



Ingénierie moléculaire de fluorophores absorbants biphotonique pour des applications biologiques

Hussein Ftouni

► To cite this version:

Hussein Ftouni. Ingénierie moléculaire de fluorophores absorbants biphotonique pour des applications biologiques. Chimie organique. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ051 . tel-00809524

HAL Id: tel-00809524

<https://theses.hal.science/tel-00809524>

Submitted on 9 Apr 2013

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.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée par

Hussein FTOUNI

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Domaine : **Chimie Organique**

INGENIERIE MOLECULAIRE DE FLUOROPHORES ABSORBANTS BIPHOTONIQUE POUR DES APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Soutenue le 13 novembre 2012 devant la commission d'examen :

Pr. Maurice GOELDNER
Pr Claude GROS
Pr. Gilles LEMERCIER
Pr. Jean-François NICOUD
Dr Frédéric BOLZE

Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

A MA CHERE FEMME FATIMA

&

A MA FAMILLE.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué à l'université de Strasbourg, au sein du laboratoire de biophotonique et pharmacologie, dirigé par le professeur Yves Mely, que je remercie pour m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie vivement Pr. Maurice Goeldner, Pr. Gilles Lemerrier et Pr. Claude Gros, pour avoir accepté de juger ce travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, monsieur Jean-François Nicoud pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce travail doctoral. Je voudrais lui exprimer ma profonde reconnaissance pour ses précieux conseils et les innombrables heures qu'il m'a consacrées. La qualité de son encadrement, sa perspicacité et lucidité scientifiques, et son esprit de rigueur ont été primordiaux tout au long de la thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon codirecteur de thèse Frédéric Bolze sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. J'ai beaucoup apprécié l'intérêt avec lequel il a suivi ce travail et ses précieuses contributions tout au long de la thèse. Je salue d'autre part sa passion pour la microscopie, son dynamisme, sa sympathie, son accueil chaleureux et sa constante bonne humeur qui ont rendus le travail plus agréable et ont fait de ces trois années une expérience inoubliable.

Je n'oublie pas les personnes avec lesquelles j'ai collaboré : Dr. Hugues de Rocquigny du laboratoire de biophotonique et pharmacologie, Pr. Pierre Leoni de l'université de Pise en Italie, Dr. Yannick Schwab de l'IGBMC à Illkirch-Graffenstaden et Dr. Jean-Luc Rehspringer de l'IPCMS à Strasbourg. Ce qui me donne aussi l'occasion de remercier le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour le financement de cette thèse.

Je remercie infiniment Ludovic Richert, Youri Arntz, Pascal Didier, Patrick Wehrung et Cyril Antheaume pour leurs aides précieuses.

Merci aussi à tous mes collègues et amis de longue date du laboratoire. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien, en particulier je cite : Zeinab,

Hala, Nedal, Sarwat, Avisek, Noemy, Vanille, Salah, Evgen, Zehra... et les stagiaires qui ont contribué à ce travail : Doria Abed, Tony Barbier et Esat Oney

Je tiens aussi à remercier Ali Hayek, l'ancien thésard que je n'ai malheureusement pas pu rencontrer mais dont le travail m'a beaucoup inspiré.

Je souhaite également remercier mes amis, en particulier Hussein Saleh, Mohammad Mahdi, Anji Elzein et Nada Krayem pour leurs encouragements et leur soutien permanent lors de ces années de thèse, sans oublier bien sûr Rammal, Kalout, Moety, Yassine, Berjawi, Nadine, Hakam, Didier, Rabih, Elias, Nader, Wassim et tous ceux que j'oublie ici...

Je ne terminerai pas mes remerciements sans avoir une pensée sympathique à mes meilleurs amis Hussein Idriss et Mohammad Younes avec qui j'ai partagé les moments agréables ainsi que les moments difficiles en France.

J'en profite aussi pour remercier mes beaux-parents (Trad et Dibeh), mon beau-frère Hussein et ma belle-sœur Hoda pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Enfin Je remercie ma très chère femme Fatima, qui m'a accordé le support moral et qui m'a supporté tout particulièrement pendant ces quelques derniers mois et je remercie mes parents (Ghassan et Najoi), ma sœur Najat et mes frères (Amer et Ali), sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail dans de bonnes conditions, et je leur dédie ce travail.

