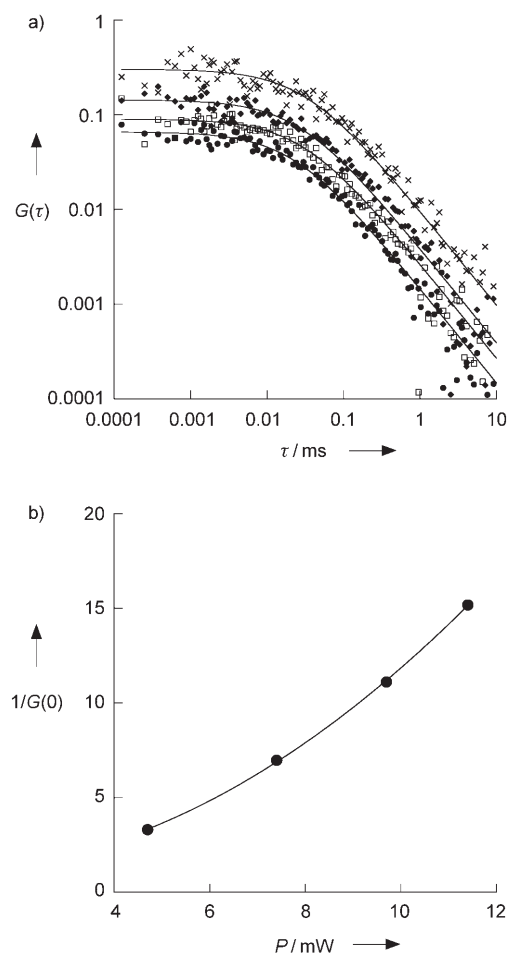


Figure 4. a) FCS autocorrelation curves $G(\tau)$ recorded at 293 K from $1 \mu\text{M}$ **10c** solutions at increasing laser powers at the sample, P ($P=5$ mW, x ; $P=7.5$ mW, \blacklozenge ; $P=10$ mW, \square ; $P=11.5$ mW, \bullet ; $\lambda_{exc}^{(2)}=750$ nm). Fitting the experimental points by using Equation (14) gave $32 \pm 3 \mu\text{s}$ ($P=5$ mW), $27 \pm 3 \mu\text{s}$ ($P=7.5$ mW), $28 \pm 3 \mu\text{s}$ ($P=10$ mW), and $22 \pm 3 \mu\text{s}$ ($P=11.5$ mW) for the diffusion times τ_D . b) Dependence of $1/G(0)$ as a function of P . Symbols: experimental data; line: fit according to Equation (15). From this curve, $\alpha=2500 \pm 200$ and $\delta_u(750)\Phi_u^{(2)}=40$ mGM.

We did not observe any strong coupling between the chromophores that are contained in the *o*-nitrobenzyl protecting groups and in the caged substrates in the **nb** and **nc** series. This suggests that the corresponding chromophores behave essentially independently with regards to light absorption.^[42] In contrast, energy transfer can occur towards the chromophore absorbing at the largest wavelength after excitation of the chromophore absorbing at the lowest wavelength.^[57] Such a process may be significant in calculating the quantum yield of uncaging after one-photon excitation $\Phi_u^{(1)}$ from the corresponding action uncaging cross-section for one-photon excitation $\epsilon_u(325)\Phi_u^{(1)}$ at $\lambda_{exc}^{(1)}=325$ nm if the *o*-nitrobenzyl chromophore absorbs at the largest wavelength. If energy transfer from the excited state of the caged substrate to the *o*-nitrobenzyl moiety is faster than its relaxation, one should

take the molar absorption coefficient of the caged compound to calculate $\Phi_u^{(1)}$. In the opposite case, one should use the molar absorption coefficient of the *o*-nitrobenzyl moiety.

In the **nc** series, energy transfer cannot occur from the coumarin to the *o*-nitrobenzyl moiety because the former always absorbs light at a larger wavelength than the latter. In contrast, energy transfer could be relevant in most **nb** caged compounds (except **1b** and possibly **3b**). In view of the very low quantum yields of fluorescence emission of nitrobenzene derivatives, such as **3a**, that would slow considerably any energy transfer by the Förster mechanism to the *o*-nitrobenzyl moiety,^[57] we did not consider energy transfer in calculating $\Phi_u^{(1)}$ in the data analysis.^[58] Thus, we used the molar absorption coefficients of the alcohols **na** as appropriate orders of magnitude of the corresponding molar absorption coefficients of alkyl ethers of the *o*-nitrobenzyl moieties. In fact, choosing the molar absorption coefficient of the caged compound **nb** would not change considerably the $\Phi_u^{(1)}$ values, except for **1b**. Indeed, at the one-photon excitation wavelength that was used in the present series of experiments ($\lambda_{exc}^{(1)}=325$ nm), the molar absorption coefficients of an alkyl ether of *p*-nitrophenol, such as **3a**, is about $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and this value is lower than the molar absorption coefficients of the *o*-nitrobenzyl moieties that were investigated in the present study.

Table 2 displays the results. We first examined the significance of the backbone conjugated to the nitro substituent if the benzylic position bears two hydrogen atoms. In the **nb** series, the quantum yield for uncaging after one-photon excitation is largest for **1b**, with $\Phi_u^{(1)}(\mathbf{1b}) \approx 10\%$. $\Phi_u^{(1)}(\mathbf{nb})$ values are within the 1% range for **3b**, **4b**, **7b**, and **8b**. In particular, $\Phi_u^{(1)}(\mathbf{4b})$ compares satisfactorily with the reported value of a phenol caged with the **4** backbone.^[43] Uncaging was too slow for **5b**, **6b**, and **9b** to calculate the corresponding quantum yields reliably. In fact, $\Phi_u^{(1)}$ seems to drop as the maximum wavelength of absorption of the *o*-nitro protecting group increases. This trend was already observed upon going from the 2-nitrobenzyl to the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl group.^[7] It was also implicit in reported results,^[29] but the absence of measurements of $\Phi_u^{(1)}$ in the latter work makes the comparison difficult. We observed a similar trend in the **nc** series. Interestingly, $\Phi_u^{(1)}(\mathbf{4c})$ is in line with reported values of the quantum yields of uncaging after one-photon excitation for **4**-caged nonabsorbing carboxylic acids.^[7] In fact, energy transfer could occur from the **4** *o*-nitrobenzyl moiety to the coumarin before the primary photoreaction leading to aci-nitro tautomers (Scheme 8a). Under such conditions, we should observe lower quantum yields of uncaging in our series than with nonabsorbing caged carboxylic acids. The absence of any energy transfer probably results from the very low quantum yields of fluorescence emission from the *o*-nitrobenzene derivatives that slows energy transfer by the Förster mechanism, and from the fast subpicosecond timescale that was reported for the primary photoreaction.^[25] All together, the present observations suggest that the photophysical properties of the caged substrate do not alter strongly the uncaging behavior with

regard to the *o*-nitrobenzyl photochemistry. In fact, such a result is fortunate because evaluation of the uncaging efficiency upon two-photon excitation is facilitated greatly if use is made of fluorescent caged probes. In addition, it allows us to use typical values of the uncaging quantum yields to evaluate the uncaging quantum yields of caged fluorophores that are often used as fluorescent polar tracers in biology.

The significance of introducing a substituent on the benzylic position is based on the results obtained in the **4c** series. The effect is significant, but it remains weak: the best tribromomethyl substituent exhibits a quantum yield for uncaging after one-photon excitation that is only four times larger than that of the cyano substituent that gives the worst results here. Analysis of these observations is difficult. In fact, the benzylic substituent can introduce different types of alterations governing the efficiency of the uncaging pathway after light absorption by the caged compound. Electronic effects should affect the lability of the benzylic proton that is involved in the uncaging mechanism (Scheme 8a). The presence of heavy atoms could promote alternative relaxation pathways implying the triplet states. Eventually, steric hindrance could also play a role. In particular, we did not obtain the favorable results reported with the trifluoromethyl as well as with the cyano substituents.^[10,30] The corresponding discrepancy questions the use of the benzylic substituent to improve quantum yields of uncaging after one-photon excitation; efficiencies could be strongly dependent on the nature of the caged substrate.

We used the quantum yields for uncaging after one-photon excitation of the **nb** series and the molar absorption coefficients of the **na** alcohols to derive a representative order of magnitude of the action uncaging cross-section of the present *o*-nitrobenzyl photolabile protecting groups (Table 2). In fact, the protecting groups **7** and **8** appear better than the reference **4** at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)} = 350$ nm. The results obtained in the **4c** series probably indicate that **4Cl** and **4Br** would also be more efficient than **4**. Despite such improvements, one can notice that the action uncaging cross-section for one-photon excitation in the present series should be increased by hardly more than one order of magnitude by combining the best conjugated backbone and benzylic substituent.

We now turn to the results obtained from two-photon excitation. The action uncaging cross-section for two-photon excitation of the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl photolabile protecting group has been already measured by two different methods for nonabsorbing caged carboxylic acids: $\delta_{\text{u}}(740)\Phi_{\text{u}}^{(2)} = 0.03$ GM^[7] and $\delta_{\text{u}}(740)\Phi_{\text{u}}^{(2)} = 0.01$ GM^[28] were reported, respectively. Here, we derived $\delta_{\text{u}}(740)\Phi_{\text{u}}^{(2)} = 0.02$ GM for **4c**. In fact, this fair agreement led us to the same conclusion independently of the excitation mode: in the **nc** series, the energy transfer from the *o*-nitrobenzyl moiety to the coumarin is not competing considerably with the primary photoreaction leading to substrate release.

We first consider the $\delta_{\text{u}}(750, \mathbf{nc})\Phi_{\text{u}}^{(2)}$ values given in Table 2 by investigating the role of the backbone conjugated

to the nitro substituent if the benzylic position bears two hydrogen atoms. In fact, we obtained essentially similar values, whatever the structure of the conjugated backbone in the present series: $\delta_{\text{u}}(750)\Phi_{\text{u}}^{(2)}$ for **4c**, **5c**, **8c**, **9c**, and **10c** are all within the 0.02–0.05 GM range. A similar conclusion arises at 800 nm: $\delta_{\text{u}}(800)\Phi_{\text{u}}^{(2)}$ lies between 0.02 and 0.03 GM for **8c**, **9c**, and **10c** whereas 0.01 GM was reported for a 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl derivative at the same excitation wavelength.^[7]

Figure 1 displays parts of the uncaging absorption spectra upon two-photon excitation $\delta_{\text{u}}\Phi_{\text{u}}^{(2)}$ for **8c**, **9c**, and **10c**. In line with the corresponding results that were reported for 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl caged compounds,^[7,28] they reasonably compare with the absorption spectra upon one-photon excitation after dividing the excitation wavelength by a factor two. The whole collection of results suggests that the same excited state is involved in photolysis after both one- and two-photon excitation in the *o*-nitrobenzyl series. Consequently, if it is assumed that the quantum yields of uncaging after one- and two-photon excitation are identical, that is, $\Phi_{\text{u}}^{(1)} = \Phi_{\text{u}}^{(2)}$, the data contained in Table 2 can be used to derive orders of magnitude for the two-photon absorption cross-sections of the *o*-nitrobenzyl moieties by the expression: $\delta(\lambda_{\text{exc}}^{(2)}) = \delta_{\text{u}}(\lambda_{\text{exc}}^{(2)})\Phi_{\text{u}}^{(2)}/\Phi_{\text{u}}^{(1)}$. Thus, we derived $\delta(750, \mathbf{4c}) \approx 3$ GM and $\delta(750, \mathbf{nc}) \approx 20$ –50 GM (**n** = **8**, **9**, and **10**). The value of $\delta(750, \mathbf{4c})$ confirms that the coumarin chromophores do not contribute strongly, if at all, to light absorption leading to uncaging because one would typically expect $\delta(750, \mathbf{12}) \approx 10$ –20 GM for the coumarin **12**.^[31] In addition, these estimates are in reasonable agreement with the expectations based on molecular structure. For instance, we recorded fluorescence excitation spectra for two-photon excitation to measure $\delta(\lambda_{\text{max}}^{(2)}) \approx 60$ GM in a series that is closely related to the *o*-nitrobenzyl chromophore in **10c** that should here exhibit $\delta(\lambda_{\text{max}}^{(2)}) \approx 40$ GM.^[59,60]

The role of the benzylic substituent can be analyzed in the **4c** series. We observed $\delta_{\text{u}}(750, \mathbf{4cBr})\Phi_{\text{u}}^{(2)} > \delta_{\text{u}}(750, \mathbf{4cCl})\Phi_{\text{u}}^{(2)} \approx \delta_{\text{u}}(750, \mathbf{4cCN})\Phi_{\text{u}}^{(2)} \approx \delta_{\text{u}}(750, \mathbf{4c})\Phi_{\text{u}}^{(2)} > \delta_{\text{u}}(750, \mathbf{4cF})\Phi_{\text{u}}^{(2)}$. This trend seems reasonable if it is assumed again that uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation are identical. In fact, all the members of the **4c** series share the same *o*-nitrobenzyl chromophore and should consequently exhibit the same $\delta(750)$ value. Then, the evolution of $\delta_{\text{u}}(750)\Phi_{\text{u}}^{(2)}$ and $\Phi_{\text{u}}^{(1)}$ would be comparable, which is indeed essentially observed. The best benzylic substituent is again tribromomethyl, which exhibits a quantum yield for uncaging after two-photon excitation that is three times larger than that for any other substituent.

Despite the expected increase in the action uncaging cross-section for two-photon excitation that would result from the appropriate choice of the best present *o*-nitrobenzyl backbone and benzylic substituent, we reach again a conclusion similar to the one upon using one-photon excitation: the action uncaging cross-section for two-photon excitation should be increased by hardly more than one order of magnitude in the *o*-nitrobenzyl series.

Conclusion

We evaluated the *o*-nitrobenzyl platform for designing photolabile protecting groups with red-shifted absorption that could be photolyzed upon one- and two-photon excitation. Special attention was paid to the latter excitation mode in view of promising biological applications.

From the synthetic point of view, this work shows that several strategies can be envisaged to introduce the 2-nitrobenzyl motif in putative photolabile protecting groups. We generated several 2-nitrobenzyl alcohols and the corresponding synthetic pathways could be transposed easily to yield other 2-nitrobenzyl derivatives. In particular, the palladium-coupling approach relying on the **IIa** synthon opens the way to the syntheses of other conjugated species.

As anticipated from the availability of reliable structure–property relationships, the 2-nitrobenzyl alcohols synthesized in the present study exhibit absorption properties in agreement with expectations based on their molecular structures. In particular, we improved considerably the match between their absorption features and the wavelength ranges of the current laser sources for two-photon excitation. With regard to the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl reference, several of the 2-nitrobenzyl photolabile protecting groups described possess significantly red-shifted and enlarged light absorption upon one- or two-photon excitation. We anticipate that better results could be obtained with more conjugated backbones that could exhibit more red-shifted and larger light absorptions than those in the present series.

In addition to the cross-sections for light absorption, the quantum yields of uncaging after one- and two-photon excitation are the other significant photophysical parameters that determine the values of the action uncaging cross-sections. We showed that the caged substrates were released cleanly upon photolysis in the whole series investigated. With appropriate caged substrates from the present series, the action uncaging cross-sections can be derived easily and reliably from experiments based on UV-visible absorption and fluorescence emission (one-photon excitation) and from FCS (two-photon excitation). For the purpose of molecular engineering, our observations suggest that the values of the quantum yields of uncaging after one- and two-photon excitation are similar in the 2-nitrobenzyl series. This observation should facilitate the design of future photolabile protecting groups bearing a donor–acceptor backbone. Indeed, most available quantum yields of uncaging rely presently on one-photon excitation.

We found that the quantum yields of uncaging remained low in the whole 2-nitrobenzyl series investigated: they generally lie within the 0.1–1% range. This is a drawback to enlarging the action uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. For instance, cross-sections for two-photon absorption that are ten times larger than in the present series would be required to get results comparable with those of the best available series. Moreover, we observed that the quantum yields of uncaging dropped if the maximum of wavelength absorption of the *o*-nitrobenzyl moiety

was increased. Although difficult to analyze at the present time, this result indicates that one cannot necessarily optimize independently both the absorption and the uncaging properties of a photolabile protecting group. In the 2-nitrobenzyl series, the observed trend could make it difficult to enlarge the action uncaging cross-sections beyond the existing values.

Experimental Section

Syntheses: The syntheses of the final compounds, as well as of the synthetic intermediates, are detailed in the Supporting Information.

UV/Vis absorption: UV/Vis absorption spectra were recorded at 293 K by using a Kontron Uvikon-940 spectrophotometer. Molar absorption coefficients were calculated by checking the validity of the Beer–Lambert law.

Steady-state fluorescence emission: Corrected fluorescence spectra were obtained by using a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorometer. Solutions for fluorescence measurements were adjusted to concentrations so that the absorption maximum was around 0.15 at the excitation wavelength (typical range: a few micromolar). The overall fluorescence quantum yields after one-photon excitation $\Phi_{\text{F}}^{(1)}$ were calculated from Equation (2):

$$\Phi_{\text{F}}^{(1)} = \Phi_{\text{ref}}^{(1)} \frac{1 - 10^{-A_{\text{ref}}(\lambda_{\text{exc}})}}{1 - 10^{-A(\lambda_{\text{exc}})}} \frac{D}{D_{\text{ref}}} \left(\frac{n}{n_{\text{ref}}} \right)^2 \quad (2)$$

in which the subscript “ref” stands for standard samples, $A(\lambda_{\text{exc}})$ is the absorbance at the excitation wavelength, D is the integrated emission spectrum, and n is the refractive index for the solvent. The error in the experimental value of $\Phi_{\text{F}}^{(1)}$ was estimated to be $\pm 10\%$. The standard fluorophore for the quantum yields measurements was quinine sulfate in 0.1 M H_2SO_4 with $\Phi_{\text{ref}}^{(1)} = 0.55$.^[62]

Irradiation experiments: Irradiation experiments were performed at 20 °C in $\text{CH}_3\text{CN}/20$ mM Tris pH 9 buffer 1:1 (v/v). No thermal hydrolysis was observed on the timescale of the present irradiation experiments (24 h).

One-photon excitation: Irradiations relying on one-photon excitation were performed at 325 nm on 3 mL samples in 1×1 cm² quartz fluorescence cuvettes under constant stirring. Excitations were performed by using the 75 W xenon lamp of a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorometer at several slit widths. The corresponding incident-light intensities were systematically calibrated by determining the kinetics of photoconversion of the α -(4-dimethylaminophenyl)-*N*-phenylnitron into 3-(4-dimethylaminophenyl)-2-phenyloxaziridine in fresh dioxane as described in reference [44]. For the present series of experiments, typical incident-light intensities were within the 1×10^{-4} Einstein min⁻¹ range.

To derive the cross-section for uncaging after one-photon excitation, we considered that the illuminated system was submitted to the reaction:



in which ROPG, ROH, and PG designate the caged species, the species that was initially caged, and the product from the protecting moiety after ROH release.

The reaction rate for photodeprotection of the caged compound ROPG is proportional to the intensity of the monochromatic excitation light absorbed by ROPG at the excitation wavelength that leads to uncaging, $I_{\text{u}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$, and to the uncaging cross-section for one-photon excitation, $\Phi_{\text{u}}^{(1)}$:

$$-\frac{d[\text{ROPG}]}{dt} = \frac{I_{\text{u}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})\Phi_{\text{u}}^{(1)}}{V} \quad (4)$$

in which V is the irradiated volume. $I_u(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$ and all the subsequent absorbed-light intensities are expressed in Einstein per unit of time. By introducing $A_u(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$, $A_{\text{tot}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$, and $I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$ that designate the effective ROPG absorbance for uncaging, the total absorbance, and the intensity of the incident beam at the excitation wavelength, respectively, Equation (4) provides the following:

$$-\frac{d[\text{ROPG}]}{dt} = \frac{1 - \exp[-2.3A_{\text{tot}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})\Phi_u^{(1)}I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})A_u(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})]}{A_{\text{tot}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})} \quad (5)$$

If $A_{\text{tot}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \ll 1$, one obtains at first order:

$$-\frac{d[\text{ROPG}]}{dt} = k[\text{ROPG}] \quad (6)$$

with

$$k = \frac{2.3\Phi_u^{(1)}I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})\varepsilon_u(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})l}{V} \quad (7)$$

in which $\varepsilon_u(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$ and l represent the effective molar absorption coefficient for uncaging of ROPG at the excitation wavelength, and the pathlength of the light beam, respectively.

By assuming that the system contains initially only ROPG, one then easily derives:

$$\frac{A_{\text{tot}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}, t)}{A_{\text{tot}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}, 0)} = \frac{\varepsilon_{\text{ROH}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) + \varepsilon_{\text{PG}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})}{\varepsilon_{\text{ROPG}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})} + \left(1 - \frac{\varepsilon_{\text{ROH}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) + \varepsilon_{\text{PG}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})}{\varepsilon_{\text{ROPG}}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})}\right) \exp(-kt) \quad (8)$$

in which ε_{ROH} , ε_{PG} , and $\varepsilon_{\text{ROPG}}$ designate the molar absorption coefficients of ROH, PG, and ROPG, respectively.

For the present series of experiments, the total absorbance at the excitation wavelength had a maximum of around 0.15 to avoid the effects associated with inner filtering and to be in the region of approximation leading to Equation (6). Under the same experimental conditions, the temporal evolution of the intensity $I_F(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}, \lambda_{\text{em}})$ of the steady-state fluorescence emission at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)}$ upon excitation at λ_{em} can be written:

$$\frac{I_F(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}, \lambda_{\text{em}}, t)}{I_F(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}, \lambda_{\text{em}}, 0)} = \frac{Q_{\text{ROH}}^{(1)}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) + Q_{\text{PG}}^{(1)}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})}{Q_{\text{ROPG}}^{(1)}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})} + \left(1 - \frac{Q_{\text{ROH}}^{(1)}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) + Q_{\text{PG}}^{(1)}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})}{Q_{\text{ROPG}}^{(1)}(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})}\right) \exp(-kt) \quad (9)$$

in which $Q_x^{(1)} = \varepsilon_x(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})\Phi_F^{(1)}(x)$ designates the brightness after one-photon excitation of ROH, PG, and ROPG ($\Phi_F^{(1)}(x)$ is the quantum yield of fluorescence emission after one-photon excitation of the species x).

Two-photon excitation: Our home-built two-photon excitation FCS setup has been previously reported.^[56,63] Illumination is provided by a mode-locked titanium-sapphire laser (Mira pumped by Verdi, Coherent) through a 60 \times , 1.2 NA water immersion objective (Olympus). The sample at 1 μM concentration was contained in a cuvette described in reference [56]. To measure excitation power, we measured the input-laser power by using a Lasermate powermeter (Coherent) and the power loss between input and sample level. Power at the sample level was then derived without disturbing the cuvette. For the present series of experiments, fluorescence photons were collected through a 560/80 nm band-pass filter with two avalanche photodiodes (APD, SPCM-AQR-14, Perkin-Elmer, Vaudreuil, Canada) coupled to an ALV-6000 correlator (ALV GmbH). At 0.1–5 μM concentrations in caged coumarin, we typically observed signals of 500 Hz to 10 kHz on each APD. We investigated the dependence of the fluorescence emission from **12** as a function of the excitation power. The range of investigated excitation powers was chosen to be in the region of power-squared dependence for the intensity of fluorescence emission (21–85 mW input-laser power, which corresponds to 3–12 mW at the sample level). Under these experimental conditions, no contribution of the triplet state to the experimental FCS autocorrelation curves was observed. In the present work, a typical FCS experiment con-

sisted of between several hundred and a few thousand acquisitions of three seconds each, leading to a typical acquisition time of 1 h.

The experimental FCS autocorrelation curves $G(\tau)$ defined in Equation (1) were fitted by assuming that the solution contained two freely diffusing species with the same diffusion constant D , **nc** and **ncA**⁻ (Scheme 8b). By denoting these species as **1** and **2**, respectively, the associated fitting function is:^[53]

$$G(\tau) = \frac{(Q_1^{(2)})^2 N_1 + (Q_2^{(2)})^2 N_2}{[Q_1^{(2)} N_1 + Q_2^{(2)} N_2]^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (10)$$

In Equation (10), $Q_1^{(2)}$ and $Q_2^{(2)}$ designate the respective brightnesses of **1** and **2** ($Q_x^{(2)} = \delta_x \Phi_{F,x}^{(2)}$ in which δ_x designates the cross-section for two-photon absorption of **x** and $\Phi_{F,x}^{(2)}$ is the quantum yield of fluorescence of **x** after two-photon excitation), N_1 and N_2 represent the number of molecules of **1** and **2** in the illuminated spot described as two-dimensional Gaussian, and τ_D is the diffusion time of **1** and **2** through the beam waist. By introducing the relative brightness $\alpha = Q_2^{(2)}/Q_1^{(2)}$, Equation (10) becomes:

$$G(\tau) = \frac{N_1 + \alpha^2 N_2}{(N_1 + \alpha N_2)^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (11)$$

Provided that α is large enough, the amplitude of the FCS autocorrelation curve can reveal the presence of even a very small amount of **2**, N_2 . By following the theoretical treatment of Kiskin et al.,^[13] the averaged number of molecules of **2** in the illuminated spot in the steady state equals:

$$\frac{N_2}{N_{\text{tot}}} \approx \frac{k\tau_D/2.5}{1 + k\tau_D/2.5} \quad (12)$$

in which $N_{\text{tot}} = N_1 + N_2$ and:

$$k = 1.17\delta_u \Phi_u^{(2)} \frac{T}{\tau_p} \left(\frac{\lambda}{\pi h c w_0^2}\right)^2 P^2 V F \quad (13)$$

In Equation (13), δ_u is the cross-section for two-photon absorption leading to uncaging at the excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}^{(2)}$, $\Phi_u^{(2)}$ is the quantum yield of uncaging after two-photon excitation, T is the period of the laser pulses (13.6 ns in our case), τ_p (200 fs) is the duration of the laser pulses, w_0 (0.3 μm) is the waist of the focussed laser beam, P is the laser power at the sample and $V F$ is a geometrical term (equal to 0.63 if $w_0 > 0.3 \mu\text{m}$, like in the present case).

Preliminary results suggested that $\frac{N_2}{N_1} \ll 1$ and $\alpha \gg 1$. Thus, we considered the approximate correlation function [Eq. (14)] with fewer undetermined constants to fit experimental data:

$$G(\tau) = \frac{N_{\text{tot}} + \alpha^2 N_2}{(N_{\text{tot}} + \alpha N_2)^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (14)$$

In the fitting process using Equation (14), N_{tot} was assumed from the concentration used in **nc** and of the illuminated volume from a preliminary calibration,^[56] and only $\frac{N_{\text{tot}} + \alpha^2 N_2}{(N_{\text{tot}} + \alpha N_2)^2}$ and τ_D were adjusted. By writing $k = \gamma P^2$ and $\beta = \tau_D \gamma / 2.5$, and by considering that $\beta P^2 \ll 1$ under the present experimental conditions, one obtains:

$$\frac{1}{G(0)} \approx N_{\text{tot}} \frac{(1 + \alpha \beta P^2)^2}{1 + \alpha^2 \beta P^2} \quad (15)$$

FCS autocorrelation curves were recorded at different laser powers P . The curves were fitted by using Equation (14) to calculate $G(0)$ and τ_D (data were processed by using Matlab and Origin softwares). The values of $1/G(0)$ were then plotted as a function of P and the experimental data were fitted by using Equation (15) to calculate the values of α and β .^[64] The action uncaging cross-section for two-photon excitation $\delta_u \Phi_u^{(2)}$ was finally derived from the β value.

Acknowledgements

Dr. J.-F. Allemand is gratefully acknowledged for his help to design FCS experiments. This research was financially supported by the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC) (2005, project no. 3787).

- [1] V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, 1–26.
- [2] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142.
- [3] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458.
- [4] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [5] R. Wieboldt, K. R. Gee, L. Niu, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8752–8756.
- [6] N. A. Porter, J. W. Thuring, H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7716–7717.
- [7] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193–2000.
- [8] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [9] A. Banerjee, C. Grewer, L. Ramakrishnan, J. Jäger, A. Gameiro, H.-G. A. Breiter, K. R. Gee, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8361–8367.
- [10] A. Specht, M. Goeldner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2042–2046; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2008–2012.
- [11] M. Lukeman, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7698–7699.
- [12] O. D. Fedoryak, J.-Y. Sul, P. G. Haydon, G. C. R. Ellis-Davies, *Chem. Commun.* **2005**, 3664–3666.
- [13] N. Kiskin, R. Chillingworth, J. A. McCray, D. Piston, D. Ogden, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 588–604.
- [14] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122.
- [15] M. Albota, D. Beljonne, J.-L. Brédas, J. E. Ehrlich, J.-Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Röckel, M. Rumi, G. Subramanian, W. W. Webb, X.-L. Wu, C. Xu, *Science* **1998**, *281*, 1653–1656.
- [16] C. Le Droumaguet, O. Mongin, M. H. V. Werts, M. Blanchard-Desce, *Chem. Commun.* **2005**, 2802–2804.
- [17] R. Jasuja, J. Keyoung, G. P. Reid, D. R. Trentham, S. Khan, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1706–1719.
- [18] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777–8778.
- [19] A. Barth, J. E. T. Corrie, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2864–2871.
- [20] Q. Cheng, M. G. Steinmetz, V. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7676–7677.
- [21] M. Ghosh, I. Ichetovkin, X. Song, J. S. Condeelis, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2440–2441.
- [22] W. F. Veldhuyzen, Q. Nguyen, G. McMaster, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13358–13359.
- [23] S. Abbruzzetti, S. Sottini, C. Viappiani, J. E. T. Corrie, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9865–9874.
- [24] J. E. T. Corrie, A. Barth, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham, M. C. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8546–8554.
- [25] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581–4595.
- [26] B. Hellrung, Y. Kamdzhilov, M. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8934–8935.
- [27] Y. V. Il'ichev, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10159–10170.
- [28] E. B. Brown, J. B. Shear, S. R. Adams, R. Y. Tsien, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489–499.
- [29] C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341–6346.
- [30] M. C. Pirrung, W. H. Pieper, K. P. Kaliappan, M. R. Dhananjayan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12548–12553.
- [31] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481–491.
- [32] E. Cogné-Laage, J.-F. Allemand, O. Ruel, J.-B. Baudin, V. Croquette, M. Blanchard-Desce, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1445–1455.
- [33] N. M. Yoon, C. S. Pak, H. C. Brown, S. Krishnamurthy, T. P. Stocky, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786–2792.
- [34] M. C. Venuti, G. H. Jones, R. A. Alvarez, J. J. Bruno, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 303–318.
- [35] G. V. De Lucca, U. T. Kim, C. Johnson, B. J. Vargo, P. K. Welch, M. Covington, P. K. A. Solomon, R. C. Newton, G. L. Trainor, C. P. Decicco, S. S. Ko, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3794–3804.
- [36] R. Krishnamurti, D. R. Bellew, G. K. S. Prakash, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 984–989.
- [37] V. K. Aggarwal, A. Mereu, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7211–7212.
- [38] P. J. Atkins, V. Gold, W. N. Wassef, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1984**, 1247–1251.
- [39] O. Mitsunobu, *Synthesis*, **1981**, 1–28.
- [40] D. L. Hughes, *Org. React.* **1992**, *42*, 335–656.
- [41] E. Brunet, P. Garcia-Losada, J. C. Rodriguez-Ubis, O. Juanes, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 169–174.
- [42] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part II*, Freeman, New York, **1980**.
- [43] Y. R. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [44] P. F. Wang, L. Jullien, B. Valeur, J.-S. Filhol, J. Canceill, J.-M. Lehn, *New J. Chem.* **1996**, *20*, 895–907.
- [45] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705–708.
- [46] E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1–27.
- [47] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Biopolymers* **1974**, *13*, 29–61.
- [48] "Fluorescence Correlation Spectroscopy", N. L. Thompson, *Top. Fluoresc. Spectrosc.* **1991**, *1*, 337–410.
- [49] *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (Eds.: R. Rigler, E. S. Elson), Springer Series in Chemical Physics, Springer, Berlin, **2001**.
- [50] E. L. Elson, *Traffic* **2001**, *2*, 789–796.
- [51] Y. Chen, J.-D. Müller, J.-S. Eid, E. Gratton in *New Trends in Fluorescence Spectroscopy, Applications to Chemical and Life Sciences* (Eds.: B. Valeur, J.-C. Brochon), Springer Series on Fluorescence, Methods and Applications, Springer, Berlin, **2001**, pp. 277–296.
- [52] N. L. Thompson, A. M. Lieto, N. W. Allen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 634–641.
- [53] O. Krichavsky, G. Bonnet, *Rep. Prog. Phys.* **2002**, *65*, 251–297.
- [54] S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, *Biochemistry* **2002**, *41*, 697–705.
- [55] D. C. Lamb, A. Schenk, C. Röcker, C. Scalfi-Happ, G. U. Nienhaus, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1129–1138.
- [56] S. Charier, A. Meglio, D. Alcor, E. Cogné-Laage, J.-F. Allemand, L. Jullien, A. Lemarchand, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15491–15505.
- [57] B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley VCH, **2002**.
- [58] We did not consider the alternative Dexter mechanism for energy transfer in view of the absence of considerable coupling between the two considered chromophores.
- [59] S. Charier, O. Ruel, J.-B. Baudin, D. Alcor, J.-F. Allemand, A. Meglio, L. Jullien, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4889–4892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4785–4788.
- [60] S. Charier, O. Ruel, J.-B. Baudin, D. Alcor, J.-F. Allemand, A. Meglio, L. Jullien, B. Valeur, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1097–1113.
- [61] E. W. P. Damen, T. J. Nevalainen, T. J. M. Van den Bergh, F. M. H. de Groot, H. W. Scheeren, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 71–77.
- [62] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991–1024.
- [63] C. Gosse, A. Boutorine, I. Aujard, M. Chami, A. Kononov, E. Cogné-Laage, J.-F. Allemand, J. Li, L. Jullien, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6485–6497.
- [64] Lack of published results makes it difficult to discuss the values of the relative brightness of ncA^- with respect to nc , $\alpha(\lambda_{\text{exc}}^{(2)})$. The brightness after two-photon excitation is equal to the product of the quantum yield of fluorescence, $\Phi_{\text{F}}^{(2)}$, and the cross-section for two-photon absorption, δ . In the case of donor-acceptor fluorophores, one generally considers that the same emissive state is reached after one- and two-photon excitation, so that $\Phi_{\text{F}}^{(2)} = \Phi_{\text{F}}^{(1)}$ (ref.[31]). The data in Table 1 suggests $\Phi_{\text{F}}^{(1)}(\text{nc}) \approx \Phi_{\text{F}}^{(2)}(\text{nc}) \approx 0.1\%$ as an order of magnitude. It is more difficult to derive a range for the quantum

yield of fluorescence of the corresponding aci-nitro intermediates \mathbf{ncA}^- . In fact, the low quantum yield of fluorescence of the \mathbf{nc} caged species probably results from the presence of the nitro substituent. One could anticipate that the removal of the nitro substituent promotes an increase in the quantum yield of fluorescence of the corresponding aci-nitro intermediates \mathbf{ncA}^- . If one assumes that the latter lies within the same range as the esters of **12**, then $\Phi_{\text{F}}^{(1)}(\mathbf{ncA}^-) \approx \Phi_{\text{F}}^{(2)}(\mathbf{ncA}^-) \approx 10\%$. The derivation of the ratio $\delta(\lambda_{\text{exc}}^{(2)}, \mathbf{ncA}^-) / \delta(\lambda_{\text{exc}}^{(2)}, \mathbf{nc})$ is also difficult. Firstly, the relationship between molecular structure and $\delta(\lambda_{\text{max}}^{(2)})$ has not been established definitively; to derive a crude estimate, we assume $\delta(\lambda_{\text{max}}^{(2)}, \mathbf{ncA}^-) \approx \delta(\lambda_{\text{max}}^{(2)}, \mathbf{nc})$ in view of the similarity of the conjugated paths in \mathbf{ncA}^-

and \mathbf{nc} . We also take into account the expected red-shift that generally accompanies the conversion from the *ortho*-nitrobenzyl caged derivatives to the aci-nitro intermediates (ref. [25]). Upon considering that $\lambda_{\text{max}}^{(2)}$ is close to $2\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ in donor-acceptor chromophores (refs. [31,32]) and that $\lambda_{\text{exc}}^{(2)}$ was generally larger than $2\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ in the present work, we finally retained $\delta(\lambda_{\text{exc}}^{(2)}, \mathbf{ncA}^-) / \delta(\lambda_{\text{exc}}^{(2)}, \mathbf{nc}) \approx 1-10$. Thus, one obtains 10^2-10^3 as a crude estimate for $\alpha(\lambda_{\text{exc}}^{(2)})$. As shown in Table 2, the parameters calculated from the fit are in line with the preceding derivation.

Received: November 8, 2005

Revised: April 25, 2006

Published online: June 8, 2006

CHEMISTRY 
A EUROPEAN JOURNAL

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2006

o-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-shifted
Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-sections for One- and
Two-Photon Excitation

Isabelle Aujard,^[a] Chouaha Benbrahim,^[a] Marine Gouget,^[a]
Odile Ruel,^[a] Jean-Bernard Baudin,^[a] Pierre Neveu,^[a,b] Ludovic Jullien,^{[a],*}

^[a] *Dr. I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, Dr. O. Ruel, Dr. J.-B. Baudin, Prof. Dr. L. Jullien,
Département de Chimie (C.N.R.S. U.M.R. 8640), École Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, 75231 Paris
Cedex 05, France, Fax: (+33) 1 44 32 33 25, E-mail: Ludovic.Jullien@ens.fr;* ^[b] *Dipl. P. Neveu,
Département de Physique (C.N.R.S. U.M.R. 8550), École Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, 75231
Paris Cedex 05, France*

Supporting Information

Syntheses

General Procedures

The commercially available chemicals were used without further purification. Anhydrous solvents were freshly distilled before use. Column chromatography (CC): silica gel 60 (0.040-0.063 mm) Merck. Analytical and thin layer chromatography (TLC): Merck silica gel 60 F₂₅₄ precoated plates; detection by UV (254 nm). Melting point: Büchi 510. ¹H-NMR Spectra: AM-250 or 400 AVANCE Bruker; chemical shifts (δ) in ppm related to protonated solvent as internal reference (¹H: CHCl₃ in CDCl₃, 7.26 ppm; CHD₂COCD₃ in CD₃COCD₃, 2.20 ppm; CHD₂SOCD₃ in CD₃SOCD₃, 2.49 ppm. ¹³C: ¹³CDCl₃ in CDCl₃, 77.0 ppm; ¹³CD₃COCD₃ in CD₃COCD₃, 29.8 ppm; ¹³CD₃SOCD₃ in CD₃SOCD₃, 39.6 ppm); Coupling constants J in Hz. Mass spectrometry (chemical ionization and high resolution with NH₃ or CH₄) was performed at the Service de Spectrométrie de masse de l'ENS. Microanalyses were obtained from the Service de Microanalyses de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.

5-Methoxy-2-nitro-benzyl alcohol 3a A mixture of 5-hydroxy-2-nitro-benzyl alcohol **2a** (900 mg, 5.3 mmol), methyl iodide (0.5 mL, 7.7 mmol, 1.5 equiv), dry potassium carbonate (1.33 g, 9.6 mmol, 1.8 equiv) in dry acetone (12 mL) was vigorously stirred under nitrogen at 35–40°C for 46 h. After cooling to room temperature, the suspension was filtered. The solvent was evaporated under a vacuum

and the residue was dissolved in ether. The organic phase was washed with water, and then with saturated aqueous potassium carbonate. It was dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to give **3a** as a pale yellow solid (484 mg, 50% yield). m.p. 122°C (methanol); ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 8.30 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 7.63 (d, 1 H, J=2.9 Hz), 7.16 (dd, 1 H, J=9.0 Hz and J=2.9 Hz), 5.17 (d, 2 H, J=5.5 Hz), 4.82 (t, 1 H, J=5.5 Hz), 4.10 (s, 3 H); ¹³C NMR (62.8 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 164.2, 149.0, 140.3, 127.9, 114.1, 113.2, 62.9, 55.9; MS (CI, NH₃): m/z 201, 152 (calcd av mass for C₈H₉NO₄: 183.05); MS (CI, CH₄, HR): m/z 184.0608 (calcd av mass for C₈H₁₀NO₄: 184.0610).

2,2,2-Trifluoro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol 4Fa A catalytic amount of tetrabutylammonium fluoride (ca. 4.8 mg) was added to a mixture of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde (490 mg, 2.32 mmol) and 0.5 M (trifluoromethyl)trimethylsilane in tetrahydrofuran (5 mL, 2.5 mmol, 1.1 equiv) cooled to 0°C, under nitrogen atmosphere. An orange color instantaneously appeared. The solution was stirred for 30 min at 0°C and was then warmed to room temperature. After stirring for 2 h, 1.2 M hydrochloric acid (3 mL) was added and the mixture was stirred overnight. After extraction with ether, the organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 3/2 v/v as eluent. **4Fa** was obtained as a pale yellow solid (520 mg, 80% yield). m.p. 112°C (cyclohexane/ether: 4/1); ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 7.82 (s, 1 H), 7.62 (s, 1 H), 6.47–6.41 (m, 2 H), 4.13 (s, 3 H), 4.13 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 153.8, 149.8, 141.5, 125.1 (q, ¹J=280.6 Hz), 124.6, 110.8, 108.4, 66.2 (q, ²J=31.6 Hz), 56.2, 56.1; ¹⁹F NMR (235 MHz, CFCl₃, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= -77.1 (d, J=7.0 Hz); MS (CI, CH₄): m/z 282, 264, 252 (calcd av mass for C₁₀H₁₀F₃NO₅: 281.05); MS (CI, CH₄, HR): m/z 282.0583 (calcd av mass for C₁₀H₁₁F₃NO₅: 282.0589); elemental analysis calcd (%) for C₁₀H₁₀F₃NO₅ (281.19): C 42.71, H 3.58, N 4.98; found: C 43.23, H 3.86, N 5.27.

2,2,2-Trichloro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol 4Cla Freshly distilled 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (0.35 mL, 2.36 mmol, 1 equiv) was added dropwise under nitrogen to a solution of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde (500 mg, 2.36 mmol) in freshly distilled chloroform (0.4 mL, 4.8 mmol, 2 equiv). The mixture was stirred overnight at room temperature. After dilution with chloroform (10 mL), the organic phase was washed with hydrochloric acid aqueous solution (1.2 M, 3 × 10 mL), and dried over sodium sulfate. After solvent evaporation, **4Cla** was obtained as a yellow solid (762 mg, 98% yield). m.p. 158–159°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 7.75 (s, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 6.98 (d, 1 H, J=6.0 Hz), 6.69 (d, 1 H, J=6.0 Hz), 4.12 (s, 3 H), 4.11 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 152.7, 149.8, 143.2, 125.0, 112.3, 108.0, 76.8, 67.0, 56.1, 56.1; MS (CI, CH₄): m/z 312, 182 (calcd av mass for C₁₀H₁₀NCl₃O₅: 328.96); MS (CI, CH₄,

HR): m/z 329.9700 and 331.9672 (calcd av mass for $C_{10}H_{11}NCl_3O_5$: 329.9703, 331.9675).

2,2,2-Tribromo-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol 4Bra Tribromoacetic acid previously recrystallised in chloroform (1.05 g, 3.55 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde (500 mg, 2.36 mmol) in freshly distilled dimethyl sulfoxide (12.5 mL). The mixture was stirred for 1 h at room temperature under nitrogen. Then it was poured into ice-cold water (125 mL). The solution was extracted with ether. The organic phase was washed with sodium hydrogencarbonate solution (5% m/m), and dried over magnesium sulfate. After solvent evaporation, **4Bra** was obtained as a yellow solid (962 mg, 88%). m.p. 177–180°C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ (ppm) = 7.63 (s, 1 H), 7.53 (s, 1 H), 6.61 (s, 1 H), 4.01 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 3.65 (s, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ (ppm) = 151.9, 149.1, 142.9, 123.8, 111.7, 107.7, 77.9, 56.4, 56.3, 52.5; MS (CI, CH_4): m/z 208 (calcd av mass for $C_{10}H_{10}NBr_3O_5$: 460.81); MS (CI, CH_4 , HR): m/z 465.8141, 463.8172 and 461.8192 (calcd av mass for $C_{10}H_{11}NBr_3O_5$: 461.82, 463.8167, 465.81).

Hydroxy-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)acetonitrile 4CNa Same as for **4Fa**. Tetrabutylammonium fluoride (ca. 4.8 mg), 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde (500 mg, 2.36 mmol), trimethylsilylamine cyanide (0.4 mL, 3.07 mmol, 1.3 equiv) in tetrahydrofuran (5 mL). After stirring for 2 h at room temperature, 1.2 M hydrochloric acid (3 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h. The solution was extracted with ether. The organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to yield **4CNa** as a brown solid (500 mg, 90%). m.p. 148–150°C (methanol); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ (ppm) = 7.74 (s, 1 H), 7.36 (s, 1 H), 6.19 (s, 1 H), 4.04 (s, 3 H), 3.99 (s, 3 H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ (ppm) = 154.1, 149.5, 125.6, 117.6, 110.2, 108.5, 60.4, 56.7, 56.5; MS (CI, NH_3): m/z 229, 212, 182 (calcd av mass for $C_{10}H_{10}N_2O_5$: 238.06).

5-Amino-2-nitro-benzyl alcohol 5a ^[?] A 1 M borane solution in tetrahydrofuran (9 mL, 9 mmol, 1.33 equiv) was added dropwise to a solution of 5-amino-2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, 1.0 g, 5.5 mmol) in tetrahydrofuran (3 mL) cooled to 0°C. The resulting mixture was warmed to room temperature and was then refluxed for 2 h. The mixture was cooled to 0°C and sodium hydroxide (3 M, 10 mL) was added. After stirring at room temperature for 12 h, the aqueous layer was extracted twice with ether. The combined organic layers were dried over sodium sulfate. After evaporation of the solvents, **5a** was obtained as a pale yellow solid (764 mg, 83% yield). m.p. 144.5–145.5°C (methanol); 1H NMR (250 MHz, CD_3COCD_3 , 25°C): δ (ppm) = 8.14 (d, 1 H, $J=8.9$ Hz), 7.30 (d, 1 H, $J=2.5$ Hz), 6.78 (dd, 1 H, $J=8.9$ Hz and $J=2.5$ Hz), 6.16 (s, 2 H), 5.10 (d, 2 H, $J=5.6$ Hz), 4.57 (t, 1 H, $J=5.6$ Hz); ^{13}C NMR (62.8 MHz, CD_3COCD_3 , 25°C): δ (ppm) = 163.0, 155.0, 143.1, 128.4, 111.6, 111.5, 62.0; elemental analysis calcd (%) for $C_7H_8N_2O_3$ (168.15): C 50.00, H 4.80, N 16.66; found: C 50.30, H 4.74, N 16.42.

5-Iodo-2-nitrobenzoic acid I 5-amino-2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, 2.0 g, 11 mmol) in tetrahydrofuran (22 mL) was added under nitrogen to neat boron trifluoride etherate (5.6 mL, 27 mmol, 2.5 equiv) cooled to -15°C. Then tert-butyl nitrite (3.5 mL, 29 mmol, 2.6 equiv) dissolved in tetrahydrofuran (5.5 mL) was added dropwise to the rapidly stirred solution. After complete addition, the mixture was stirred at -15°C for 10 min and was then allowed to warm to 5°C. A fine precipitate appeared. After stirring at 5°C for 20 min, cold ether (2 mL) was added. The precipitate was collected by filtration, washed with cold ether, and air-dried. The resulting diazonium tetrafluoroborate salt was added portionwise to a solution of sodium iodide (4.4 g, 29 mmol, 2.6 equiv) in acetone (110 mL). The mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the solvent, ether (140 mL) and water (140 mL) were added to the residue. The aqueous layer was made basic (pH=11) with sodium hydroxide pellets and the mixture was vigorously stirred for 30 min at room temperature. The aqueous phase was washed twice with ether, acidified (pH=1) by adding concentrated hydrochloric acid and stirred with additional ether (150 mL) for 30 min. The layers were separated and the aqueous layer was extracted twice with ether. The combined organic phases were dried over magnesium sulfate and then concentrated. Recrystallisation in hydrochloric acid solution (1.2 M) gave **I** as pale yellow crystals (2.1 g, 65% yield). m.p. 174-175°C (HCl 1.2 M, lit.: 174°C [?]); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.38 (d, 1 H, J=1.9 Hz), 8.34 (dd, 1 H, J=1.9 Hz and J=8.3 Hz), 7.91 (d, 1 H, J=8.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 164.2, 149.6, 141.6, 138.9, 129.0, 125.6, 99.1; elemental analysis calcd (%) for C₇H₄NO₄I (293.02): C 28.69, H 1.37, N 4.78; found: C 28.86, H 1.25, N 4.57.

5-Iodo-2-nitrobenzyl alcohol II [?] 1 M borane in tetrahydrofuran (9 mL, 9 mmol, 1.33 equiv) was added dropwise to 5-Iodo-2-nitrobenzoic acid **I** (2.0 g, 6.8 mmol) in tetrahydrofuran (8 mL) at 0°C. The resulting mixture was warmed to room temperature and then stirred at reflux for 1 h. Excess hydride was carefully destroyed at 0°C with a saturated aqueous solution of ammonium chloride. The aqueous layer was extracted twice with ether. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of potassium carbonate and dried over magnesium sulfate. Removal of the solvents gave **II** as a pale yellow solid (1.7 g, 90% yield). m.p. 121-122°C (H₂O/Ethanol: 3/1 v/v); ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.17 (s, 1 H), 7.82 (s, 2 H), 4.97 (s, 2 H), 2.41 (bs, 1 H); ¹³C NMR (62.8 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 167.8, 138.6, 138.4, 137.5, 126.2, 102.2, 61.8; elemental analysis calcd (%) for C₇H₆NO₃I (279.03): C 30.13, H 2.16, N 5.02; found: C 30.13, H 2.11, N 4.88.

5-(4-Methoxy-phenyl)-2-nitro-benzyl alcohol 7a 5-iodo-2-nitrobenzyl alcohol **II** (400 mg, 1.43 mmol) in dry toluene (24 mL) was stirred at room temperature under nitrogen for 30 min with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (67 mg, 5.8 mmol, 4 mol %) and sodium carbonate (2.4 mL of 2 M aqueous solution). 4-methoxyphenylboronic acid (468 mg, 3.16 mmol, 2.1 equiv) dissolved

in dry ethanol (2 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was refluxed for 2h30. After cooling to 5°C, 30% hydrogen peroxide was added. Dichloromethane (100 mL) was added. The organic phase was washed with water (2 x 70 mL) and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (2 x 70 mL). Then it was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 60/40 v/v as eluent to give **7a** as a pale yellow solid (280 mg, 78% yield). m.p. 102°C (cyclohexane/ethyl acetate: 94/6 v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.17 (d, 1 H, J=8.5 Hz), 7.91 (d, 1 H, J=2.0 Hz), 7.63 (dd, 1 H, J=8.5 Hz and J=2.0 Hz), 7.59 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 7.00 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 5.03 (s, 2 H), 3.86 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 160.4, 146.7, 145.6, 137.5, 130.8, 128.5, 127.7, 126.0, 125.9, 114.5, 62.9, 55.4; MS (CI, CH₄): m/z 260, 242 (calcd av mass for C₁₄H₁₃NO₄: 259.08); MS (CI, CH₄, HR): m/z 260.0924 (calcd av mass for C₁₄H₁₄NO₄: 260.0923).

5-(4-Methoxy-phenylethynyl)-2-nitro-benzyl alcohol 8a 4-Ethynylanisole (200 mg, 1.5 mmol, 1 equiv) was added to a solution of 5-iodo-2-nitrobenzyl alcohol **II** (422 mg, 1.5 mmol) in deoxygenated piperidine (6 mL) with copper(I) iodide (3 mg, 0.015 mmol, 1 mol %) and tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (44 mg, 0.04 mmol, 2.5 mol %) at 0°C. After stirring for 2 h at room temperature, saturated aqueous solution of ammonium chloride and ether were added. The aqueous layer was extracted twice with ether. The combined organic layers were washed with a hydrochloric acid solution (1.2 M) and dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvent, the brown crude residue was purified by column chromatography on silica gel with dichloromethane/cyclohexane: 95/5 as eluent to give **8a** as a pale yellow solid (376 mg, 89% yield). m.p. 90°C (cyclohexane/ethanol: 4/1 v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.11 (d, 1 H, J=8.5 Hz), 7.87 (d, 1 H, J=1.8 Hz), 7.54 (dd, 1 H, J=8.5 Hz and J=1.8 Hz), 7.49 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 6.90 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 5.00 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H); ¹³C NMR (ppm, 100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 160.3, 145.0, 137.2, 133.4, 132.3, 130.8, 130.3, 125.3, 114.1, 114.0, 94.9, 86.6, 62.4, 55.3; elemental analysis calcd (%) for C₁₆H₁₃NO₄ (283.28): C 67.84, H 4.63, N 4.94; found: C 67.70, H 4.60, N 4.75.

5-(4-Methoxy-phenylethylene)-2-nitro-benzyl alcohol 9a Silver nitrate (311 mg, 1.8 mmol, 1 equiv) was added to a mixture of 5-iodo-2-nitrobenzyl alcohol **II** (500 mg, 1.8 mmol), palladium acetate (8 mg, 0.036 mmol, 0.02 equiv), triphenylphosphine (19 mg, 0.07 mmol, 0.04 equiv), 4-methoxystyrene (0.48 mL, 3.6 mmol, 2 equiv) and triethylamine (0.3 mL, 2.15 mmol, 1.2 equiv) in acetonitrile (5 mL). The solution was refluxed for 5 days. After cooling to room temperature, it was diluted with dichloromethane (5 mL) and filtered. The filtrate was washed with hydrochloric acid (1.2 M). The aqueous phase was extracted twice with dichloromethane. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate. After solvent evaporation, the crude residue was purified by column chromatog-

raphy on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 80/20, 70/30 then 50/50 v/v as eluent. **9a** was obtained as a pale yellow solid (194 mg, 34% yield). m.p. 106°C (cyclohexane/ethanol: 5/1 v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.11 (d, 1 H, J=8.6 Hz), 7.79 (d, 1 H, J=1.7 Hz), 7.51 (dd, 1 H, J=8.6 Hz and J=1.7 Hz), 7.48 (AA'XX', 2 H, J=8.7 Hz), 7.23 (d, 1 H, J=17.0 Hz), 6.98 (d, 1 H, J=17.0 Hz), 6.92 (AA'XX', 2 H, J=8.7 Hz), 5.00 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H), 2.67 (s, 1 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 160.2, 145.4, 143.9, 137.6, 133.0, 128.9, 128.4, 127.1, 125.9, 125.4, 123.9, 114.3, 62.8, 55.3; MS (CI, CH₄): m/z 286 (calcd av mass for C₁₆H₁₅NO₄: 285.1); MS (CI, CH₄, HR): m/z 286.1074 (calcd av mass for C₁₆H₁₆NO₄: 286.1079).

3-Methyl-4-nitrobenzoic acid methyl ester III [?] A solution of 3-methyl 4-nitrobenzoic acid (9.05 g, 50 mmol) and concentrated sulfuric acid (9.8 g, 100 mmol, 2 eq) in methanol (50 mL) was refluxed for 3 h. After cooling, the precipitated solid was filtered and washed three times with cold methanol. After recrystallization in methanol, **III** was obtained as colourless crystals (7.73 g, 79%).

3-Bromomethyl-4-nitrobenzoic acid methyl ester IV [?] A mixture of **III** (7.73 g, 40 mmol), N-bromosuccinimide (10.57 g, 45 mmol, 1.15 eq) and benzoyl peroxide (338 mg, 1.39 mmol, 3.5% eq) in carbon tetrachloride (250 mL) was refluxed for 18 h. After filtration, the filtrate was concentrated until a solid appeared. **IV** was isolated as a colourless solid after filtration (3.28 g, 12 %). Evaporation of the remaining solution gave 7.93 g of a mixture of **IV** (42 %), methyl 3-dibromomethyl 4-nitrobenzoate (31 %) and **III** (27 %).

3-Hydroxymethyl-4-nitrobenzoic acid V A mixture of **IV** (2.11 g, 7.7 mmol), concentrated sulfuric acid (7.56 g, 77 mmol) and water (78 mL) was refluxed overnight [?]. The cooled solution was extracted with ethyl acetate to afford **V** that was used without further purification for the next step (1.28 g, 84%).

3-Acetoxyethyl-4-nitrobenzoic acid VI A solution of **V** (1.93 g, 9.79 mmol), acetic anhydride (2.0 g, 19.6 mmol, 2 eq) and DMAP (4 mg) in tetrahydrofuran (10 mL) was stirred at room temperature for 16 h. After solvent evaporation, ethyl acetate and water were added. The organic layer was acidified to pH=1 with concentrated hydrochloric acid, dried over magnesium sulfate. Essentially pure **VI** was obtained after solvent evaporation (2.17 g, 92%). It was used without further purification for the next step. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.33 (s, 1 H), 8.32–8.12 (m, 2 H), 5.54 (s, 2 H), 2.44 (s, 1 H), 2.21 (s,3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 170.4, 169.2, 150.6, 139.5, 132.6, 131.0, 130.6, 125.4, 62.4, 20.8; MS (CI, C₄H₁₀): m/z (%) 257(39) (M+H₂O), 240 (19) [M+H]⁺, 180 (100).

Acetic acid 5-[2-(4-Methoxyphenyl)-2-oxo-ethylcarbamoyl]-2-nitro-phenyl ester VIII A suspension of **VI** (2.15 g, 9.0 mmol) in thionyl chloride (5 mL) was refluxed for 45 min. Crude acetic acid 5-chlorocarbonyl-2-nitrobenzyl ester **VII** was obtained after evaporation of the thionyl chloride in excess. Dichloromethane filtered over neutral alumina (150 mL) was added and the solution was cooled to 0°C. After addition of 4-methoxy-2'-aminoacetophenone chlorhydrate (1.64 g, 8.1 mmol, 0.9 eq) and potassium carbonate (3.10 g, 22.5 mmol, 2.5 eq), the mixture was stirred at room temperature for 15 h. After pouring onto ice, the organic layer was washed with water, dried over magnesium sulfate and evaporated to yield 3.02 g of crude product. The crude was purified by column chromatography over silica gel by using dichloromethane-ethyl acetate 95/5, then 90/10 as eluent. **VIII** was isolated as a white powder (203 mg, 71%). m. p. 145°C; ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.19 (d, J=8.3 Hz, 1 H), 8.11 (s, 1 H), 8.02 (AA'XX', J=8.6 Hz, 2 H), 7.96 (d, J= 8.3 Hz, 1 H), 7.43 (t, J=3.9 Hz, 1 H), 7.01 (AA'XX', J=8.6 Hz, 2 H), 5.54 (s, 2 H), 4.91 (d, J=3.9 Hz, 2 H), 3.91 (s, 3 H), 2.21 (s, 3 H); ¹H NMR (250 MHz, CD₃SOCD₃, 25°C): δ (ppm)= 9.20 (t, J=3.2 Hz, 1 H), 8.26 (d, J=8.4 Hz, 1 H), 8.15 (s, 1 H), 8.13 (d, J=8.4 Hz, 1 H), 8.08 (AA'XX', J=8.7 Hz, 2 H), 7.10 (AA'XX', J=8.6 Hz, 2 H), 5.46 (s, 2 H), 4.80 (d, J=3.2 Hz, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 2.14 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 192.0, 170.3, 165.1, 164.6, 149.2, 138.7, 132.8, 130.4 (2), 128.3, 127.3, 127.1, 125.5, 114.3 (2), 62.6, 55.6, 46.5, 20.8; MS (CI, C₄H₁₀) m/z (%) 404 (14) (M+H₂O), 388(21), 387(100)[M+H]⁺ (calcd av mass for C₁₉H₁₉N₂O₇ 387.36); elemental analysis calcd (%) for C₁₉H₁₈N₂O₇ (386.36): C 59.07, H 4.70, N 7.25; found: C 59.28, H 4.72, N 7.43.

5-[5-(4-Methoxyphenyl)-2-oxazol-2-yl]-2-nitro-benzyl ester IX A solution of **VIII** (2.747 g, 7.1 mmol) in phosphoryl chloride (10 mL) was refluxed for 70 min. The solution was poured onto ice. The resulting suspension was filtered and the precipitate was washed with water. After drying, the crude solid was purified by column chromatography over silica gel by using dichloromethane-ethyl acetate 90/10 as eluent. After recrystallization in ethanol, **IX** was obtained as yellow crystals (940 mg, 36%). m. p. 150°C; ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.30 (d, ⁵J=1.7 Hz, 1 H), 8.24 (d, J=8.7 Hz, 1 H), 8.16 (dd, J=8.7 Hz and ⁵J=1.7 Hz, 1 H), 7.68 (AA'XX', J=8.8 Hz, 2 H), 7.42 (s, 1 H), 7.01 (AA'XX', J=8.8 Hz, 2 H), 5.58 (s, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 2.23 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 170.3, 160.4, 158.1, 153.0, 147.7, 133.2, 132.2, 126.4, 126.1 (2), 126.0, 125.9, 122.9, 120.1, 114.6 (2), 62.9, 55.4, 20.8; MS (CI, C₄H₁₀) m/z (%) 370 (21), 369 (100) [M+H]⁺ (calcd av mass for C₁₉ H₁₇N₂O₆ MM=369.34), 309 (8); elemental analysis calcd (%) for C₁₉H₁₆N₂O₆ (368.34): C 61.95, H 4.38, N 7.60; found: C 61.39, H 4.37, N 7.63.

{5-[5-(4-Methoxyphenyl)-oxazol-2-yl]-2-nitrophenyl}-methanol 10a A solution of (5-(5'-(4-methoxyphenyl)oxazol-2'yl)-2-nitro-phenyl)methyl acetate **IX** (1.104 g, 3 mmol) and of 1 M sodium hydroxide (6 mL; 6 mmol, 2 eq) in tetrahydrofuran (27 mL) was stirred at room temperature for 16 h.

After solvent evaporation, water and ethyl acetate were added. The organic phase was washed with water, and dried over magnesium sulfate. After solvent evaporation, the crude residue was purified by column chromatography over silica gel by using dichloromethane/ethyl acetate 4/1 as eluent. After recrystallization in ethanol, **10a** was obtained as red-brown crystals (52 mg, 13%). m.p. 179°C; ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.49 (s, 1 H), 8.23 (d, J=8.5 Hz, 1 H), 8.16 (d, J=8.5 Hz, 1 H), 7.69 (AA'XX', J=8.8 Hz, 2 H), 7.42 (s, 1 H), 7.01 (AA'XX', J=8.8 Hz, 2 H), 5.1 (bs, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 2.67 (bs, 1 H); ¹H NMR (250 MHz, CD₃SOCD₃, 25°C): δ (ppm)= 8.53 (s, 1 H), 8.26 (d, J=8.5 Hz, 1 H), 8.19 (d, J=8.5 Hz, 1 H), 7.86 (s, 1 H), 7.84 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 7.12 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 5.80 (t, J=5.6 Hz, 1 H), 4.93 (d, J=5.6 Hz, 2 H), 3.85 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃SOCD₃, 25°C): δ (ppm)= 159.2, 158.0, 152.2, 147.0, 139.7, 131.0, 126.0 (2), 125.6, 125.2, 124.7, 123.4, 119.6, 114.7 (2), 59.8, 55.3; MS (CI, C₄H₁₀) m/z (%) 328 (18), 327 (100) [M+H]⁺ (calcd av mass for C₁₇H₁₅N₂O₅ (327.31)), 295 (22); elemental analysis calcd (%) for C₁₇H₁₄N₂O₅ (326.31): C 62.57, H 4.32, N 8.58; found: C 62.35, H 4.43, N 8.43.

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-chloro-2-nitro-benzene 1b Same as for **4b**. Diethyl azodicarboxylate (1.25 mL, 8 mmol, 1.5 equiv), 5-chloro-2-nitro-benzyl alcohol (Sigma-Aldrich 1.0 g, 5.33 mmol), triphenylphosphine (2.1 g, 8 mmol, 1.5 equiv) and 4-nitrophenol **11** (1.1 g, 8 mmol, 1.5 equiv) in tetrahydrofuran (30 mL). The mixture was refluxed for 15 h. After solvent evaporation, the residue was suspended in methanol (15 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting precipitate was filtered, washed with cold methanol and dried under reduced pressure to give **1b** as a pale yellow powder (852 mg, 51% yield). m.p. 167–169°C (Tetrahydrofuran); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.22 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 8.16 (d, 1 H, J=8.8 Hz), 7.84 (d, 1 H, J=2.3 Hz), 7.47 (dd, 1 H, J=8.8 Hz and J=2.3 Hz), 7.08 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 5.53 (s, 2 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.4, 144.8, 142.3, 141.2, 134.4, 128.9, 128.3, 126.8, 126.1, 114.9, 66.8; elemental analysis calcd (%) for C₁₃H₉ClN₂O₅ (308.67): C 50.58, H 2.94, N 9.08; found: C 50.59, H 3.04, N 9.00.

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-methoxy-2-nitro-benzene 3b Same as for **4b**. Diethyl azodicarboxylate (0.25 mL, 1.4 mmol, 1.5 equiv), 5-methoxy-2-nitro-benzyl alcohol **3a** (200 mg, 1.1 mmol), triphenylphosphine (442 mg, 1.7 mmol, 1.5 equiv) and 4-nitrophenol **11** (228 mg, 1.6 mmol, 1.5 equiv) in tetrahydrofuran (16 mL). The mixture was refluxed for 40 h. After solvent evaporation, the residue was suspended in methanol (10 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting precipitate was filtered, washed with cold methanol and dried under reduced pressure to give **3b** as a yellow powder (131 mg, 40% yield). m.p. 173°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.30 (d, 1 H, J=9.1 Hz), 8.24 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 7.30 (d, 1 H, J=2.8 Hz), 7.09 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 6.95 (dd, 1 H, J=2.8 Hz and J=9.1 Hz), 5.61 (s, 2 H), 3.91 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz,

CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 164.2, 162.8, 142.1, 139.5, 135.5, 128.2, 126.0, 114.9, 113.4, 112.7, 67.6, 56.0; elemental analysis calcd (%) for C₁₄H₁₂N₂O₆ (304.25): C 55.27, H 3.98, N 9.21; found: C 55.30, H 4.09, N 9.06.

1-(4-nitrophenoxyethyl)-4,5-dimethoxy-2-nitro-benzene 4b [?] Diethyl azodicarboxylate (0.5 mL, 3.2 mmol, 1.35 equiv) was added dropwise to a solution of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl alcohol (Sigma-Aldrich, 500 mg, 2.3 mmol), 4-nitrophenol **11** (322 mg, 2.3 mmol, 1 equiv) and triphenylphosphine (832 mg, 3.2 mmol, 1.35 equiv) in tetrahydrofuran (40 mL) at 0°C, under nitrogen atmosphere. Upon completion of the addition, the solution was stirred at room temperature for 14 h and was subsequently refluxed for 6 h. After solvent evaporation, the residue was suspended in ether (30 mL) and was stirred overnight at room temperature. The resulting precipitate was filtered, washed with ether and dried under reduced pressure to give **4b** as a pale yellow solid (645 mg, 84% yield). m.p. 201-203°C (THF); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.24 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 7.79 (s, 1 H), 7.25 (s, 1 H), 7.09 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 5.59 (s, 2 H), 3.98 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.8, 153.9, 148.2, 142.1, 139.1, 127.3, 126.0, 114.9, 109.2, 108.1, 67.6, 56.4, 56.4; elemental analysis calcd (%) for C₁₅H₁₄N₂O₇(334.28): C 53.89, H 4.22, N 8.38; found: C 53.90, H 4.27, N 8.43.

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-amino-2-nitro-benzene 5b Same as for **4b**. Diethyl azodicarboxylate (0.8 mL, 4.4 mmol, 1.35 equiv), 5-amino-2-nitrobenzyl alcohol **5a** (552 mg, 3.3 mmol), triphenylphosphine (1.16 g, 4.4 mmol, 1.35 equiv) and 4-nitrophenol **11** (460 mg, 3.3 mmol, 1 equiv) in tetrahydrofuran (35 mL). The mixture was refluxed for 25 h. After solvent evaporation, the residue was suspended in methanol (15 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting precipitate was filtered, washed with cold methanol and dried under reduced pressure to give **5b** as a brown powder (475 mg, 50% yield). m.p. 209-211°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 8.40 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 8.23 (d, 1 H, J=8.9 Hz), 7.39 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 7.16 (d, 1 H, J=2.5 Hz), 6.88 (dd, 1 H, J=8.9 Hz and J=2.5 Hz), 6.30 (s, 2 H), 5.79 (s, 2 H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 163.9, 155.1, 142.2, 136.4, 135.8, 128.9, 126.1, 115.6, 112.3, 111.6, 68.7; elemental analysis calcd (%) for C₁₃H₁₁N₃O₅ (289.24): C 53.98, H 3.83, N 14.53; found: C 54.10, H 3.88, N 14.34.

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-(N-methylpiperazine)-2-nitro-benzene 6b 1-Methylpiperazine (0.8 mL, 7 mmol, 10 equiv) was added to a solution of 1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-chloro-2-nitrobenzene **1b** (200 mg, 0.65 mmol) in dimethylformamide (8 mL). The solution was heated at 110°C for 2 h. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in dichloromethane. The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of potassium carbonate, and dried over

sodium sulfate. After solvent evaporation, the crude residue was purified by column chromatography on silica gel with dichloromethane/ethanol: 3/2 v/v as eluent. **6b** was obtained as a pale yellow solid (187 mg, 78% yield). m.p. 168–169°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.22 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 8.21 (d, 1 H, J=9.5 Hz), 7.12 (d, 1 H, J=2.8 Hz, J=9.2 Hz), 7.09 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 6.80 (dd, 1 H, J=9.5 Hz and J=2.8 Hz), 5.60 (s, 2 H), 3.44 (t, 4 H, J=5.1 Hz), 2.53 (t, 4 H, J=5.1 Hz), 2.34 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 163.0, 154.3, 141.9, 136.1, 135.2, 128.3, 126.0, 114.9, 111.8, 110.8, 68.3, 54.4, 46.7, 46.0; MS (CI, CH₄): m/z 373 (calcd av mass for C₁₈H₂₀N₄O₅: 372.38); MS (CI, CH₄, HR): m/z 373.1505 (calcd av mass for C₁₈H₂₁N₄O₅: 373.1512).

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-(4-methoxy-phenyl)-2-nitro-benzene 7b Same as for **4b**. Diethyl azodicarboxylate (0.25 mL, 1.4 mmol, 1.35 equiv), 5-(4-methoxy-phenyl)-2-nitro-benzyl alcohol **7a** (274 mg, 1 mmol), triphenylphosphine (374 mg, 1.4 mmol, 1.35 equiv) and 4-nitrophenol **11** (147 mg, 1 mmol, 1 equiv) in tetrahydrofuran (25 mL). The mixture was refluxed for 24 h. After solvent evaporation, the residue was suspended in methanol (10 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting precipitate was filtered, washed with cold methanol and dried under reduced pressure to give **7b** as a yellow powder (118 mg, 31% yield). m.p. 165-167°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.29 (d, 1 H, J=8.6 Hz), 8.25 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 7.98 (d, 1 H, J=2.0 Hz), 7.68 (dd, 1 H, J=8.6 Hz and J=2.0 Hz), 7.56 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 7.12 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 7.02 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 5.65 (s, 2 H), 3.87 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.9, 160.6, 146.9, 144.9, 142.1, 132.9, 130.7, 128.6, 126.4, 126.1, 126.0, 126.0, 114.9, 114.6, 67.6, 55.4; MS (CI, CH₄): m/z 409, 381, 242, 140 (calcd av mass for C₂₀H₁₆N₂O₆: 380.10); MS (CI, CH₄, HR): m/z 380.1012 and 381.1082 (calcd av mass for C₂₀H₁₆N₂O₆: 380.1008 and C₂₀H₁₇N₂O₆: 381.1087).

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-(4-methoxy-phenylethynyl)-2-nitro-benzene 8b Same procedure as for **4b**. Diethyl azodicarboxylate (0.1 mL, 0.69 mmol, 1.35 equiv), 5-(4-methoxy-phenylethynyl)-2-nitro-benzyl alcohol **8a** (145 mg, 0.5 mmol), triphenylphosphine (181 mg, 0.69 mmol, 1.35 equiv) and 4-nitrophenol **11** (71 mg, 0.5 mmol, 1 equiv) in tetrahydrofuran (12 mL). After precipitation in ether (8 mL), **8b** was obtained as a pure pale yellow powder (150 mg, 75% yield). m.p. 169°C (THF); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.26 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 8.21 (d, 1 H, J=8.5 Hz), 7.93 (d, 1 H, J=1.8 Hz), 7.61 (dd, 1 H, J=8.5 Hz and J=1.8 Hz), 7.50 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 7.12 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 6.90 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 5.58 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.8, 160.5, 145.0, 142.1, 133.5, 132.7, 131.2, 130.7, 130.5, 126.0, 125.5, 114.9, 114.2, 113.8, 95.4, 86.5, 67.2, 55.3; elemental analysis calcd (%) for C₂₂H₁₆N₂O₆ (404.37): C 65.34, H 3.99, N 6.93; found: C 65.4, H 3.96, N 6.93.

1-(4-nitrophenoxyethyl)-5-(4-methoxy-phenylethylene)-2-nitro-benzene 9b Same as for **4b**. Diethyl azodicarboxylate (0.21 mL, 1.35 mmol, 1.5 equiv), 5-(4-methoxy-phenylethylene)-2-nitro-benzyl alcohol **9a** (232 mg, 0.9 mmol), triphenylphosphine (335 mg, 1.35 mmol, 1.5 equiv) and 4-nitrophenol **11** (187 mg, 1.35 mmol, 1.5 equiv) in tetrahydrofuran (7 mL). The mixture was refluxed for 48 h. After solvent evaporation, the residue was suspended in methanol (10 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting precipitate was filtered, washed with cold methanol and dried under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 7/3 v/v as eluent, **9b** was obtained as a pale yellow solid (114 mg, 30% yield). m.p. 190-192°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.26 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 8.23 (d, 1 H, J=8.6 Hz), 7.84 (d, 1 H, J=1.8 Hz), 7.61 (dd, 1 H, J=1.8 Hz and J=8.6 Hz), 7.49 (AA'XX', 2 H, J=8.7 Hz), 7.23 (d, 1 H, J=16.3 Hz), 7.13 (AA'XX', 2 H, J=9.2 Hz), 7.00 (d, 1 H, J=16.3 Hz), 6.92 (AA'XX', 2 H, J=8.7 Hz), 5.62 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.9, 160.3, 144.6, 144.1, 142.1, 133.5, 133.0, 128.7, 128.5, 126.1, 126.1, 125.7, 125.4, 123.8, 114.9, 114.3, 67.6, 55.3; MS (CI, CH₄): m/z 407, 270, 140 (calcd av mass for C₂₂H₁₈N₂O₆: 406.12); MS (CI, CH₄, HR): m/z 407.1242 (calcd av mass for C₂₂H₁₉N₂O₆: 407.1243).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 12 [?] **12** was prepared according to the literature procedure from Knoevenagel condensation between 4-diethylamine salicylaldehyde and diethylmalonate and additional hydrolysis of the resulting ethyl ester. The carboxylic acid was purified by precipitation in ether. Yield: 65%.

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl ester 4c Dicyclohexycarbodiimide (78.4 mg, 0.38 mmol, 1 equiv) was added at 0°C under nitrogen to a stirred solution of 7-diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (100 mg, 0.38 mmol), 4,5-dimethoxybenzyl alcohol (81 mg, 0.38 mmol, 1 equiv) and 4-dimethylaminopyridine (47 mg, 0.38 mmol, 1 equiv) in anhydrous dichloromethane (10 mL). The mixture was stirred for 10 min at 0°C and for 12 h at 20°C. The organic phase was washed with 1.2 M hydrochloric acid (2 x 10 mL) and with saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate (2 x 10 mL). It was subsequently dried over magnesium sulfate and evaporated. The resulting residue was suspended in methanol. The precipitate was filtered, washed with cold methanol and dried under reduced pressure to give **4c** as a yellow powder (136 mg, 78%). m.p. 243°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.60 (s, 1 H), 8.04 (s, 1 H), 7.77 (s, 1 H), 7.40 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 6.63 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.0 Hz), 6.48 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 5.79 (s, 2 H), 4.12 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 3.45 (q, 4 H, J=7.1 Hz), 1.24 (t, 6 H, J=7.1 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 164.4, 158.7, 158.6, 154.4, 153.2, 150.6, 147.6, 138.6, 131.3, 128.5, 110.5, 109.7, 108.0, 107.9, 107.7, 96.6, 64.3, 57.1, 56.3, 45.2, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 457 (calcd av mass for C₂₃H₂₄N₂O₈: 456.46); MS (CI, NH₃, HR): m/z 457.1608 (calcd for C₂₃H₂₅N₂O₈: 457.1611).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 2,2,2-trifluoro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-ethyl ester 4Fc Same procedure as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (100 mg, 0.38 mmol), 2,2,2-trifluoro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4Fa** (135 mg, 0.48 mmol, 1.25 equiv), 4-dimethylaminopyridine (47 mg, 0.38 mmol, 1 equiv) and dicyclohexycarbodiimide (78.4 mg, 0.38 mmol, 1 equiv). **4Fc** as a yellow powder (126 mg, 63%). m.p. 178–180°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.52 (s, 1 H), 7.88 (s, 1 H), 7.76 (s, 1 H), 7.76 (q, 1 H, J=6.0 Hz), 7.43 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 6.67 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.0 Hz), 6.50 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 4.12 (s, 3 H), 4.01 (s, 3 H), 3.50 (q, 4 H, J=7.2 Hz), 1.28 (t, 6 H, J=7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.9, 158.9, 157.9, 153.7, 153.5, 150.9, 149.4, 140.7, 131.5, 124.4, 121.4, 111.9, 109.9, 108.1, 107.8, 106.7, 96.6, 67.3 (q, ²J=33 Hz), 57.0, 56.4, 45.2, 29.7, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 525 (calcd av mass for C₂₄H₂₃F₃N₂O₈: 524.44); MS (CI, CH₄, HR): m/z 525.1483 (calcd for C₂₄H₂₃F₃N₂O₈: 525.1485); elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₂₃F₃N₂O₈ (524.44): C 54.97, H 4.42, N 5.34; found: C 54.48, H 4.78, N 5.23.

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 2,2,2-trichloro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-ethyl ester 4Clc Same as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (100 mg, 0.38 mmol), 2,2,2-trichloro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4Cla** (159 mg, 0.48 mmol, 1.25 equiv), 4-dimethylaminopyridine (47 mg, 0.38 mmol, 1 equiv) and dicyclohexycarbodiimide (78.4 mg, 0.38 mmol, 1 equiv). **4Clc** as a yellow powder (118 mg, 54%). m.p. 190–194°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.49 (s, 1 H), 8.11 (s, 1 H), 7.99 (s, 1 H), 7.63 (s, 1 H), 7.39 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 6.62 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.0 Hz), 6.45 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 4.07 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 3.46 (q, 4 H, J=7.1 Hz), 1.23 (t, 6 H, J=7.1 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.8, 158.9, 157.9, 153.4, 152.5, 150.7, 149.3, 142.2, 131.5, 122.3, 113.4, 109.8, 107.9, 107.8, 107.0, 96.6, 77.3, 56.9, 56.4, 45.2, 29.7, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 573 (calcd av mass for C₂₄H₂₃Cl₃N₂O₈: 573.82); MS (CI, CH₄, HR): m/z 573.0596 and 575.0565 (calcd for C₂₄H₂₄Cl₃N₂O₈: 573.0598 and 575.0573); elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₂₃Cl₃N₂O₈ (573.82): C 50.24, H 4.04, N 4.88; found: C 49.95, H 4.30, N 4.68.

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 2,2,2-tribromo-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-ethyl ester 4Brc Same procedure as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (100 mg, 0.38 mmol), 2,2,2-tribromo-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4Bra** (232 mg, 0.5 mmol, 1.3 equiv), 4-dimethylaminopyridine (47 mg, 0.38 mmol, 1 equiv) and dicyclohexycarbodiimide (78.4 mg, 0.38 mmol, 1 equiv). **4Brc** as a yellow powder (161 mg, 60%). m.p. 260–262°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.55 (s, 1 H), 8.17 (s, 1 H), 8.13 (s, 1 H), 7.68 (s, 1H), 7.43 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 6.66 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.0 Hz), 6.50 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 4.12 (s, 3 H), 4.01 (s, 3 H), 3.50 (q, 4 H, J=7.2 Hz), 1.28 (t, 6 H, J=7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz,

CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.6, 158.9, 157.9, 153.4, 152.4, 150.6, 149.3, 142.5, 131.5, 123.2, 113.5, 109.8, 107.9, 107.8, 107.2, 96.6, 77.5, 56.9, 56.4, 45.2, 29.7, 12.4; MS (CI, NH₃): m/z 707 and 709 (calcd av mass for C₂₄H₂₃Br₃N₂O₈: 707.90); MS (CI, NH₃, HR): m/z 706.9060 and 708.9030 (calcd for C₂₄H₂₄Br₃N₂O₈: 706.9064 and 708.9046).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid cyano- (4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-methyl ester 4CNc Same procedure as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (52 mg, 0.20 mmol), 2,2,2-trichloro-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **4CNa** (60 mg, 0.25 mmol, 1.25 equiv), 4-dimethylaminopyridine (24.5 mg, 0.20 mmol, 1 equiv) and dicyclohexycarbodiimide (41.3 mg, 0.20 mmol, 1 equiv). **4CNc** as a yellow powder (60 mg, 62%). m.p. 219–222°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.63 (s, 1 H), 8.20 (s, 1 H), 7.86 (s, 1 H), 7.47 (d, 1 H, J=9.1 Hz), 7.28 (s, 1 H), 6.69 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.1 Hz), 6.52 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 4.20 (s, 3 H), 4.04 (s, 3 H), 3.52 (q, 4 H, J=7.2 Hz), 1.29 (t, 6 H, J=7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 162.9, 159.1, 158.1, 154.6, 153.8, 151.7, 149.4, 138.8, 131.8, 122.9, 115.3, 111.0, 110.1, 108.1, 108.0, 105.8, 96.6, 60.4, 57.3, 56.5, 45.3, 12.4; MS (CI, NH₃): m/z 482 (calcd av mass for C₂₄H₂₃N₃O₈: 481.45).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-amino-2-nitro-benzyl ester 5c Same procedure as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (115 mg, 0.4 mmol), 5-amino-2-nitrobenzyl alcohol **5a** (74 mg, 0.4 mmol, 1 eq), 4-dimethylaminopyridine (45 mg, 0.4 mmol, 1 eq) and dicyclohexycarbodiimide (91 mg, 0.4 mmol, 1 eq). **5c** as a yellow powder (130 mg, 65%). m. p. 235–237°C (methanol); ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOCD₃, 25°C): δ (ppm)= 8.89 (s, 1 H), 8.24 (d, 1 H, J=9.1 Hz), 7.90 (d, 1 H, J=9.1 Hz), 7.02 (dd, 1 H, J=9.1 Hz and J=2.3 Hz), 6.99 (d, 1 H, J=2.3 Hz), 6.79 (m, 2 H), 5.80 (s, 2 H), 3.71 (q, 4 H, J=7.0 Hz), 1.36 (t, 6 H, J=7.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃SOCD₃, 25°C): δ (ppm)= 162.8, 158.2, 157.0, 155.1, 153.0, 149.7, 136.4, 133.9, 132.0, 128.7, 111.5, 111.5, 109.9, 107.0, 106.4, 95.8, 63.5, 44.3, 12.3; MS (CI, NH₃): m/z 412 (calcd av mass for C₂₁H₂₁N₃O₆: 411.41); MS (FAB, HR): m/z 412.1514 (calcd for C₂₁H₂₂N₃O₆: 412.1509).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-iodo-2-nitrobenzyl ester IIc Same procedure as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (439 mg, 1.7 mmol), 5-iodo-2-nitrobenzyl alcohol **II** (585 mg, 2.1 mmol, 1.25 equiv), 4-dimethylaminopyridine (205 mg, 1.7 mmol, 1 equiv) and dicyclohexycarbodiimide (347 mg, 1.7 mmol, 1 equiv). **IIc** as a yellow powder (460 mg, 52%). m.p. 117.5–178°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.50 (m, 2 H), 7.84 (s, 2 H), 7.39 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 6.62 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.0 Hz), 6.47 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 5.73 (s, 2 H), 3.46 (q, 4 H, J=7.1 Hz), 1.24 (t, 6 H, J=7.1 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 163.9, 158.7, 158.2, 153.2, 150.2, 146.3, 138.3, 137.7, 134.3, 131.3, 126.0, 109.7, 107.8, 107.6, 102.3,

96.6, 62.8, 45.1, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 523, 279, 262 (calcd av mass for C₂₁H₁₉IN₂O₆: 522.29).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-(4-methoxy-phenylethynyl)-2-nitrobenzyl ester 8c 4-Ethynylanisole (0.44 mL, 0.34 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of 7-diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-iodo-2-nitrobenzyl ester **IIc** (150 mg, 0.29 mmol) in deoxygenated piperidine (1 mL) with copper(I) iodide (2.7 mg, 0.014 mmol, 5 mol %) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (33 mg, 0.03 mmol, 10 mol %) at 0°C. After stirring for 4 h at room temperature, saturated aqueous solution of ammonium chloride and ether were added. The aqueous layer was extracted twice with dichloromethane. The combined organic layers were washed with a hydrochloric acid solution (1.2 M) and dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvent, the brown crude residue was purified by column chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 3/2 v/v as eluent to give **8c** as a pale yellow solid (92 mg, 61% yield). m.p. 193–194°C (ethyl acetate); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.50 (s, 1 H), 8.13 (d, 1 H, J=8.5 Hz), 8.02 (s, 1 H), 7.56 (d, 1 H, J=8.5 Hz), 7.50 (d, 2 H, J=8.7 Hz), 7.38 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 6.88 (d, 2 H, J=8.7 Hz), 6.61 (dd, 1 H, J=2.2 Hz and J=9.0 Hz), 6.48 (d, 1 H, J=2.2 Hz), 5.77 (s, 2 H), 3.83 (s, 3 H), 3.45 (q, 4 H, J=7 Hz), 1.24 (t, 6 H, J=7 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 163.9, 160.3, 158.7, 158.1, 153.1, 150.1, 145.6, 133.5, 133.0, 131.8, 131.3, 131.0, 130.2, 125.2, 114.2, 114.0, 109.6, 107.8, 96.6, 94.9, 86.7, 63.4, 63.3, 55.3, 45.1, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 527 (calcd av mass for C₃₀H₂₆N₂O₇: 526.24); MS (CI, CH₄, HR): m/z 527.1815 (calcd for C₃₀H₂₇N₂O₇: 527.1818).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-(4-Methoxy-phenylethylene)-2-nitrobenzyl ester 9c Silver nitrate (89 mg, 0.53 mmol, 1 equiv) was added to a mixture of 7-diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-iodo-2-nitrobenzyl ester **IIc** (275 mg, 0.53 mmol), palladium acetate (2.7 mg, 0.01 mmol, 0.02 equiv), triphenylphosphine (5.5 mg, 0.02 mmol, 0.04 equiv), 4-methoxystyrene (0.48 mL, 3.6 mmol, 2 equiv) and triethylamine (0.1 mL, 0.63 mmol, 1.2 equiv) in acetonitrile (3 mL). The solution was refluxed for 6 days, then diluted with dichloromethane (5 mL) and filtered. The filtrate was washed with hydrochloric acid (1.2 M). The aqueous phase was extracted twice with dichloromethane. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 3/2 v/v then dichloromethane as eluent. **9c** was obtained as a yellow solid (120 mg, 43% yield). m. p. 203–205°C (ethyl acetate); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.52 (s, 1 H), 8.29 (d, 1 H, J=1.4 Hz), 8.15 (d, 1 H, J=8.5 Hz), 7.54–7.49 (m, 3 H), 7.39 (d, 1 H, J=16.3 Hz), 7.38 (d, 1 H, J=9.0 Hz), 7.01 (d, 1 H, J=16.3 Hz), 6.90 (AA'XX', 2 H, J=8.7 Hz), 6.61 (dd, 1 H, J=2.4 Hz and J=9.0 Hz), 6.48 (d, 1 H, J=2.4 Hz), 5.8 (s, 2 H), 3.83 (s, 3 H), 3.45 (q, 4 H, J=7.0 Hz), 1.24 (t, 6 H, J=7.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 164.2, 160.0, 158.7, 158.3, 153.1,

150.2, 144.6, 144.0, 133.5, 133.3, 131.3, 129.1, 128.5, 126.4, 125.7, 125.2, 124.0, 114.1, 109.6, 108.0, 107.8, 96.6, 63.9, 55.3, 45.1, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 529 (calcd av mass for C₃₀H₂₈N₂O₇: 528.57); MS (CI, CH₄, HR): m/z 529.1970 (calcd for C₃₀H₂₉N₂O₇: 529.1975).