MERCI ENCORE À TOUS ...

LISTE DES ABBREVIATIONS

TECHNIQUES

CCM	Chromatographie sur Couche Mince
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
ppm	Parties par million
Rdt.	Rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SMHR	Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
s, d, dd, t, q, m	Singulet, doublet, doublet dédoublé, triplet quadruplet, multiplet
t_a	Température ambiante

COMPOSES CHIMIQUES

BOC	<i>t</i> -ButOxyCarbonyl
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPP	1,4-dicéto-3,6-biphénylpyrrolo[3,4,c]pyrrole
FMOC	9-FluorenylMethylOxyCarbonyl
NMP	N-méthylpyrrolidone
OEG	Oligo Ethylène Glycol
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyl
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
ToP	Tri(<i>o</i> -tolyl)phosphine

OPTIQUE

A	Absorbance
ADP	Absorption à deux photons
CIS	Croisement inter-système
E	Energie
F	Fluorescence
IR	Infrarouge
MDP	Microscopie de fluorescence excitée à deux photons
NIR	Proche infrarouge
NR	Non-radiative
OL	Optique Linéaire
ONL	Optique Non-Linéaire
P_{laser}	Puissance laser

Ps	Phosphorescence
UV	Ultraviolet
u. a.	Unité arbitraire

BIOLOGIE

AA	Acide aminé
β -ALA	Bêta-alanine
FLIM	Imagerie de microscopie par durée de vie de fluorescence
GABA	Acide γ -aminobutyrique
Glu	Glutamate
HeLa	Cellules humaines de fibroblastes du col utérin
HIV	Human immunodeficiency virus
IRM	Imagerie par résonance magnétique
TAT	Trans-Activator of Transcription

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I

L'ABSORPTION A DEUX PHOTONS : PRINCIPES ET APPLICATIONS

I.1. L'absorption à deux photons	7
I.1.1 Introduction à l'optique non linéaire	7
I.1.2. Théorie de l'absorption à deux photons	8
I.1.3. Mesure de la section efficace d'ADP	10
I.2. Applications de l'absorption à deux photons	13
I.2.1. Stockage optique tridimensionnel de données.....	14
I.2.2. Microfabrication 3D	15
I.2.3. La limitation optique	16
I.2.4. La thérapie photodynamique à deux photons (TPD 2P).....	17
I.2.5. Photoactivation à deux photons	18
I.3. La microscopie de fluorescence induite par excitation à deux photons	20
I.3.1. Vision historique.....	20
I.3.2. Avantages de la MDP par rapport à la microscopie confocale.....	23
I.3.3. Le microscope de fluorescence par excitation biphotonique.....	25
I.3.4. Optimisation pour l'imagerie en profondeur dans les tissus vivants.....	27
I.3.5. Marqueurs fluorescents pour la MDP	30
I.4. Ingénierie moléculaire de fluorophores absorbant biphotoniques.....	31
I.4.1. Choix des groupes terminaux	34
I.4.2. Le cœur central et la longueur du système π conjugué.....	36
Références	40

CHAPITRE II

NOUVEAUX FLUOROPHORES POUR LA MICROSCOPIE

BI-PHOTONIQUE BASES SUR

UN CŒUR DICETOPYRROLOPYRROLE

II.1. Ingénierie moléculaire de nouveaux chromophores absorbants biphotoniques...	47
II.1.1. Le cœur dicétopyrrolopyrrole (DPP).....	48
II.1.2. Systèmes périphériques électroactifs et systèmes conjugués	50
II.2. Synthèses et caractérisations physicochimiques	52
II.2.1. DPPs avec un système conjugué basé sur un phényle	52
II.2.2. DPP contenant un système conjugué basé sur un motif biphényle	54
II.2.3. DPPs contenant un système conjugué basé sur un motif stilbène.....	56
II.2.4. DPPs contenant un système conjugué basé sur un motif tolane	60
II.2.5. Conclusion.....	63
II.3. Propriétés photophysiques.....	64
II.3.1. Généralités.....	64
II.3.2. Propriétés photophysiques des dérivés de la pyridine.....	68
II.3.3. Propriétés photophysiques des dérivés de l'anisole	74
II.3.3. Propriétés photophysiques des dérivés de l'aniline.....	82
II.4. Imageries cellulaire	84
II.4.1. Cellules HeLa	84
II.4.2. Imagerie cellulaire des dérivés de la pyridine.....	85
II.4.3. Imagerie cellulaire des dérivés de l'anisole	89
II.4.4. Imagerie cellulaire des dérivés de l'aniline.....	91
II.5. Conclusion	92
Références	93