7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid 5-[5-(4-methoxy-phenyl)-oxazol-2-yl]-2-nitro-benzyl ester 10c Same procedure as for **4c**. 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid **12** (64 mg, 0.24 mmol), 5-[5-(4-methoxy-phenyl)-oxazol-2-yl]-2-nitro-phenyl-methanol **10a** (100 mg, 0.31 mmol, 1.25 eq), 4-dimethylaminopyridine (30 mg, 0.24 mmol, 1 eq) and dicyclohexycarbodiimide (50 mg, 0.24 mmol, 1 eq). **10c** as a yellow powder (53 mg, 40%). m. p. 207–209°C (methanol); ¹H NMR (ppm, 400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 8.81 (s, 1 H), 8.54 (s, 1 H), 8.26 (d, 1 H, J=8.6 Hz), 8.18 (dd, 1 H, J=8.6 Hz and J=1.6 Hz), 7.76 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 7.40 (s, 1 H), 7.39 (d, 1 H, J=8.9 Hz), 6.96 (AA'XX', 2 H, J=8.8 Hz), 6.62 (dd, 1 H, J=2.3 Hz and J=8.9 Hz), 6.46 (d, 1 H, J=2.3 Hz), 5.86 (s, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 3.46 (q, 4 H, J=7.1 Hz), 1.25 (t, 6 H, J=7.1 Hz); ¹³C NMR (ppm, 100 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 164.0, 160.1, 158.8, 158.2, 158.1, 153.1, 152.9, 150.1, 147.0, 133.9, 132.5, 131.4, 126.6, 126.2, 125.8, 125.6, 122.8, 120.3, 114.5, 109.7, 108.0, 107.8, 96.6, 63.5, 55.3, 45.1, 12.4; MS (CI, CH₄): m/z 570 (calcd av mass for C₃₁H₂₇N₃O₈: 569.56); MS (CI, CH₄, HR): m/z 570.1873 (calcd for C₃₁H₂₈N₃O₈: 570.1876).

Article

Reporting two-photon uncaging with the efficient 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging group.

Gagey N, Neveu P, Jullien L.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2007**, *46*, 2467–2469.

Contribution:

- exploitation des expériences de photodéprotection à un photon (avec Nathalie Gagey).
- conception, réalisation et exploitation des expériences de photodéprotection à deux photons (avec Nathalie Gagey).
- participation à l'écriture de l'article.

Two-Photon Uncaging with the Efficient 3,5-Dibromo-2,4-dihydroxycinnamic Caging Group**

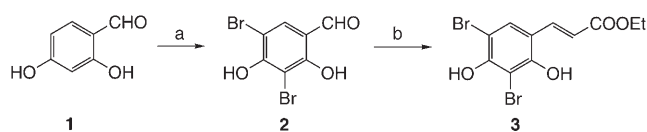
Nathalie Gagey, Pierre Neveu, and Ludovic Jullien*

Cells constantly adjust the concentrations of their components in response to interactions with the environment. Therefore, influencing cell biology requires versatile tools to deliver a variety of chemicals. Apart from passive permeation, microinjection has been the most widely used delivery method. However, its spatial resolution is poor unless injection is performed invasively through the cell membrane. Two-photon photoactivation has been envisioned as a finely tunable noninvasive alternative^[1–3] mimicking an “optical syringe” with submicrometer resolution. Here two major issues are the action cross section of two-photon uncaging and quantification of delivery. To avoid detrimental effects, the cross section should be as large as possible to reduce the illumination power needed to release a given amount of effector. For application in complex systems (e.g., a living organism) with unknown characteristics (e.g., volume, diffusion coefficients, optical homogeneity), quantification should ideally be performed during each uncaging event. Here we show how the above tasks can be performed with an appropriately designed photolabile moiety: Systematically nonfluorescent in the caged substrate, this photolabile moiety transforms on photoactivation into a water-soluble, strongly fluorescent coumarin that reports on the release of the desired chemical.^[4] Quantitative analysis is thus simply achieved by recording fluorescence emission after uncaging at the targeted site.

There has been constant development of new caging groups aimed at improving their photophysical and photochemical characteristics.^[5] Surprisingly, real-time quantification of uncaging has not attracted much attention: In contrast to *in vitro* conditions, studies are generally not quantitative *in vivo*. The *ortho*-hydroxycinnamic caging platform introduced by Porter et al.^[6] provides an attractive means to fulfill this

goal. In contrast to the photoreleased coumarin coproduct, the caged substrate does not fluoresce. Moreover, the *ortho*-hydroxycinnamic backbone is favorable for designing caging groups for specific demands. The photophysics/photochemistry with one- and two-photon excitation of such donor-acceptor ethylenic systems^[7,8] and the formation of the fluorescent coumarin reporter^[9] are well documented. In contrast to other systems,^[10] syntheses are short and easy. We here report on the 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging platform, which was optimized in terms of solubility and photophysical/photochemical properties for quantitative implementation of the optical-syringe strategy at the single-cell level. The relevance of these properties was tested by using zebrafish embryos as a model system.

Alcohols and amines can be photoreleased from their respective esters^[6] and amides^[11,12] by using the *ortho*-hydroxycinnamic strategy. For characterization of the caging moiety, we chose ethyl 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamate (**3**) as a model releasing an alcohol (e.g., ethanol, **5**) on illumination (Figure 1 a). Ester **3** is efficiently synthesized in two steps (Scheme 1): Commercially available 2,4-dihydroxy-



Scheme 1. Two-step synthesis of ethyl 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamate (**3**). a) Br₂, AcOH, 60%; b) Ph₃P=CHCOOEt, toluene, 60%.

benzaldehyde (**1**) is first brominated twice with bromine in acetic acid to give 3,5-dibromo-2,4-dihydroxybenzaldehyde (**2**) in 60% yield, which is subsequently condensed with ethyl triphenylphosphoranylidenacetate in toluene to provide **3** with the desired *E* configuration (60% yield).

The 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging group is weakly acidic: In water at 293 K it exhibits a first protonation constant of $pK_{a,1}(\mathbf{3}) = 5.0 \pm 0.1$, which is within the range of 4.5–7.4 relevant to biological media. Around neutral pH, as in a cell, caged substrate **3** exchanges between its acidic uncharged phenol state, which makes it soluble in a lipophilic environment such as a bilayer, and its basic, negatively charged phenolate form, which confers solubility in water. This dual solubility was introduced to facilitate the permeation of uncharged substrates caged with the 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic moiety inside targeted cells embedded in a whole organism.

The caged substrate **3** forms thermally stable aqueous solutions at neutral pH at room temperature. These solutions strongly absorb light beyond 350 nm when **3** is in its anionic

[*] Dipl.-Chem. N. Gagey, Dipl.-Chem. P. Neveu, Prof. Dr. L. Jullien
Département de Chimie (C.N.R.S. U.M.R. 8640)
École Normale Supérieure
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05 (France)
Fax: (+33) 1-4432-3325
E-mail: ludovic.jullien@ens.fr
Homepage: <http://www.chimie.ens.fr>

Dipl.-Chem. P. Neveu
Laboratoire de Physique Statistique (C.N.R.S. U.M.R. 8550)
École Normale Supérieure
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05 (France)

[**] Prof. Sophie Vríz is gratefully acknowledged for generous gifts of zebrafish embryos. Dr. Jean-François Allemand is acknowledged for interfacing the spectrograph. This work was supported by ARC 2005 (contract no. 3787).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

basic state: $\epsilon_3(\lambda_{\max}=369 \text{ nm})=2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at pH 7.0 (Figure 2a). At the same pH, **3** is almost nonfluorescent on excitation at $\lambda_{\text{exc}}=350 \text{ nm}$: We obtained $\Phi_{\text{F}}^1(\mathbf{3})=0.01$ for its quantum yield of fluorescence. Illumination of **3** initiates a

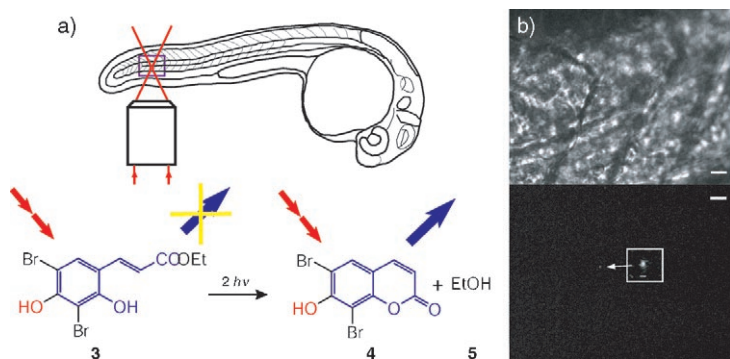


Figure 1. Optical-syringe strategy (a zebrafish embryo is used for illustration). The embryo is incubated in a solution of a nonfluorescent and biologically inactive caged precursor **3** (here $10 \mu\text{M}$ ethyl 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamate) that penetrates the whole organism. Then the embryo is submitted to two-photon excitation by focusing a laser beam (red arrows) in the caudal-fin area (a; the bonds involved in the *ortho*-hydroxycinnamic caging platform and the deprotonated hydroxy group at neutral pH are shown in blue and red, respectively). Local light absorption leads to uncaging of the biologically active substrate (here ethanol, **5**) in the targeted cell. Its final concentration is obtained by measuring the intensity of fluorescence emission from the 6,8-dibromo-7-hydroxycoumarin (**4**) that is formed as coproduct on uncaging in the single illuminated cell (b; top: bright-field image, scale bar: $10 \mu\text{m}$; bottom: focal spot of two-photon excitation, scale bar $10 \mu\text{m}$ and $1 \mu\text{m}$ (inset); both images were taken with a regular CCD camera).

cascade of reactions:^[6] *trans-cis* photoisomerization is followed by thermally driven lactonization leading to quantitative release of the desired substrate **5** and 6,8-dibromo-7-hydroxycoumarin (**4**; Figure 1a), as evidenced by ^1H NMR spectroscopy and UV/Vis absorption. The measured quantum yield of uncaging after one-photon excitation of $\Phi_{\text{u}}^{(1)}=0.05$ gives rise to an uncaging action cross section for one-photon excitation at $\lambda_{\max}=369 \text{ nm}$ of $\epsilon_3\Phi_{\text{u}}^{(1)}=1250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Such a value exceeds by a factor of 40 the uncaging action cross section for the most popular 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl photolabile protecting group^[10] and satisfactorily compares with the most efficient caging groups reported to date.^[2,3,13–15]

To facilitate implementation of the optical-syringe strategy, uncaging and excitation of the reporting fluorescent molecule should be done with the same excitation source. Coumarin **4** and caged substrate **3** do absorb light in the same wavelength range ($\epsilon_4(\lambda_{\max}=377 \text{ nm})=2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). However, **4** exhibits intense fluorescence emission (quantum yield of fluorescence $\Phi_{\text{F}}^{(1)}(\mathbf{4})=0.65 \pm 0.05$; emission peaks at $\lambda_{\text{em}}=456 \text{ nm}$, Figure 2b), in contrast to **3**. Note also that caged substrate **3** and coumarin coproduct **4** essentially exhibit similar acid–base behavior ($\text{p}K_{\text{a}}(\mathbf{4})=4.7 \pm 0.1$ in water at 293 K). In particular, the water solubility of **4** at neutral pH is significant for reliable quantification of uncaging based on fluorescence emission.

Similar behavior is observed on two-photon excitation in the wavelength range of 720–800 nm. Smooth formation of fluorescent coumarin **4** is evidenced by the analysis of the rise of fluorescence emission on illumination of a **3** solution with a Ti-sapphire pulsed laser. Its brightness $\delta\Phi_{\text{F}}^{(2)}$ after two-photon excitation lies in the 1-GM range ($1 \text{ GM}=10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1}$) between 720 and 790 nm (see Figure 2a) and thus makes coumarin **4** a satisfactory uncaging reporter with two-photon excitation. Figure 2a also displays the uncaging-action cross-section spectrum of **3** with two-photon excitation in the same wavelength range: $\delta_{\text{u}}\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\lambda_{\text{exc}}^{(2)}, \mathbf{3})$ peaks at 1.6 GM at 750 nm, which is an order of magnitude larger than the limit of 0.1 GM that was claimed to be the lowest value relevant for biological applications.^[2] This value makes the *ortho*-hydroxycinnamic caging platform one of the most efficient available to date.^[2,3,14–16]

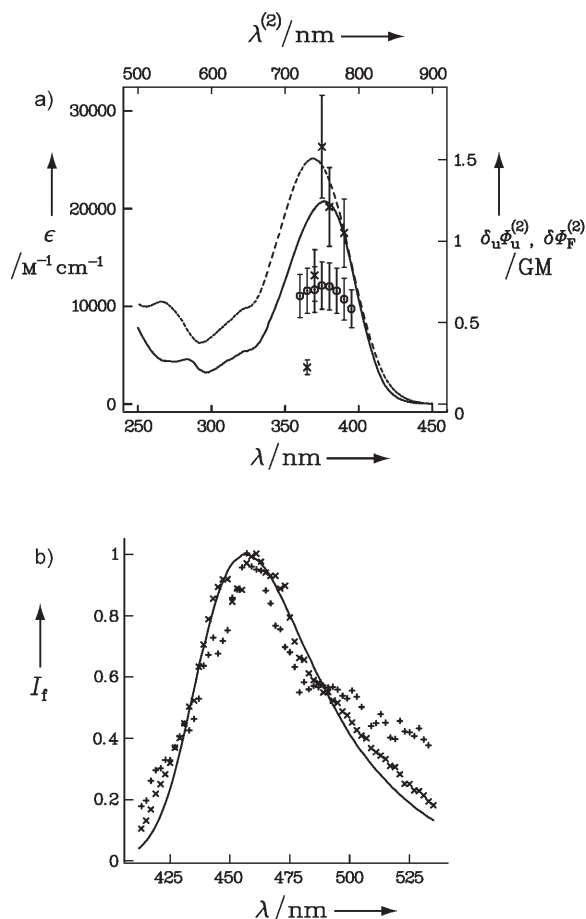


Figure 2. Photophysical and photochemical properties of **3** and **4** in vitro and in vivo. a) Single-photon absorption spectra: molar absorption coefficients $\epsilon(\lambda)$ for **3** (dashed line) and **4** (solid line); cross sections of **3** uncaging and fluorescence after two-photon excitation: $\delta_{\text{u}}\Phi_{\text{u}}^{(2)}(\lambda^{(2)})$ (x) and $\delta\Phi_{\text{F}}^{(2)}(\lambda^{(2)})$ (o). b) Normalized steady-state fluorescence emission spectra of **4** with one- (—) and two-photon excitation (x) ($\lambda_{\text{exc}}=350 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{exc}}^{(2)}=750 \text{ nm}$). The normalized final steady-state fluorescence emission spectrum with two-photon excitation arising from the targeted cell in vivo is displayed as plus signs (+).

Having quantitatively characterized the behavior of the caged substrate **3** in vitro, we checked that the protecting group was suitable for biological applications in a living organism. We chose the zebrafish, which seems particularly promising for the use of light to control biological activity: its embryo is transparent, unpigmented strains are available, and it has recently emerged as an attractive model animal for numerous studies.^[17] We incubated a zebrafish embryo at the 10–15-somite stage in a 10 μM solution of **3** for 60 min and illuminated the caudal-fin area at 750 nm (Figure 1 a). Figure 2 b displays the fluorescence emission spectra with two-photon excitation recorded within the targeted embryo cell and the corresponding spectrum of **4** in water. The good agreement between the spectra suggests that the emitting fluorophore is indeed coumarin **4** in an aqueous environment. Then the emission intensity from the fluorescent cell can be converted to **4** concentration by using the **4** emission rate per molecule measured by fluorescence correlation spectroscopy after two-photon excitation. We found values in the 10 μM range which suggest that the initial intracellular concentration of caged precursor **3** was essentially similar to the concentration of the incubating solution. As shown in Figure 1 b, the targeted single cell can be easily identified by its final strong fluorescence emission.

Thus, the 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging platform seems promising for implementing the optical-syringe approach in vivo. The solubility of the 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic moiety favors cell permeation. Its robust photophysical and photochemical properties after two-photon excitation put this caging group among the best available for substrate uncaging in biological samples. Quantitative control of delivery can be achieved by recording fluorescence emission from the water-soluble coumarin coproduct **4** that reports on the concentration of photo-released substrate.

Received: November 10, 2006

Revised: December 15, 2006

Published online: February 20, 2007

Keywords: donor–acceptor systems · fluorescence · photochemistry · photolysis · two-photon excitation

- [1] S. B. Cambridge, R. L. Davis, J. S. Minden, *Science* **1997**, *277*, 825–828.
- [2] T. Furuta, S. S. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193–1200
- [3] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. Barsotti, G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [4] Uncaging that occurs with an increase in fluorescence associated with the release of the desired substrate was already reported (see, for instance: V. Hagen, S. Frings, J. Bendig, D. Lorenz, B. Wiesner, U. Benjamin Kaupp, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3775–3777; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3625–3628). However, the absence of fluorescence emission in the caged precursor was associated with the quenching of coumarin fluorescence by the substrate moiety. This behavior is markedly different from the present approach, in which the difference in brightness is expected to be systematically large between the caged substrate and the released coumarin coproduct whatever the substrate moiety.
- [5] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142.
- [6] A. D. Turner, S. V. Pizzo, G. Rozakis, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 244–250.
- [7] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481–491.
- [8] I. Burghardt, L. S. Cederbaum, J. T. Hynes, *Faraday Discuss.* **2004**, *127*, 395–411.
- [9] R. Hershfield, G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7359–7369.
- [10] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [11] B. H. Wang, A. Zheng, *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 715–718.
- [12] H. Li, J. H. Yang, N. A. Porter, *J. Photochem. Photobiol. A* **2005**, *169*, 289–297.
- [13] M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou, J. E. Corrie, D. Ogden, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *112*, 29–42.
- [14] M. Matsuzaki, G. C. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [15] A. Specht, J.-S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690–1695.
- [16] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [17] L. I. Zon, R. T. Peterson, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 35–44.



Supporting Information

© Wiley-VCH 2007

69451 Weinheim, Germany

Reporting Two-Photon Uncaging with the Efficient 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic Caging Group

Nathalie Gagey,^[a] Pierre Neveu,^[a,b] Ludovic Jullien^{[a],*}

^[a] *Dipl. N. Gagey, Dipl. P. Neveu, Prof. Dr. L. Jullien,
Département de Chimie (C.N.R.S. U.M.R. 8640), École Normale Supérieure,
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France,*

Fax: (+33) 1 44 32 33 25, E-mail: Ludovic.Jullien@ens.fr

^[b] *Dipl. P. Neveu,*

*Laboratoire de Physique Statistique (C.N.R.S. U.M.R. 8550), École Normale Supérieure,
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France*

Experimental Section

Syntheses **cA**: $C_{11}H_{10}Br_2O_4$ (365.9 g.mol⁻¹). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 7.81 (d, 1H, ³J(H,H) = 16.1 Hz), 7.60 (s, 1H), 6.47 (d, 1H, ³J(H,H) = 16.1 Hz), 6.07 (bs, 2H, OH), 4.22 (q, 2H, ³J(H,H) = 7.0 Hz), 1.33 (t, 3H, ³J(H,H) = 7.0 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 167.3, 154.2, 153.7, 138.7, 131.6, 118.8, 117.8, 102.1, 101.8, 60.7, 14.6. Elemental Analysis: (%) for $C_{11}H_{10}O_4Br_2$ (365.9): C 36.10, H 2.75; found : C 36.06, H 2.63; Mass spectrometry: MS (CI, CH₄): m/z 367 [M+1]; MS (CI, CH₄, HR): m/z 364.9024, 366.9006 and 368.8992 (calcd mass for $C_{11}H_{10}O_4Br_2$: 364.9024, 366.9004 and 368.8985); **F** (formed as a by-product during **cA** synthesis): $C_9H_4Br_2O_3$ (319.9 g.mol⁻¹). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm)= 7.64 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, ³J(H,H) = 9.5 Hz), 6.38 (s, 1H, OH), 6.34 (d, 1H, ³J(H,H) = 9.5 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃, 25°C): δ (ppm)= 159.8, 154.7, 152.7, 143.7, 131.6, 115.2, 115.0, 106.7, 99.4; Mass spectrometry: MS (CI, CH₄): m/z 321 [M+1]; MS (CI, CH₄, HR): m/z 318.8611, 320.8587 and 322.8549 (calcd mass for $C_9H_5O_3Br_2$: 318.8605, 320.8585 and 322.8566);

Solutions Except for pK_a measurements performed in the Britton-Robinson buffer [1] (acetic acid, boric acid, phosphoric acid) at 0.1 M, the present *in vitro* experiments were made in CH₃CN/20 mM Tris pH=7 100 mM NaCl buffer 1:1 v:v (the presence of acetonitrile does not introduce any significant alteration of the photophysical and photochemical properties of **cA** with regard to pure water). No **cA** thermal hydrolysis was ever observed at the time scale of the present experiments (24 h at 293 K).

One-photon excitation The UV/Vis absorption spectra were recorded on a Kontron Uvikon-940 spectrophotometer. Their dependences on pH were analyzed with the *SPECFIT/32TM* Global Analysis System (Version 3.0 for 32-bit Windows systems) to extract protonation constants of **cA** and **F** [2]. The emission spectra were obtained on a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorometer. The overall fluorescence quantum yields after one-photon excitation $\Phi_F^{(1)}$ were calculated using quinine sulfate in 0.1 M H₂SO₄ with $\Phi_{ref}^{(1)} = 0.55$ as a standard fluorophore. [3]

F formation from **cA** photoisomerization was evidenced either by ¹H-NMR (illumination with 6 W 365 nm UV lamp, Fisher Bioblock, above a cuvette containing $V = 2.5$ mL of illuminated solution) or UV-Vis absorption during the experiments devoted to analyze the kinetics of **cA** photoisomerization (continuous illumination with the 75 W xenon lamp of the spectrofluorometer at $\lambda_{exc}=350$ nm on 2.5 mL samples in 1×1 cm² quartz fluorescence cuvettes under constant stirring). The quantum yield of uncaging after one-photon excitation $\Phi_u^{(1)}$ was extracted from the time dependence of fluorescence intensity after calibration of the incident light intensity as in reference [4].

Two-photon excitation The brightness with two-photon excitation was recorded with a home built set-up [5–7] using the reported excitation spectrum of fluorescein for calibration [8]. Illumination comes from a mode-locked titanium-sapphire laser (Mira pumped by Verdi, Coherent). Filters and dichroic were purchased from Omega filters or Chroma. Fluorescence photons were collected with an Olympus UPlanApo 60 \times 1.2 NA water immersion objective through filters (AHF Analysentechnik) and optical fibers (FG200LCR multimode fiber, Thorlabs) connected to two avalanche photo-diodes (SPCM-AQR-14, Perkin Elmer, Vaudreuil, Canada) coupled to an ALV-6000 correlator (ALV GmbH) or to a SpectraPro 150 spectrograph (Princeton Instruments/Acton). The excitation input

power was measured with a Lasermate powermeter (Coherent) or a Nova II powermeter (Ophir Optronics Ltd.). Powers were kept under 2.5 mW in order to stay in the quadratic range for absorption and to be not detrimental to cells in the in vivo application. Irradiations were performed on 2.5 μL samples contained in a cylindrical well made of paraffin (radius: 1.25 mm; height: 2 mm) sealed with parafilm. \mathbf{F} photoproduction was evidenced by means of its photophysical and diffusive properties that can be investigated even at low \mathbf{F} concentrations (emission spectrum with the spectrograph and flux of emitted photons per molecule and per second as well as diffusion coefficient extracted from Fluorescence Correlation Spectroscopy). $\delta_u \phi_u^{(2)}(\lambda_{exc}^{(2)}, \mathbf{cA})$ was extracted from analyzing the temporal dependence of fluorescence intensity by using the theoretical expression of the uncaging rate constant given in reference [9].

References

- [1] C. Frugoni, *Gazz. Chim. Ital.* **1957**, *87*, 403–407.
- [2] H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1986**, *33*, 943–951.
- [3] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991–1024.
- [4] P. F. Wang, L. Jullien, B. Valeur, J. - S. Filhol, J. Canceill, J. - M. Lehn, *New. J. Chem.* **1996**, *20*, 895–907.
- [5] E. Cogné-Laage, J.-F. Allemand, O. Ruel, J.-B. Baudin, V. Croquette, M. Blanchard-Desce, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1445–1455.
- [6] S. Charier, S. A. Meglio, D. Alcor, E. Cogné-Laage, J.- F. Allemand, L. Jullien, A. Lemarchand, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15491–15505.
- [7] S. Charier, O. Ruel, J.-B. Baudin, D. Alcor, J.-F. Allemand, A. Meglio, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1097–1113.
- [8] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481–491.
- [9] N. Kiskin, R. Chillingworth, J. A. McCray, D. Piston, D. Ogden, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 588–604.

Article

Two-Photon Uncaging with Fluorescence Reporting: Evaluation of the ortho-Hydroxy Cinnamic Platform.

Gagey N, Neveu P, Benbrahim C, Goetz B, Aujard I, Baudin JB, Jullien L.

submitted to *J. Am. Chem. Soc.*

Contribution:

- exploitation des expériences de photodéprotection à un photon (avec Nathalie Gagey).
- conception, réalisation et exploitation des expériences de photodéprotection à deux photons (avec Nathalie Gagey).
- participation à l'écriture de l'article.

Two-Photon Uncaging with Fluorescence Reporting: Evaluation of the *o*-Hydroxycinnamic Platform

Nathalie Gagey,[†] Pierre Neveu,^{†,‡} Chouaha Benbrahim,[†] Bernard Goetz,[#] Isabelle Aujard,[†] Jean-Bernard Baudin,[†] and Ludovic Jullien^{*,†}

Contribution from the *École Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 8640 PASTEUR, 24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France, École Normale Supérieure, Laboratoire de Physique Statistique, UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 and Paris 7 8550, 24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France, and École Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 8642; 24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France*

Received March 29, 2007; E-mail: ludovic.jullien@ens.fr

Abstract: This paper evaluates the *o*-hydroxycinnamic platform for designing efficient caging groups with fluorescence reporting upon one- and two-photon excitation. The model cinnamates are easily prepared in one step by coupling commercial or readily available synthons. They exhibit a large one-photon absorption that can be tuned in the near-UV range. Uncaging after one-photon excitation was investigated by ¹H NMR, UV–vis absorption, and steady-state fluorescence emission. In the whole investigated series, the caged substrate is quantitatively released upon photolysis. At the same time, uncaging releases a strongly fluorescent coproduct that can be used as a reporter for quantitative substrate delivery. The quantum yield of double bond photoisomerization leading to uncaging after one-photon absorption mostly lies in the 10% range. Taking advantage of the favorable photophysical properties of the uncaging coproduct, we use a series of techniques based on fluorescence emission to measure the action uncaging cross sections with two-photon excitation of the present cinnamates. Exhibiting values in the 1–10 GM range at 750 nm, they satisfactorily compare with the most efficient caging groups reported to date. Noticeably, the uncaging behavior with two-photon excitation is retained *in vivo* as suggested by the results observed in living zebrafish embryos. Reliable structure property relationships were extracted from analysis of the present collected data. In particular, the careful kinetic analysis allows us to discuss the relevance of the *o*-hydroxycinnamic platform for diverse caging applications with one- and two-photon excitation.

Introduction

The spatio-temporal delivery pattern of precise given amounts of chemicals is of major importance in chemistry and biology. Syringes have been used to achieve this goal at the microscopic level. However such microinjections, by their invasive nature, are not appropriate if the targeted organism has to remain intact. Given the excellent intrinsic localization in two-photon excitation,¹ photoactivation has been envisioned to provide an attractive noninvasive alternative: the “optical microsyringe”.^{2–5} In the corresponding approach, a focused light pulse is used to release within an organism perfused with a solution of a

biologically nonactive precursor the desired chemical after two-photon photoactivation (or uncaging).⁶

A large enough two-photon action uncaging cross section is a key factor to satisfactorily implement the preceding two-photon photoactivation strategy in sensitive samples. In fact, the cross section should be as large as possible to reduce the illumination duration and power needed to release a given amount of effector without generating detrimental effects. For instance, it was claimed to have to exceed 0.1 or 10 Goeppert–Mayer (GM; 1 GM = 10⁻⁵⁰ cm⁴s/photon) for biological applications.^{3,7} In fact, the 1 GM range has already been reached,^{3,8,9} and the corresponding caging groups have been successfully used in biological systems. Nevertheless the improvement of the efficiency of a photolabile protecting group upon two-photon excitation remains difficult, and it is therefore useful to gain reliable structure property relationships. Indeed we still lack general rules to predict the cross section for two-

[†] UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 8640 PASTEUR.

[‡] UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 and Paris 7 8550.

[#] UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 8642.

(1) Xu, C.; Zipfel, W.; Shear, J. B.; Williams, R. M.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 10763–10768.

(2) Cambridge, S. B.; Davis, R. L.; Minden, J. S. *Science* **1997**, *277*, 825–828.

(3) Furuta, T.; Wang, S. S. H.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 1193–1200.

(4) Ando, H.; Furuta, T.; Tsien, R. Y.; Okamoto, H. *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.

(5) Momotake, A.; Lindegger, N.; Niggli, E.; Barsotti, R. J.; Ellis-Davies, G. C. R. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.

(6) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, *45*, 4900–4921.

(7) Kiskin, N.; Chillingworth, R.; McCray, J. A.; Piston, D.; Ogden, D. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 588–604.

(8) Lu, M.; Fedoryak, O. D.; Moister, B. R.; Dore, T. M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122.

(9) Gagey, N.; Neveu, P.; Jullien, L. *Angew. Chem., Intl. Ed.* **2007**, *46*, 2467–2469.

photon absorption of a chromophore from its structure. In addition, it is not obvious to predict the quantum yield of uncaging after two-photon excitation, even when the corresponding quantum yield of uncaging after one-photon excitation is known. Indeed the mechanism leading to uncaging could depend on the excitation mode.

Another important issue is the quantification of delivery upon uncaging, when one is interested to reach a critical molecule concentration to induce a specific activity. First, calibration of the laser power can be made difficult in complex systems (e.g., a living organism) because of the uncertainties associated to many unknown medium characteristics regarding volume, viscosity, optical homogeneity, etc. Second, the system response can strongly depend on the amount of uncaged substrate (e.g., biological response resulting from the interaction between a photoreleased ligand and its biological target). An elegant way to address this quantification task relies on the simultaneous release of a fluorescent reporter and the desired caged substrate from the same nonfluorescent caged precursor. Quantitative analysis could be then simply obtained from analyzing the increase of fluorescence emission after or better during uncaging at the targeted site. Whereas numerous caging groups have been continuously introduced with the goal to improve their photophysical and photochemical characteristics,^{10–12} uncaging quantification using an optical method has attracted little attention. Indeed, in most cases, the caged substrate and the coproduct from the photolabile moiety after uncaging exhibit similar brightnesses. From the latter point of view, the coumaryl photolabile protecting group was shown to be satisfactory in several occurrences.¹³ Nevertheless the absence of fluorescence emission in the caged substrate was not intrinsic in the reported systems but was associated to the quenching of the reporter fluorescence by the substrate moiety: Hence, beyond the restriction for caging acidic substrates, the coumaryl photolabile protecting group lacks of generality for the reporting purpose.

The preceding considerations led us to consider with high interest the *o*-hydroxycinnamic platform that was introduced to cage alcohols and amines by Porter et al.^{14–16} In this series, the primary event leading to uncaging is light absorption by the cinnamic backbone that belongs to the extensively investigated series of donor–acceptor ethylenic systems. In the context of two-photon excitation, the wavelength maximum and the value of the cross section for two-photon absorption of such donor–acceptor ethylenic systems can be now reasonably predicted from the molecular structure.^{17,18} Their photophysical behavior is also satisfactorily established, in particular the competition between fluorescence emission and isomerization in the excited state.^{19–21} In addition, the mechanism and kinetics

of the thermal reactions involved in the formation of the coumarin coproduct accompanying the release of the caged substrate are already well-documented.^{22,23} Eventually the reported cinnamates intrinsically do not fluoresce, in marked contrast with the photoreleased coumarin coproduct. The latter behavior is here particularly attractive in relation to the intended purpose of having a fluorescent reporter upon uncaging.

The present paper examines the *o*-hydroxycinnamic platform to tailor efficient photolabile protecting groups that exhibit large two-photon uncaging action cross sections and that release strongly fluorescent coproducts upon uncaging. The first section deals with the design and the syntheses of two series of model *o*-hydroxycinnamate that differ by the substitution pattern of the double bond. The second section evaluates the present series of photolabile protecting groups with one-photon excitation. After an initial screen to identify the most promising substitution patterns, we characterize the one-photon absorption properties of the compounds, then we determine the uncaging mechanism, the corresponding kinetics associated to the photochemical step and the subsequent thermal step, and the uncaging action cross section with one-photon excitation. In the third section, we determine the uncaging action cross sections with two-photon excitation of the most promising caging groups in the investigated series. Then we demonstrate the relevance of the *o*-hydroxy platform for biological applications by investigating two-photon uncaging in a zebrafish embryo. Section 4 is devoted to the discussion. In particular, we show that the choice of the “best” *o*-hydroxycinnamic caging moiety is not intrinsic but depends on the considered application and on the experimental constraints. Concluding remarks are eventually given in section 5.

Design and syntheses

Our investigation of the *o*-hydroxycinnamic platform for uncaging applications starts from the original design of Porter (Figure 1).²⁴

Retaining a same cinnamate series leading to alcohol release upon uncaging, we aimed at studying the significance of different structural parameters to optimize the photorelease efficiency. As suggested in the introduction, we were especially interested in establishing structure–property relationships to improve the uncaging action cross sections with two-photon excitation as well as the fluorescence reporting features. Nevertheless, we also considered other aspects such as thermal

(10) Pillai, V. N. R. *Synthesis* **1980**, 1–26.

(11) Bochet, C. G. J. *Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, 1, 125–142.

(12) Pelliccioli, A. P.; Wirz, J. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 441–458.

(13) Hagen, V.; Frings, S.; Bendig, J.; Lorenz, D.; Wiesner, B.; Kaupp, U. B. *Angew. Chem., Intl. Ed.* **2002**, 41, 3625–3628.

(14) Turner, A. D.; Pizzo, S. V.; Rozakis, G.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 244–250.

(15) Wang, B. H.; Zheng, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 715–718.

(16) Li, H.; Yang, J. H.; Porter, N. A. *J. Photochem. Photobiol. A* **2005**, 169, 289–297.

(17) Xu, C.; Webb, W. W. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, 13, 481–491.

(18) Cogné-Laage, E.; Allemand, J. F.; Ruel, O.; Baudin, J. B.; Croquette, V.; Blanchard-Desce, M.; Jullien, L. *Chem.–Eur. J.* **2004**, 10, 1445–1455.

(19) Dauben, W. G.; Salem, L.; Turro, N. J. *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 41–54.

(20) Burghardt, I.; Cederbaum, L. S.; Hynes, J. T. *Faraday Discuss.* **2004**, 127, 395–411.

(21) Burghardt, I.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 11411–11423.

(22) Hershfield, R.; Schmir, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7359–7369.

(23) Hershfield, R.; Schmir, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 8032–8040.

(24) In the course of the present work, we also considered relying on the *o*-aminocinnamic platform for uncaging applications as reported by Porter in ref 16. Indeed we expected that this series should be particularly favorable to get large k_2 constants because of the lower electronegativity of the nitrogen atom with regard to the oxygen one. Thus we synthesized the 3-(6-amino-benzo(1,3)dioxo-5-yl)-acrylic acid ethyl ester in two steps by condensing the 1-carboxymethylidene triphenyl phosphorane on 6-amino-3,4-methylenedioxybenzaldehyde that was obtained from Fe/HCl reduction of 6-nitro-3,4-methylenedioxybenzaldehyde in a mixture of acetic acid, ethanol, and water. 3-(6-Amino-benzo(1,3)dioxo-5-yl)-acrylic acid ethyl ester exhibits satisfactory absorption properties: in Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer/acetonitrile 1/1 (v/v), $\epsilon_E(\lambda_E^{(1)}) = 13 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 385 nm. The quinolone resulting from uncaging is also reasonably fluorescent ($\lambda_F^{(1)} = 390 \text{ nm}$; $\Phi_F^{(1)} = 7\%$), although less than the coumarins obtained from the present *o*-hydroxycinnamic derivatives. Unfortunately, whereas k_2 was indeed so large that we were unable to measure it (subsecond time scale; see ref 16), k_1 was found to be extremely low ($1.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ with $I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) = 2.1 \times 10^{-7} \text{ einstein min}^{-1}$; k_1 is here typically two orders of magnitude smaller than in the *o*-hydroxycinnamate series; see Table 1S) forbidding to rely on the *o*-aminocinnamic platform to develop an efficient series of photolabile protecting groups for two-photon uncaging applications.

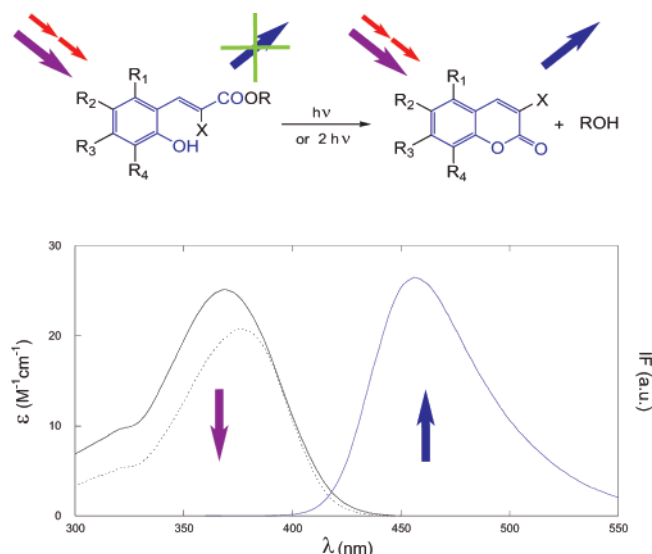
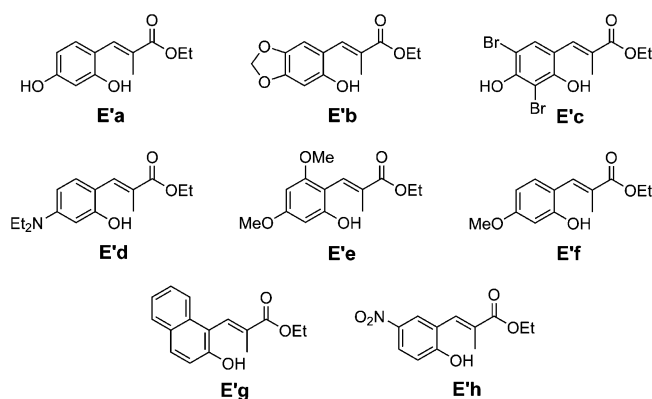


Figure 1. The *o*-hydroxycinnamic platform to illustrate uncaging with fluorescence reporting. The intrinsically nonfluorescent cinnamate of the alcohol substrate **ROH** is illuminated in a wavelength range where it absorbs light (violet and red arrows with one- and two-photon excitation, respectively). Light absorption initiates a series of photochemical and thermal processes in the *o*-hydroxycinnamate backbone leading to release the **ROH** substrate together with the fluorescent coumarin **F** coproduct in a one-to-one stoichiometric ratio. As the starting cinnamate and the coumarin coproduct absorb light in the same wavelength range (black solid and dotted lines, respectively), the **F** coumarin continuously emits fluorescence (blue solid line) upon uncaging and its fluorescence intensity reports on the uncaging extent. The absorption and emission properties of the cinnamate **Ec** at 293 K in Tris(pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer/acetonitrile 1/1 (v/v) are used for a purpose of illustration.

Chart 1. Structures of the **E'** Series of Photolabile Protecting Groups Investigated in the Present Study

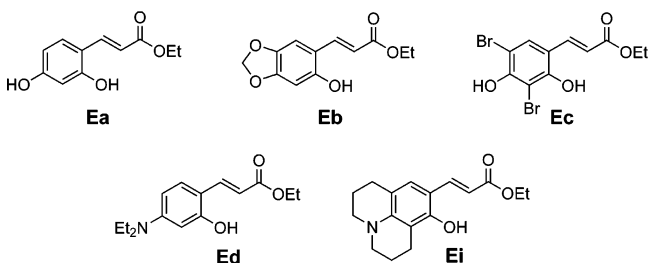


stability, water solubility, kinetics of substrate release, etc., which can prove to be crucial for biological applications.

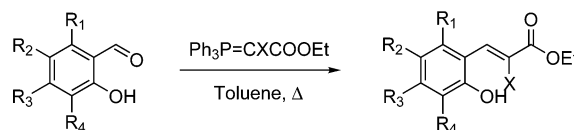
To examine the role of the substitution pattern of the double bond, we synthesized two closely related series of cinnamates sharing the same (*E*) stereochemistry. Chart 1 and Chart 2 displays the two different **E'** and **E** series that were evaluated during the present study.

The **E'** series relies on the original design of Porter: It incorporates a methyl substituent on the trisubstituted double bond. In contrast, the **E** series contains only disubstituted derivatives in which the double bond bears the carboxylate group on one hand and the substituted aromatic moiety on the other hand. Both series are ethyl cinnamate leading to the release of ethanol upon uncaging. The choice of the ethyl moiety was here

Chart 2. Structures of the **E** Series of Photolabile Protecting Groups Investigated in the Present Study



Scheme 1. Syntheses of the Caged Model Alcohols (X = H and X = Me in the **E** and **E'** Series, Respectively)



related to its neutrality with regards to the photophysical and photochemical properties of the cinnamate backbone.

In both series, the substitution pattern of the phenyl ring was designed to locate the maximum of two-photon absorption in the 700–900 nm wavelength range that is currently available with the common IR pulsed laser sources. In particular, we grafted several electron-releasing moieties on the phenyl position para to the vinyl carboxylate group. The molecular design was here facilitated by the resulting unsymmetrical donor–acceptor conjugated structure for which the position of the two-photon absorption maximum usually satisfactorily compares with twice the corresponding one of the one-photon absorption.^{17,18}

In the present series, the syntheses are short, easy, and rely on commercially available or readily accessible synthons. All the cinnamic esters displayed in Charts 1 and 2 were synthesized with good yields in one step by condensing the substituted salicylaldehydes with the appropriate phosphorane (Scheme 1).²⁵ It is essential here to pay attention to protecting the reactive medium from light and to accurately controlling heat and time to reduce the formation of the coumarin resulting either from photo- or thermal isomerizations.

Uncaging with One-Photon Excitation. The physicochemical experiments with one-photon excitation were performed stepwise. First, we screened the photophysical and photochemical behavior of the **E'a–h** series in aqueous solutions. The purpose was here to evaluate the solubility issue, the wavelength of maximum light absorption with one-photon excitation and the robustness of the photochemical behavior leading to the alcohol release. The results led us to identify (i) the members of the second series **Ea–i** by keeping the most promising substituents on the phenyl group of the cinnamate and (ii) appropriate experimental conditions, in particular the solvent, to allow comparisons between the different cinnamates.

Preliminary Screening. In view of possible biological applications, the **E'a–h** series has been first tentatively evaluated in aqueous solutions. At that step, its members that did not exhibit enough water solubility at the submillimolar concentrations required for NMR, and UV–vis absorption experiments were dissolved after adding a small amount of cosolvent. The cinnamate solutions were irradiated with one-photon excitation

(25) Porter, N. A.; Thuring, J. W.; Li, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7719–7717.

Table 1. Photophysical and Photochemical Properties of the Investigated (*E*)-Cinnamates That Are Relevant to the Uncaging Process with One- and Two-Photon Excitation^a

	$10^{-3}\epsilon_E(\lambda_E^{(1)})$ M ⁻¹ cm ⁻¹ (nm)	$\lambda_F^{(1)}[\Phi_F^{(1)}]$ nm[%]	$\lambda_{exc}^{(1)}$ nm	Q_E/Q_F	$\Phi_{EZ}^{(1)}$ %	$\epsilon_E(\lambda_{exc}^{(1)})\Phi_{EZ}^{(1)}$ mM ⁻¹ cm ⁻¹	$K_1(\lambda_{exc}^{(1)})$	k_2, λ_2 10 ⁻³ s ⁻¹	$\delta_E(750)\Phi_{EZ}^{(2)}$ GM
Ea	18(331)	452 [40]	350	0.005	9	1.0	0.2	1.6,1.6	<i>b</i>
Eb	16(360)	423 [30]	350	<i>c</i>	3	0.4	0.2	3.2,4.8	3.8
Ec	25(369)	454 [70]	350	0.025	5	1.2	0.5	2.2,2.2	0.6
Ed	28(378)	475 [60]	360	0.060	2	0.4	0.1	3.7,6.2	2.0
Ei	20(394)	482 [50]	370	0.015	3	0.4	0.1	9.5,9.1	4.7
E'a	17(319)	461 [50]	330	0.070	7	1.0	0.8	10,8	<i>b</i>
E'b	14(344)	421 [40]	350	0.050	10	1.3	3.5	30,35	<i>b</i>
E'd	31(362)	473 [40]	350	0.050	10	2.7	0.9	12,11	<i>b</i>
E'f	15(317)	391 [40]	330	0.055	7	0.8	0.3	13,13	<i>b</i>
E'g	6(339)	408 [40]	350	0.003	25	1.2	0.1	20,30	2.5

^a Maxima of single-photon absorption ($\lambda_E^{(1)}$) and molar absorption coefficients for single-photon absorption at $\lambda_E^{(1)}$, $\epsilon_E(\lambda_E^{(1)})$ ($\pm 5\%$) of the (*E*)-cinnamates; wavelength maxima ($\lambda_F^{(1)}$) and quantum yields ($\Phi_F^{(1)} \pm 10\%$) of fluorescence emission of the coumarin coproducts upon uncaging after one-photon excitation; excitation wavelength used for the series of uncaging experiments with one-photon excitation, $\lambda_{exc}^{(1)}$; relative brightness of the starting (*E*)-cinnamate with regard to brightness of the **F** coumarin coproduct at $\lambda_{exc}^{(1)}$, Q_E/Q_F ; quantum yield of (*E*) to (*Z*) photoisomerization after one-photon excitation at $\lambda_{exc}^{(1)}$, $\Phi_{EZ}^{(1)}$ ($\pm 10\%$), action cross section for (*E*) to (*Z*) photoisomerization with one-photon excitation at $\lambda_{exc}^{(1)}$, $\epsilon_E(\lambda_{exc}^{(1)})\Phi_{EZ}^{(1)}$ ($\pm 5\%$), steady-state constant $K_1(\lambda_{exc}^{(1)}) = k_1(\lambda_{exc}^{(1)})/k_{-1}(\lambda_{exc}^{(1)})$ ($\pm 5\%$) associated to the **E** to **ZI** exchange with one-photon excitation at $\lambda_{exc}^{(1)}$; rate constant for the thermal (*Z*)-cinnamate to coumarin lactonization extracted from continuous illumination (k_2) and relaxation (λ_2) experiments respectively ($\pm 10\%$), and action cross section for (*E*) to (*Z*) photoisomerization with two-photon excitation at $\lambda_{exc}^{(2)} = 750$ nm, $\delta_E(750)\Phi_{EZ}^{(2)}$ ($\pm 20\%$; GM, 1 GM = 10^{-50} cm⁴ s (photon)⁻¹) for the (*E*)-cinnamate. Except for $\delta_E(750)\Phi_{EZ}^{(2)}$ given in acetonitrile, acetonitrile/Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer 1/1 (v/v) is the solvent. $T = 293$ K (see text and Supporting Information). ^b Not evaluated. ^c Too low to be reliably evaluated.

around their wavelength of maximum absorption, and the absorption and steady-state emission spectra were recorded after different illumination durations. The results are given in Table 1S in the Supporting Information. The main conclusions of this preliminary screening are the following: (i) The uncaging behavior is robust. All the **E'a–h** cinnamates release alcohol together with a strongly fluorescent coumarin coproduct upon one-photon illumination. Noticeably **E'h** exhibit a limited or very slow photoisomerization. (ii) Except for **E'e** in which the steric hindrance introduced by the 6-methoxy substituent probably forbids the phenyl conjugation with the double bond, the members of the **E'** series exhibit a significant absorption with one-photon excitation in the 300–400 nm wavelength range. Taking into account their donor–acceptor conjugated structure, the latter feature makes the series potentially appropriate to observe significant absorptions with two-photon excitation between 700 and 900 nm; (iii) **E'c** and **E'd** are not thermally stable (see Supporting Information). At room temperature, they isomerize in a few hours and thermally release the ethanol and the coumarin coproduct.

In fact, the latter preliminary observations made with the **E'** compounds led us to design the second **E** series of cinnamates displayed in Chart 2. We first removed the methyl group on the double bond to increase the energy barrier for thermal isomerization (see Supporting Information for a theoretical schematic picture to analyze thermal and photochemical isomerization in the cinnamate series). Then we adopted the phenyl substituents leading both to significant absorptions beyond 300 nm and to fast enough uncaging.

After this preliminary screening, we eventually retained Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer/acetonitrile 1/1 (v/v) as a common solvent for one-photon experiments and **Ea–i**, **E'a–b**, **E'd**, **E'f**, and **E'g** as caged substrates for the following series of thorough investigations with one-photon excitation.

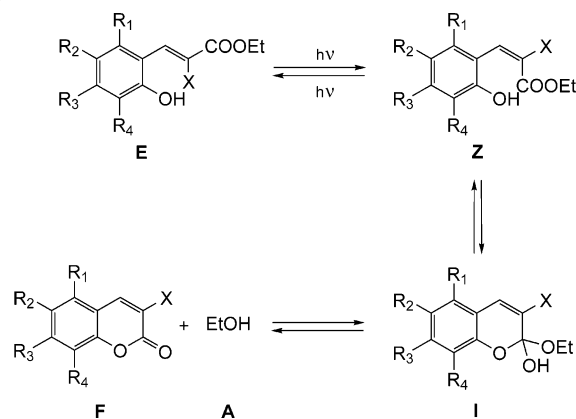
One-Photon Absorption of the Cinnamates. The absorption properties with one-photon excitation of the investigated (*E*)-cinnamates have been obtained by recording their UV–vis

absorption spectra. In Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer/acetonitrile 1/1 (v/v), the investigated **E** and **E'** cinnamates exhibit an absorption spectrum in the 300–400 nm range. In the case of the less donating phenyl substituents (**a** and **b** derivatives), two bands are visible in the corresponding wavelength range (Figure 1S; see Supporting Information). In contrast, one notices the presence of a main band with a shoulder on its blue edge for the more electron-releasing phenyl substituents (see Figure 1). In all the investigated cases, the band at the lowest wavelength is the weakest among the two absorption bands. Noticeably, the position of the band associated to the more energetic transition is only weakly dependent on the substituent nature. In contrast, the band at the longest wavelength is red-shifted upon increasing the electron donating power of the phenyl substituent. Table 1 summarizes the absorption features, $\lambda_E^{(1)}$ and $\epsilon_E(\lambda_E^{(1)})$, associated to the band at the longest wavelength of the investigated (*E*)-cinnamates.

For a same phenyl substituent (entries **a**, **b**, and **d**), the absorption maximum with one-photon excitation $\lambda_E^{(1)}$ of the **E** derivative is systematically red-shifted by 14 kJ mol⁻¹ (12–16 nm) compared to the one of the corresponding **E'**. This behavior is most probably related to a partial loss of planarity associated to a weaker conjugation in the **E'** series that would result from the steric hindrance between the methyl double-bond substituent and the *o*-hydroxy phenyl substituent.

As anticipated, $\lambda_E^{(1)}$ shifts to the red when the donating power of the conjugated phenyl substituent increases in both **E** and **E'** series. Hence, the longest maximal wavelength of absorption was observed for the julolidine derivative **Ei** ($\lambda_{Ee}^{(1)} = 394$ nm) for which the absorption band significantly extends up to 450 nm. One should here notice the discrepancy between the nonbrominated **Ea** and dibrominated **Ec** 4-phenol cinnamates. In fact, the electron withdrawing properties of the bromine atoms in **Ec** decrease the protonation constant of its 4-hydroxy group by about 5 orders of magnitude (see Supporting Information). As a consequence, **Ec** is ionized at pH = 7 which gives rise to a phenoxy double bond substituent that is

Scheme 2. Mechanism of the Uncaging Process Leading to the Release of the Caged Alcohol **A** (Here Ethanol) Together with a Coumarin **F** When a Solution of (*E*) *o*-Hydroxycinnamate **E** Is Illuminated with One-Photon Excitation (Inspired from Schmir et al.)²²



significantly more electron-donating than the corresponding phenol in **Ea**.

Eventually, the molar absorption coefficients at the wavelength of maximal absorption are satisfactorily large. Except for the naphthalene derivative **E'g**, $\epsilon_E(\lambda_E^{(1)}) \approx 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Irradiation Experiments with One-Photon Excitation. The irradiation experiments with one-photon excitation were performed stepwise.

In a first series of experiments, we used ¹H NMR and UV–vis absorption spectroscopy to analyze the species resulting from illumination of the caged (*E*)-cinnamates **E** and **E'** (see Supporting Information). In the case of **Ec**, we first showed that the uncaging process obeys the reaction displayed in Figure 1: The caged alcohol **A** (here ethanol) is released in a one-to-one stoichiometry together with a coumarin coproduct **F** upon illumination with one-photon excitation. This behavior is in line with Porter's previous observation.^{14,26} Noticeably the (*E*)-cinnamates **E** and the corresponding coumarin **F** exhibit similar absorption properties making it possible to perform uncaging and excitation of the reporting fluorescent molecule with a same excitation source.

During this series of ¹H NMR experiments, we also identified an intermediate containing a double bond exhibiting a (*Z*) stereochemistry during the course of the photoconversion. Such an observation is in line with the previous observations of Schmir on a series of closely related coumarinic acids.^{22,23} **Z** would be the primary intermediate that results from (*E*) to (*Z*) photoisomerization of the starting (*E*)-cinnamates (Scheme 2). A second intermediate **I** would be subsequently obtained from the nucleophilic addition of the *o*-hydroxy group onto the ethyl ester moiety.

We then turned to analyze the kinetics of the uncaging process in the present (*E*)-cinnamate series. Noticing that only the (*E*)-to-(*Z*) and (*Z*)-to-(*E*) cinnamate exchanges should be photochemically activated upon excitation at a large enough wavelength, we considered retrieving the photochemical properties of the present caging groups by analyzing their uncaging kinetics.

Figure 2a displays the typical temporal evolutions of the fluorescence emission from a solution of a (*E*)-cinnamate that

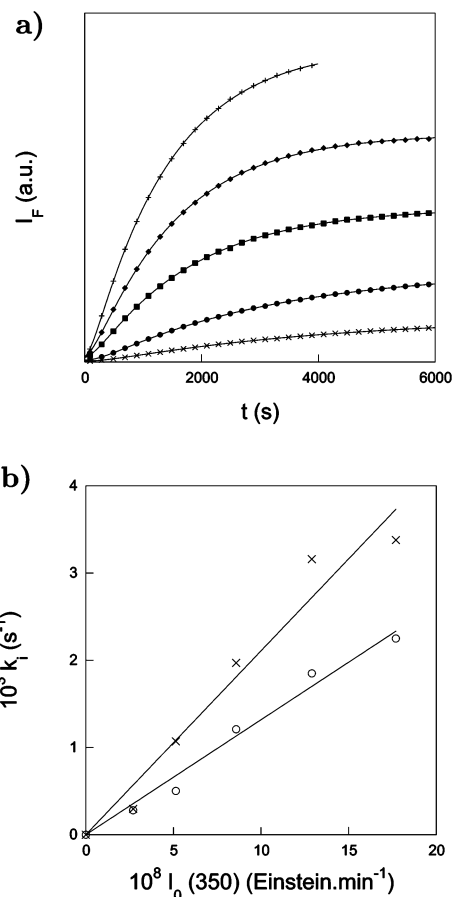
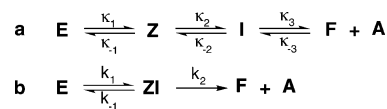


Figure 2. (a) Temporal evolution of the fluorescence emission at $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ from a $5.7 \mu\text{M}$ **Ec** solution in acetonitrile/Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer 1/1 (v/v) upon one-photon irradiation ($\lambda_{exc}^{(1)} = 350 \text{ nm}$) at several incident light intensities $I_0(350)$ (from bottom to top in $10^{-8} \text{ Einstein min}^{-1}$: 2.7, crosses; 5.1, disks; 8.6, squares; 12.9, diamonds; 17.7, pluses). Markers indicate the experimental data; lines indicate fits with eq 14. (b) Dependence on the incident light intensities $I_0(350)$ of the rate constants k_1 (circles) and k_{-1} (crosses) extracted from the evolutions displayed in Figure 2a. $T = 293 \text{ K}$ (see Experimental Section).

Scheme 3. Reduction of the Mechanism of the Photochemical Isomerization of the (*E*)-Cinnamate **E** Leading to the Simultaneous Release of the Caged Alcohol **A** and of the Coumarin **F**



^a Complete mechanism corresponding to the reactive scheme displayed in Scheme 2. The rate constants associated to each elementary step are denoted κ_i , where the subscript i indicates the corresponding step. ^bReduced mechanism after taking into account the relative values of κ_2 , κ_{-2} , κ_3 , and κ_{-3} . The rate constants associated to each step of the reduced mechanism are denoted k_i , where the subscript i indicates the corresponding step.

is continuously illuminated at different light intensities at a wavelength $\lambda_{exc}^{(1)}$ closely located to its maximal wavelength of absorption $\lambda_E^{(1)}$. One can observe a large increase of fluorescence emission as a function of time that gets faster when the illumination intensity is increased.

The analysis of the curves displayed in Figure 2a requires a modeling of the uncaging process. In principle, Scheme 2 suggests consideration of a three step–six reactions mechanism that would involve six rate constants (Scheme 3a). However, it is possible to reduce the mechanism to a two step–three reactions mechanism (see Scheme 3b).

(26) Porter, N. A.; Bruhnke, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7616–7618.

Taking advantage of the similar electronic demands of the hydroxy and ethoxy groups, we first relied on the thorough investigation of the cyclization of para substituted derivatives of coumarinic acid yielding the corresponding coumarins.^{22,23} In the preceding work, the conversion of the **I**-type tetrahedral intermediate to the **F** coumarin with water release was reported to be the rate-limiting step of the **Z**-like coumarinic acid to the coumarin conversion in the case of coumarinic acids para substituted with electron donating conjugated substituents and at neutral pH like in the present study. Thus **Z** and **I** are suggested to be in fast exchange at the time scale of the **I** to **F** cyclization. At the same time, the rate constants associated to the photochemical exchange between the **E** and **Z** states and the rate constant for the **I** to **F** cyclization were in a comparable range under the present illumination conditions suggesting a consideration of **Z** and **I** in a fast exchange regime during the whole uncaging process. Eventually the final coumarin **F** is thermodynamically strongly favored among the different states displayed in Scheme 2^{22,23} so as to neglect the backward reaction from the coumarin **F** to the **I** intermediate in the final model. After introducing the **ZI** species that is relevant in describing **Z** + **I** when **Z** and **I** are in a fast exchange, we eventually retained the reduced model that is displayed in Scheme 3b to analyze the data.

The fit of data such as displayed in Figure 2a provides the values of the rate constants k_1 , k_{-1} , and k_2 (see Experimental Section). Figure 2b shows that k_1 and k_{-1} depend linearly on the incident light intensity: this supports the model adopted in Scheme 3b. To bring further support to the model, we performed a complementary series of experiments to independently access the value of the rate constant k_2 by observing by UV-vis absorption spectroscopy the relaxation of solutions of the (*E*)-cinnamates after a short illumination with a UV lamp of large power; under such experimental conditions, only the **ZI** to **F** conversion of Scheme 3b is assayable. As displayed in Table 1, we obtained a satisfactory agreement between the k_2 values extracted from both series of experiments.

After the preceding model validation, we derived the photochemical properties of the *o*-hydroxycinnamate photolabile protecting group with one-photon excitation from k_1 and k_{-1} (see Experimental Section). k_1 gives the action (*E*) to (*Z*) photoisomerization cross section with one-photon excitation of the (*E*)-cinnamate **E**. The analysis of k_{-1} is more difficult because the equilibrium constant \mathcal{K}_2 associated to the fast exchange between **Z** and **I** cannot be measured which forbids us to derive the action (*Z*) to (*E*) photoisomerization cross section with one-photon excitation of the (*Z*)-cinnamate **Z**. The fit also yields the relative brightness of the starting (*E*)-cinnamate **E** with regards to the one of the coumarin coproduct **F**. Table 1 summarizes the results of the different parameters extracted from the series of irradiation experiments with one-photon excitation performed in the whole investigated **E** and **E'** series. The evidenced trends are examined and discussed in the following paragraphs.

Brightness of the (*E*)- and (*Z*)-Cinnamates and of the Coumarin Uncaging Coproducts. The release of a strongly fluorescent molecule compared to the initial caged molecule would be of great interest in quantifying the uncaging reaction in environments where reaction calibrations can prove to be daunting, such as in biological applications. Table 1 shows that

the *o*-hydroxycinnamic series is especially favorable from this point of view: The brightness of the (*E*)-cinnamate caged compounds at the excitation wavelength required for uncaging is uniformly very low whereas the one of the coumarin coproduct is large. In fact, the emission from the starting cinnamate can be typically neglected in front of the one of the coumarin photoproduct beyond 1% extent of the uncaging process.

Quantum Yield of Photoisomerizations Involved in Uncaging. The quantum yields of (*E*)- to (*Z*)-cinnamate photoisomerization leading to alcohol uncaging are significant in both the **E** and **E'** series. They are always larger than 1% and reach up to 25% for **E'g**; in fact, they seem to be slightly larger in the **E'** series than in the **E** one (see Supporting Information for an interpretation). In particular, our 10% result for **E'd** satisfactorily compares with the 13% value reported by Porter et al. in Tris buffer.²⁷ Such values are in the range of the quantum yields associated to other relevant uncaging photochemistries. Lower values are generally observed for the most popular *o*-nitro benzyl photoisomerization,²⁸ whereas similar values are reported in the case of the coumaryl photolabile protecting group.³

Upon one-photon illumination, one does not only observe the (*E*)- to (*Z*)- but also the corresponding (*Z*)- to (*E*)-cinnamate photoisomerization in the present investigated series. In fact, the apparent thermodynamic constant $K_1 = k_1/k_{-1}$ which describes the exchange between the starting cinnamate **E** and the intermediate **ZI** is always lower than one except for **E'c** (Table 1). Such a result has been already observed by Porter et al. for the **E'd** derivative.²⁷ As anticipated from eq 17, K_1 depends on the excitation wavelength and peak at 0.6 at 375 nm (see Supporting Information). This behavior can be accounted for by the difference of the absorption spectra of the (*E*)- and (*Z*)-cinnamate as suggested from studying an ortho methoxy analogue of **Ec**, **EcMe** (see Supporting Information).

Rate Constant for the Thermally Driven Events Leading to Uncaging. Both series of experiments devoted to measure the rate constant k_2 associated to the thermal cyclization of the (*Z*)-cinnamates leading to alcohol release together with the formation of the corresponding coumarin coproduct provide similar values (Table 1). In the buffer-acetonitrile 1:1 (v:v) mixture, they lie in the 10^{-2} s^{-1} range for all the investigated compounds and are about 1 order of magnitude larger in the **E'** series than in the **E** one. One may additionally notice a trend for increasing the rate constant k_2 upon increasing the donating power of the phenyl para substituent in the **E** series.

The preceding observations are in line with the behavior observed in the coumarinic series for which the **I** to **F** reaction is the rate-limiting step during the thermal **Z** to **F** conversion at neutral pH (Scheme 2).^{22,23} Indeed, the presence of the methyl substituent on the double bond is expected to accelerate the **I** to **F** reaction by increasing the associated release of steric hindrance with regards to the corresponding hydrogen derivative. In addition, the presence of an electron donating conjugated substituent in para of the phenyl group is expected to facilitate the release of the leaving-alcohol moiety.

(27) Koenigs, P. M.; Faust, B. C.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9371–9379.

(28) Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J. B.; Neveu, P.; Jullien, L. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.

In fact, the k_2 value is expected to strongly depend on the nature of the caged substrate as well as on the solvent. Indeed, the rate limiting $\mathbf{I} \rightarrow \mathbf{F}$ step probably obeys here an E_1 mechanism associated to the loss of the alcohol moiety.²² Then one anticipates k_2 to increase either with an increase of the withdrawal electronic properties of the alcohol or with an increase of the solvent polarity. During the present work, we did not attempt to modify the nature of the caged alcohol. Nevertheless it is here interesting to notice that Porter mentioned that the thermal cyclization of a (*Z*)-cinnamate to the corresponding coumarin occurred in less than 1 ms in the case of a phenol protected with an *o*-hydroxycinnamate moiety.¹⁴ In contrast, we benefited from the favorable solubility properties of the **Ec** cinnamate to reproduce uncaging experiments in different solvents. We found the same $k_2 = 11 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ value in pure acetonitrile and in the acetonitrile/Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer 1/1 (v/v) mixture. In contrast, we observed a spectacular 300-fold increase of the corresponding rate constant in Tris (pH = 7) 20 mM NaCl 100 mM buffer: we found $k_2 = 0.3 \text{ s}^{-1}$. The latter results are in line with Porter's previous k_2 measurements for **E'd** in mixtures of ethanol and pH 7.4 Tris buffer in different proportions.²⁶ In particular, Porter found that k_2 varied by more than 3 orders of magnitude when going from ethanol/buffer 98:2 (v/v) ($k_2 = 7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) to ethanol/buffer 2:98 (v/v) ($k_2 = 2 \text{ s}^{-1}$).

Irradiation Experiments with Two-Photon Excitation. In Vitro Uncaging. We took advantage of the release upon uncaging of the fluorescent coumarin in a one-to-one stoichiometry with the caged alcohol to measure the uncaging action cross section.

We first characterized the uncaging process by evidencing the photoinduced formation of the coumarin coproduct by means of its photophysical properties that can be investigated even at low concentrations. Figure 3a displays the temporal evolution of the fluorescence emission from a $1.8 \mu\text{M}$ **Ec** solution in acetonitrile upon irradiation at 750 nm at two laser powers.²⁹ One observes a continuous increase. Such a behavior is in line with the formation of a photoproduct that is more fluorescent than the starting (*E*)-cinnamate ester **Ec**. In a preceding communication,⁹ we relied on a spectral analysis to conclude that this photoproduct was the coumarin **Fc**: both species exhibit the same emission spectrum with two-photon excitation. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements also lead to the same conclusion (Figure 3b). Indeed the fluorophore that is formed upon illumination with two-photon excitation exhibits the same diffusion coefficient and flux of emitted photons per molecule and per second as the reference coumarin **Fc**.

Then we analyzed the kinetics of the uncaging process. In reference to the kinetic model displayed in Scheme 3b, the rate constant k_2 is now much larger than the rate constants k_1 and k_{-1} in the present conditions of illumination with two-photon excitation. Indeed the illuminated volume is lower with two-photon than with one-photon excitation during in vitro experiments (see eqs 15, 16, 18). Then only k_1 is here accessible: the Experimental Section explains that k_1 and the action cross section for

(29) To study uncaging with two-photon excitation for the whole series of cinnamates in a same solvent, we had to switch from the acetonitrile/buffer 1:1 (v/v) mixture to pure acetonitrile. Indeed, we observed in the former solvent that the fluorescence traces such as in Figure 3a periodically exhibited plateaus for the most hydrophobic derivatives (noticeably except for **Ec** which is fairly water-soluble).

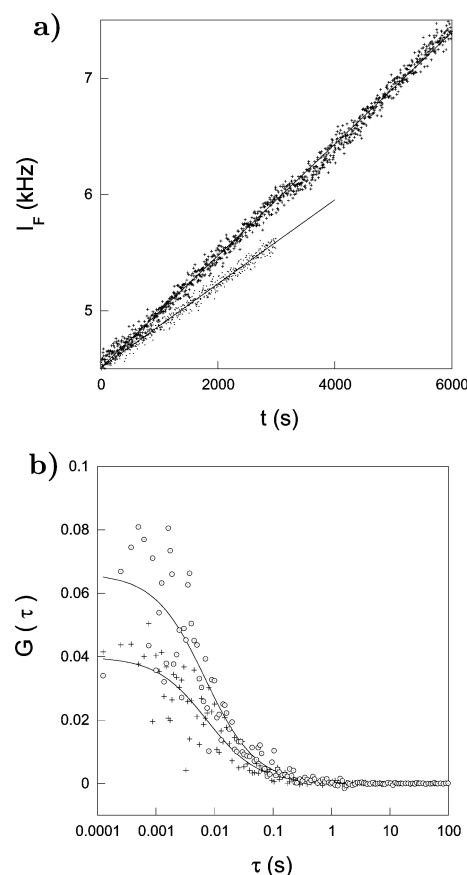


Figure 3. (a) Temporal evolution of the fluorescence emission from a $1.8 \mu\text{M}$ **Ec** solution in acetonitrile upon irradiation at $\lambda_{\text{exc}}^{(2)} = 750 \text{ nm}$ at two laser powers P (mW), 1.5 (dots) and 1.7 (pluses). The initial value of the two traces were made identical to favor the comparison of the slopes (see Experimental Section). (b) FCS autocorrelation curves $G(\tau)$ with two-photon excitation from the illuminated volume V_{exc} resulting from focusing the Ti-Sapphire laser beam at $P = 1.7 \text{ mW}$ after different illumination times: 0–1500 (circles) and 4500–6000 (pluses) s. Fitting (solid line) of the experimental points (markers) with eq 2, respectively provided $7 \pm 3 \mu\text{s}$ and $7 \pm 3 \mu\text{s}$ for the diffusion time τ_D and 15 and 25 for the number of fluorescent molecules contained within the excitation volume V_{exc} . After taking into account the intensity of fluorescence emission from V_{exc} that was measured at the APD, we evaluate at 300 Hz the flux of emitted photons per fluorescent molecule and per second that satisfactorily compared with the value measured for the reference **Fc** coumarin. The data shown in Figure 3a and 3b are used to extract the action (*E*) to (*Z*) photoisomerization cross section with two-photon excitation at $\lambda_{\text{exc}}^{(2)} = 750 \text{ nm}$, $\delta_E(750) \Phi_{EZ}^{(2)}$: solvent, acetonitrile; $T = 293 \text{ K}$.

(*E*)- to (*Z*)-cinnamate photoisomerization with two-photon excitation can be extracted from the slope of the linear temporal evolution of the fluorescence intensity displayed in Figure 3a. In particular, we verified in the course of this series of experiments that the dependence of the rate constant k_1 with the average laser power was quadratic so as to conclude that the observed behavior did result from two-photon absorption.

Table 1 displays the (*E*) to (*Z*) photoisomerization action cross sections with two-photon excitation of several (*E*)-cinnamates at $\lambda_{\text{exc}}^{(2)} = 750 \text{ nm}$ in acetonitrile. They are all 1 order of magnitude larger than the 0.1 GM limit which was claimed to be the lowest value relevant for biological applications.³ In fact, the **Ee** value equal to 4.7 GM at 750 nm is the largest reported to date.³

In Vivo Uncaging. Having quantitatively characterized in vitro the behavior of a caged alcohol, we were willing to investigate whether the *o*-hydroxycinnamic moiety would be

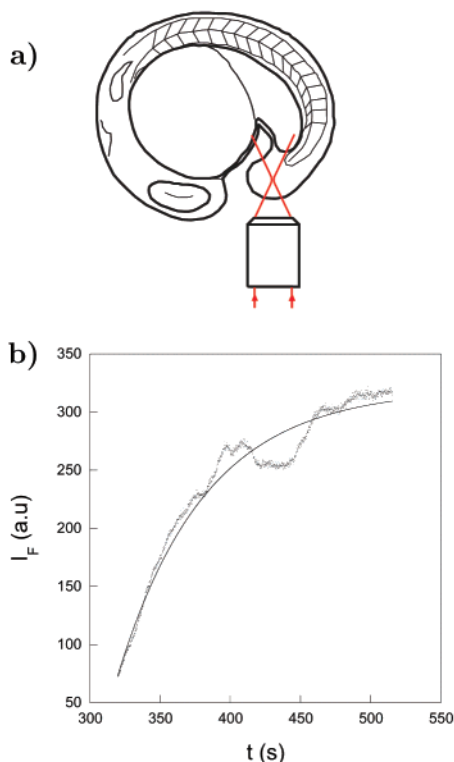


Figure 4. Evaluation of two-photon uncaging with fluorescence reporting of the *o*-hydroxycinnamic platform in vivo (a zebrafish embryo is used for illustration). The embryo was incubated in a $10\ \mu\text{M}$ aqueous solution of nonfluorescent caged alcohol **Ec** that penetrates in the whole organism. The embryo was subsequently submitted to a continuous two-photon excitation by focusing a laser beam (red arrows) in the caudal fin area (a) and the fluorescence signal emitted from the illuminated tiny zone was recorded as a function of time. The uncaging process is specifically revealed by the exponential dependence on time of singular fluorescence rises observed along the fluorescence trace (b) (see text and Experimental Section).

appropriate as a photolabile protecting group for biological applications in a living organism. We adopted the zebrafish animal model that seems particularly promising for the use of light to control biological activity: its embryo is transparent, unpigmented strains are available, and it has recently emerged as an attractive model animal for numerous studies.³⁰

We first incubated a zebrafish embryo at the 10–15 somite stage in a $10\ \mu\text{M}$ solution of **Ec** for 60 min. We subsequently illuminated at 750 nm the caudal fin area (Figure 4a) and we continuously recorded the fluorescence emission arising from the focal point. We observed a smooth increase of the fluorescence signal (see Figure 4b). Ethanol uncaging occurred in the illuminated cell releasing the fluorescent coumarin coproduct **Fc** characterized from its emission spectrum.⁹ Thus we concluded that two-photon uncaging with fluorescence reporting is active at the single-cell level in vivo in the *o*-hydroxycinnamic series.

It can be shown that the temporal dependence of the fluorescence emission during uncaging in a closed volume is exponential if the starting cinnamate **Ec** and the coumarin photoproduct **Fc** do not permeate at the uncaging time scale (see Supporting Information). Such an exponential behavior was indeed observed by analyzing individual fluorescence rises such as shown in Figure 4b. The final asymptotic value associated

to the exponential fit of the fluorescence emission from the focal spot was in line with the signal intensity expected from the coumarin **Fc** in aqueous solution at a typical $10\ \mu\text{M}$ concentration. We further checked the agreement between the plateau value and the incubating solution concentration by conducting the same experiment with a more dilute solution ($500\ \text{nM}$) and recorded the FCS autocorrelation curve upon uncaging completion. We measured a $500\ \text{nM}$ **Fc** concentration inside cells (see eq 2 in Experimental Section). Such observations suggest that the initial intracellular concentration in caged precursor **Ec** was essentially similar to the concentration of the incubating solution.

The rate given by the exponential fit is the one of the limiting step in the uncaging reaction. We measured $6 \times 10^{-3}\ \text{s}^{-1}$. The expected rate from a 1.6 GM uncaging action cross section with two-photon excitation of **Ec** at $750\ \text{nm}$ ⁹ would be $20\ \text{s}^{-1}$ at 4.5 mW power in this closed environment (see eq 18 in Experimental Section and data not shown). This value is 3 orders of magnitude greater than the measured rate. We thus can rule out the (*E*)-to-(*Z*) photoisomerization of **Ec** as limiting step. A first possible rate-limiting step could be here the **ZIc** to **Fc** conversion. Indeed, we do not know what is actually the location of the (*E*)-cinnamate **Ec** within an embryo cell, and we observed that k_2 is considerably decreased if **Ec** is not located in water but in an organic-like medium. Another possible explanation could be that the uncaging process is limited by the off-rate constant of some complex involving **Ec** that would be located out from the laser focal point. In both cases, it is here important to notice that the observed uncaging rate constant would considerably depend on the structure of the caged alcohol.

Discussion

Evaluating the efficiency of a caging group is a complex issue. Indeed the demands on the caging group can vary considerably depending on the application. In the following discussion, we are essentially concerned with discussing two aspects of the *o*-hydroxycinnamic platform for uncaging applications in biology. We first examine processing issues that are relevant to condition the biological sample. We subsequently discuss the uncaging opportunities provided by the *o*-hydroxycinnamic photolabile moiety for two-photon uncaging in a biological context.

During this study, we have been particularly concerned with the solubility of the caged substrate. This point is especially significant for biological applications. For instance, in the zebrafish embryo considered here, the caged substrate has first to be dissolved in an aqueous solution, which requires an exhibition of some hydrophilicity, and then reach the targeted cell, which involves crossing hydrophobic barriers. From the latter point of view, the *o*-hydroxycinnamic platform is particularly favorable: this photolabile moiety is synthetically easily accessible, and the different substituents on the benzene ring can be easily changed to finely tune the hydrophilic/hydrophobic balance in the caged derivatives as well as in the coumarin coproduct. In particular, we consider as satisfactory the results obtained with **Ec** (and **Fc**) in which we introduced in the *o*-hydroxycinnamic caging moiety a conjugated acidic phenol with a protonation constant in the range of intracellular pH (4.5–7.5). First, the native acidic state absorbs only rather far in the UV: the strong UV–vis absorption yielding uncaging only occurs after dissolution in water, and the pure caged substrate

(30) Zon, L. I.; Peterson, R. T. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 35–44.

can be easily stored as an inert compound. Furthermore, at neutral pH such as in a cell, the caged substrate constantly switches between its acidic uncharged phenol state (making it soluble in a lipophilic environment such as a bilayer) and its basic negatively charged phenate form (conferring water solubility). Water solubility facilitates organism exposition to the caged substrate and the dual hydrophilic/hydrophobic character probably explains why we found **Ec** at the concentration of the incubating **Ec** solution even in cells deeply embedded in the zebrafish embryo. At the same time, the coumarin coproduct **Fc** is significantly water-soluble which permits a reliable interpretation of its fluorescence emission *in vivo*.⁹

Two-photon uncaging has been especially considered for biological applications in view of its promising spatial and temporal resolution. However most photochemically driven substrate releases involve a multistep mechanism with both photochemical and thermal reactions.¹¹ The primary photochemical event initiated at the focal spot of the laser beam and the subsequent substrate release are consequently most often decoupled in time and, correspondingly, in space since the intermediates generated after illumination would be generally free to diffuse. Thus a detailed kinetic analysis not restricted to the photochemical events is required to appreciate the efficiency of a photolabile protecting group for given two-photon uncaging applications.^{7,31} In the two following paragraphs, we examine two generic situations according to the position of the focal spot with regard to the cellular environment.

In extracellular photolysis, uncaging occurs in a volume which can be considered as infinite and two-photon uncaging is used to generate in the focal spot a concentration in photoreleased substrate that significantly departs from its concentration in the environment. Then an “efficient” caging group has to exhibit rate constants associated to the primary photochemical event as well as to the subsequent thermal reactions larger than the rate of diffusion through the laser beam waist (typically 10^4 s^{-1}).^{31,32} Moreover increasing the latter rate constants beyond the diffusion rate still improves the uncaging efficiency. To have a tunable delivery at nondetrimental laser powers, the rate-limiting step should be the primary photochemical event in which a two-photon uncaging action cross section should be at least be equal to 0.1–1 GM at 750 nm.

The boundary conditions are very different in intracellular photolysis: Two-photon uncaging now occurs in a closed volume and one is concerned with generating a homogeneous intracellular concentration in released substrate from a caged precursor faster than the biological phenomena to be triggered. The lower temporal resolution is now fixed by an homogenization time which is at least in the 10–100 ms range for a typical “small” substrate in a $1000 \mu\text{m}^3$ cell.³³ Then an “efficient” caging group only requires the rate constants of the primary photochemical event and of the subsequent thermal reactions to be larger than the rate of diffusion within the closed territory (typically 10^1 – 10^2 s^{-1}). Noticeably increasing the preceding rate constant does not improve here the uncaging efficiency but only forces diffusion to be taken into account to yield the

intracellular distribution in photoreleased substrate. In fact, the constraint on the rate constant in the case of intracellular photolysis is rather permissive in terms of action cross section with two-photon excitation of the primary photochemical event: 1 mGM range is now sufficient to be “efficient” at nondetrimental laser powers.

In the present *o*-hydroxycinnamate system, the primary photochemical event is the (*E*)- to (*Z*)-cinnamate photoisomerization which is associated to action cross sections with two-photon excitation exceeding the 1 GM range. From the latter point of view, the *o*-hydroxycinnamate is an excellent photochemical platform belonging to the most efficient available to date.^{3,5,8} Nevertheless, one has also to take into account the thermal reactions involved in the substrate release. Although Porter reported rate constants larger than 10^3 s^{-1} for phenol uncaging, we here observed at most the 1 s^{-1} range for alkyl alcohol uncaging with **Ec** in water. To increase the latter value, the present study suggests some possible improvement associated with modifying the substitution pattern of the cinnamate double bond: For instance, we observed that the addition of a methyl substituent increased k_2 by a factor of ten. At the present time, we estimate that the *o*-hydroxycinnamate system should be essentially restricted for alcohol uncaging in intracellular photolysis where its excellent fluorescence reporting features are particularly appropriate to yield information on the amount of released substrate. As an example, it should prove to be useful to control gene expression through the release of ligands for transcription factors. Indeed, tetracyclin and ecdysone are the inducers of two widely used gene expression inducible systems;^{34,35} they contain alcohol groups which can be used to graft *o*-hydroxycinnamate groups to inactivate their biological functions. Moreover, the relevant biological timescales associated with gene expression are fully compatible with release rates in the 1 s^{-1} or even the 10^{-2} s^{-1} range.

Conclusion

The present investigation underlines the significance of the *o*-hydroxycinnamic platform to design versatile photolabile protecting groups with fluorescence reporting for alcohols upon one- and two-photon excitation. The *o*-hydroxycinnamate series is synthetically easily accessible. An appropriate choice of the different substituents on the benzene ring is expected to allow for fine-tuning of the hydrophilic/hydrophobic balance in the caged derivatives as well as in the coumarin coproduct upon alcohol uncaging. In addition, the robust photophysical and photochemical properties are particularly attractive. The maximal wavelength for one-photon absorption of the *o*-hydroxycinnamates can be easily tuned at the UV–vis limit where the cinnamates exhibit a strong absorption. The caged alcohol is essentially nonfluorescent and quantitatively releases upon one-photon excitation the alcohol substrate together with a strongly fluorescent coumarin coproduct in a one-to-one molar ratio. Uncaging and excitation of the reporting fluorescent molecule can be additionally done using the same excitation source. We eventually observed maximal wavelength and action cross sections associated to uncaging upon two-photon excitation that favorably compare with the best reported values.

(31) Brown, E. B.; Shear, J. B.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y.; Webb, W. W. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489–499.

(32) Kiskin, N. I.; Ogden, D. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 571–587.

(33) In fact, one should also consider here that a caged compound might form a complex with some intracellular components (bilayer, proteins) not located at the laser focus. Then the apparent homogenization time could be associated to the off-rate of the caged substrate from the complex.

(34) Cambridge, S. B.; Geissler, D.; Keller, S.; Curten, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2229–2231.

(35) Lin, W.; Albanese, C.; Pestell, R. G.; Lawrence, D. S. *Chem. Biol.* **2002**, *12*, 1347–1353.

The *o*-hydroxycinnamic caging group appears particularly attractive in biological applications that do require precise but not necessarily “fast” two-photon excitation-induced substrate release. In particular, our results suggest that quantitative control of substrate delivery could be achieved *in vivo* at the second time scale by recording the fluorescence emission from the coumarin **F** coproduct that reports on the concentration in photoreleased substrate.

Experimental Section

Syntheses. 2,4-Dihydroxybenzaldehyde, 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde, 4-diethylamino-2-hydroxybenzaldehyde, 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde, 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehyde, carboethoxyethylidenetriphenylphosphorane and carboethoxymethylidenetriphenylphosphorane were commercially available. The syntheses of the other starting substituted benzaldehydes and of the 1-carboxymethylidene triphenylphosphorane are reported in Supporting Information.

General Procedures. The commercially available chemicals were used without further purification. Anhydrous solvents were freshly distilled before use. Column chromatography (CC) used silica gel 60 (0.040–0.063 mm) from Merck; analytical and thin layer chromatography (TLC) was performed with Merck silica gel 60 F₂₅₄ precoated plates, detection by UV (254 nm); melting point used a Büchi 510. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were obtained by AM 250 SY Bruker. Chemical shifts (δ) in ppm related to protonated solvent as internal reference: (¹H) CHCl₃ in CDCl₃, 7.26 ppm; CHD₂COCD₃ in CD₃-COCD₃, 2.20 ppm; CHD₂SOCD₃ in CD₃SOCD₃, 2.54 ppm; (¹³C) ¹³-CDCl₃ in CDCl₃, 77.0 ppm; ¹³CD₃COCD₃ in CD₃COCD₃, 29.8 ppm; ¹³CD₃SOCD₃ in CD₃SOCD₃, 39.6 ppm. Coupling constants *J* are given in Hz. Mass spectrometry (chemical ionization and high resolution with NH₃ or CH₄) was performed at the Service de Spectrométrie de masse de l'ENS. Microanalyses were obtained from the Service de Microanalyses de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.

General Procedure for Wittig Reactions.²⁵ A mixture of aldehyde and carboethoxyethylidenetriphenylphosphorane or carboethoxymethylidenetriphenylphosphorane (1.5 equiv) in toluene (10 mL for 1 mmol of aldehyde) was heated at 60 °C under argon upon protecting from light. The course of the reaction was followed by TLC (cyclohexane/AcOEt). After 2 to 4 h, the reaction was completed. After cooling to room temperature, toluene was removed in a vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (mixtures of ethyl acetate and cyclohexane as eluent) to yield the desired cinnamate in high yield (from 60 to 90%; about 10% of the coumarin resulting from thermal *trans*–*cis* isomerization followed by lactonization was formed during the reaction).