CHAPITRE III

NOUVEAUX CHROMOPHORES FONCTIONNALISES AMINO-REACTIFS

III.1. Généralités	97
III.2. Synthèse des dérivés DPP fonctionnalisés.....	97
III.2.1. Synthèse des fluorophores de type I	98
III.2.1. Synthèse de systèmes bio-conjuguables de type II	100
III.3. Propriétés photophysiques	102
III.3.1 Propriétés photophysiques à un photon	102
III.3.2 Propriétés photophysiques à deux photons	103
III.4. Marquage de la protéine activatrice de transcription du VIH-1 (TAT).....	104
III.4.1. Généralités	104
III.4.2. La bioconjugaison avec TAT	105
III.4.3. Propriétés photophysiques et imageries cellulaires	106
III.5. Conclusion	110
Références	111

CHAPITRE IV

NOUVELLES SONDES MULTIMODALES POUR L'IMAGERIE CORRELATIVE

IV.1. Introduction	115
IV.1.3. L'imagerie corrélative	115
IV.1.1. La microscopie électronique.....	116
IV.1.2. Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)	118
IV.2. Synthèse de sondes multimodales	120
IV.2.1. Dérivés de DPP liés à une nanoparticule d'oxyde de fer biocompatible.....	120
IV.2.2. Dérivé d'un cluster de platine.....	126
IV.2.3. Dérivé de DPP contenant de l'or	131
IV.2.4. Dérivés de DPP lié à un cyclène.....	134
IV.4. Imageries cellulaires.....	137

IV.4.1. Dérivés de DPP liés à une nanoparticule d'oxyde de Fer.....	137
IV.4.2. Dérivé d'un cluster de platine.....	139
IV.3.3. Dérivé de DPP contenant de l'or	141
IV.4. Conclusion.....	142
Références	143
 CHAPITRE V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
Conclusion	147
Perspectives	150
 PARTIE EXPERIMENTALE.....	 151
 ANNEXE	 191

INTRODUCTION GENERALE

La fluorescence induite par excitation à deux photons, phénomène relevant de l'optique non-linéaire, connaît de nos jours un développement de plus en plus marqué en imagerie biologique. Lors de l'excitation à deux photons, un fluorophore, au lieu d'absorber un seul photon d'énergie $h\nu$ pour atteindre un état excité, il absorbe quasi simultanément deux photons d'énergie $h\nu/2$. Une telle excitation nécessite une intensité lumineuse extrêmement forte, et l'utilisation d'un laser pulsé et focalisé est nécessaire. Cette technique permet d'induire une résolution tridimensionnelle intrinsèque car la forte intensité lumineuse indispensable pour induire ce phénomène non-linéaire ne se trouvera qu'au point focal du système optique utilisé (environ $1\ \mu\text{m}^3$). La diminution de l'énergie des photons utilisés pour une telle excitation ($h\nu/2$ au lieu de $h\nu$, ce qui correspond pour les fluorophores classiques à une lumière infrarouge au lieu de lumière UV) permet de réduire le photoblanchiment des fluorophores, mais aussi la photo-toxicité vis à vis des tissus biologiques. D'autre part, les longueurs d'ondes utilisées dans le proche infrarouge sont peu diffusées et absorbées en milieu biologique, ce qui permet une observation en profondeur. C'est grâce à ces nombreux avantages que la microscopie par excitation à deux photons s'est développée très rapidement ces dernières années, et la plupart des plateformes de microscopie proposent maintenant cette technique d'excitation sur leurs microscopes. Cependant, la faible sensibilité des fluorophores classiquement utilisés en microscopie confocale depuis de nombreuses années rend nécessaire la conception de nouveaux fluorophores spécifiques pour l'absorption à deux photons (ADP). Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a ainsi porté sur l'ingénierie moléculaire de nouveaux fluorophores spécifiquement conçus pour la microscopie par excitation biphotonique. Nous nous sommes particulièrement intéressés à des systèmes unidimensionnels (1D) de petite taille comportant des systèmes π étendus autour d'un cœur rigide et entourés par différents systèmes électro-actifs.