(E)-3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'a). Yield, 60%; mp 121–122 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CD₃-COCD₃, 298 K) δ : 8.63 (bs, 1 H), 7.9 (s, 1 H), 7.27 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 6.5 (d, 1 H, *J* = 2.3 Hz), 6.45 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.3 Hz), 4.22 (q, 2 H, *J* = 7 Hz), 2.07 (s, 3 H), 1.31 (t, 3 H, *J* = 7 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CD₃COCD₃, 298 K) δ : 168.6, 159.7, 157.7, 134.5, 131.5, 125.1, 115.2, 107.3, 102.9, 60.3, 14.1, 14.0. Anal. Calcd (%) for C₁₂H₁₄O₄ (222.09): C, 64.85; H, 6.35. Found: C, 64.63; H, 6.31. Mass spectrometry, MS (CI, NH₃): *m/z* 223 [*M* + 1].

(E)-3-(6-Hydroxy-benzo(1,3)dioxo-5-yl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'b). Yield, 70%; mp 113–114 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 7.65 (s, 1 H), 6.70 (s, 1 H), 6.47 (s, 1 H), 5.94 (s, 1 H), 5.02 (s, 2 H), 4.27 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 2.02 (s, 3 H), 1.34 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CD₃COCD₃, 298 K) δ : 168.9, 125.5, 149.7, 141.6, 135.0, 126.5, 115.7, 109.3, 102.3, 98.6, 61.0, 14.7, 14.5. Anal. Calcd (%) for C₁₃H₁₄O₅ (250): C, 62.39; H, 5.64. Found: C, 62.27; H, 5.59. Mass spectrometry, MS (CI, CH₄): *m/z* 251 [*M* + 1]. MS (CI, CH₄, HR): *m/z* 251.0924 (calcd mass for C₁₃H₁₅O₅, 251.0919).

(E)-3-(3,5-Dibromo-2,4-dihydroxy-phenyl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'c). Yield, 35%; mp 112–114 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 7.67 (s, 1 H), 7.38 (s, 1 H), 5.99 (s, 1 H), 5.88 (s, 1 H), 4.27 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 2.03 (d, 3 H, *J* = 1.4 Hz), 1.34 (t, 3 H, *J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 168.2, 151.1, 149.7, 132.0, 131.3, 129.7, 117.4, 100.1, 99.0, 61.0, 14.2 (2C). Anal. Calcd (%) for C₁₂H₁₂O₄Br₂ (380.03): C, 37.93; H, 3.18. Found: C, 37.70; H, 3.10. Mass spectrometry, MS (CI, CH₄): *m/z* 381 [*M* + 1]. MS (CI, CH₄, HR): *m/z* 380.9161 (calcd mass for C₁₂H₁₃O₄⁷⁹-Br⁸¹Br, 380.9153).

(E)-3-(4-Diethylamino-2-hydroxy-phenyl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'd).²⁵ Yield, 70%; mp 96–97 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 7.71 (s, 1 H), 7.12 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz), 6.21 (dd, 1 H, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz), 6.1 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz), 5.3 (s, 1 H), 4.18 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 3.27 (q, 4 H, *J* = 7.1 Hz), 2.01 (s, 3 H), 1.26 (t, 3 H, *J* = 7.17 Hz), 1.1 (t, 6 H, *J* = 7.1 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 169.3, 155.6, 149.6, 133.6, 131.2, 125.1, 110.2, 104.3, 98.0, 60.7, 44.4 (2C), 14.4 (2C), 12.7 (2C). Anal. Calcd (%) for C₁₆H₂₃O₃N (277.36): C, 69.28; N, 5.05; H, 3.18. Found: C, 69.14; N, 5.07; H, 8.65. Mass spectrometry, MS (CI, CH₄): *m/z* 278 [*M* + 1]. MS (CI, CH₄, HR): *m/z* 278.1761 (calcd mass for C₁₆H₂₄O₃N, 278.1756).

(E)-3-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-phenyl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'e). Yield, 30%; mp 99 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 7.49 (d, 1 H, *J* = 1.1 Hz), 6.12 (dd, 2 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 1.1 Hz), 4.93 (s, 1 H), 4.27 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 3.79 (s, 3 H), 3.78 (s, 3 H), 1.57 (s, 3 H), 1.34 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 168.1, 161.8, 158.8, 154.5, 131.5, 131.3, 104.6, 93.2, 91.3, 60.9, 55.6, 55.4, 15.0, 14.3. Anal. Calcd (%) for C₁₄H₁₈O₅ (266.12): C, 63.15; H, 6.81. Found: C, 63.14; H, 6.72. Mass spectrometry, MS (CI, NH₃): *m/z* 367 [*M* + 1].

(E)-3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'f). Yield, 60%; mp 99 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 7.73 (s, 1 H), 7.11 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz), 6.8 (bs, 1 H), 6.42 (s, 1 H), 6.39 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz), 4.17 (q, 2 H, *J* = 7.2 Hz), 3.68 (s, 3 H), 1.96 (s, 3 H), 1.24 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 169.4, 161.1, 155.7, 134.2, 130.8, 127.4, 115.7, 106.1, 101.5, 61.0, 55.2, 14.2, 14.1. Anal. Calcd (%) for C₁₃H₁₆O₄ (236.10): C, 66.09; H, 6.83. Found: C, 66.03; H, 6.78. Mass spectrometry, MS (CI, NH₃): *m/z* 237 [*M* + 1].

(E)-3-(2-Hydroxy-naphtalen-1-yl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'g). Yield, 80%; mp 94–96 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 7.9 (s, 1 H), 7.7 (m, 3 H), 7.47–7.21 (m, 3 H), 5.6 (bs, H), 4.35 (q, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 1.87 (d, 3 H, *J* = 0.9 Hz), 1.40 (t, 3 H, *J* = 7.3 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 167.6, 150.0, 134.5, 132.8, 132.1, 130.2, 128.7, 128.3, 126.8, 123.9, 123.7, 117.6, 114.6, 61.2, 14.6, 14.3. Anal. Calcd (%) for C₁₆H₁₆O₃ (256): C, 75.00; H, 6.25. Found: C, 74.95; H, 6.28. Mass spectrometry, MS (CI, CH₄): *m/z* 257 [*M* + 1]. MS (CI, CH₄, HR): *m/z* 257.1176 (calcd mass for C₁₆H₁₇O₃, 257.1178).

(E)-3-(2-Hydroxy-5-nitrophenyl)-2-methyl Acrylic Acid Ethyl Ester (E'h). Yield, 50%; mp 115–115.5 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 8.15 (m, 2 H), 7.63 (s, 1 H), 6.99 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz), 6.10 (s, 1 H), 4.31 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 2.03 (d, 3 H, *J* = 1.2 Hz), 1.37 (t, 3 H, *J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ : 169.1, 160.1, 140.9, 132.4, 131.9, 126.1, 125.9, 123.3, 116.1, 61.8, 14.2 (2C). Anal. Calcd (%) for C₁₂H₁₃NO₅ (251): C, 57.37; N, 5.58; H, 5.22. Found: C, 57.45; N, 6.58; H, 5.30. Mass spectrometry, MS (CI, CH₄): *m/z* 252 [*M* + 1].

(E)-3-(2,4-Dihydroxyphenyl) Acrylic Acid Ethyl Ester (Ea). Yield, 70%; mp 193–195 °C. ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CD₃SOCD₃, 298 K) δ : 10.12 (bs, 1 H), 9.9 (bs, 1 H), 7.78 (d, 1 H, *J* = 16 Hz), 7.42 (d, 1 H, *J* = 8.6 Hz), 6.4–6.35 (m, 2 H), 6.28 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.1 Hz), 4.15 (q, 2 H, *J* = 7.2 Hz), 1.24 (t, 3 H, *J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (ppm, 62.8 MHz, CD₃SOCD₃, 298 K) δ : 167.1, 160.9, 158.5,

140.3, 130.3, 113.0, 112.6, 107.8, 102.4, 59.4, 14.3. Anal. Calcd (%) for $C_{11}H_{12}O_4$ (208.07): C, 63.45; H, 5.81. Found: C, 63.37; H, 5.80.

(E)-3-(6-Hydroxy-benzo(1,3)dioxo-5-yl) Acrylic Acid Ethyl Ester (Eb). Yield, 60%; mp 149–150 °C. 1H NMR (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ : 8.02 (d, 1 H, $J = 16.1$ Hz), 6.92 (s, 1 H), 6.41 (s, 1 H), 6.31 (d, 1 H, $J = 15.9$ Hz), 6.02 (s, 1 H), 5.95 (s, 2 H), 4.26 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 1.29 (t, 3 H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (ppm, 62.8 MHz, CD_3COCD_3 , 298 K) δ : 167.8, 153.7, 151.5, 142.6, 140.1, 115.5, 114.7, 106.5, 102.5, 98.6, 60.4, 14.7. Anal. Calcd (%) for $C_{12}H_{12}O_5$ (236): C, 61.01; H, 5.12. Found: C, 60.86; H, 5.21. Mass spectroscopy, MS (CI, CH_4): m/z 237 [$M+1$]. MS (CI, CH_4 , HR): m/z 237.0762 (calcd mass for $C_{12}H_{12}O_5$, 237.0763).

(E)-3-(3,5-Dibromo-2,4-dihydroxyphenyl) Acrylic Acid Ethyl Ester (Ec). Yield, 40%; mp 118–118.5 °C. 1H NMR (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ : 7.81 (d, 1 H, $J = 16.1$ Hz), 7.60 (s, 1 H), 6.47 (d, 1 H, $J = 16.1$ Hz), 6.07 (bs, 2 H), 4.22 (q, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 1.33 (t, 3 H, $J = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (ppm, 62.8 MHz, CD_3COCD_3 , 298 K) δ : 167.3, 154.2, 153.7, 138.7, 131.6, 118.8, 117.8, 102.1, 101.8, 60.7, 14.6. Anal. Calcd (%) for $C_{11}H_{10}O_4Br_2$ (365.9): C, 36.10; H, 2.75. Found: C, 36.06; H, 2.63. Mass spectrometry, MS (CI, CH_4): m/z 367 [$M+1$]. MS (CI, CH_4 , HR): m/z 364.9024, 366.9006, and 368.8992 (calcd mass for $C_{11}H_{10}O_4Br_2$: 364.9024, 366.9004, and 368.8985).

(E)-3-(4-Diethylamino-2-hydroxy-phenyl) Acrylic Acid Ethyl Ester (Ed). Yield, 65%; mp 134–137 °C. 1H NMR (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ : 7.88 (d, 1 H, $J = 15.9$ Hz), 7.31 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz), 6.33 (d, 1 H, $J = 15.9$ Hz), 6.25 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz), 6.03 (s, 1 H), 5.66 (s, 1 H), 4.24 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 3.34 (q, 4 H, $J = 7.0$ Hz), 1.32 (t, 3 H, $J = 7.0$ Hz), 1.16 (t, 6 H, $J = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (ppm, 62.8 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ : 168.6, 156.8, 150.7, 140.3, 130.7, 112.2, 110.0, 105.1, 98.0, 60.0, 44.5 (2C), 14.4, 12.6 (2C). Anal. Calcd (%) for $C_{15}H_{21}O_3N$ (263.3): C, 68.40; H, 8.03; N, 5.31. Found: C, 67.87; H, 7.98; N, 5.65. Mass spectroscopy, MS (CI, CH_4): m/z 264 [$M+1$]. MS (CI, CH_4 , HR): m/z 264.1596 (calcd mass for $C_{15}H_{21}O_3N$: 264.1600).

(E)-3-(8-Hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido(3,2,1-ij)quinolin-9-yl) Acrylic Acid Ethyl Ester (Ei). Yield, 75%; mp 167–169 °C. 1H NMR (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ : 7.86 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 6.97 (s, 1 H), 6.24 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 4.95 (s, 1 H), 4.22 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 3.38 (q, 4 H, $J = 5.2$ Hz), 2.67 (t, 4 H, $J = 6.4$ Hz), 1.94 (m, 4 H), 1.31 (t, 3 H, $J = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (ppm, 62.8 MHz, CD_3OCD_3 , 298 K) δ : 168.4, 153.8, 146.7, 141.5, 126.5, 115.2, 111.5, 111.0, 108.0, 59.9, 50.6, 49.8, 28.0, 22.8, 22.1, 22.0, 14.8. Anal. Calcd (%) for $C_{17}H_{21}O_3N$ (287): C, 71.06; N, 4.87; H, 7.37. Found: C, 70.83; N, 4.70; H, 7.5. Mass spectroscopy, MS (CI, CH_4): m/z 288 [$M+1$]. MS (CI, CH_4 , HR): m/z 288.1603 (calcd mass for $C_{17}H_{21}O_3N$: 288.1600).

Solutions. Except for pK_a measurements performed in the Britton–Robinson buffer³⁶ (acetic acid, boric acid, phosphoric acid) at 0.1 M, in vitro experiments were made in $CH_3CN/20$ mM Tris (pH = 7) 100 mM NaCl buffer 1/1 v/v or in acetonitrile. No thermal (*E*) to (*Z*) isomerization or thermal ester hydrolysis were ever observed at the time scale of the present experiments (24 h).

pH Measurements. pH measurements were performed on a Standard pH meter PHM210 Radiometer Analytical that was calibrated with buffers at pH 4 and 7.

Spectroscopic Measurements and Irradiation Experiments. One-Photon Excitation. UV–Visible Absorption. UV/vis absorption spectra were recorded at 293 K on a Kontron Uvikon-940 spectrophotometer. Molar absorption coefficients were extracted while checking the validity of the Beer–Lambert law.

The evolutions of the absorbance as a function of pH were analyzed with the SPECFIT/32 Global Analysis System (version 3.0 for 32-bit

Windows systems) to extract the pK_a of the ground state (see Supporting Information).³⁷

Steady-State Fluorescence Emission. Corrected fluorescence spectra upon one-photon excitation were obtained from a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorimeter. Solutions for fluorescence measurements were adjusted to concentrations such that the absorption maximum was around 0.15 at the excitation wavelength. The overall fluorescence quantum yields after one-photon excitation $\Phi_F^{(1)}$ were calculated from the relation (1):

$$\Phi_F^{(1)} = \Phi_{ref}^{(1)} \frac{1 - 10^{-A_{ref}(\lambda_{exc})}}{1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}} \frac{D}{D_{ref}} \left(\frac{n}{n_{ref}} \right)^2 \quad (1)$$

where the subscript ref stands for standard samples. $A(\lambda_{exc})$ is the absorbance at the excitation wavelength, D is the integrated emission spectrum, and n is the refractive index for the solvent. The uncertainty in the experimental value of $\Phi_F^{(1)}$ was estimated to be $\pm 10\%$. The standard fluorophore for the quantum yields measurements was quinine sulfate in 0.1 M H_2SO_4 with $\Phi_{ref}^{(1)} = 0.55$.³⁸

Irradiation Experiments. Three different protocols have been used to perform the irradiations relying on one-photon excitation.

The experiments devoted to the identification of the products from the photochemical isomerization of the cinnamate **Ec** by 1H NMR were performed for various durations at 20 °C by putting a bench top UV lamp (6 W 365 nm UV lamp; Fisher Bioblock) above a cuvette containing $V = 2.5$ mL of illuminated solution that was subsequently transferred into a NMR tube.

The experiments devoted to evidencing the formation of the coumarin **Fc** from the photochemical isomerization of the cinnamate **Ec** by UV–vis absorption as well as to analyze the kinetics of **E** photoisomerization were performed on 2.5 mL samples in 1×1 cm² quartz cuvettes under constant stirring. Excitations were performed with the 75 W xenon lamp of a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorometer. In the case of the kinetics experiments, the continuous illumination was performed at several slit widths to cover a significant range of incident light intensities. The corresponding incident light intensities were systematically calibrated by determining the kinetics of photoconversion of the α -(4-dimethylaminophenyl)-*N*-phenylnitron into 3-(4-dimethylaminophenyl)-2-phenyloxaziridine in fresh dioxane as described in ref 39. During the present series of experiments, typical incident light intensities were in the 10^{-7} einstein min⁻¹ range.

The experiments devoted to analyze the kinetics of the thermal processes following the (*E*) to (*Z*) cinnamate photoisomerization were performed on 2.5 mL samples in 1×1 cm² quartz cuvettes. The cuvette was continuously submitted to the irradiation from a bench top UV lamp (6 W 365 nm UV lamp; Fisher Bioblock) for 1 min. The absorbance was subsequently recorded as a function of time on the red edge of the absorption band.

Two-Photon Excitation. The two-photon experiments were performed with a home-built setup^{9,40} using fluorescein for calibration. Illumination comes from a mode-locked titanium–sapphire laser (Mira pumped by Verdi, Coherent). Fluorescence photons were collected with an Olympus UPlanApo 60 \times 1.2 NA water immersion objective through filters (AHF Analysentechnik) and optical fibers (FG200LCR multi-mode fiber, Thorlabs) connected to two avalanche photodiodes (SPCM-AQR-14, Perkin-Elmer, Vaudreuil, Canada) coupled to an ALV-6000 correlator (ALV GmbH). The excitation input power was measured with a Lasermate powermeter (Coherent) or a Nova II

- (37) Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1985**, *32*, 95–101. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1985**, *32*, 257–264. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1985**, *32*, 1133–1139. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1986**, *33*, 943–951.
 (38) Demas, J. N.; Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991–1024.
 (39) Wang, P. F.; Jullien, L.; Valeur, B.; Filhol, J. S.; Canceill, J.; Lehn, J. M. *New J. Chem.* **1996**, *20*, 895–907.
 (40) Charier, S.; Meglio, A.; Alcor, D.; Cogné-Laage, E.; Allemand, J. F.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15491–15505.

(36) Frugoni, C. *Gazz. Chim. Ital.* **1957**, *87*, 403–407.

powermeter (Ophir Optronics Ltd.). Powers were kept under 5 mW at the sample to stay in the quadratic range for absorption and to be not detrimental to cells in the *in vivo* application.⁴¹ The intensity and the temporal correlation function of the collected fluorescence emission are recorded.

FCS Experiments. FCS autocorrelation curve $G(\tau)$ were recorded during the irradiation experiments devoted to extract the action photoisomerization cross sections with two-photon excitation (*vide infra*). At the beginning of the irradiation experiment, the fluorescence emission from the solution of the cinnamate **E** is too weak to record any tractable FCS curve. Therefore we first irradiate the **E** solution to produce enough coumarin coproduct **F** to get enough signal and appropriate FCS curves: We typically excite the solution at 750 nm with a laser power in the 1–2 mW range for $\Delta t_0 = 2$ h which typically corresponds to 1% of **E** \rightarrow **F** photoconversion. Beyond Δt_0 , any FCS autocorrelation curve $G(\tau)$ can be reliably fitted by assuming that the solution contains one freely diffusing species only: the coumarin **F**. Indeed, the contribution of the residual caged alcohol **E** in the $G(\tau)$ curve can be neglected owing to the weak **E** brightness. We consequently used eq 2 to fit the experimental FCS autocorrelation curves $G(\tau)$ displayed in Figure 3b.⁴²

$$G(\tau) = \frac{1}{N_F} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (2)$$

In eq 2, N_F and τ_D designate the average number of **F** molecules in the illuminated spot described as 2D-Gaussian and the diffusion time of **F** through the beam waist.

Irradiation Experiments. The irradiations were performed on 2.5 μ L samples contained in a cylindrical well made of paraffin (radius, 1.25 mm; height, 2 mm) sealed with Parafilm (no evaporation occurs on a time scale of several days).

Kinetic Analysis of the Photoisomerization of the Cinnamates E to the Coumarins F. The Model. We are here interested in the derivation of the theoretical expressions of the concentrations in **E**, **Z**, **I**, and **F** (E , Z , I , and F , respectively) during the *in vitro* uncaging process.

We first assume that the system (volume V) is homogeneous at any time of its evolution. In fact, the whole system is not homogeneously illuminated during the irradiation experiments; only part of the system (volume V_{exc}) is submitted to light. Thus matter transport has to be considered to support the homogeneity assumption:

(1) In the case of the one-photon illumination, the cuvette content is continuously stirred, and the homogeneity assumption is fulfilled as soon as uncaging does not occur much below the second time scale which is here the case.

(2) In contrast, there is no such stirring upon two-photon illumination; homogenization is controlled by diffusion. In fact, we take here again advantage from the slow uncaging rates with regards to the homogenization process: the uncaging relaxation time is much larger than the characteristic time τ_V required for **E**, **Z**, **I**, and **F** to diffuse in the whole system. Indeed, for *in vitro* two-photon experiments, $V = 2.5$

μ L and $\tau_V = 4$ min, whereas $\tau_u = 1/(k_1 + k_{-1}) \approx 4700$ min in the fastest situations encountered during that work.

Thus the following equations can be considered as valid beyond a characteristic homogenization time scale by considering concentrations averaged over the whole volume V .

Then we rely on the mechanism displayed in Scheme 3a to write eqs (3–6) describing the concentration evolutions:

$$\frac{dE}{dt} = -\kappa_1 E + \kappa_{-1} Z \quad (3)$$

$$\frac{dZ}{dt} = \kappa_1 E - (\kappa_{-1} + \kappa_2) Z + \kappa_{-2} I \quad (4)$$

$$\frac{dI}{dt} = \kappa_2 Z - (\kappa_{-2} + \kappa_3) I + \kappa_{-3} F \times A \quad (5)$$

$$\frac{dF}{dt} = \kappa_3 I - \kappa_{-3} F \times A \quad (6)$$

where A designates the concentration in photoreleased alcohol.

Then we first take into account that the exchange between **Z** and **I** is fast at the time scale of the *in vitro* irradiation experiments; beyond the relaxation time associated to the $Z \rightleftharpoons I$ exchange, it is meaningful to introduce the average species **ZI** (concentration $ZI = Z + I$; then the concentrations in **Z** and **I** are $(1/(1+\mathcal{K}_2)) ZI$ and $(\mathcal{K}_2/(1+\mathcal{K}_2)) ZI$, respectively, where \mathcal{K}_2 designates the equilibrium constant associated to the conversion of **Z** into **I**). We additionally consider the large coumarin stability to neglect the terms associated to the back reaction (–3) in eqs 5–6. Thus eqs 3–6 transform into eqs 7–9:

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 E + k_{-1} ZI \quad (7)$$

$$\frac{dZI}{dt} = k_1 E - (k_{-1} + k_2) ZI \quad (8)$$

$$\frac{dF}{dt} = k_2 ZI \quad (9)$$

with $k_1 = \kappa_1$, $k_{-1} = (1/(1+\mathcal{K}_2))\kappa_{-1}$, and $k_2 = (\mathcal{K}_2/(1+\mathcal{K}_2))\kappa_3$. Equations 7–9 make clear the interpretation of the reduced mechanism displayed in Scheme 3b, that it is only valid beyond the time scale for exchange between **Z** and **I**.

During the continuous illumination experiments, the differential equation governing the temporal evolution of F is

$$\frac{d^3 F}{dt^3} + (k_1 + k_{-1} + k_2) \frac{d^2 F}{dt^2} + k_1 k_2 \frac{dF}{dt} = 0 \quad (10)$$

Considering that the system initially only contains **E** (initial concentration E_0), we get after integration:

$$E = \frac{E_0}{\sqrt{\Delta}} \left(\frac{\sqrt{\Delta} + k_1}{2} e^{-(k_1+k_{-1}+k_2+\sqrt{\Delta})t/2} + \frac{\sqrt{\Delta} - k_1}{2} e^{-(k_1+k_{-1}+k_2-\sqrt{\Delta})t/2} \right) \quad (11)$$

$$ZI = \frac{k_1 E_0}{\sqrt{\Delta}} \left(e^{-(k_1+k_{-1}+k_2-\sqrt{\Delta})t/2} - e^{-(k_1+k_{-1}+k_2+\sqrt{\Delta})t/2} \right) \quad (12)$$

$$F = \frac{2k_1 k_2 E_0}{\sqrt{\Delta}} \left[\frac{1}{k_1 + k_{-1} + k_2 + \sqrt{\Delta}} (-1 + e^{-(k_1+k_{-1}+k_2+\sqrt{\Delta})t/2}) + \frac{1}{k_1 + k_{-1} + k_2 - \sqrt{\Delta}} (1 - e^{-(k_1+k_{-1}+k_2-\sqrt{\Delta})t/2}) \right] \quad (13)$$

where $\Delta = (k_1 + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1 k_2$.

(41) During the present series of experiments, we observed the formation of holes from focusing the laser beam in the zebrafish embryo at laser powers beyond 15 mW at 750 nm at the sample. We do not think that this detrimental effect results from heat associated with light absorption with residual one-photon excitation at 750 nm followed by nonradiative deexcitation. First, below 5 mW at 750 nm at the sample, water does not lead to any significant heating (see: Schönle, A.; Hell, S. W.; *Opt. Lett.* **1998**, *23*, 325–327). In addition, the zebrafish embryo does not contain any significant amount of interfering endogenous chromophores at that step of development. In particular, we were never able to express GFP under control of a heat-shock promoter by simply focusing the IR laser beam in any targeted cell of an appropriate transgenic embryo. In fact, we estimate that our observation is more probably related to plasma formation that occurs at 10 mW at 750 nm even in pure solvents (see: Sacchi, C. A. *J. Opt. Soc. Am. B* **1991**, *8*, 337–345. Vogel, A.; Noack, J.; Hüttman, G.; Paltauf, G.; *App. Phys. B* **2005**, *85*, 1015–1047).

(42) Krichevsky, O.; Bonnet, G. *Rep. Prog. Phys.* **2002**, *65*, 251–297.

Introducing \mathcal{Q}_E , \mathcal{Q}_{ZI} and \mathcal{Q}_F the brightnesses of **E**, **ZI**,⁴³ and **F**, respectively, we eventually derive the temporal evolution of the fluorescence intensity I_F as

$$I_F = \alpha \frac{E_0}{\sqrt{\Delta}} \left[\sqrt{\Delta} \mathcal{Q}_F + e^{-(k_1+k_{-1}+k_2-\sqrt{\Delta})t/2} \left(\mathcal{Q}_{ZI} k_1 + \mathcal{Q}_E \frac{\sqrt{\Delta} - k_1}{2} - \mathcal{Q}_F \frac{2k_1 k_2}{k_1 + k_{-1} + k_2 - \sqrt{\Delta}} \right) + e^{-(k_1+k_{-1}+k_2+\sqrt{\Delta})t/2} \left(-\mathcal{Q}_{ZI} k_1 + \mathcal{Q}_E \frac{\sqrt{\Delta} + k_1}{2} + \mathcal{Q}_F \frac{2k_1 k_2}{k_1 + k_{-1} + k_2 + \sqrt{\Delta}} \right) \right] \quad (14)$$

where α is a collecting factor of fluorescence emission.

In the case of relaxation experiments devoted to independently measuring the rate constant associated to the thermal conversion of **ZI** to **F**, the evolution of the sample absorption with one-photon excitation \mathcal{A} is followed as a function of time after an initial strong illumination pulse. Adopting the second step displayed in Scheme 3b to model the system relaxation, the absorbance \mathcal{A} obeys an exponential law: $\mathcal{A}(t) = \mathcal{A}_0 \exp(-k_2 t) + \mathcal{A}_\infty [1 - \exp(-k_2 t)]$.

Extraction of the Action Photoisomerization Cross Sections with One- and Two-Photon Excitation. One-Photon Illumination. The orders of magnitude of k_1 , k_{-1} , and k_2 are similar under the present experimental conditions with one-photon excitation. The fluorescence evolution is thus directly fitted with eq 14 using $\chi_1 = (k_1 + k_{-1} + k_2 - \sqrt{\Delta})/2$, $\chi_2 = (k_1 + k_{-1} + k_2 + \sqrt{\Delta})/2$, $A_1 = ((\mathcal{Q}_{ZI}/\mathcal{Q}_F)k_1 + \mathcal{Q}_E/\mathcal{Q}_F (\sqrt{\Delta} - k_1)/2 - k_1 k_2/\chi_1)$ and $A_2 = (- (\mathcal{Q}_{ZI}/\mathcal{Q}_F)k_1 + \mathcal{Q}_E/\mathcal{Q}_F (\sqrt{\Delta} + k_1)/2 + k_1 k_2/\chi_2)$ as floating parameters. k_1 , k_{-1} , and k_2 are then extracted from analyzing the dependence of χ_1 and χ_2 on light intensity. In addition, A_1 and A_2 provide $\mathcal{Q}_{ZI}/\mathcal{Q}_F$ and $\mathcal{Q}_E/\mathcal{Q}_F$.

The action photoisomerization cross sections with one-photon excitation are eventually derived from the expressions of k_1 and k_{-1} given by the relations (15–16):³⁹

$$k_1 = \frac{2.3 \epsilon_E(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \phi_{EZ}^{(1)} I}{V} I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \quad (15)$$

$$k_{-1} = \frac{1}{1 + \mathcal{K}_2} \frac{2.3 \epsilon_Z(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \phi_{ZE}^{(1)} I}{V} I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \quad (16)$$

In eqs (15,16), $\epsilon_E(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$ and $\epsilon_Z(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$, $\phi_{EZ}^{(1)}$ and $\phi_{ZE}^{(1)}$, l , V , and $I_0(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$ designate the molar absorption coefficients of the (*E*) and (*Z*) cinnamate stereoisomers, the quantum yields for the (*E*)- to (*Z*)- and (*Z*)- to (*E*)-photoconversions, the path length of the light beam, the irradiated volume, and the light intensity at the excitation wavelength, respectively.

In Table 1, we introduce the steady-state constant $K_1(\lambda_{\text{exc}}^{(1)})$ associated to the **E** to **ZI** exchange with one-photon excitation at $\lambda_{\text{exc}}^{(1)}$:

$$K_1 = (1 + \mathcal{K}_2) \frac{\epsilon_E(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \phi_{EZ}^{(1)}}{\epsilon_Z(\lambda_{\text{exc}}^{(1)}) \phi_{ZE}^{(1)}} \quad (17)$$

Two-Photon Illumination. To derive the expressions of k_1 and k_{-1} when two-photon excitation is used, we consider that the reactions (1) and (–1) displayed in Scheme 3b take place only in the focal volume V_{exc} resulting from laser focusing. The value k_2 is now much larger than k_1 and k_{-1} under the present experimental conditions with two-photon excitation. In particular, $\chi_1 = k_1$ and $\chi_2 = k_2$ at first order. Upon assuming that the reservoir of starting cinnamate is infinite ($E = E_0$) and by neglecting the brightness of **E** in front of the one of **F**, one easily demonstrates that the temporal fluorescence evolution given in eq 14 becomes linear in the kinetic regime between the times $1/k_2$ and

(43) $\mathcal{Q}_{ZI} = (1/(1 + \mathcal{K}_2))\mathcal{Q}_Z + (\mathcal{K}_2/(1 + \mathcal{K}_2))\mathcal{Q}_I$ where \mathcal{Q}_Z and \mathcal{Q}_I designate the brightnesses of **Z** and **I**, respectively.

$1/k_1$ which was analyzed here. Then the corresponding slope of the linear I_F variation is equal to $\dot{I}_F = \alpha \mathcal{Q}_F E_0 k_1$.

$\alpha \mathcal{Q}_F$ can be independently measured by recording and analyzing the APD counts and the autocorrelation curve from a solution of the coumarin **F**. The APD counts provide $\alpha \mathcal{Q}_F N_F P^2$ where N_F and P designate the average number of **F** molecules in the illuminated spot and the laser power at the sample. The FCS autocorrelation curve gives N_F from the ordinate at the origin, and P is measured with the powermeter.

E_0 being known, k_1 can be thus derived from \dot{I}_F .⁴⁴ The action photoisomerization cross section with two-photon excitation $\delta_E^{(2)} \Phi_{EZ}^{(2)}$ is eventually derived from the expressions of k_1 following Kiskin et al.:⁷

$$k_1 = 0.737 \delta_E^{(2)} \Phi_{EZ}^{(2)} \frac{\mathcal{J}}{\tau_p} \left(\frac{\lambda}{\pi h c w_{xy}} \right)^2 \frac{V_{\text{exc}} P^2}{V} \quad (18)$$

In eq 18, $\delta_E^{(2)}$, $\Phi_{EZ}^{(2)}$, \mathcal{J} , τ_p , and w_{xy} designate the cross sections for two-photon absorption leading to (*E*)- to (*Z*)-photoisomerization at the excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}^{(2)}$ of **E**, the quantum yields associated to the (*E*)- to (*Z*)-photoconversions after two-photon excitation, the period of the laser pulses (13.6 ns in our case), the duration of the laser pulses (200 fs), and the waist of the focused laser beam (0.3 μm).

Acknowledgment. Prof. Sophie Vrız is gratefully acknowledged for generous gifts of zebrafish embryos. Dr. Jean-François Allemand is gratefully acknowledged for his help in designing FCS experiments. This research is financially supported by the ‘‘Association pour la Recherche sur le Cancer’’ (ARC) (2005, Project n3787).

Supporting Information Available: Syntheses of the non-commercially available starting substituted benzaldehydes and of the 1-carboxymethylidene triphenyl phosphorane; preliminary screening of the thermal stability and the photophysical and the photochemical properties of the caged model compounds **Ea–h** in aqueous solutions (Table 1S); a schematic picture to analyze the photochemical and thermal isomerizations in the cinnamate series (Schemes 1S and 2S); UV–vis absorption spectra of **Ea** and **Eb** (Figure 1S); measurement of the **Ec** and **Fc** protonation constants (Figures 2Sa–c); identification of the products from the photochemical isomerization of the cinnamate **Ec** with one-photon excitation (Figures 3Sa–b, 4Sa–d, and 5S); dependence of the apparent thermodynamic constant for the **Ec** to **ZIc** exchange on the one-photon excitation wavelength (Figures 6S and 7S, Scheme 3S); model for the kinetics of two-photon uncaging in vivo. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA0722022

(44) Although here less precise, a satisfactory order of magnitude of k_1 can also be extracted from the FCS data. In the considered kinetic regime, **E** can be considered to directly afford **F** with k_1 rate constant and the number of **F** molecules in the focal point, N_F , increases linearly with time with a slope $E_0 k_1$. Then the average number of molecules $1/G(0) = \langle N_F \rangle_{[t_1; t_2]}$ extracted from the FCS experiment between time t_1 and t_2 (0 and 1500 s, and then 4500 and 6000 s in the experiment shown in Figure 3b) is given by the expression:

$$\frac{1}{\langle N_F \rangle_{[t_1; t_2]}} = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{E_0 k_1 t + N_F^0} = \frac{1}{E_0 k_1 (t_2 - t_1)} \ln \left(\frac{E_0 k_1 t_2 + N_F^0}{E_0 k_1 t_1 + N_F^0} \right)$$

where N_F^0 is the number of **F** molecules in the focal point at $t = 0$ s. Then the results from at least two FCS experiments provide N_F^0 and k_1 . In the case of the curves displayed in Figure 3b, we can extract in particular $k_1 = 1.2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ which is in good agreement with the value obtained from the slope extracted from Figure 3a, $k_1 = 1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.

Two-Photon Uncaging with Fluorescence Reporting: Evaluation of the ortho-Hydroxy Cinnamic Platform

Nathalie Gagey,[†] Pierre Neveu,^{†,‡} Chouaha Benbrahim,[†] Bernard Goetz,[‡] Isabelle Aujard,[†] Jean-Bernard Baudin,[†] Ludovic Jullien^{†,*}

[†] *N. Gagey, C. Benbrahim, I. Aujard, J.-B. Baudin, L. Jullien
École Normale Supérieure, Département de Chimie,
UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 8640 PASTEUR,
24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France,
Fax: (+33) 1 44 32 33 25, E-mail: Ludovic.Jullien@ens.fr*

[‡] *P. Neveu,
École Normale Supérieure, Laboratoire de Physique Statistique,
UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 and Paris 7 8550,
24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France*

[‡] *B. Goetz,
École Normale Supérieure, Département de Chimie,
UMR CNRS-ENS-Université Paris 6 8642
24, rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France.*

May 23, 2007

Supporting Information

- Syntheses of the noncommercially available starting substituted benzaldehydes and of the 1-carboxymethyliden triphenyl phosphorane;
- Preliminary screening of the thermal stability, the photophysical and the photochemical properties of the caged model compounds **E'a–h** in aqueous solutions (Table 1S);
- A schematic picture to analyze the photochemical and thermal isomerizations in the cinnamate series (Schemes 1S and 2S);
- UV-Vis absorption spectra of **Ea** and **Eb** (Figure 1S);
- Measurement of the **Ec** and **Fc** protonation constants (Figures 2Sa–c);
- Identification of the products from the photochemical isomerization of the cinnamate **Ec** with one-photon excitation (Figures 3Sa–b, 4Sa–d and 5S);

- Dependence of the apparent thermodynamic constant for the **Ec** to **ZIc** exchange on the one-photon excitation wavelength (Figures 6S and 7S, Scheme 3S);
- Model for the kinetics of two-photon uncaging *in vivo*.

Syntheses

Syntheses of the noncommercially available starting substituted aldehydes

6-hydroxy-3,4-methylenedioxybenzaldehyde.¹ A solution of sesamol (1.1 g, 8 mmol) and hexamethylenetetraamine (11.2 g, 80 mmol) in trifluoroacetic acid (90 mL) was refluxed for 2 h. After cooling, the mixture was diluted with water (100 mL) and extracted with dichloromethane (5 × 50 mL). The combined extracts were washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (2 × 50 mL), dried and concentrated in vacuo. The resulting crude solid was filtered on silica gel (eluent: 1/5 (v/v) cyclohexane/ethyl acetate). 6-hydroxy-3,4-methylenedioxybenzaldehyde was obtained as white needles from ethanol (600 mg, 45 %). m.p. 125–126°C; ¹H-NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ 9.62 (s, 1 H), 6.85 (s, 1 H), 6.46 (s, 1 H), 6.01 (s, 2 H); ¹³C-NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ 193.6, 161.5, 155.1, 141.3, 113.6, 109.3, 102.1, 98.3.

3,5-dibromo-2,4-dihydroxybenzaldehyde.² Bromine (2.32 g, 0.74 mL, 14.5 mmol; 2 eq) was added dropwise to a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (1.00 g, 7.25 mmol) in acetic acid (10 mL) over 30 min at room temperature. The resulting mixture was vigorously stirred for 2 h at room temperature. After addition of water (20 mL), the precipitate was filtered, washed with water and dried. 3,5-dibromo-2,4-dihydroxybenzaldehyde was obtained as pale orange crystals after recrystallization of the crude residue in ethanol (1.20 g, 55% yield). m.p: 200°C; ¹H-NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ 9.68 (s, 1 H), 7.70 (s, 1 H), 6.60 (s, 1 H); ¹³C-NMR (ppm, 62.8 MHz, CDCl₃, 298 K) δ 193.5, 158.6, 157.1, 135.6, 114.9, 99.9, 97.8.

8-hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido(3,2,1-ij)quinoline-9-carbaldehyde.³ A solution of 8-hydroxyjulolidine (1.83 g, 9.1 mmol) in anhydrous DMF (1.8 mL) was slowly poured into a mixture of POCl₃ (0.9 mL, 9.6 mmol) and anhydrous DMF (2 mL) at 4°C. After 30 min at 4°C, the mixture was heated at 100°C for 30 min. After cooling to room temperature, water (10 mL) was added and the mixture was stirred for 90 min. The precipitate was filtered, washed with water, and dissolved in dichloromethane. After washing 3 times with water, the organic phase was dried over MgSO₄, filtered and evaporated. 8-hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido(3,2,1-ij)quinoline-9-carbaldehyde was obtained as an orange solid after recrystallization of the crude residue in ethanol (1.60 g, 80% yield). ¹H-NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 298 K) δ 9.39 (s, 1 H), 6.86 (s, 1 H), 3.31–3.25 (m, 4 H), 2.70–2.65 (m, 4 H) 1.98–1.88 (m, 4 H).

Syntheses of the starting phosphoranes

Carboethoxyethylidetriphenylphosphorane and carboethoxymethylidene triphenyl-phosphorane are both commercially available. Nevertheless, we prepared large amounts of 1-carboxymethylidene triphenyl phosphorane in the course of this work.

1-carboxymethyliden triphenyl phosphorane.⁴ Ethyl bromoacetate (5.75 g, 34.5 mmol) was added to a solution of triphenylphosphine (10.0 g, 38 mmol; 1.15 eq) in toluene (40 mL). The mixture was vigorously refluxed for 10 h under stirring. The white precipitate was filtered off, washed with toluene and dried. The addition at 5°C of 1 M NaOH (50 mL) to a solution of white solid (10 g) in water (200 mL) gave a white and gummy solid that was filtered, washed with water and dried to yield 1-carboxymethyliden triphenyl phosphorane as a white solid (8.0 g, 60% yield).

Table 1S. Absorption of the caged model compounds **E'a–h** (maxima of single-photon absorption, $\lambda_{max}^{(1)}$, and molar absorption coefficients for single-photon absorption at $\lambda^{(1)}$, $\varepsilon(\lambda^{(1)}) \pm 5\%$), fluorescence emission of the corresponding coumarin coproducts **F'a–h** (maxima of steady-state fluorescence emission with one-photon excitation, $\lambda_{em}^{(1)}$, and quantum yields of fluorescence after one-photon excitation, $\Phi_F^{(1)} \pm 10\%$), half-time for thermal double bond isomerization, $t_{1/2,th} \pm 10\%$ and half-time for photochemical double bond isomerization $t_{1/2,h\nu} \pm 10\%$ with incident light intensity at $\lambda_{exc}^{(1)}$, $I_0(\lambda_{exc}^{(1)})$. Otherwise indicated, solvent: Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer. T=293 K.

	$\lambda_{max}^{(1)}(\mathbf{E}')$ nm	$\varepsilon(\lambda_{max}^{(1)}), \varepsilon(350), \varepsilon(400)(\mathbf{E}')$ mM ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda_{em}^{(1)}[\Phi_F^{(1)}](\mathbf{F})$ nm [%]	$t_{1/2,th}$ min	$t_{1/2,h\nu}(\lambda_{exc}^{(1)}, 10^8 \times I_0(\lambda_{exc}^{(1)}))$ s (nm, Einstein min ⁻¹)
E'a	313	13,3,0	464 [60]	– ^[a]	540 (320,3)
E'b ^[c]	338	9,7,0	443 [70]	– ^[a]	3800 (350,16)
E'c	351	20,20,6	464 [70]	150	270 (340,10)
E'd ^[d]	360	22,21,7	478 [– ^[b]]	350	280 (365,3)
E'e	297	1,0,0	446 [– ^[b]]	– ^[a]	1500 (294,9)
E'f	311	13,2,0	396 [– ^[b]]	– ^[a]	460 (320,3)
E'g ^[e]	340	5,3,0	420 [60]	– ^[a]	730 (350,0.2)
E'h	410	17,10,15	463 [– ^[b]]	– ^[a]	– ^[b] (too low)

^[a] No significant thermal isomerization around the double bond was observed in 24 h.

^[b] Not evaluated.

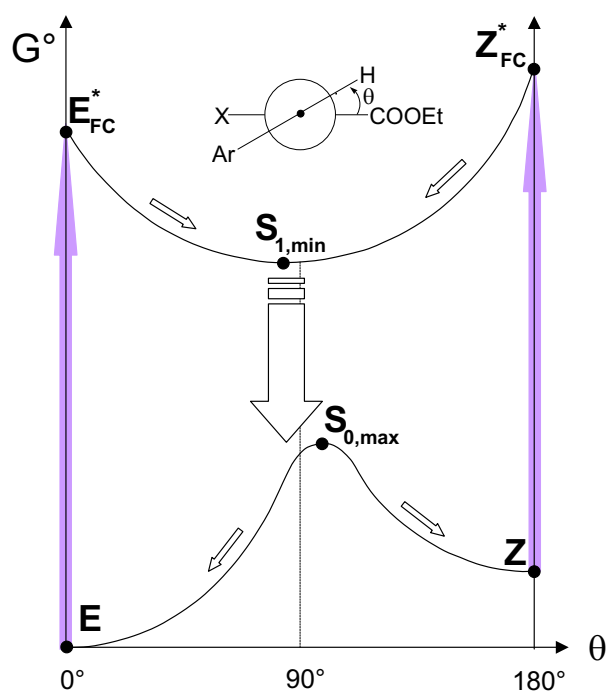
^[c] Solvent: Tris pH=7 buffer 20 mM NaCl 100 mM/acetonitrile 9/1 (v/v).

^[d] Solvent: Tris pH=7 buffer 20 mM NaCl 100 mM/methanol 9/1 (v/v).

^[e] Solvent: MeOH.

A schematic picture to analyze the photochemical and thermal isomerizations in the cinnamate series

We relied on the stilbene analysis as a guideline to tentatively draw the schematic picture governing the present photochemical and thermal isomerizations around the double bond in the cinnamate series (Scheme 1S).⁵ As shown below, this simple scheme seems appropriate to account for the results observed in the present study.

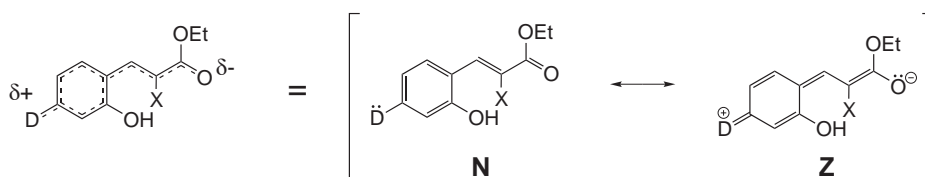


Scheme 1S. Schematic picture of the electronic ground (S_0) and first excited (S_1) state free energy surfaces in the dihedral angle coordinate that measures the extent of rotation around the C_2 – C_3 cinnamate bond (inspired from reference [5]).

Thermal isomerizations

The thermal isomerization behavior can be appreciated on the S_0 surface: The higher $S_{0,max}$, the more difficult the thermal isomerization leading to the undesirable thermal substrate release. The evolution of the height of the energy barrier for the (E)- to (Z)-cinnamate isomerization can be evaluated in the **E** and **E'** series from a valence bond analysis. Scheme 2S displays the two-state description of the **E** and **E'** cinnamates. The corresponding description suggests a decrease of the double bond character of the C_2 – C_3 cinnamate bond in the ground state when the phenyl substituent para to the vinyl moiety is enough donating: Thermal isomerization is facilitated. Such a trend was indeed observed in the **E'** series for **E'c** and **E'd** that possess the most strongly π donating substituents in the investigated **E'** series (See Table 1S). In contrast, we never observed such a behavior in the **E** series. The latter absence is probably related to a larger energy barrier for (E)- to (Z)- isomerization with regard to the **E'** series. Indeed, the destabilizing increase in steric hindrance introduced by the substitution of an hydrogen for a

methyl substituent on the cinnamate double-bond is significant in the planar (E)- state whereas it is expected to play a more minor role in the twisted $S_{0,max}$ state.



Scheme 2S. Description of the ground electronic state of the investigated cinnamates **E** and **E'** as a mixture of two states: **N** (neutral) and **Z** (zwitterionic).

Photochemical isomerizations

In Scheme 1S, light absorption (left violet arrow) by the (E)-cinnamate **E** first yields the planar excited Franck-Condon state \mathbf{E}_{FC}^* (a similar reasoning can be made from the (Z)-cinnamate **Z**). \mathbf{E}_{FC}^* is not the absolute minimum on the S_1 free energy surface. In particular, changing the molecular geometry from planar ($\theta = 0^\circ$) to twisted ($\theta \sim 90^\circ$) is a source of stabilization (small white arrow). As the lifetime of the S_1 state is large enough, the S_1 free energy minimum $\mathbf{S}_{1,min}$ can be reached. From there, the molecule can relax towards its ground state S_0 with $\theta \sim 90^\circ$ (large white arrow) that is not a minimum on the S_0 free energy surface. As a consequence, the molecule spontaneously tends to become planar either by yielding the initial (E)-cinnamate **E** or its photoisomerized (Z)- stereoisomer **Z**. The relative proportions in both isomers depend on the relative positions of the extrema $\mathbf{S}_{1,min}$ and $\mathbf{S}_{0,max}$.

Steric hindrance makes **Z** less stable than **E** in the ground state. In addition, the maximal wavelengths associated to the S_0 to S_1 transition with one-photon excitation are essentially similar for **E** and **Z** (see Figure 7S and reference [11]). Thus we deduce that $\theta_{S_{0,max}} > \theta_{S_{1,min}}$ from applying the Hammond principle in the present simple description. Then **E** should be preferentially obtained over **Z** after one cycle of light absorption. Indeed the latter prediction was observed: $\phi_{EZ}^{(1)} < \phi_{ZE}^{(1)}$ in the present series.¹¹

Scheme 1S is also appropriate to account for the larger $\phi_{EZ}^{(1)}$ value in the **E'** series. Indeed, the steric hindrance introduced by the methyl double-bond substituent is expected to destabilize the (E)- state more than the (Z) one with regard to the **E** series. Thus one correspondingly anticipates that the position of $\mathbf{S}_{0,max}$ is shifted toward lower θ values in the **E'** series giving rise to a larger proportion of (Z) stereoisomer after one photocycle.

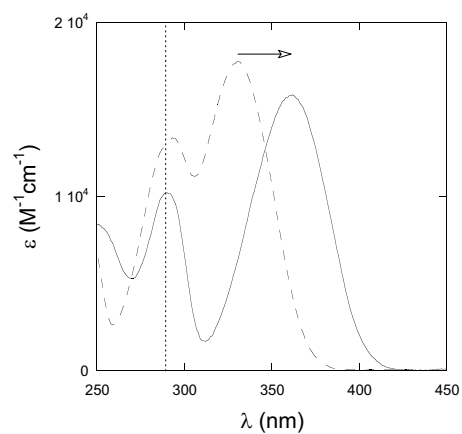


Figure 1S. Single-photon absorption spectra of **Ea** (dashed line) and **Eb** (solid line): molar absorption coefficient $\epsilon(\lambda)$ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Solvent: Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer/acetonitrile 1/1 (v/v).

Measurement of the **Ec** and **Fc** protonation constants

Figure 2Sa, 2Sb and 2Sc display the evolution of the UV-Vis absorption spectra of the caged alcohol **Ec** and of the corresponding coumarin **Fc** on pH in Britton-Robinson buffers at 0.1 M.

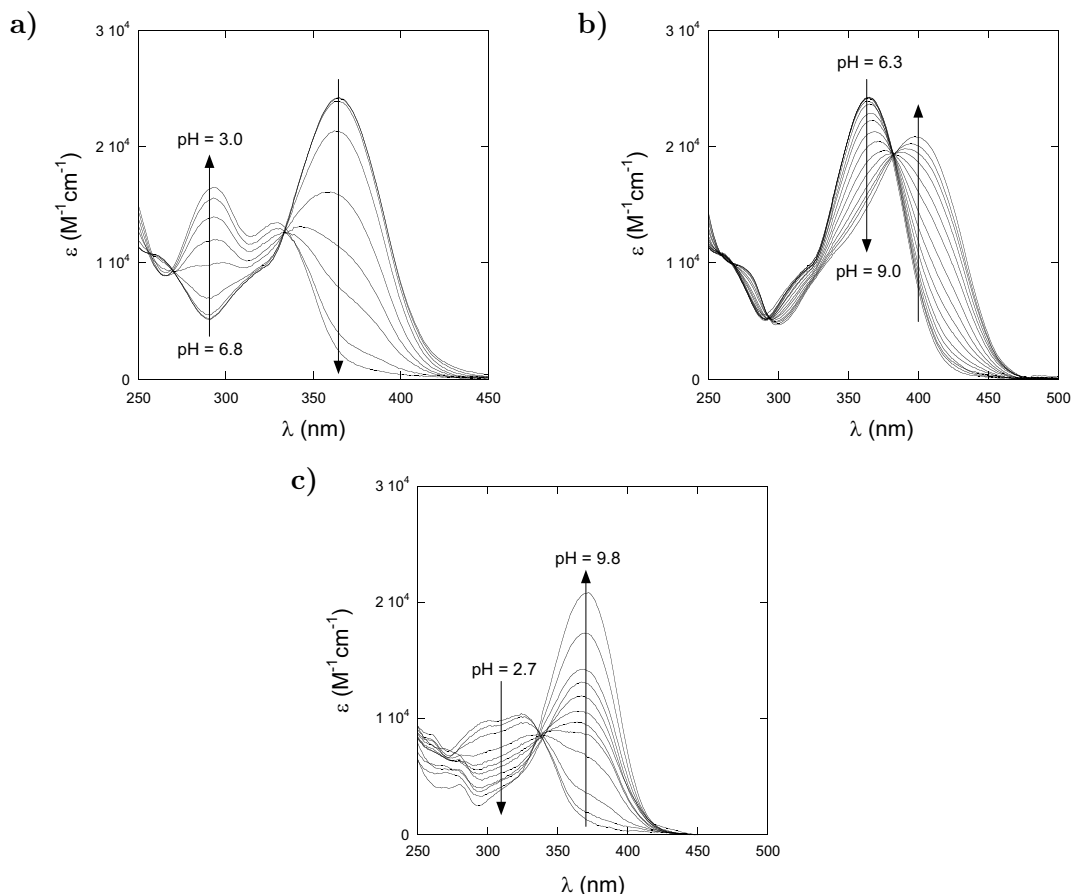


Figure 2S. Dependence on pH of the absorption spectra of **Ec** ($[Ec] = 5.6 \mu M$; **a**: from acidic to basic: pH = 3.0, 3.7, 4.4, 4.7, 5.2, 5.7, 6.3, 6.6, 6.8; **b**: from acidic to basic: pH = 6.3, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.1, 8.3, 8.5, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0) and of the coumarin **Fc** (**c**; $[Fc] = 6.0 \mu M$ from acidic to basic: pH = 2.7, 2.9, 3.6, 4.2, 4.5, 4.7, 4.9, 5.5, 6.4, 7.2, 8.8, 9.8). Solvent: Britton-Robinson buffer⁶ (acetic acid, boric acid, phosphoric acid) at 0.1 M at 293 K.

Ec exhibits a large one-photon absorption with a pH-dependence that is associated to the presence of two ionizable phenol groups in **Ec**. Starting from the nonionized neutral state at low pH ($\epsilon(\lambda_{max}) = 293 \text{ nm}) = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at pH = 3.0), we observe upon increasing pH a first bathochromic shift which is in line with the increase of the donating power from a phenol group (presumably in the 4-position of the phenyl ring) upon ionization ($\epsilon(\lambda_{max}) = 365 \text{ nm}) = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at pH = 6.6). Further pH increase is accompanied by a second red shift that agrees with the ionization of the remaining phenol group (presumably in the 2-position of the phenyl ring) ($\epsilon(\lambda_{max}) = 403 \text{ nm}) = 2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at pH = 9.1).

Fc essentially exhibits similar results: $\varepsilon(\lambda_{max} = 324 \text{ nm}) = 1.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in its nonionized neutral state at $\text{pH} = 2.7$ and $\varepsilon(\lambda_{max} = 372 \text{ nm}) = 2.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in its basic anionic form. As for **Ec**, the bathochromic shift observed by increasing the pH is in line with the increase of the donating power of the 7-hydroxyl upon ionization.

The corresponding evolutions of the absorbance as a function of pH were analyzed with the *SPECFIT/32TM* Global Analysis System (Version 3.0 for 32-bit Windows systems) to extract the protonation constant of the corresponding hydroxyl group in water.⁷ We found $pK_{a,1} = 5.0 \pm 0.1$ and $pK_{a,2} = 8.4 \pm 0.1$ for the two successive **Ec** protonation constants, and $pK_a = 4.6 \pm 0.1$ for the **Fc** protonation constant.

Identification of the products from the photochemical isomerization of the cinnamate **Ec** with one-photon excitation

Two different techniques were used to analyze the nature and the amount of the photoproducts originating from the photoisomerization of the ethyl 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamate ester **Ec** with one-photon excitation.

$^1\text{H-NMR}$ investigation

We first analyzed the evolution of the $^1\text{H-NMR}$ spectra of **Ec** after different illumination durations. Figures 3S and 4S display the results that were obtained in a 1/1 (v/v) mixture of deuterated acetonitrile/deuterated Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer.¹

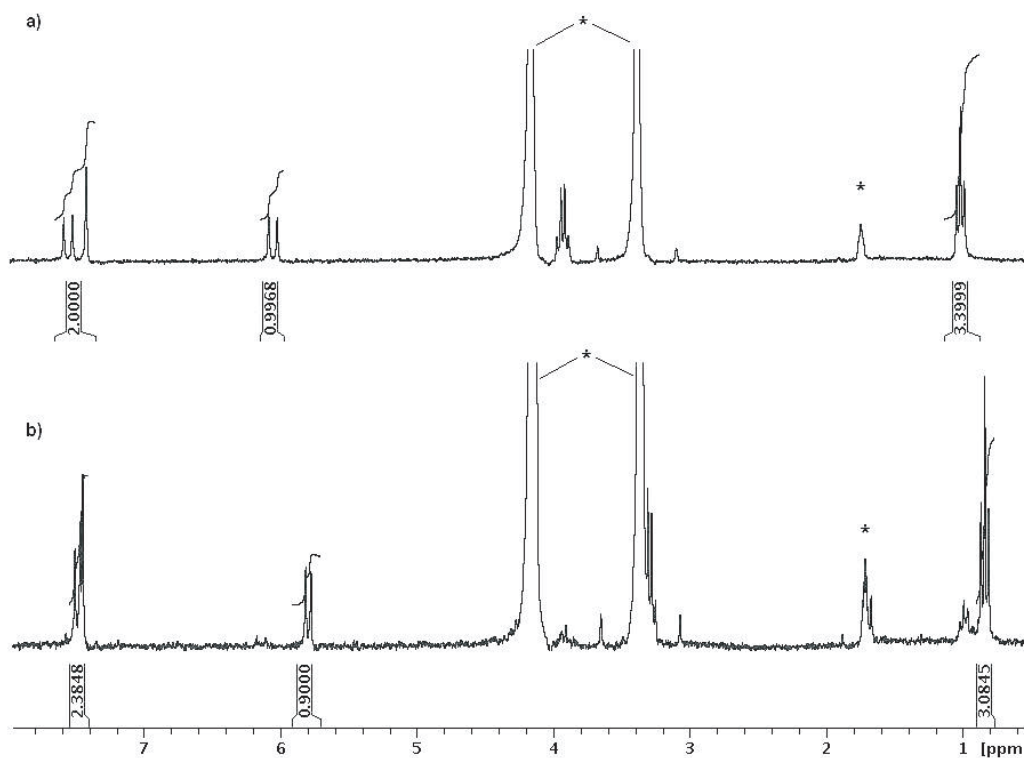


Figure 3S. Comparison of the $^1\text{H-NMR}$ spectra of **Ec** before (a) and after (b) UV illumination. The relative integrations of the peaks associated to the ethanol terminal methyl and to the double bonds hydrogens are identical in a and b within experimental NMR error. Solvent: 1/1 (v/v) mixture of deuterated acetonitrile/deuterated Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer; the stars indicate the signals originating from the buffer (either intrinsic or from impurities). Concentrations: 0.5 mg/0.8 mL. T = 293 K.

Figure 3S compares the initial and final $^1\text{H-NMR}$ spectra. The final spectrum corresponds to a mixture of coumarin **Fc** and ethanol in a one-to-one molar ratio. This observation suggests that the photoconversion of the cinnamate **Ec** into the coumarin **Fc** leading to ethanol release

¹The deuterated aqueous buffer was prepared by repeating two times the lyophilization of 5 mL Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer and the dissolution of the lyophilized powder in 5 mL of deuterated water.

is quantitative at the NMR precision. The latter observation is in line with Porter's results on comparable substrates.⁸

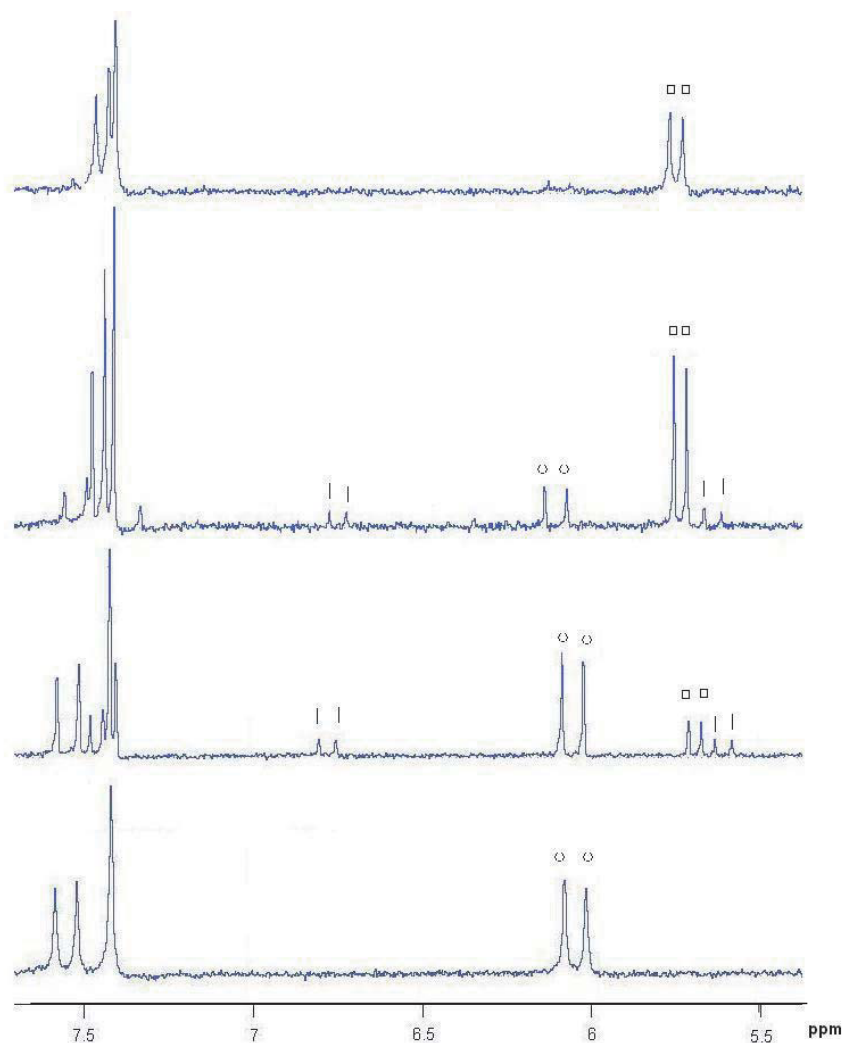


Figure 4S. Temporal evolution of the ^1H -NMR spectrum from an illuminated **Ec** solution emphasizing on aromatic and ethylenic signals (duration of UV illumination in min: **a**: 0, **b**: 10, **c**: 30, **d**: 60). The peaks originating from the intermediate state **ic** (see Scheme 2 of the Main Text) are indicated by short segments. Solvent: 1/1 (v/v) mixture of deuterated acetonitrile/deuterated Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer. Concentrations: 0.5 mg/0.8 mL. $T = 293\text{ K}$.

Figure 4S shows that one intermediate forms during the **Ec** photoconversion. It contains two vinylic protons exhibiting a coupling constant $^3J = 9\text{ Hz}$ that significantly differs from the corresponding initial coupling constant $^3J = 16\text{ Hz}$.² The former value suggests that the initial (E) stereochemistry of the double bond in **Ec** is now (Z) in the intermediate. This observation is in line with the expectations based on the mechanism of lactonization of coumarinic acids:^{9,10} As shown in Scheme 2, the **Ec** cinnamate would first photoisomerize to yield the corresponding coumarinate **Zc** that would subsequently cyclize to give the tetrahedral intermediate **ic** which ultimately provides the coumarin **Fc** after ethanol elimination. Both **Zc** and **ic** would exhibit the observed (Z) stereochemistry of the double bond. The analysis of the absorption spectra during

²One also observes at intermediate times a complex pattern at the level of the triplet and the quadruplet associated to the ethoxy moiety (data not shown).

the relaxation experiment devoted to measure τ_2 supports that the most abundant intermediate during the **Ec** to **Fc** conversion that is observed in Figure 4S is **Ic**.

Investigations by UV-Vis absorption

We also examined the evolution of the UV-Vis absorption of **Ec** after different illumination durations. As displayed in Figure 5S, the final UV-Vis spectrum satisfactorily compares with the UV-Vis spectrum of the reference coumarin **Fc**.

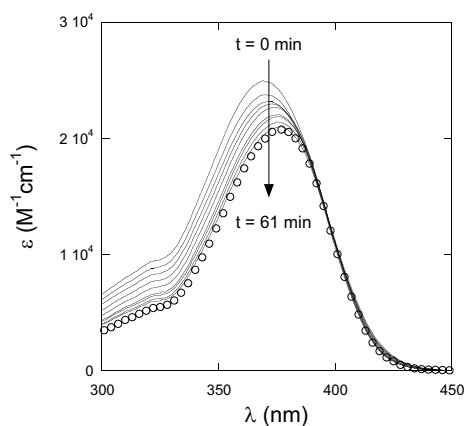


Figure 5S. Normalized UV-Vis absorption spectra of **Ec** solutions at 293 K after several durations of illumination at $\lambda_{exc}^{(1)} = 350$ nm: $t(\text{min}) = 0, 3, 8, 13, 21, 31, 41, 51, 61$ (solid lines). Reference UV-Vis absorption spectrum of a **Fc** solution (circles). Solvent: 1/1 (v/v) Acetonitrile/Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer.

The observations by UV-Vis absorption confirmed the main result that was obtained by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy: The photoconversion of the cinnamate **Ec** into the coumarin **Fc** (concomitantly associated to ethanol release) is quantitative.

Dependence of the apparent thermodynamic constant for the **Ec** to **ZIc** exchange on the one-photon excitation wavelength

Direct evaluation

The experiments reported in the Main Text (Figures 2) give access to the rate constants k_1 and k_{-1} associated to the conversion between the states **E** and **ZI**. The ratio $K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}$ provides an apparent thermodynamic constant for the corresponding exchange or similarly the relative proportions in both states in the steady-state.

We performed a series of experiments to examine the dependence of the K_1 value on the excitation wavelength for the **Ec** cinnamate (Figure 6S). In fact, Eq.(17) of the Main Text depends on the excitation wavelength $\lambda_{exc}^{(1)}$ but not on the illumination intensity $I_0(\lambda_{exc}^{(1)})$.

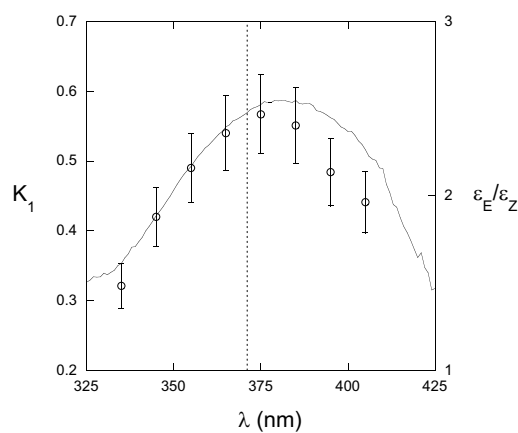


Figure 6S. Dependence of the apparent thermodynamic constant $K_1(\lambda_{exc}^{(1)})$ on the excitation wavelength with one-photon excitation for **Ec**. $K_1(\lambda_{exc}^{(1)})$ is evaluated at each excitation wavelength from the $k_1(\lambda_{exc}^{(1)})$ and $k_{-1}(\lambda_{exc}^{(1)})$ values extracted as explained in the Main Text from a series of illumination experiments with one-photon excitation. The ratio $\varepsilon_E(\lambda_{exc}^{(1)})/\varepsilon_Z(\lambda_{exc}^{(1)})$ is not measured on **Ec** but on the **EcMe** model compound. Solvent: acetonitrile/Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer 1/1 (v/v). T = 293 K.

In the case of **Ec**, the dependence of K_1 on the excitation wavelength exhibits a maximum at 375 nm that is slightly red-shifted with regards to the maximum of **Ec** absorption with one-photon absorption (369 nm). Hence K_1 is increased by 50 % if the excitation wavelength is changed from 335 nm to 375 nm (24% and 36% of **ZI** in the steady-state respectively).

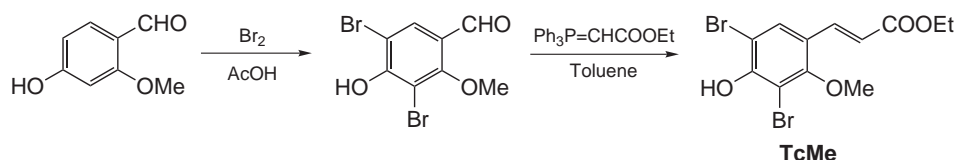
Evaluation on a model compound EcMe

Eq.(17) suggests that the dependence of K_1 on the wavelength results from the difference of the absorption spectra of the (E)- and (Z)-cinnamate. To directly evaluate this proposition in the ortho-hydroxy cinnamic series is made difficult by the cyclization of the (Z) stereoisomer leading to the formation of the coumarin uncaging coproduct.¹¹

We alternatively considered to examine the behavior of an ortho-methoxy cinnamate. From an electronic point of view, such a species is expected to share similar properties with the corresponding ortho-hydroxy derivative. Nevertheless, in contrast to the ortho-hydroxy cinnamate,

its (*Z*) stereoisomer cannot cyclize and its spectroscopic properties can be easily characterized. Thus we prepared the methylated analog of **Ec**, **EcMe**, and examined its photophysical and photochemical behavior with one-photon excitation.

EcMe was efficiently synthesized in two steps (Scheme 1S): The commercially available 4-hydroxy-2-methoxy-benzaldehyde was first brominated twice with bromine and sodium acetate in acetic acid to give 3,5-dibromo-4-hydroxy-2-methoxy-benzaldehyde (75% yield)³ which was subsequently condensed with ethyl(triphenylphosphoranylidene)acetate in toluene to provide **EcMe** with the (*E*) stereochemistry (85% yield).⁴



Scheme 3S. Synthesis of the ortho-methoxy cinnamate model of **Ec**: **EcMe**.

2 mL of a 7.5 mM solution of (*E*)-**EcMe** in a 1/1 (v/v) mixture of deuterated acetonitrile/deuterated Tris pH=7 buffer 20 mM was submitted to a 1200 s illumination with a bench top UV lamp (6 W 365 nm UV lamp; Fisher Bioblock) at 20°C and its ¹H-NMR spectrum was recorded. We observed the clean formation of the (*Z*) stereoisomer of **EcMe** as evidenced by the presence of new peaks in particular exhibiting a characteristic coupling $J = 13$ Hz for a *cis* stereoisomer. The relative proportions in the (*E*)- and (*Z*)-stereoisomers in the irradiated sample were 25:75.

We subsequently recorded in a mixture of acetonitrile/Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer the absorption spectra of the reference (*E*)-stereoisomer of **EcMe** and of the preceding irradiated solution after appropriate dilution. Then it was possible to extract the absorption spectrum of the (*Z*)-stereoisomer of **EcMe** from the knowledge of the relative proportions in (*E*)- and (*Z*)-stereoisomers in the irradiated sample. Figure 7S displays the results. As already reported by Porter et al in the case of **E'd**,¹¹ the absorption of the (*Z*)-cinnamate is weaker and slightly blue-shifted with regard to the one of the (*E*) stereoisomer.

³ *3,5-dibromo-4-hydroxy-2-methoxybenzaldehyde*. Bromine (1.06 g, 6.6 mmol; 2eq) was slowly added to a white suspension of 4-hydroxy-2-methoxybenzaldehyde (0.50 g, 3.3 mmol), sodium acetate (0.35 g, 4.3 mmol; 2 eq) and acetic acid (4 mL): Decoloration is observed upon bromine addition. After stirring at room temperature for 1 h, the precipitated solid was filtered off and washed with water yielding the desired aldehyde as a white powder (0.76 g; 75%). m.p 167–169°C; ¹H-NMR (ppm, 250 MHz, CD₃COCD₃) δ 10.28 (s, 1 H), 8.09 (s, 1 H), 4.17 (s, 3 H); ¹³C-NMR (ppm, 250 MHz, CD₃COCD₃) δ 187.2, 162.0, 157.9, 132.2, 125.3, 107.8, 107.4, 64.0; Mass spectrometry: MS (CI, CH₄): m/z 311 [$M+1$].

⁴ (*E*)-ethyl 3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-2-methoxyphenyl)acrylate. Same Wittig protocol as described in the Main Text. (*E*)-ethyl 3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-2-methoxyphenyl)acrylate as a white powder with 85% yield. m.p 123°C; ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (s, 1 H), 7.92 (d, 1 H, $J=16$ Hz), 6.73 (d, 1 H, $J=16$ Hz), 4.37 (q, 2 H, $J=7$ Hz), 4.00 (s, 3 H), 1.43 (t, 3 H, $J=7$ Hz); ¹³C NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃) δ 167.0, 157.8, 154.4, 137.8, 131.3, 123.5, 120.0, 108.0, 107.2, 62.2, 60.9, 14.6; Mass spectrometry: MS (CI, CH₄): m/z 381 [$M+1$]; MS (CI, CH₄, HR): m/z 378.9188 (calcd mass for C₁₂H₁₃O₄⁷⁹Br₂: 378.9181) and 382.9143 (calcd mass for C₁₂H₁₃O₄⁷⁹Br⁸¹Br: 382.9142).

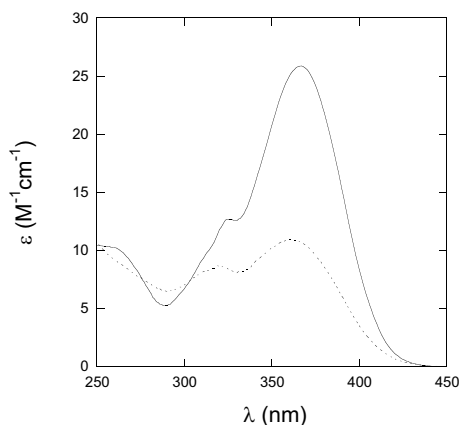


Figure 7S. Single-photon absorption spectra of the (E)- (solid line) and (Z)- (dotted line) stereoisomers of **EcMe**: molar absorption coefficient $\varepsilon(\lambda)$ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Solvent: Tris pH=7 20 mM NaCl 100 mM buffer/acetonitrile 1/1 (v/v).

Figure 6S displays the dependence of the ratio of the molar absorption coefficients of the (E)- and (Z)-stereoisomers of **EcMe**, $\varepsilon_E(\mathbf{EcMe})/\varepsilon_Z(\mathbf{EcMe})$, on the excitation wavelength. The latter dependence satisfactorily compares with the observed dependence for K_1 with **Ec**. This observation supports the relevance of the Eq.(17) to account for the K_1 value. In particular, an order of magnitude of the dependence of the ratio $(1 + \mathcal{K}_2) \frac{\phi_{EZ}^{(1)}}{\phi_{ZE}^{(1)}}$ on the excitation wavelength for **Ec** can be obtained from the product $K_1(\mathbf{Ec}) \times \frac{\varepsilon_Z(\lambda_{exc}^{(1)})}{\varepsilon_E(\lambda_{exc}^{(1)})}(\mathbf{EcMe})$. The latter product does not depend on the excitation wavelength and is equal to 0.2 ± 0.02 . In particular, the latter observation suggests that a same photochemistry leads to the (E)–(Z) isomerization whatever the excitation in the whole absorption band located at the largest wavelengths.

Model for the kinetics of two-photon uncaging *in vivo*

We consider that the immersion of the zebrafish embryo in a solution of caged compound **cA** results in an initial concentration cA_0^{in} in the targeted cell i . We assume that the kinetics for in-out exchange of the reactant and the products of the uncaging reaction between each cell i and its environment is slow at the time scale of the uncaging process arising within the cell i . Then it is possible to consider any cell as a closed system. We model it as a closed volume V containing a finite quantity of caged compound **cA**. The uncaging reaction (1) produces **A** and **F** that respectively designate the species initially caged and the product from the protecting moiety after **A** release.



Eq (1) is assumed to take place only in the focal volume V_{exc} resulting from focusing the laser beam in the volume V .

Thus the evolution of concentrations in **cA** and **A**, cA and A , obeys :

$$\frac{\partial cA(r, t)}{\partial t} = D_{\mathbf{cA}} \frac{\partial^2 cA}{\partial r^2} - k_{unc} \delta(\text{focal volume}) cA \quad (2)$$

$$\frac{\partial A(r, t)}{\partial t} = D_{\mathbf{A}} \frac{\partial^2 A}{\partial r^2} + k_{unc} \delta(\text{focal volume}) cA \quad (3)$$

where k_{unc} is the rate constant for the uncaging reaction in V_{exc} , δ is the Dirac distribution, $D_{\mathbf{cA}}$ and $D_{\mathbf{A}}$ are the diffusion coefficients of **cA** and **A**.

Eqs (2–3) can be solved exactly with almost no assumption on the geometry of cell volume V provided that the apparent uncaging process is slow at the time scale associated to the diffusion within a volume V . To fulfill the preceding condition, the associated relaxation time $\tau_{unc} = \frac{V}{k_{unc}V_{exc}}$ has to be much larger than the characteristic time τ_V required for **cA** and **A** to diffuse in the whole volume V . In the zebrafish embryo, the cells are 10 μm radius and $\tau_V = 20$ ms whereas $\tau_{unc} \simeq 1$ s in the fastest situations encountered during that work. Thus we can average the concentrations over the cell volume V and write their temporal evolution by simplifying Eqs. (2–3):

$$\frac{\partial cA}{\partial t} = -k_{unc} \frac{V_{exc}}{V} cA \quad (4)$$

$$\frac{\partial A}{\partial t} = k_{unc} \frac{V_{exc}}{V} cA \quad (5)$$

By introducing the apparent uncaging rate $k = k_{unc}V_{exc}/V$, we get:

$$\frac{\partial cA}{\partial t} = -k cA \quad (6)$$

$$\frac{\partial A}{\partial t} = k cA \quad (7)$$

Eqs.(6–7) eventually yield:

$$A(t) = A_0 \left(1 - e^{-kt}\right) \quad (8)$$

References

- [1] S. Naoki, T. Kyoichi, M. Yukie, Y. Kentaro, K. Akinori, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 53–70.
- [2] T. R. Seshadri, S. Varadarajan, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 4955–4963.
- [3] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4708–4709.
- [4] M. P. Cooke Jr., D. L. Burman, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 4955–4963.
- [5] W. G. Dauben, L. Salem, N. J. Turro, *Acc. Chem. Res.*, **1975**, *8*, 41–54.
- [6] C. Frugoni, *Gazz. Chim. Ital.*, **1957**, *87*, 403–407.
- [7] H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1985**, *32*, 95–101; Gampp, H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1985**, *32*, 257–264; H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1985**, *32*, 1133–1139; H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1986**, *33*, 943–951.
- [8] A. D. Turner, S. V. Pizzo, G. Rozakis, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 244–250.
- [9] R. Hershfield, G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 7359–7369.
- [10] R. Hershfield, G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 8032–8040.
- [11] Note that Porter et al achieved to obtain some data by working at low temperature (See P. M. Koenigs, B. C. Faust, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9371–9379). In the preceding paper, they reported that the maximum of absorption of the (Z) stereoisomer of **E'd** was blue-shifted and less intense with regards to the one of the (E) stereoisomer. Nevertheless, they never reported any absorption spectrum of a (Z)-cinnamate.

Article

Uncovery of Cell Autonomous Fast Negative Control of Retinoic Acid Signaling.

Neveu P, Vriza S, Aujard I, Benbrahim C, Le Saux T, Allemand JF, Bensimon D, Jullien L.

submitted to *PLoS Biology*

Contribution:

- conception des expériences pour étudier la photochimie de l'acide rétinoïque à un photon.
- conception, réalisation et exploitation de la caractérisation du décageage à deux photons dans les embryons de poisson zèbre.
- conception, réalisation et exploitation des expériences de décageage d'acide rétinoïque à un et deux photons chez le poisson zèbre.
- conception, réalisation et exploitation des expériences impliquant p38.
- participation à l'écriture de l'article.

Probing the cellular response to a pulse of morphogen using two-photon uncaging in a live zebrafish embryo

Pierre Neveu^{*†}, Sophie Vríz^{‡§}, Isabelle Aujard[†], Chouaha Benbrahim[†], Thomas Le Saux^{†¶},
Jean-François Allemand^{*†}, David Bensimon^{*}, Ludovic Jullien^{†¶||}

** Ecole Normale Supérieure, Laboratoire de Physique Statistique and Département de Biologie
UMR 8550, 24 rue Lhomond, F-75231 Paris, France*

*† Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie UMR CNRS-ENS-UPMC 8640,
24 rue Lhomond, F-75231 Paris, France*

*‡ Inserm U770, Hémostase et Dynamique Cellulaire Vasculaire,
80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France*

§ Université Paris 7 Denis Diderot, 75005 Paris, France

¶ Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

|| To whom correspondence should be addressed (e-mail: Ludovic.Jullien@ens.fr, phone: + 33 1 44
32 33 33, fax: + 33 1 44 32 33 25)

Summary

During embryogenesis, cells have to respond timely and accurately to changing morphogen gradients. In this work, we use two photon uncaging to release within a second in a single cell of a developing zebrafish retina a tunable concentration of retinoic acid (RA), a morphogen known to play a key role in patterning and organogenesis, and to study RA signaling pathway dynamics. We have thus discovered that a RA pulse triggers an inhibitory pathway that shuts down within five minutes the cell response to further RA pulses. We identify p38a MAP kinase as a necessary factor in this rapid negative regulation, thereby shedding a new light on the link between MAP kinases and development. The technique presented here should allow for a control of morphogens gradients and advance our understanding of short-time developmental dynamics.

Introduction

The normal embryogenesis of a multicellular organism relies on the spatio-temporal control of morphogen concentrations [1] and the way cells respond to them [2]. From a system dynamics point of view, the concentrations and actions of morphogens are ruled by multiple phenomena such as diffusion, recognition reactions, signalling cascades ... associated with different timescales. The question thus arises as to how these various kinetic variables are coupled to result in a proper developmental program. A possible approach to that question borrowed from systems analysis consists in studying *in vivo* the response of the organism to short and localized pulses of morphogen. Indeed that approach is sufficient to fully characterise the linear response of a system and it can provide important information on the structure of its non-linear response (e.g. feedback loops). To that purpose the excitation pulse has to be shorter than any developmental time (i.e. less than a few minutes) and occupy a region smaller than any developmental gradient (typically a few cells).

Light is a convenient means to generate these fast and local perturbations as well as to read out their effects. Laser beams can be delivered in bursts which can be modulated on the nanosecond time scale and focused with submicrometer spatial resolution with multiphoton excitation [3]. They can be used to trigger locally (at the focal point) photochemical reactions leading to substrate release (i.e. uncaging [4]), possibly with a fluorescent coproduct as indicator of the intracellular substrate concentrations [5, 6]. Thus, two-photon excitation has been used to achieve phototransfection at the single cell level [7] and to release with sub-cellular resolution some caged biomolecules such as neurotransmitters [8] or calcium ions [9]. In contrast, the control of gene expression has not been implemented so far except for some demonstrations of principle in cell cultures using one-photon (UV) uncaging [10]. In the following, we use two-photon excitation to quickly and locally release a caged morphogen in a live organism and investigate the spatio-temporal response of its developmental program.

Retinoic acid (**RA**) is a key morphogen which additionally exhibits attractive physical and chemical features making it suitable for caging. Alteration of **RA** concentrations during development results in major defects in the patterning of the body axis, in cell differentiation and in the formation of many organs [11], the retina in particular [12]. **RA** is generally a posteriorizing factor and its excess during gastrulation leads to misdevelopment of head structures [13]. Grafting retinoic acid soaked beads in

the dorsal part of the developing zebrafish retina at 4-14 somite stage leads to a ventralization of dorsal cells and to the formation of a second retina when the treatment is global [14, 15]. As an organism, zebrafish is an attractive model due to the transparency of its embryo, its fast development, a known genome and numerous genetic screens [16]. Its transparency is particularly relevant here since we want to use light as a means to deliver short localized **RA** pulses in a live embryo.

In the following, we first show that two-photon laser excitation can deliver, within a second, controlled nano- to micromolar amounts of **RA** in a single cell of a live zebrafish embryo. By monitoring the change in fluorescence when **RA** binds to the cytoplasmic retinol and **RA** binding proteins (CRBP and CRABP), we show that upon uncaging most of it is quickly sequestered. The remaining unbound **RA** fraction (at nM concentrations) is nonetheless sufficient to induce an alteration of eye development observable 15 hours later. Using the probability of visible retina malformation as a measure of the activity of this **RA** pulse, we show that the delivery of such a puff triggers a regulatory network that inhibits within five minutes the response of the targeted cell to further pulses of **RA**. We use a knockdown strategy to show that p38a MAP kinase is a necessary actor in this fast inhibition. Finally, we propose a model for this inhibitory pathway which predicts that p38a kinase and **RA** should have antagonistic teratogenic effects. This prediction is validated by the spectacular rescue of *p38a* knock-down embryos when endogenous **RA** synthesis is inhibited.

Results

Choosing a suitable caged retinoic acid to implement a “**RA** optical syringe”

The protocol retained to implement quick local **RA** delivery is the following: a zebrafish embryo is incubated in a solution of caged **RA** that penetrates the whole organism. The incubating solution is then washed and **RA** release is achieved by two-photon excitation (Figure 1A). To be effective, that strategy requires that caged **RA**: i) enters the cells; ii) is chemically stable under physiological conditions; iii) is biologically nonactive and nontoxic; iv) is uncaged at light levels that do not damage the cell.

To address these requirements, we used the well-established effect of **RA** on axis development and one-photon uncaging both *in vitro* and *in vivo* to screen several caged retinoic acids compounds (see Supplemental Data). We first injected 32 cell embryos with the caged compounds to test their

stability, absence of activity and non-toxicity. This led to a normal development of the injected embryos. Then we photoactivated caged **RA** molecules present inside the embryos using 365 nm UV light at light doses which are harmless for the normal development of the embryo. We observed that such illuminated embryos exhibited phenotypes similar to the ones incubated in **RA**. This series of experiments led us to select one caged **RA** (**cRA**, see Supplemental Data) which was best suited for the *in vivo* studies with two-photon excitation: **cRA** can enter the cells of a dechorionated embryo where it is present at the concentration of the incubating solution; it is physiologically stable, has no biological activity and releases **RA** upon photoactivation with UV-light.

Two-photon uncaging for local **RA** delivery

Two-photon excitation requires a high flux of photons to be efficient. The first task in designing a **RA** “optical syringe” is to determine the illumination conditions that are not detrimental to the embryo. We checked that continuous illumination of an embryo with a focused Ti:Sapphire laser beam (750 nm) did not affect its development as long as the incident power was less than 5 mW.

A major advantage of two-photon excitation is its confinement at the focal spot to a small volume, typically $10^3 - 10^6$ times smaller than the volume of the target cell. Despite such local addressing, two-photon uncaging may be less localized as the released molecule diffuses within the cell and may exit from it. To investigate these issues, we first studied a model compound (caged coumarin, **cF**; see Supplemental Data) which shares the same photolabile protecting group as **cRA** and correspondingly exhibits similar two-photon uncaging kinetics. In contrast to **cRA**, **cF** releases upon uncaging a strongly fluorescent coumarin. Therefore, we illuminated with a focused laser beam (at 750 nm) a single cell of the dorsal part of the retina in an embryo previously incubated in $1\mu\text{M}$ solution of **cF** (Figure 1B). From the rise in fluorescence we deduced the average uncaging rate for **cF** at the incident power used (1.8 mW): $k^{cF} = 0.04 \text{ s}^{-1}$. The distribution of values of k^{cF} allows us to compute the cell size distribution (see Supporting Information for details) from which we obtain an average cell size of $13.5 \pm 6 \mu\text{m}$ (error is standard deviation, see Figure 1C), consistent with known values. This agreement implies that coumarin does not diffuse out of the cell within the observation times (a few minutes).

Equipped with a characterization of two-photon uncaging in a live cell (with negligible diffusion of the released substrate out of the cell), we investigated the release of **RA** from **cRA**. Although **RA** is

almost non-fluorescent in solution [17], it becomes fluorescent when bound to endogenous cytoplasmic retinol or retinoic acid binding proteins (CRBP or CRABP) [18]. The photo-release and complexation of **RA** can thus be monitored via the change in fluorescence induced by its binding to CRABP and CRBP (where it competes with the more fluorescent endogenous retinol) [19, 20]. This approach at 1 mW incident illumination yields two rate constants (see Figure 1D). The first is associated to retinol unbinding from CRBP which results in a decrease of fluorescence. Its value $k_{\text{off}} = 0.06 \text{ s}^{-1}$ is consistent with the reported values of 0.01-0.1 s^{-1} [21, 22]. The 23% decrease in fluorescence intensity is also consistent with the 26% decrease reported when **RA** displaces retinol from its complex with CRBP [20]. The second rate constant, $k_{\text{on}} = 0.015 \text{ s}^{-1}$, is associated to **RA** binding to CRABP which is here limited by the uncaging rate (see below). Indeed, it compares well with the value deduced at an incident power of 1 mW from the estimate of k^{cF} (at 1.8 mW): $k_{\text{on}} = k^{cF}(1/1.8)^2 = 0.013 \text{ s}^{-1}$. From this good agreement, we deduce that, within the time-span of the measurement (about 3 minutes), **RA** (like coumarin) remains essentially confined to the volume of the illuminated cell where it is quickly sequestered by CRBP and CRABP proteins.

Having estimated the two-photon uncaging rate of **cRA**, established its localization and quick sequestration, we wanted to see whether a puff of **RA** of known concentration but limited in space and time, could affect the development of an embryo. To address that question, we chose a phenotype with a precise spatial location, **RA**-induced retina malformations. It was previously shown [14, 15] that when beads soaked in **RA** were implanted in the dorsal part of a developing retina, the eye development was altered in a dose-dependent manner. However in these experiments as in all other experiments with **RA** (or any other morphogen for that matter), the tissue or embryo is incubated for typically hours in presence of the morphogen. Its effect is thus integrated over a timescale that may be longer than the dynamics of the developmental processes that it triggers. It is impossible with these approaches to study the short time (minutes) response of the embryo to pulses of morphogen. It is in particular not at all obvious that a pulse of **RA** given locally and for a very short time (seconds) can result in any observable malformation of the retina. That is the first question that we wanted to address.

A two-photon Ti:Sapphire laser source (750 nm, 4.5 mW incident power) was successively focused (for durations τ inferior to 1.25 s) in 4 different cells (see Experimental Procedures) of the dorsal part

of a zebrafish retina and adjacent diencephalon (4-14 somite stage embryos, previously incubated for 90 min in a 10 μM **cRA** solution) (Figure 2A). The effects on the retina induced by **cRA** uncaging were tested 15 hours after illumination by assaying the treated embryos for eye malformations by binocular inspection or by whole-mount *in situ* hybridization against *pax6* mRNA, a known marker of the retina [23] (for each case the average number of embryos studied was 28, full numbers for each experiment in Supplemental Data). As we illuminated only one eye, the second acted as a control. The results of these observations are that a quick, local delivery of **RA** may induce a malformation of the retina and a modification of the *pax6* expression pattern (Figure 2B-D). Out of 120 fixed embryos, we never observed a bilateral modified expression of *pax6*, i.e. a malformation of both retinas. We thus conclude that the impact of the laser-induced **cRA** uncaging remains localized and may affect only the development of the illuminated eye and adjacent diencephalon.

The probability P_{ret} of observing a retina malformation increases with the dose of **RA** released during an illumination of duration τ , see Figure 2(E-F). The **RA** concentration $C(\tau)$ can be deduced from the previous estimate of the uncaging rate ($k^{cRA} = 0.28 \text{ s}^{-1}$ at 4.5 mW): $C = C_0 [1 - \exp(-k^{cRA}\tau)]$, where C_0 is the total intracellular concentration of **cRA** which was shown to be equal to the known external concentration $C_0 = 10 \mu\text{M}$ (notice however that due to its sequestration by CRABP the free concentration of **RA** is more than 2 orders of magnitude smaller, see below). P_{ret} obeys a Michaelis-Menten-like relation $P_{ret} = C/(C + C_{1/2})$, see Figure 2F and Supplemental Data. Interestingly, the value $C_{1/2} = 1.6 \mu\text{M}$ that best fits our data is the same as the value deduced from the data obtained with grafted **RA** soaked beads [15]. In these experiments, however, the beads acted as a constant source of **RA**, whereas in the present investigation, the initial pulse of **RA** is rapidly complexed with CRABP and may diffuse or be degraded on longer time-scales (minutes). Possibly it is the initial increase in **RA** concentration that triggers the physiological response, in which case the persistence of a **RA** background in the grafted bead experiments would be irrelevant to the final results. To address this issue, it is important to study the temporal response of the system.

p38a MAP kinase is involved in a rapid RA negative regulation

The possibility of releasing known amounts of **RA** quickly at precise times and locations allows us to study the temporal response of the **RA**-associated pathway leading to retina malformations 15

hours later. We uncaged **cRA** in four dorsal cells of the developing retina not with one but with two laser pulses separated by a time lapse $\Delta\tau$ in each cell. In principle, such an experiment can yield three qualitatively different outcomes: sensitization, indifference or inhibition if the response (i.e. the probability of malformation) to the delayed pulses is respectively larger, equal or smaller than the response to their sum (see Figure 3A).

While the first pulse lasted 0.25 s, the second pulse lasted 1.25 s and thus delivered a higher **RA** dose (roughly 700 nM and 3 μ M respectively). The resulting dependence of the probability of retina malformation with $\Delta\tau$ is shown in Figure 3B. If $\Delta\tau < 5$ min, the probability of malformation $P_{ret} \sim 0.55$ is equal to that obtained when $\Delta\tau = 0$. However if $\Delta\tau > 5$ min, $P_{ret} \sim 0.3$ is equal to the malformation probability observed with the smaller first pulse only, even though the **RA** delivered by the second pulse should have led to a higher malformation probability. In other words, the response to two successive pulses of **RA** exhibit strong inhibition if the time lapse between the pulses is longer than 5 min. To check if that inhibition of the action of the second **RA** pulse was intracellular or not, two successive pulses were delivered in two separate ($\sim 50 \mu$ m apart) cells of the dorsal side of a developing retina. In that case, the probability of malformation was independent of $\Delta\tau$ and was similar to that induced when $\Delta\tau = 0$: $P_{ret} \sim 0.55$.

The preceding time-resolved experiments allow us to deduce that the first **RA** pulse initiates an intracellular inhibitory process which efficiently suppresses within a 5 minute time lapse the effect of a second larger pulse of **RA**. This inhibitory effect could be either transcriptional or post-translational. Although a fast (10 min) transcriptional response has been reported [24], the inhibitory timescale observed here suggested that the associated pathway was likely post-translational, as timescales compatible with our 5 min process have been reported in phosphorylation cascades [25]. In particular, we hypothesized that a **RA**-induced phosphorylation and degradation of a coactivator [26] of the **RA**-receptor (RAR) could account for the rapid **RA** inhibitory mechanism discovered here.

Indeed, some recent work by Gianni et al. [26] links p38 α MAP kinase to transcription regulation by RAR. These authors showed that **RA** activation of RAR α induces the phosphorylation by p38 α kinase of the p160 coactivator SRC-3. Phosphorylated SRC-3 is then degraded by the proteasome pathway inhibiting further transcription. To test for a possible involvement of p38 α kinase (the zebrafish ortholog of p38 α) in the fast **RA** inhibitory mechanism discovered here, we used a knockdown approach and

injected p38a antisense morpholinos in zebrafish embryos at the one cell stage. Then we repeated the two-photon uncaging experiments previously described, in particular the response of the retina to two consecutive short pulses of **RA**.

We used a morpholino concentration (1.5 ng/nl) that although resulting in observable heart and axis defects led to normal development of the retina, see Figure 5C. We checked that the knockdown did not affect the dependence of the retina malformation probability on **RA** concentration both by using global **RA** treatment (data not shown) and two-photon uncaging of **cRA** (see Figure 3B). We then investigated the response of *p38a* knockdown embryos to two delayed **RA** pulses in one of their retina.

Two-photon uncaging experiments were done in parallel on embryos injected with a *p38a* antisense morpholino and embryos injected with a control morpholino. Except for the injection, the experiments were conducted exactly as on non-injected embryos using delays $\Delta\tau = 10$ and 15 min between pulses. As before, we tested for retina malformations 15 hours after uncaging. As shown in Figure 3C, embryos injected with control morpholinos did not react to the second **RA** pulse if given 10 min after the first one, in agreement with the observations in non-treated embryos, see Figure 3B. In contrast, embryos injected with a *p38a* antisense morpholino responded to a second **RA** pulse delivered 10 or 15 min after the first one, as they would have responded if the pulses had been delivered with no delay. We therefore deduced that p38a kinase is necessary for the establishment of the pathway that inhibits within minutes the response of the embryo to a second puff of **RA**.

Discussion

In this work, we have shown how an “optical syringe” can be used to introduce controlled spatio-temporal perturbations of the concentration of a morphogen. We have been able to investigate part of the dynamical response to a morphogen (retinoic acid) pulse with unprecedented temporal and spatial resolutions in a native environment.

We first discuss the cell’s response to a pulse of **RA** as inferred from our observations and published data. The fact that the slow release of **RA** (over minutes at low illumination intensities, see Figure 1D) can be well fitted by first order kinetics implies that **RA** homogenizes rapidly throughout the cell and does not diffuse out of it during the measurement timescale. The lower bound for **RA** diffusion in the

cell deduced from these observations: $D_{RA} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ is consistent with the value ($10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) reported in chicken embryos [27]. The absence of diffusion of **RA** out of the cell over several minutes, i.e. the relative impermeability of the cellular membrane to **RA**, is also consistent with reports of the typical timescale of permeation (2.5 min [28]) of the structurally close but more hydrophobic retinol (**RA** would be expected to diffuse even slower out of the cell). Moreover, the good agreement between the values of the uncaging rate of **cRA** deduced from the quick complexation of **RA** with CRABP or estimated from the uncaging kinetics of **cF** implies that the endogenous degradation of **RA** is negligible on the timescale of our experiments (a few minutes), in agreement with reported values for the half life time of **RA** [29].

We thus conclude that upon illumination during a time τ (which can be a fraction of a second), **RA** can be released at micromolar concentrations, $C(\tau)$. However the presence of retinol and retinoic acid binding proteins (CRBP and CRABP) at similar or higher concentrations $C_{\mathcal{BP}}$ results in the rapid sequestration (within ms [22, 18]) of most of that released **RA**. Indeed, with a dissociation constant $K_d^{CRABP} \sim 10 \text{ nM}$ [30, 31], the complex **RA**·CRABP acts as an effective buffer of **RA**, which free concentration can be estimated to be: $[RA]_{free} \sim K_d^{CRABP} C / C_{\mathcal{BP}} \sim 1 \text{ nM}$, well within its physiological range.

This concentration estimate is consistent with the observation that the probability of retina malformation is not saturated in our experimental conditions. The continuous increase in that probability suggests that the number of certain gene products of the **RA** pathway while small (to account for the probabilistic nature of the response) increases with the dose of **RA**. In particular, the value of the released **RA**, $C_{1/2} = 1.6 \mu\text{M}$ where the malformation probability is 50% is consistent with the affinity of **RA** for RAR (i.e. $K_d^{RAR} \sim 1 \text{ nM}$ [32]) and its sequestration by CRABP: $C_{1/2} = K_d^{RAR} C_{\mathcal{BP}} / K_d^{CRABP} \sim 1 \mu\text{M}$. Noticeably, the increase in the activity of the **RA** responsive promoters with **RA** concentration implies that the interaction of **RA** with its receptor RAR reaches equilibrium on less than a minute timescale.

Once a cellular response has been triggered by a pulse of **RA**, our observations suggest that p38a kinase inhibits within 5 minutes the response to a second pulse. In Figure 4, we propose a simple mechanism for that inhibition based on the known interactions of p38a kinase. In the presence of a **RA**-RAR complex p38a kinase phosphorylates a RAR-coactivator, which is then degraded by the proteasome pathway. Thus p38a kinase may regulate the number of RAR-stimulated transcription

rounds by controlling the turnover of the pre-initiation complex (a phenomenon of similar kind has been documented in Metivier et al., [33]).

If this model is correct, the loss of regulation by p38a should result in an excess of **RA** pathway gene products in a fashion similar to what is expected at high **RA** concentrations. Indeed these predictions are borne out by the observations in *p38 α* mice knockouts [34, 35, 36] of severe defects in heart development in the surviving embryos. A prolonged action of **RA**, an anti-angiogenic, has also been shown to restricts the cardiac progenitor pool in zebrafish [37]. To test our model in the present context, we checked its prediction that the increased stimulation of RAR-controlled transcription in p38a knockdown can be offset by reducing the **RA** concentration. Figure 5E demonstrates that the developmental defects observed in the *p38a* zebrafish knockdowns can be spectacularly rescued by partially inhibiting endogenous retinoic acid synthesis using diethylaminobenzaldehyde (DEAB). The effects of the depletion of endogenous **RA** concentration and of the p38a knockdown thus compensate each other, validating our working hypothesis. The close link between p38a MAP kinase and **RA** signaling may therefore provide a unified explanation for the multiplicity of its reported effects in embryogenesis [34, 35, 36].

From a developmental perspective, the role of fail-safe mechanism played by p38a kinase in the **RA** response pathway makes sense: by combining with **RA** to inhibit the response to later pulses of **RA**, p38a kinase essentially prevents the reinitiation of that pathway. From this point of view, the timescale of that inhibition (i.e. about 5 minutes) is compatible with the typical timescales of some developmental programs where **RA** is known to play a role, such as somitogenesis [38, 39] where new somites are generated every 20 minutes.

The p38a mediated mechanism exposed here may be more general: the phosphorylation of a cofactor may define a precise short-time window for the response of transcription to a variety of morphogens and transcriptional factors [40]. In other words, the fast negative feedback mechanism described above which regulates **RA** signaling on very short time scales might be present in other morphogenetic networks, where precise timing of the response is also required.

Significance

Embryogenesis results from accurate spatial and temporal responses of cells to changing morphogen gradients. While the long time developmental response is well documented, our understanding of the dynamical response to these changes would be advanced by the development of methods to perturb quickly and locally the concentrations of morphogens. By using two-photon uncaging of **cRA** in a developing zebrafish embryo, we discovered that cells are sensitive to **RA** for only five minutes after a first **RA** puff was delivered and did not respond past that delay to further excitation even with larger **RA** puffs. We showed that this process is intracellular as there is no inhibition when retinoic acid is delivered in two different cells. Finally, we identified p38a MAP kinase as a necessary actor in this inhibitory pathway and validated this link by showing that the lack of p38a can be rescued by inhibiting **RA** synthesis.

The approach developed here permits the non-invasive, fast and accurate delivery of a known physiological concentration of a morphogen such as retinoic acid in a single cell of a live zebrafish embryo. This features open the way to unprecedented series of experiments such as controlling morphogen gradients or unravelling the dynamics of regulation processes during development. In the specific context of retinoic acid, the ability to control its spatio-temporal release may allow, for instance, to investigate key events such as somitogenesis where the comparison of models with experiments has been hampered by the lack of means to precisely set the gradients of retinoic acid [29].

Experimental Procedures

Chemicals

The syntheses and the screening of the caged esters of all-*trans* retinoic acid are described in the Supporting Information. The synthesis of the caged coumarin **cF** used for the two-photon uncaging kinetic studies has been described [41]. 10 mM stock solutions of all the caged compounds were prepared in DMSO and kept at -20°C; when needed, further dilutions were made in DMSO which does not induce any biological effect after subsequent dilution in water (data not shown). All other chemicals were used as received from Aldrich or Sigma.

Characterization of *in vivo* two-photon uncaging kinetics using **cF** and **cRA**

Instrumental setup. For the *in vivo* uncaging calibration studies, a home-built microscope [5] equipped with an Olympus UPlanApo 60× 1.2 NA water immersion objective was used to image the embryos on a JAI-40 CCD camera and locate the focal spot of the two-photon excitation. Illumination (200 fs, 76 kHz, 750 nm) was provided by a mode-locked Ti-Sapphire laser (Mira, Coherent). The incident power (≤ 4.5 mW) was measured with a Lasermate powermeter (Coherent). Fluorescence photons collected through filters (AHF Analysentechnik, emission filter: 480/60 nm, excitation wavelengths: 750 nm for the experiments with **cF** and 720 nm with **cRA**) and optical fibers (FG200LCR multimode fiber, Thorlabs) were detected with avalanche photodiodes (SPCM-AQR-14, Perkin Elmer) coupled to an ALV-6000 correlator (ALV GmbH). The intensity of the collected fluorescence emission and its temporal correlation function were recorded. The geometrical characteristics of the focal point were determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) measurements on a fluorescein solution of known concentration.

Zebrafish embryo conditioning. Embryos were manually dechorionated at 1-3 somite stage. They were subsequently incubated in embryo medium supplemented with 10 μ M **cF** or **cRA** for 90 min. We located the two-photon focal spot in the dorsal part of the retina and continuously monitored the fluorescence intensity. As a control, the same experiment was done on non-treated embryos.

Studies of retina malformation induced by cRA uncaging

For retina malformation studies, we used a Nikon Diaphot inverted microscope modified for two-photon excitation (at incident power of 4.5 mW) (to prevent unwanted uncaging of cRA, a 532 nm high pass filter was inserted in the brightfield illumination pathway). A Nikon CFI Plan Apochromat 20× (NA=0.75) air objective was used and its focal point geometry characterised by FCS. Imaging was done with a CCD camera (Hamamatsu ORCA C4742-95-12ER). Filters and dichroics mirrors were purchased from Omega Optical or Chroma Technology. The duration of the illumination was set by inserting an electro-mechanical shutter (Thorlabs) in the path of the laser beam.

Four different cells stacked in the z direction perpendicular to the plane of the retina were excited in embryos at the 4-14 somites stage. We also uncaged cRA in just one cell of the retina. This was sufficient to trigger a similar phenotype but with a malformation probability smaller than the one measured here (data not shown).

Whole-mount in situ hybridization

Whole mount *in situ* hybridizations were carried out with DIG-labelled riboprobes for *pax6a* (Roche) using a hybridization robot (Intavis AG) on 30 hpf embryos fixed in paraformaldehyde. Embryos were embedded in standard condition and sections (5 μ m) were performed using a microtome.

Morpholinos injections

p38a antisense morpholino (AAGTGGGTCTTTCTTTCTGCGACAT) complementary to the first 25 bases of the coding region of the *p38a* gene and a standard control morpholino (CCTCTTACCTCAGT-TACAATTTATA) were obtained from Gene Tools, LLC. For retina development studies, 5 nl of morpholinos (1.5 ng/nl) were injected into one-cell embryos with a Femtojet microinjector (Eppendorf).

Rescue of *p38* knockdown phenotype

For these experiments, 5 nl *p38a* antisense morpholino (3 ng/nl) and the standard control morpholino were injected into one-cell embryos, which were subsequently incubated in embryo medium supplemented with 5 μ M diethylaminobenzaldehyde (DEAB) at 1-3 somite stage and left to develop in this solution. Non-treated and treated embryos were assayed at 30 hpf.

Supplemental Data can be found online.

Acknowledgments

We thank P. Dufourcq for help with *in situ* hybridization and cross section and F. Rosa for access to his fish facility. We thank M. Mark, X. Michalet, K.C. Neuman, F. Rosa, Y. Shav-Tal, B. Shraiman, M. Volovitch for critical reading of the manuscript. This work has been supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). The authors declare no competing financial interests.

References

1. Lander, A.D. (2007). Morpheus unbound: reimagining the morphogen gradient. *Cell* *128*, 245–256.
2. Freeman, M., and Gurdon, J.B. (2002). Regulatory principles of developmental signaling. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* *18*, 515–539.
3. Xu, C., Zipfel, W., Shear, J.B., Williams, R.M., and Webb, W.W. (1996). Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 10763–10768.
4. Bochet C.G. (2002). Photolabile protecting groups and linkers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 125–142.
5. Gagey, N., Neveu, P., and Jullien, L. (2007). Reporting two-photon uncaging with the efficient 3,5-dibromo-2,4-dihydroxycinnamic caging group. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *46*, 2467–2469.
6. Gagey, N., Neveu, P., Benbrahim, C., Aujard, I., Baudin, J.B., and Jullien, L. (2007). Two-photon uncaging with fluorescence reporting: evaluation of the o-hydroxycinnamic platform. *J. Am. Chem. Soc.* doi:10.1021/ja0722022.
7. Tirlapur, U.K., Konig, K. (2002). Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* *418*, 290–291.
8. Wieboldt, R., Gee, K.R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B.K., and Hess, G.P. (1994). Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 8752–8756.
9. Furuta, T., Wang, S.S., Dantzker, J.L., Dore, T.M., Bybee, W.J., Callaway, E.M., Denk, W., and Tsien, R.Y. (1999). Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1193–2000.
10. Cambridge, S.B., Geissler, D., Keller, S., and Curten, B. (2006). A caged doxycycline analogue for photoactivated gene expression. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *45*, 2229–2231.

11. Gudas, L.J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.* *269*, 15399–15402.
12. Wagner, E., McCaffery, P., and Drager, U.C. (2000). Retinoic acid in the formation of the dorso-ventral retina and its central projections. *Dev. Biol.* *222*, 460–470.
13. Schier, A.F., and Talbot, W.S. (2005). Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 561–613.
14. Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Marsh-Armstrong, N.R., and Dowling, J.E. (1992). Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 8293–8297.
15. Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Marsh-Armstrong, N., McCaffery, P., Drager, U.C., and Dowling, J.E. (1996). Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* *122*, 195–204.
16. Pichler, F.B., Laurensen, S., Williams, L.C., Dodd, A., Copp, B.R., and Love, D.R. (2003). Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat. Biotechnol.* *21*, 879–883.
17. Zipfel, W.R., Williams, R.M., Christie, R., Nikitin, A.Y., Hyman, B.T., and Webb, W.W. (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7075–7080.
18. Dong, D., Ruuska, S.E., Levinthal, D.J., and Noy, N. (1999). Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* *274*, 23695–23698.
19. Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S., and Shinitzky, M.R. (1976). Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur. J. Biochem.* *65*, 71–78.
20. MacDonald, P.N., and Ong, D.E. (1987). Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, type II. *J. Biol. Chem.* *262*, 10550–10556.
21. Herr, F.M., Li, E., Weinberg, R.B., Cook, V.R., and Storch, J. (1999). Differential mechanisms of retinoid transfer from cellular retinol binding proteins types I and II to phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* *274*, 9556–9563.

22. Noy, N., and Blaner, W.S. (1991). Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein. *Biochemistry* *30*, 6380–6386.
23. Ashery-Padan, R., and Gruss, P. (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* *13*, 706–714.
24. Boehm, A.K., Saunders, A., Werner, J., and Lis, J.T. (2003). Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7628–7637.
25. Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C., Gilles, E.D., and Muller, G. (2002). *Nat. Biotechnol.* *20*, 370–375.
26. Gianni, M., Parrella, E., Raska, I., Jr, Gaillard, E., Nigro, E.A., Gaudon, C., Garattini, E., and Rochette-Egly, C. (2006). P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RAR α -mediated transcription. *EMBO J.* *25*, 739–751.
27. Eichele, G., and Thaller, C. (1987). Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retinoid in the chick limb bud. *J. Cell. Biol.* *105*, 1917–1923.
28. Chen, C.C., and Heller, J. (1977). Uptake of retinol and retinoic acid from serum retinol-binding protein by retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *252*, 5216–5221.
29. Goldbeter, A., Gonze, D., and Pourquié, O. (2007). Sharp developmental thresholds defined through bistability by antagonistic gradients of retinoic acid and FGF signaling. *Dev. Dyn.* *236*, 1495–1508.
30. Fiorella P.D., Giguere V., and Napoli, J.L. (1993). Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in *Escherichia coli*. Characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I). *J. Biol. Chem.* *268*, 21545–21552.
31. Napoli, J.L. (1996). Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* *10*, 993–1001.
32. Allenby, G., Bocquel, M., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P., et al. (1993).

- Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors: Interactions with Endogenous Retinoic Acids Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *90*, 30–34.
33. Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* *115*, 751–763.
34. Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R., and Nebreda, A.R.; (2000). Essential role of p38 α MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol. Cell* *6*, 109–16.
35. Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S., and Shen, M.M. (2000). Essential role for p38 α mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 10454–10459.
36. Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R., and Karin, M. (2000). Requirement for p38 α in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* *102*, 221–231.
37. Keegan, B.R., Feldman, J.L., Begemann, G., Ingham, P.W., and Yelon, D. (2005). Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science* *307*, 247–249.
38. Kawakami, Y., Raya, A. Raya, R.M.; Rodriguez-Esteban, C., and Belmonte, J.C. (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* *435*, 165–171.
39. Vermot, J., and Pourquié, O. (2005). Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature* *435*, 215–220.
40. Chow, C.W., and Davis, R.J. (2006). Protein kinases: chromatin-associated enzymes? *Cell* *127*, 887–890.
41. Aujard, I., Benbrahim, C., Gouget, M., Ruel, O., Baudin, J.-B., Neveu, P., and Jullien, L. (2006). *o*-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chem. Eur. J.* *12*, 6865–6879.

Figure 1: **Kinetics of two photon uncaging *in vivo*.** (A) Principle of the experiment: a single cell of the retina of a manually dechorionated 4-14 somite embryo previously incubated for 90 min in 1 μM **cF** (or 10 μM **cRA**) is illuminated and the temporal variation of the fluorescence signal recorded. (B) Increase in fluorescence resulting from the release upon uncaging (at 1.8 mW laser power) of fluorescent coumarin from its non-fluorescent precursor (**cF**). Continuous line: fit to $I(t) = I_{max}(1 - e^{-k^{cF}t})$ with rate constant $k^{cF} = 0.04 \text{ s}^{-1}$; (C) Probability distribution of cell sizes deduced from the distribution of the values of k^{cF} (see Supplemental Data for details). (D) Variation in the fluorescence intensity $I(t)$ upon **cRA** uncaging (at 1 mW laser power). The changes are due to retinol unbinding from CRBP which results in a decrease in fluorescence and to **RA** binding to CRABP which increases the fluorescence. Continuous line: double exponential fit $I(t) = I^0 - \Delta I^{\text{off}}(1 - e^{-k_{\text{off}}t}) + \Delta I^{\text{on}}(1 - e^{-k_{\text{on}}t})$ where $k_{\text{off}} = 0.06 \text{ s}^{-1}$ is the rate of retinol unbinding and $k_{\text{on}} = 0.015 \text{ s}^{-1}$ is the uncaging rate at 1 mW power. Error bars represent s.e.m.

Figure 2: **Induction of retina malformation in the eye of a zebrafish embryo by local two-photon (750 nm) uncaging of cRA and probability of retina malformation induced by uncaging with a single laser pulse.** (A) Scheme of the experiment: a 4.5 mW laser pulse of duration τ is focused in four dorsal cells of the right developing eye of a zebrafish embryo at 4-14 somite stage; (B, C) whole mount in situ hybridization against *pax6* mRNA (for clarity, the eyes are outlined) in a 30 hpf embryo initially illuminated as in (A) (hb: hindbrain). (D) cross section through the head of a whole mount embryo (similar to the one shown in (B) and (C)) showing overexpression of *pax6* (arrows) in the illuminated right retina and the immediately adjacent cells of the diencephalon (di) and normal expression in the nonilluminated left eye. (F, E) Malformation probability P_{ret} as a function of the duration τ of the laser pulse or the estimated released **RA** concentration. Blue crosses: experimental points; black circles: experimental points on *p38a* knockdown embryos; black diamonds in (E): non-treated embryos; black diamonds in (F): data from [15]; solid red line: Fit to $P_{ret} = C/(C + C_{1/2})$ with $C = C_0 [1 - \exp(-k^{cRA}\tau)]$ and $C_{1/2} = 1.6 \mu\text{M}$ [15]. The concentration C of **RA** is evaluated from the known initial concentration of **cRA** in the cell ($C_0 = 10 \mu\text{M}$) and the uncaging rate at 4.5 mW ($k^{cRA} = 0.28 \text{ s}^{-1}$). Error bars represent s.e.m.

Figure 3: **Probability of retina malformation upon two-photon excitation with two delayed laser pulses.** (A) Scheme of the experiment: the delivery of a **RA** concentration pulse followed after a time delay $\Delta\tau > 0$ by a second larger pulse may result in three different responses: sensitization, indifference or inhibition if the cell's response to the second pulse is respectively larger, identical or smaller than its response at $\Delta\tau = 0$. (B) Malformation probability in embryos submitted in the same 4 cells of a single retina to two pulses (the first of duration $\tau = 0.25$ s and the second of duration $\tau = 1.25$ s) separated by a delay $\Delta\tau$ (blue crosses); black diamonds: same but the two pulses were applied in different cells $50 \mu\text{m}$ apart. (C) Same experiment on morpholino injected embryos; black squares: control morpholino; red circles: *p38a* antisense morpholino. Whereas inhibition is still present on embryos injected with the control morpholino, it disappears on the *p38a* knockdown. Dashed lines are guides to the eye. Error bars represent s.e.m.

Figure 4: **A model inspired from Gianni et al. [26] for the rapid p38a inhibition of the RA response.** Released **RA** binds to its receptor RAR forming an active RAR*RA complex that stimulates the phosphorylation by a p38a MAP kinase of a transcriptional coactivator (SRC-3 noted CoAct). The phosphorylated protein is then degraded by the proteasome. Thus p38a MAP kinase acts as an inhibitor of transcription, the initiation of which requires the binding of a RAR*RA complex and its coactivator.

Figure 5: **Rescue of a *p38a* knock-down by inhibition of endogeneous RA synthesis.** Embryos injected with control morpholinos (A) and incubated in $5 \mu\text{M}$ DEAB at 1-3 somite stage (B). (C) Embryos injected with *p38a* anti-sense morpholinos (5 nl at 1.5 ng/nl) exhibit normal eye development. (D) Embryos injected with *p38a* anti-sense morpholinos (5 nl at 3 ng/nl) exhibit major axis and heart defects. (E) Incubation of embryos such as in D in $5 \mu\text{M}$ DEAB at 1-3 somite stage leads to a spectacular rescue of the axis defects.

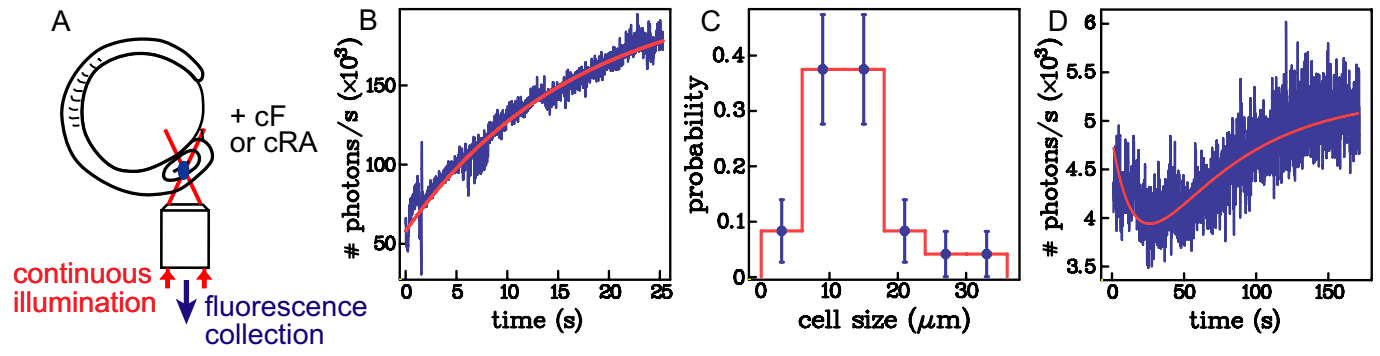


Figure 1

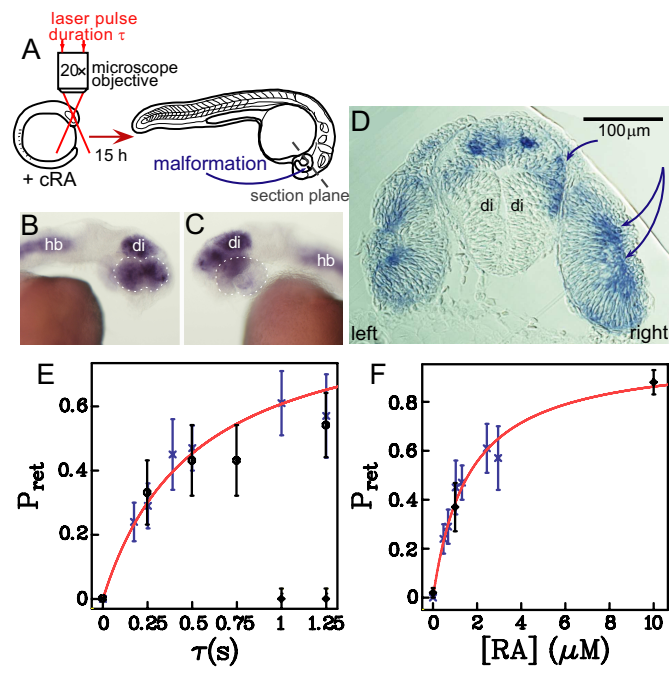


Figure 2

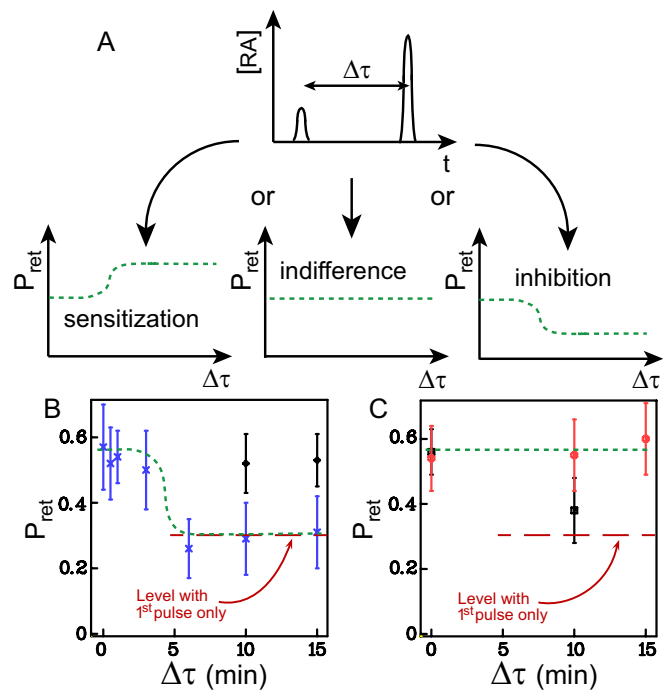


Figure 3

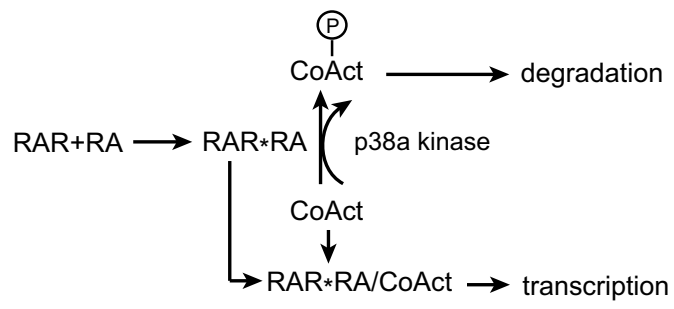


Figure 4

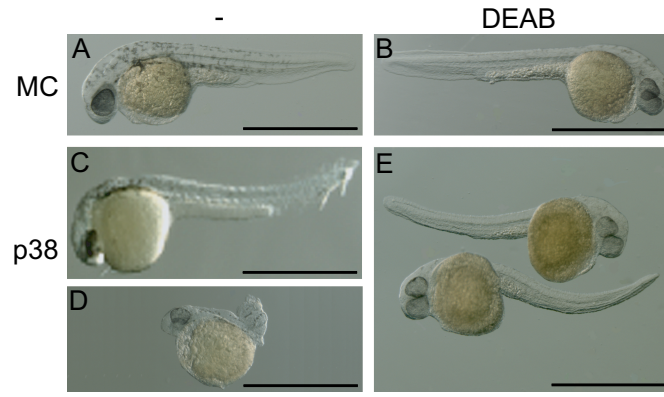


Figure 5

Probing the cellular response to a pulse of morphogen using two-photon uncaging in a live zebrafish embryo

Pierre Neveu^{*†}, Sophie Vríz^{‡§}, Isabelle Aujard[†], Chouaha Benbrahim[†], Thomas Le Saux^{†¶},
Jean-François Allemand^{*†}, David Bensimon^{*}, Ludovic Jullien^{†¶||}

^{*} *Ecole Normale Supérieure, Laboratoire de Physique Statistique and Département de Biologie
UMR 8550, 24 rue Lhomond, F-75231 Paris, France*

[†] *Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie UMR CNRS-ENS-UPMC 8640,
24 rue Lhomond, F-75231 Paris, France*

[‡] *Inserm U770, Hémostase et Dynamique Cellulaire Vasculaire,
80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France*

[§] *Université Paris 7 Denis Diderot, 75005 Paris, France*

[¶] *Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France*

Supplemental Data

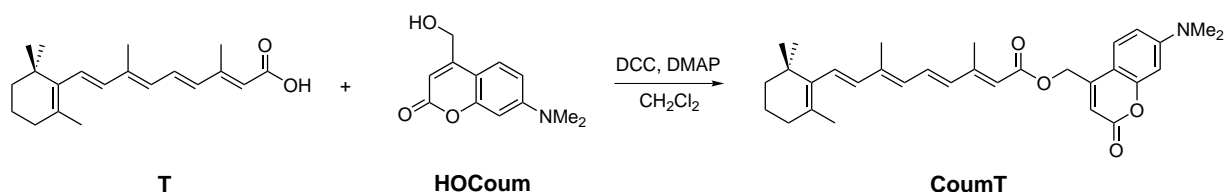
The Supplemental Data reports on:

- The syntheses and characterizations of the caged compounds obtained from all-*trans* retinoic acid.
- The one-photon photoconversion kinetics of **cRA** upon UV illumination.
- The choice of a suitable caged retinoic acid.
- The determination of the two-photon uncaging kinetics *in vivo*.
- The caged coumarin **cF** used as model for two-photon uncaging kinetic studies.
- The derivation of the fraction of RAR which are bound to **RA**.
- The number of investigated embryos in the two-photon experiments.

The syntheses and characterizations of the caged compounds obtained from all-*trans* retinoic acid.

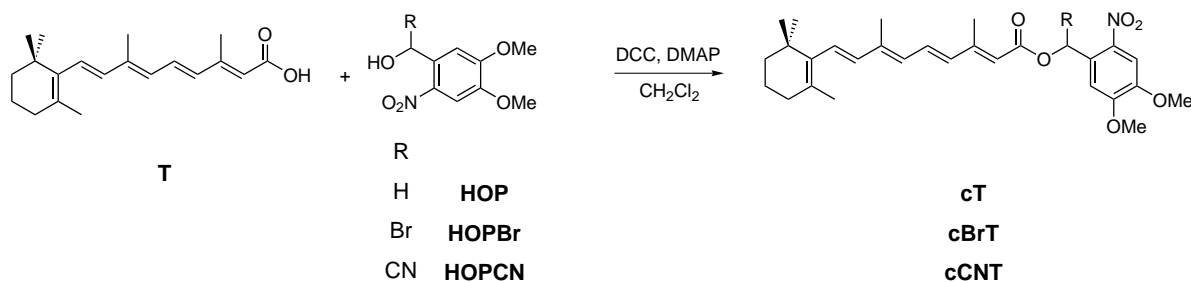
We retained two series of photolabile protecting groups: the first caging group relies on bond breaking of appropriate benzylic coumaryl derivatives in the excited state [1, 2, 3], whereas the second is based on the photoisomerization followed by subsequent thermal reactions in the ortho-nitrobenzyl derivatives [4].

We first prepared the 7-dimethylamino-coumarin-4-ylmethyl ester **CoumT** of all-*trans* retinoic acid **T** by condensation between **T** and the 7-dimethylamino-coumarin-4-yl methanol **HOCoum** in the presence of DCC (scheme 1SA).



Scheme 1SA. Synthesis of **CoumT**.

The 2-nitrobenzyl esters of all-*trans* retinoic acid **T**: **cT** (=cRA), **cBrT**, and **cCNT** were obtained under similar conditions by condensation between **T** and the corresponding 2-nitrobenzyl alcohols **HOP**, **HOPBr**, and **HOPCN** [5] (Scheme 1SB).



Scheme 1SB. Syntheses of the 2-nitrobenzyl esters of all-*trans* retinoic acid **T**.

General

The commercially available chemicals were used without further purification. Anhydrous solvents were freshly distilled before use. Column chromatography (CC): silica gel 60 (0.040-0.063 mm) Merck. Analytical and thin layer chromatography (TLC): Merck silica gel 60 F₂₅₄ precoated plates; detection

by UV (254 nm). Melting point: Büchi 510. ¹H-NMR Spectra: AM-250 or 400 AVANCE Bruker; chemical shifts (δ) in ppm related to protonated solvent as internal reference (¹H: CHCl₃ in CDCl₃, 7.26 ppm; CHD₂SOCD₃ in CD₃SOCD₃, 2.49 ppm. ¹³C: ¹³CDCl₃ in CDCl₃, 77.0 ppm; ¹³CD₃SOCD₃ in CD₃SOCD₃, 39.6 ppm); Coupling constants J in Hz. Mass spectrometry (chemical ionization and high resolution with NH₃ or CH₄) was performed at the Service de Spectrométrie de masse de l'ENS. Microanalyses were obtained from the Service de Microanalyses de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Experimental Procedures

3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-enyl)-nona-2,4,6-trienoic acid 7-dimethylamino-2-oxo-2-*H*-chromen-4-ylmethyl ester (C_{oum}T) Same as for **cT**. 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (68 mg, 0.33 mmol, 1 eq), all-*trans* retinoic acid **T** (98 mg, 0.33 mmol), 7-dimethylamino-2-oxo-2-*H*-chromen-4-ylmethanol **HOC_{oum}** (90 mg, 0.41 mmol, 1.25 eq; [3]), 4-dimethylaminopyridine (34 mg, 0.33 mmol, 1 eq). After purification by column chromatography on silica gel with methylene chloride as eluent, **C_{oum}T** as a yellow powder (132 mg, 84%). ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃) δ = 7.35 (d, 1 H, J=8.9 Hz), 7.06 (dd, 1 H, J= 11.5 Hz and J= 15 Hz), 6.62 (dd, 1 H, J= 2.2 Hz and J=8.9 Hz), 6.53 (d, 1 H, J=2.2 Hz), 6.31 (d, 2 H, J= 15.5 Hz), 6.16 (d, 1 H, J= 10.6 Hz), 6.15 (d, 1 H, J= 17,0 Hz), 5.87 (s, 1 H), 5.27 (s, 2 H), 3.05 (s, 6 H), 2.39 (s, 3 H), 2.04-2.01 (m, 5 H), 1.72 (s, 3 H), 1.64-1.57 (m, 2 H), 1.48-1.44 (m, 2 H), 1.03 (s, 6 H); MS (CI, CH₄): m/z 502 (calcd av mass for C₃₂H₄₀NO₄: 502.29); MS (CI, CH₄, HR): m/z 502.2952 (calcd av mass for C₃₂H₄₀NO₄: 502.2957).

3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-enyl)-nona-2,4,6-trienoic acid 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl ester cT (cRA). 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (103 mg, 0.5 mmol, 1 eq) was added to a solution of all-*trans* retinoic acid **T** (150 mg, 0.5 mmol), 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl alcohol **HOP** (106 mg, 0.5 mmol, 1 eq) and 4-(dimethylamino)pyridine (61 mg, 0.5 mmol, 1 eq) in dry dichloromethane (5 mL) at 0°C under nitrogen. After 10 min at 0°C, the mixture was stirred at room temperature in the absence of light for 12 h. After filtration, the filtrate was washed with 1.2 M hydrochloric acid and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate, then dried over sodium sulfate,

and concentrated under vacuum. **cT** was obtained as a yellow powder after precipitation in methanol (150 mg, 60%). m.p. 113°C; ¹H NMR (ppm, 400 MHz, CDCl₃, 25°C) δ= 7.72 (s, 1 H), 7.04 (dd, 1 H, J=11.0 Hz and 15.0 Hz), 7.02 (s, 1 H), 6.31 (d, 1 H, J=15.0 Hz), 6.29 (d, 1 H, J=16.1 Hz), 6.15 (d, 1 H, J=11.0 Hz), 6.14 (d, 1 H, J=16.1 Hz), 5.88 (s, 1 H), 5.56 (s, 2 H), 3.96 (s, 3 H), 3.95 (s, 3 H), 2.37 (d, 3 H, J=0.81 Hz), 2.01 (m, 2 H), 2.00 (s, 3 H), 1.71 (s, 3 H), 1.60 (m, 2 H), 1.46 (m, 2 H), 1.02 (s, 6 H); ¹³C NMR (ppm, 100 MHz, CDCl₃, 25°C) δ= 166.3, 154.4, 153.4, 148.0, 140.2, 137.6, 137.1, 134.7, 131.7, 130.1, 129.2, 129.0, 127.9, 117.1, 110.1, 108.1, 62.4, 56.3, 56.3, 39.5, 34.2, 33.0, 28.9, 21.7, 19.1, 13.9, 12.9; elemental analysis calcd (%) for C₂₉H₃₇NO₆(495.61): C 70.28, H 7.52, N 2.83; found : C 70.09, H 7.73, N 2.63; MS (CI, CH₄) : m/z 496.27 (calcd av mass for C₂₉H₃₇NO₆ : 495.61); MS (CI, CH₄, HR) : m/z 496.2693 (calcd av mass for C₂₉H₃₈NO₆ : 496.2699).

3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-enyl)-nona-2,4,6-trienoic acid 2,2,2-tribromo-1-(4,5-dimethoxy-2-nitro-phenyl)-ethyl ester cBrT. Same as for **cT**. 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (52 mg, 0.25 mmol, 1 eq), all-*trans* retinoic acid **T** (75 mg, 0.25 mmol), 2,2,2-tribromo-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **HOPBr** [5] (145 mg, 0.31 mmol, 1.25 eq), 4-dimethylaminopyridine (30 mg, 0.25 mmol, 1 eq). After purification by column chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 as eluent, **cBrT** as a yellow oil (165 mg, 88%). ¹H NMR (ppm, 250 MHz, CDCl₃, 25°C) δ= 7.79 (s, 1 H), 7.57 (s, 1 H), 7.41 (s, 1 H), 7.01 (dd, 1 H, J=15.0 Hz, J=11.4 Hz), 6.31 (d, 1 H, J=15.0 Hz), 6.25 (d, 1 H, J=15.6 Hz), 6.09 (d, 1 H, J=13.6 Hz), 6.08 (d, 1 H, J=15.6 Hz), 5.90 (s, 1 H), 3.92 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 2.32 (s, 3 H), 1.94 (s, 3 H), 1.85 (m, 2 H), 1.64 (s, 3 H), 1.54 (m, 2 H), 1.38 (m, 2 H), 0.95 (s, 6 H); ¹³C NMR (ppm, 100 MHz, CDCl₃, 25°C) δ= 163.9, 163.1, 156.9, 155.1, 152.1, 149.3, 142.9, 140.9, 137.6, 137.2, 134.3, 132.6, 130.3, 129.4, 129.1, 123.4, 115.6, 111.4, 108.2, 73.3, 56.5, 56.4, 39.5, 33.1, 28.9, 21.7, 19.1, 14.2, 12.9; MS (CI, NH₃): m/z 763.0, 745.9 (calcd av mass for C₃₀H₄₀N₂O₆Br₃: 763.0, calcd av mass for C₃₀H₃₆NO₆Br₃ : 746.32); MS (CI, NH₃, HR): m/z 763.0406 and 765.0383 (calcd av mass for C₃₀H₄₀N₂O₆Br₃: 763.0418 and 765.0401).

3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-enyl)-nona-2,4,6-trienoic acid cyano-(4,5-dimethoxy-2-nitro-phenyl)-methyl ester cCNT. Same as for **cT**. 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide

(103 mg, 0.5 mmol, 1 eq), all-*trans* retinoic acid **T** (150 mg, 0.5 mmol), hydroxy-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)acetonitrile **HOPCN** [5] (150 mg, 0.62 mmol, 1.25 eq), 4-dimethylaminopyridine (61 mg, 0.5 mmol, 1 eq). **cCNT** as a yellow powder (270 mg, 48%). m.p. 145°C; ¹H NMR (ppm, 400 MHz, CDCl₃, 25°C) δ= 7.74 (s, 1 H), 7.18 (s, 1 H), 7.10 (dd, 1 H, J=12.3 Hz and 15.1 Hz), 6.33 (d, 1 H, J=15.1 Hz), 6.30 (d, 1 H, J=14.6 Hz), 6.15 (d, 1 H, J=12.3 Hz), 6.14 (d, 1 H, J=14.6 Hz), 6.17 (s, 1 H), 5.82 (s, 1 H), 4.03 (s, 3 H), 3.98 (s, 3 H), 2.38 (s, 3 H), 2.02 (s, 3 H), 2.02 (m, 2 H), 1.71 (s, 3 H), 1.61 (m, 2 H), 1.46 (m, 2 H), 1.02 (s, 6 H); ¹³C NMR (ppm, 100 MHz, CDCl₃, 25°C) δ= 163.9, 157.7, 153.8, 149.7, 141.3, 139.8, 137.6, 137.0, 134.0, 133.1, 130.4, 129.6, 129.1, 122.3, 115.8, 114.4, 110.0, 108.4, 58.8, 56.7, 56.5, 39.5, 34.2, 33.1, 28.9, 21.7, 19.1, 14.2, 12.9; MS (CI, NH₃): m/z 521 (calcd av mass for C₃₀H₃₆N₂O₆ : 520.62); MS (CI, NH₃, HR): m/z 521.2657 (calcd av mass for C₃₀H₃₇N₂O₆: 521.2652).

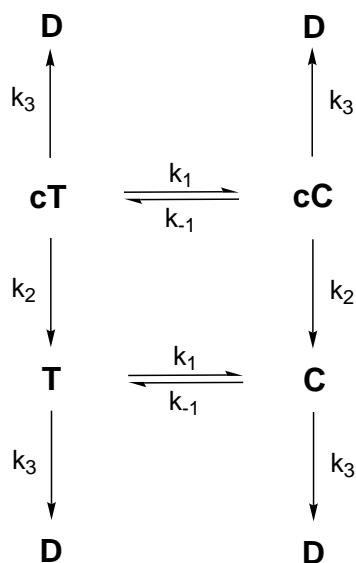
Screening of the caged compounds from all-*trans* retinoic acid

Although exhibiting a large two photon uncaging action cross section equal to 3 GM (1 GM = 10⁻⁵⁰ cm⁴.s/photon), **CoumT** was discarded in view of its poor aqueous solubility.

In contrast to the coumaryl methyl ester, the **cT** (=c**RA**), **cBrT**, and **cCNT** series as well as their side products upon uncaging are non fluorescent. They were tested for their teratogenic effects on dechorionated embryos before and after 365 nm UV illumination (see Main Text). While none was active in the dark, the **cT** derivative was the most soluble compound and produced the most pronounced teratogenic effects upon illumination with one photon excitation. It was consequently retained for the further investigation.

The photoconversion kinetics of cRA upon UV illumination.

All-*trans* retinoic acid is known to isomerize and degrade upon UV illumination [6, 7]. Our purpose here is not to study this complex photochemistry, but rather to estimate the characteristic times associated with the uncaging, isomerization and degradation of the caged all-*trans* retinoic acid **cRA** under the UV illumination conditions used to test its teratogenic effect on a whole zebrafish embryo. To this end, we shall analyze our data within the simple kinetic model displayed in Scheme 2S, where the rate constants k_1 , k_{-1} relate to *trans/cis* photoisomerization, k_2 to uncaging (denoted k^{cF} and k^{cRA} in the Main Text), and k_3 to photodegradation. The photoisomerization kinetics for the caged ester is here assumed to be similar to the one of the retinoic acid, an assumption validated by the similar temporal behavior of the absorption spectra of caged and uncaged compounds.



Scheme 2S. Kinetic model that satisfactorily accounts for the photochemical events occurring during uncaging of the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl ester of all-*trans* retinoic acid **cT** (=cRA). **cT**, **cC**, **T**, **C**, **D** designate caged all-*trans* retinoic acid, caged *cis* retinoic acids, all-*trans* retinoic acid, *cis* retinoic acids and degradation products.

The corresponding system of differential equations linking the concentrations in **cT**, **cC**, **T**, **C**, and **D** is given in Eqs.(1–4):

$$\frac{d\mathbf{cT}}{dt} = -(k_1 + k_2 + k_3)\mathbf{cT} + k_{-1}\mathbf{cC} \quad (1)$$

$$\frac{d\mathbf{cC}}{dt} = k_1\mathbf{cT} - (k_{-1} + k_2 + k_3)\mathbf{cC} \quad (2)$$

$$\frac{d\mathbf{T}}{dt} = k_2\mathbf{cT} - (k_1 + k_3)\mathbf{T} + k_{-1}\mathbf{C} \quad (3)$$

$$\frac{d\mathbf{C}}{dt} = k_2\mathbf{cC} + k_1\mathbf{T} - (k_{-1} + k_3)\mathbf{C} \quad (4)$$

The four nontrivial eigenvalues of its determinant¹ are $\lambda_1 = -(k_1 + k_{-1} + k_3)$, $\lambda_2 = -(k_2 + k_3)$, $\lambda_3 = -k_3$, and $\lambda_4 = -(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_3)$. In principle, the photoactivation kinetics is characterized by four time scales: $\tau_i = -\frac{1}{\lambda_i}$. However if the photoisomerization kinetics is the fastest (as it indeed is), the first and last time scales are similar $\tau_1 = \tau_4$.

Due to the complexity of the retinoic acid photochemistry, we have tried to study separately (as much as possible) the different pathways: uncaging, isomerization and degradation. To study the uncaging pathway, we have measured the uncaging rate constant k_2 of a substrate that did not isomerize, since it was shown that the uncaging kinetics did not depend on the caged substrate, but on the photolabile moiety [5]. We then used capillary electrophoresis to analyze the products of the isomerization and degradation of (noncaged) all-*trans* retinoic acid following UV illumination in the conditions used in our experiments. The results of these investigations is that the photoactivation kinetics of **cRA** is characterized by three separate time scales: a fast photoisomerization time: $\tau_1 \sim 20$ s followed by uncaging on a time scale $\tau_2 \sim 300$ s before degradation with characteristic time: $\tau_3 \sim 2000$ s.

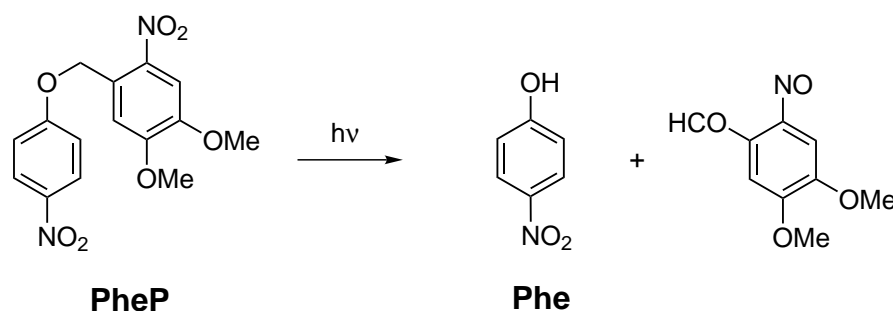
Uncaging kinetics of a model compound upon UV illumination

Previous studies suggest that the uncaging cross section for the nitrobenzyl photochemistry depends on the photolabile moiety and not on the caged substrate [5]. Thus to estimate the **cRA** uncaging rate k_2 , we used the simpler 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl caged substrate **PheP**. It does not isomerize and yields upon UV illumination a strongly colored photoproduct that facilitates the study of its uncaging

¹

$$\begin{vmatrix} \lambda + (k_1 + k_2 + k_3) & -k_{-1} & 0 & 0 \\ -k_1 & \lambda + (k_{-1} + k_2 + k_3) & 0 & 0 \\ -k_2 & 0 & \lambda + (k_1 + k_3) & -k_{-1} \\ 0 & -k_2 & -k_1 & \lambda + (k_{-1} + k_3) \end{vmatrix}$$

kinetics (Scheme 3S) [5].



Scheme 3S. Uncaging of **PheP** releases the weakly acidic substrate **Phe** that dissociates to yield a strongly absorbing anion.

Figure 1S(A) displays the evolution of the absorbance of a 25 μM **PheP** solution as a function of time in the UV illumination conditions used in our experiments on zebrafish embryos. The **PheP** absorption band continuously drops whereas an absorption band near 400 nm corresponding to the released 4-nitrophenate anion increases [5] with a typical rate: $k_2 = 3.5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, see Figure 1S(B).

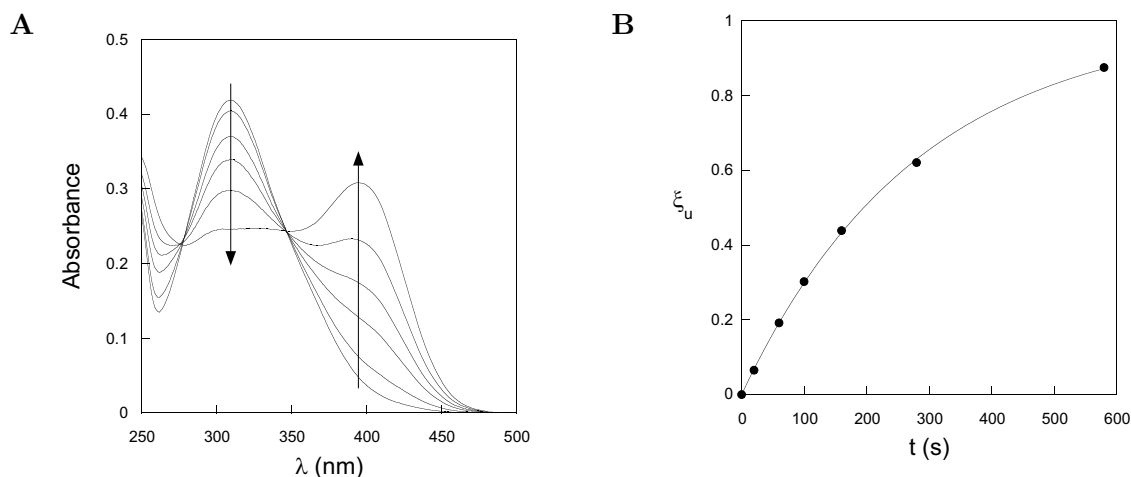


Figure 1S. One-photon irradiation of a 25 μM solution of **PheP** in acetonitrile/20 mM Tris pH=9 buffer 1/1 (v/v) at 293 K. **(A)** Evolution of the UV-Vis absorption spectra of the solution as a function of time ($t(\text{s})=0, 20, 60, 100, 160, 280$); **(B)** Uncaging extent ξ_u as a function of time as extracted from the evolution of the total absorbance at 400 nm, $A_{tot}(400, t)$: $\xi_u(t) = \frac{A_{tot}(400, t) - A_{tot}(400, 0)}{A_{tot}(400, \infty) - A_{tot}(400, 0)} = 1 - \exp(-k_2 t)$. Dots: experimental points; solid line: exponential fit.

Kinetics of photoisomerization and photodegradation of all-*trans* retinoic acid

In view of preceding work [6, 7], we used capillary electrophoresis (CE) to investigate the course of photochemical reactions exhibited by all-*trans* retinoic acid **T**.

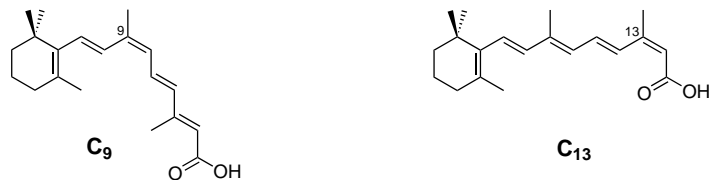


Chart 1S. Formula of the two *cis* retinoic acids identified from **T** photoisomerization: 13-*cis* retinoic acid, **C₁₃**, and 9-*cis* retinoic acid **C₉**.

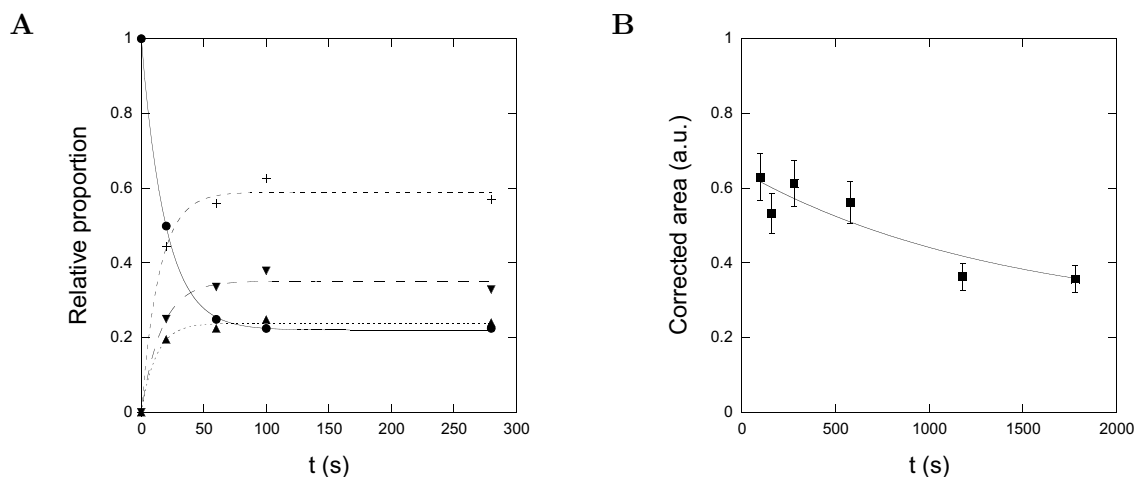


Figure 2S. One-photon irradiation of a 25 μM **T** solution in acetonitrile/embryo medium 1/1 (v/v) at 293 K under the same illumination conditions as in Figure 1S. **(A)** Photoconversion extent as a function of time extracted from the CE electropherograms of the irradiated solution (circles: **T**, uppointing triangles: **C₁₃**, downpointing triangles: **C₉**, crosses: **C** = **C₁₃** + **C₉**; lines: exponential fits; **(B)** Temporal evolution of the total amount **RA** = **T** + **C₁₃** + **C₉** as extracted from CE electropherograms (squares: experimental points; solid line: exponential fit).

Three different peaks are observed in the CE electropherograms. The peaks were attributed by comparison with reference samples of all-*trans* retinoic acid **T** and two *cis* retinoic acids involved in its photoisomerization: the major 13-*cis* retinoic acid **C₁₃** and the minor 9-*cis* retinoic acid **C₉** (Chart

1S).

As shown in Figure 2SA, the relative concentration in **T** drops as the relative concentrations of **C**₁₃ and **C**₉ increase. Clumping both *cis*-isomers into one species **C** = **C**₁₃ + **C**₉, one deduces on the short time scale where photoisomerization dominates:

$$\frac{T(t)}{T(0)} = \frac{k_{-1}}{k_1 + k_{-1}} + \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}} e^{-(k_1+k_{-1})t} \quad (5)$$

$$\frac{C(T)}{T(0)} = \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}} - \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}} e^{-(k_1+k_{-1})t} \quad (6)$$

Both curves can be fitted with a single exponential curve to yield a similar value for $k_1 + k_{-1} = 6 \pm 0.5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. On a longer time scale, one observes a continuous decrease of the total concentration of the various interconverting isomers of retinoic acid (denoted **RA**), see Figure 2SB. An exponential fit to the data yields the rate of **RA** degradation in our experimental conditions: $k_3 = 5 \pm 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

The kinetic parameters deduced from CE data and from model compounds (for k_2) are consistent with the temporal behavior of the absorption spectra of both **T** and **cT** compounds upon UV illumination (data not shown). We can therefore use them to estimate the amount of **RA** released in a zebrafish embryo under the same UV illumination conditions.

Experimental Procedures

UV illumination All UV experiments were performed at 20°C by putting a bench top UV lamp (365 nm; 6 W; Fisher Bioblock) above a glass Petri dish (diameter: 5.5 cm) containing $V = 20$ mL of solution. For the photochemical experiments, we used 25 μM solution of caged compound in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{buffer}$ 1/1 v/v mixtures. The experiments involving retinoic acid and its derivatives were performed in embryo medium.

Capillary electrophoresis Electrophoretic measurements were performed with a PACE/MDQ (Beckman Coulter) capillary electrophoresis system. Migrations were performed at 20 kV in bare fused silica capillaries (Polymicro, Phoenix, AZ), 50 μm I.D. \times 50 cm filled with running buffer (15 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ and 20 mM αCD containing 10% (v/v) acetonitrile; [8]) at 25°C. The analytes were detected by UV absorbance at 350 nm.

Choosing a suitable caged retinoic acid

The protocol retained to implement quick local **RA** delivery is the following: a zebrafish embryo is incubated in a solution of caged **RA** that penetrates the whole organism. The incubating solution is then washed and **RA** release achieved by excitation with a light source (an “optical syringe”). To be effective that strategy requires that caged **RA**:

- i) enters the cells;
- ii) is chemically stable under physiological conditions;
- iii) is biologically nonactive and nontoxic;
- iv) is uncaged at light levels that do not damage the cell.

To address these requirements, we used one-photon uncaging both *in vitro* and *in vivo* to screen several caged retinoic acids compounds on the basis of their characteristics with respect to cell permeation, physiological stability, non-toxicity and the absence of biological (teratogenic) activity. We selected one (**cRA**, formula given in Scheme 1SB) which was best suited for *in vivo* studies with two-photon excitation. As shown below it can penetrate the embryos, is chemically stable, non-toxic and non-active and is uncaged at sufficiently low light levels. Moreover **cRA** relies on an extensively analyzed [9] and widely used photochemistry [4] based on the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl photoremovable group.

With regards to the stability, inactivity and non-toxicity of our caged compounds, we first tested the response of early stage embryos either injected (at 32 cell stage) or incubated (at 128 cell stage) in a solution of the tested molecule. Embryos thus treated with **cRA** (at 10 μ M) developed normally and were not different from non-treated ones (Figure 4SB). We checked that, when illuminated for up to 4 minutes with the UV lamp used for uncaging (6 W, 365 nm), control embryos developed normally (data not shown). We also verified that the side product resulting from uncaging was biologically inert (data not shown).

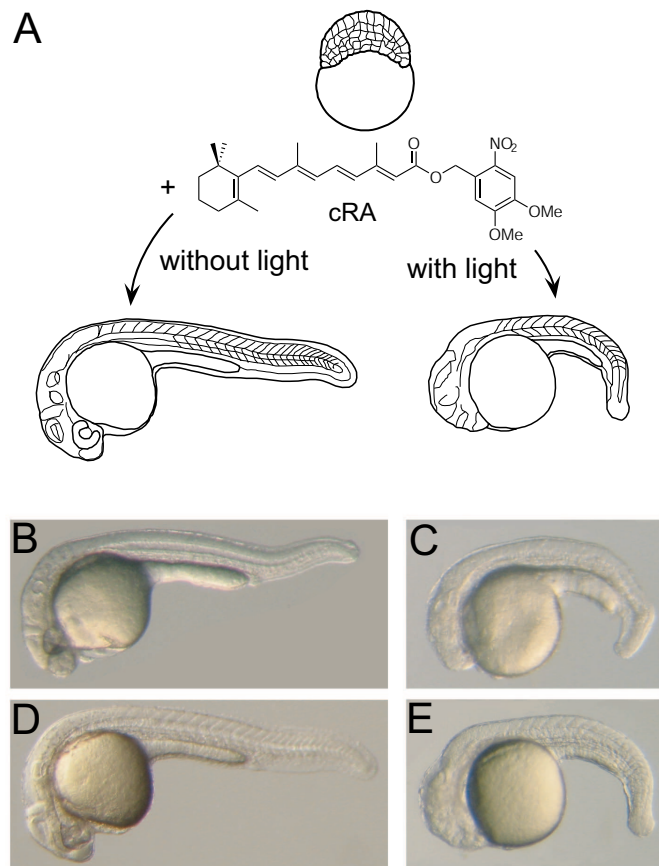


Figure 4S. Teratogenic effects induced by UV illumination of caged retinoic acid (cRA). (A) 128-cell dechorionated embryos were incubated for 90 min in 10 μM **cRA**. They were then washed with embryo medium and illuminated (or not) with a 365 nm UV lamp for 80 s. The embryos were observed at 30 hpf. The non illuminated embryos (B) develop normally as do the illuminated but non treated ones (D). The illuminated embryos (C) exhibit strong teratogenic effects similar to those observed in non-illuminated embryos (E) incubated for 90 min in 1 μM **RA**.

Having established that **cRA** was stable, non-teratogenic and non-toxic to zebrafish development, we proceeded to determine its permeation properties and effects upon uncaging. We incubated dechorionated 128 cell embryos for 90 min in a 10 μM **cRA** solution and subsequently washed them with plain embryo medium (Figure 4SA). Non-illuminated embryos developed normally, consistent with the previous experiment (Figure 4SB and 4SD). In contrast, embryos illuminated for 80 s exhibited the typical **RA**-induced phenotype observed at ~ 1 μM **RA** concentration (Figure 4SC and 4SE).

However, for longer illumination durations (> 160 s), embryos develop normally which suggests

that, at that stage of development (32 cell embryo) the various retinoids are efficiently photodegraded *in vivo* (see Figure 5S). This is in accordance with the *in vitro* experiments which show **RA**-mediated effects only over a defined window of illumination duration.



Figure 5S. Dependence of the retinoic acid-induced phenotype on the duration of UV illumination in zebrafish embryos after injection of 5 nl 0.1 mM **cRA** in 32 cell embryos and subsequent one photon 365 nm illumination for 40 (**A**), 160 (**B**) or 240 s (**C**); (**D**) control (injection of 5 nl 1% DMSO).

Both observations are consistent with our *in vitro* **cRA** uncaging studies. Three types of photochemical reactions associated with different time scales occur upon illumination of a **cRA** solution. First photoisomerization takes place followed by uncaging which yields a mixture of biologically active retinoic acid isomers that are eventually photodegraded. The second photochemical process, uncaging, explains the observation in Figure 4SC: making use of the *in vitro* kinetic study, we estimate the uncaging extent in the experiment to be $\sim 20\%$. Thus we deduce that the initial **cRA** concentration within the embryo before illumination was close to its initial external value (i.e. about $10\ \mu\text{M}$). The third photochemical process, photodegradation of **RA** upon prolonged UV irradiation accounts for the normal development of the embryos upon extended UV illumination. This observation lends

further support to our assertion that **RA** generated by **cRA** uncaging is directly responsible for the **RA**-induced phenotype shown in Figure 4SC.

On the basis of these tests, **cRA** was chosen as a suitable caged retinoic acid for the zebrafish system. It can passively enter the cells of a dechorionated embryo (though not those of a native non-dechorionated one, data not shown) yielding an internal **cRA** concentration close to the external one. It is physiologically stable, non-toxic and biologically inactive. Finally **cRA** uncaging with non-lethal doses of UV radiation releases **RA** *in vivo*. Notice however, that the teratogenic effects induced by **cRA** uncaging require enough but not too many photons to manifest themselves during early embryogenesis.

Experimental Procedures

Teratogenicity assay

Zebrafish embryos were maintained at 28°C. The teratogenicity of the various compounds was assayed by incubating pronase dechorionated zebrafish embryos at the 128-cell stage for 90 min in embryo medium supplemented with 10 μ M of the investigated substrate. After washing with plain embryo medium, the embryos were put in a Petri dish and illuminated for various durations with a 365 nm UV lamp (6 W; Fisher Bioblock) placed on top of the dish. They were checked for developmental abnormalities beyond 30 hours post fertilization (hpf) and compared with those incubated with (or without) known concentrations of **RA**.

***in vivo* RA degradation**

Embryos were injected at 32 cell stage with 5 nl of 0.1 mM **cRA** (final intra-cellular concentration 10 μ M). Embryos were put in a Petri dish and illuminated for various duration with a 365 nm UV lamp (6 W; Fischer Bioblock) placed on top of the dish. They were checked for developmental abnormalities beyond 30 hpf.

The determination of the two-photon uncaging kinetics *in vivo*

General model

We use the following model to analyze the uncaging kinetics by two-photon excitation in zebrafish. Immersion of the embryo in a solution of caged compound \mathbf{cA} (which can be caged coumarin \mathbf{cF} or caged retinoic acid \mathbf{cRA} sharing the same 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl caging group) at concentration $[\mathbf{cA}]_0^{out}$ leads to an initial distribution of \mathbf{cA} which we assume to be uniform throughout the embryo. Neglecting diffusion of substrates and products in and out of the cells within the uncaging timescales, it is possible to consider each cell as a closed system, of volume V . The uncaging reaction is:



where \mathbf{A} and \mathbf{G} are the active molecule and the caging group respectively.

The evolution of concentrations of caged and uncaged compounds \mathbf{cA} and \mathbf{A} , cA and A , obey:

$$\frac{\partial cA(r, t)}{\partial t} = D_{\mathbf{cA}} \frac{\partial^2 cA}{\partial r^2} - k_{unc} \delta(r) cA \quad (8)$$

$$\frac{\partial A(r, t)}{\partial t} = D_{\mathbf{A}} \frac{\partial^2 A}{\partial r^2} + k_{unc} \delta(r) cA \quad (9)$$

where k_{unc} is the rate constant for an uncaging reaction happening in a volume $V_{exc} \ll V$, δ is the Dirac distribution, $D_{\mathbf{cA}}$ and $D_{\mathbf{A}}$ are the diffusion coefficients of \mathbf{cA} and \mathbf{A} . The uncaging rate k_{unc} at the focal spot has been derived by Kiskin et al. [10]:

$$k_{unc} = 0.737 \delta_u \frac{T}{\tau_P} \left(\frac{\lambda}{\pi h c \omega_{xy}^2} \right)^2 P^2 \quad (10)$$

where $\delta_u = 22$ mGM [5] (1 GM = 10^{-50} cm⁴.s/photon) is the uncaging cross section of the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl caging group for two-photon absorption at the excitation wavelength $\lambda = 750$ nm, $T = 13.6$ ns is the period of the laser pulses of incident power P , duration $\tau_P = 200$ fs and waist at the focal point $\omega_{xy} = 0.3$ μ m (measured for a 60 \times objective of NA=1.2).

If (as is the case) the effective uncaging rate $k_2 = k_{unc} V_{exc} / V \sim 1$ s⁻¹ is slow with regards to the diffusion time ($\tau_V \simeq 20$ ms) in the volume V of the cell, the substrates and products are homogenized by diffusion and Eq.(9) reduces to:

$$\frac{\partial cA}{\partial t} = -k_2 cA \quad (11)$$

$$\frac{\partial A}{\partial t} = k_2 cA \quad (12)$$

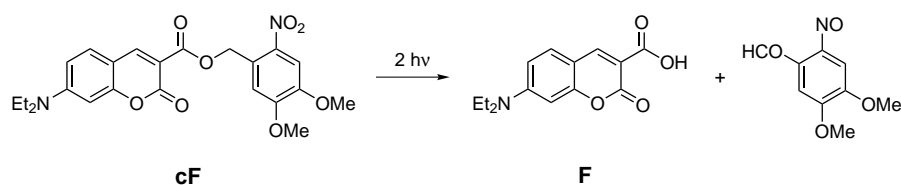
which solution is:

$$A(t) = cA_0 \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad (13)$$

We checked the validity of this analysis by using caged coumarin **cF** as experimental model.

The caged coumarin **cF** used as model for two-photon uncaging kinetic studies.

We designed a favorable caged model for **cRA**: **cF** is a non-fluorescent caged molecule sharing with **cRA** its photolabile protecting group and a similar hydrophobicity/hydrophilicity balance (see Scheme 4S for the structure of **cF**). In contrast to **cRA**, it releases a strongly fluorescent coumarin **F** upon uncaging which makes it the most appropriate for validating our model.



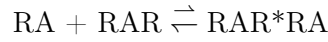
Scheme 4S. Uncaging of the model caged compound **cF** releasing the strongly fluorescent coumarin **F** upon two-photon excitation.

We monitored the increase in fluorescence intensity $\delta I(t)$ arising from the photorelease of the fluorescent substrate **F** in in a single cell of the developing retina of a zebrafish embryo, previously incubated in a **cF** solution. Figure 1B (in Main Text) shows that the intensity rises as predicted (Eq.13). Due to variation in cellular volume, k_2 varies from cell to cell. The average value deduced from fits with Eq.(13) is from data obtained from different cells yields $\langle k_2 \rangle = 0.04 \text{ s}^{-1}$ at an excitation power of 1.8 mW. Measurements of the various relevant parameters (geometry of the focal spot, laser characteristics, etc.) allow us to estimate k_{unc} (Eq. 10) and V_{exc} . Therefore the relaxation

rate k_2 allows us to estimate the volume V of the illuminated cell. Figure 1C (in Main Text) shows the distribution of typical cell size: $P(V^{1/3})$. It has a mean value $\langle V^{1/3} \rangle = 13.5 \pm 6 \mu\text{m}$ (error is standard deviation) which agrees with accepted values for the size of the targeted cells. Altogether, this series of experiments shows that two-photon uncaging obeys Eq. (13) and leads to the release of a caged substrate in a single cell that can be considered as impermeable on the timescale of the experiment (a few minutes).

Derivation of the fraction of RAR which are bound to RA

In a cellular context where the concentration of RAR (~ 10 nM, derived from [11, 12]) is much smaller than the concentration of CRABP ($C_{BP} \sim 1$ μ M, derived from [13, 14, 15]), the concentration of free **RA** ($[RA]_{free}$) is buffered by its binding to CRABP: $[RA]_{free} \sim K_d^{CRABP} C / C_{BP}$. The interaction of **RA** with RAR:



therefore happens at constant concentration of **RA**. Since $K_d^{RAR} = [RAR][RA]_{free} / [RAR*RA]$, the fraction P of bound RAR at equilibrium is:

$$P = \frac{[RAR*RA]}{[RAR]_0} = \frac{1}{1 + K_d^{RAR} / [RA]_{free}} = \frac{C}{C + K_d^{RAR} C_{BP} / K_d^{CRABP}} \quad (14)$$

where C is the released **RA** concentration. $K_d^{RAR} C_{BP} / K_d^{CRABP}$ is noted $C_{1/2}$ in the Main Text.

Our results therefore imply that the probability of retina malformation P_{ret} is equal to the probability P of formation of the active RAR*RA complex.

The number of investigated embryos in the two-photon experiments.

One laser pulse (4.5 mW, 750 nm) - various durations τ (data related to Figure 2E-F; crosses)

pulse duration τ (s)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
0.174	55	13	$24 \pm 6\%$
0.252	45	13	$29 \pm 7\%$
0.39	20	9	$45 \pm 11\%$
0.5	51	24	$47 \pm 7\%$
1	23	14	$61 \pm 10\%$
1.25	14	8	$57 \pm 13\%$

One laser pulse without cRA incubation (4.5 mW, 750 nm) - various durations τ (data related to Figure 2E-F; diamonds)

pulse duration τ (s)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
1	31	0	$0 + 3\%$
1.25	31	0	$0 + 3\%$

Two laser pulses in the same cell with a delay $\Delta\tau$ (data related to Figure 3B; crosses)

delay $\Delta\tau$ (min)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
0	14	8	$57 \pm 13\%$
0.5	21	11	$52 \pm 11\%$
1	37	20	$54 \pm 8\%$
3	16	8	$50 \pm 12\%$
6	23	6	$26 \pm 9\%$
10	17	5	$29 \pm 11\%$
15	16	5	$31 \pm 11\%$

Two laser pulses in separate cells with a delay $\Delta\tau$ (data related to Figure 3B; diamonds)

delay $\Delta\tau$ (min)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
10	29	15	$52 \pm 9\%$
15	36	19	$53 \pm 8\%$

Two laser pulses in the same cell with a delay $\Delta\tau$ after control morpholino injection (data related to Figure 3C; boxes)

delay $\Delta\tau$ (min)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
0	52	29	$56 \pm 7\%$
10	24	9	$38 \pm 10\%$

One laser pulse (4.5 mW, 750 nm)- various duration τ after p38a morpholino injection (data related to Figure 2E-F; circles)

pulse duration τ (s)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
0.25	24	8	$33 \pm 10\%$
0.5	21	9	$43 \pm 11\%$
0.75	21	9	$43 \pm 11\%$
1.25	24	13	$54 \pm 10\%$

Two laser pulses in the same cell with a delay $\Delta\tau$ after p38a morpholino injection (data related to Figure 3C; circles)

delay $\Delta\tau$ (min)	illuminated embryos	embryos with malformations	percentage
10	20	11	$55 \pm 11\%$
15	20	12	$60 \pm 11\%$

Statistical error is calculated using the formula $\sqrt{p(1-p)/N}$ where p is the percentage of embryos with a retina malformation and N the total number of embryos investigated.

References

1. Furuta, T., Wang, S.S., Dantzker, J.L., Dore, T.M., Bybee, W.J., Callaway, E.M., Denk, W., and Tsien, R.Y. (1999). Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1193–2000.
2. Eckardt, T., Hagen, V., Schade, B., Schmidt, R., Schweitzer, C., and Bendig, J. (2002). Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 2. Photocleavage of selected (coumarin-4-yl)methyl-caged adenosine cyclic 3',5'-monophosphates with fluorescence enhancement. *J. Org. Chem.* *67*, 703–710.
3. Shembekar, V.R., Chen, Y., Carpenter, B.K., and Hess, G.P. (2005). A protecting group for carboxylic acids that can be photolyzed by visible light. *Biochemistry* *44*, 7107–7114.
4. Bochet C.G. (2002). Photolabile protecting groups and linkers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 125–142.
5. Aujard, I., Benbrahim, C., Gouget, M., Ruel, O., Baudin, J.-B., Neveu, P., and Jullien, L. (2006). *o*-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chem. Eur. J.* *12*, 6865–6879.
6. Curley Jr, R.W., and Fowble, J.W. (1988). Photoisomerization of retinoic acid and its photo-protection in physiologic-like solutions. *Photochem. Photobiol.* *47*, 831–835.
7. Murayama, A., Suzuki, T., and Matsui, M. (1997). Photoisomerization of retinoic acids in ethanol under room light: a warning for cell biological study of geometrical isomers of retinoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* *43*, 167–176.
8. Bempong, D.K., Honigberg, I.L., and Meltzer, N.M. (1993). Separation of 13-cis and all-trans retinoic acid and their photodegradation products using capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography (MEC). *J. Pharm. Biomed. Anal.* *11*, 829–833.

9. Il'ichev, Y.V., Schwörer, M.A., and Wirz, J. (2004). Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: methyl ethers and caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 4581–4595.
10. Kiskin, N., Chillingworth, R., McCray, J.A., Piston, D., and Ogden, D. (2002). The efficiency of two-photon photolysis of a "caged" fluorophore, o-1-(2-nitrophenyl)ethylpyranine, in relation to photodamage of synaptic terminals. *Eur. Biophys. J.* *30*, 588–604.
11. Leid, M., Kastner, P., Lyons R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., Mader, S. et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* *68*, 377–395.
12. Delon, A., Usson, Y., Derouard, J., Biben, T., and Souchier, C. (2006). Continuous photobleaching in vesicles and living cells: a measure of diffusion and compartmentation. *Biophys. J.* *90*, 2548–62.
13. Maden, M., and Summerbell, D. (1986). Retinoic acid-binding protein in the chick limb bud: identification at developmental stages and binding affinities of various retinoids. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *97*, 239–250.
14. Eichele, G., and Thaller, C. (1987). Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retinoid in the chick limb bud. *J. Cell. Biol.* *105*, 1917–1923.
15. Miyagawa-Tomita, S., Kitamoto, T., Momma, K., Takao, A., and Momoi, T. (1992). Cellular retinoic acid binding protein type II was preferentially localized in medium and posterior parts of the progress zone of the chick limb bud. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *185*, 217–223.

Résumé

Les cellules d'un organisme multicellulaire ajustent constamment la concentration de leur constituants en fonction de leurs interactions avec leurs voisines et l'environnement. Une réponse adaptée est particulièrement importante pendant l'embryogénèse. Au cours de cette thèse, nous avons développé une technique permettant de contrôler des fonctions cellulaires à l'échelle de la cellule unique dans un organisme intact. L'utilisation de molécules cagées et de l'excitation biphotonique a permis de remplir le but visé.

Dans un premier temps, nous exposons les précautions à prendre et les propriétés nécessaires des groupements protecteurs pour l'utilisation d'une telle technique dans un contexte biologique. Dans un deuxième temps, nous nous intéressons à la caractérisation des propriétés d'absorption à deux photons des groupements protecteurs utilisés au cours de ce travail. Enfin, nous présentons une application de la technique à la voie de signalisation acide rétinoïque dans le poisson zèbre. Nous montrons que nous pouvons délivrer une concentration bien définie de molécules dans une seule cellule avec une résolution temporelle de la seconde dans un embryon intact. Grâce à ceci, nous avons pu étudier la dynamique de cette voie de signalisation et mettre en évidence un contrôle négatif rapide qui est cellule autonome et identifier la MAP kinase p38 comme étant nécessaire à ce phénomène.

Nous présentons aussi en annexes la démonstration de principe de l'utilisation de composés cagés pour générer des recombinaisons génomiques chez le poisson zèbre et inhiber une fonction enzymatique (en l'occurrence une activité topoisomérase).

Abstract

Cells in a multicellular organism constantly adjust their components concentrations in response to the interactions with their neighbors and the environment. During embryogenesis, an accurate response is of particular importance. We have developed during this thesis a technique which allows a single cell control of cellular functions in an intact organism. The combined use of caged molecules and two-photon excitation allowed us to fulfill this goal.

We first discuss on the requirements and the protecting groups properties needed to use such a tool in a biological context. Then, we relate on the characterization of the two-photon absorption properties of the protecting groups which have been used throughout this work. Finally, we apply this technique to retinoic acid signaling in zebrafish. We show that we can deliver any well defined concentration of molecules in a single cell with second temporal resolution in an intact embryo. Using that, we can study the dynamics of this signaling pathway and evidence a cell-autonomous fast negative control of it and we identify MAP kinase p38 as being necessary to this phenomenon.

We also show in the appendices the proof of principle of caged compounds use to trigger genomic recombination in zebrafish and to inhibit enzymatic function (topoisomerase activity in this case).