Le présent manuscrit est organisé en six chapitres. Le premier chapitre décrit les bases physiques de l'absorption à deux photons et quelques exemples d'applications en mettant l'accent sur la microscopie à deux photons, application qui nous a particulièrement intéressée. Les marqueurs fluorescents utilisés pour la microscopie à deux photons et l'ingénierie moléculaire de ces fluorophores sont ensuite exposés.

Dans le second chapitre, nous décrivons l'utilisation du système dicétopyrrolopyrrole ou DPP en tant que cœur rigide pour l'élaboration de nouveaux fluorophores émettant dans le rouge. Celui-ci est en effet connu depuis de nombreuses années dans l'industrie des pigments pour sa stabilité, sa couleur rouge prononcée, mais aussi pour son insolubilité, qui est un avantage

pour un pigment, mais qui s'avère être un problème pour une utilisation en microscopie où les colorants doivent être solubles dans l'eau. Nous abordons tout d'abord la mise au point une méthode de solubilisation du cœur DPP qui utilise des chaînes oligoéthylèneglycol pour induire la solubilité dans l'eau. Ensuite, nous décrivons la synthèse et la caractérisation de nouveaux fluorophores basés sur ce cœur DPP aquo-soluble relié à des systèmes organiques électro-actifs par différents liens conjugués. Nous avons utilisé différents systèmes électroactifs comme l'anisole, la pyridine, l'aniline... Afin de moduler finement les propriétés photophysiques de ces fluorophores, le lien conjugué a été lui aussi modifié et des doubles liaisons, des triples liaisons ou encore des noyaux aromatiques ont été utilisés. Après avoir décrit la préparation de ces composés, nous exposerons l'étude de leurs propriétés photophysiques à un et deux photons. Enfin, nous présenterons les expériences que nous avons réalisées en microscopie de fluorescence, à la fois confocale et à deux photons.

Dans le troisième chapitre nous décrivons la modification des fluorophores précédents de manière à pouvoir les conjuguer à des molécules d'intérêt biologique, comme des protéines. Pour ce faire, nous avons introduit une fonction acide en différentes positions, fonction qui pourra par la suite donner lieu à la formation d'une liaison peptidique. Ces fluorophores bio-conjugables ont été greffés sur un peptide du virus HIV étudié au laboratoire : le peptide TAT (Trans-Activator of Transcription), préparé par synthèse peptidique en phase solide. L'imagerie par microscopie biphotonique sur des cellules HeLa sera présentée.

Dans le quatrième chapitre, nous décrivons la mise au point de nouvelles sondes multimodales pour la microscopie corrélative biphotonique/électronique et pour l'imagerie corrélative imagerie par résonance magnétique (IRM)/microscopie de fluorescence. Ces techniques, en cours de développement, reposent sur l'observation d'un même objet à deux échelles différentes, dans notre cas à l'échelle cellulaire par microscopie de fluorescence par excitation bi-photonique et subcellulaire par microscopie électronique ou à l'échelle tissulaire par l'IRM. Les sondes utilisées devront donc présenter simultanément différentes propriétés, comme une fluorescence détectable par microscopie optique et une densité élevée aux électrons induisant un contraste en microscopie électronique ou un paramagnétisme détectable en IRM. Plusieurs séries de sondes multimodales sont présentées. Elles seront ensuite étudiées *in cellulo* par microscopie par excitation biphotonique puis par microscopie électronique en transmission et à balayage.

La conclusion générale et les perspectives sont exposées dans le cinquième et dernier chapitre.

CHAPITRE I

L'ABSORPTION A DEUX PHOTONS :

PRINCIPES ET APPLICATIONS

I.1. L'ABSORPTION A DEUX PHOTONS

I.1.1 Introduction à l'optique non linéaire ^[1]

L'interaction entre la lumière et la matière peut être exprimée à l'échelle macroscopique par un développement de la polarisation P_i au sein de la matière en fonction des puissances croissantes du champ électrique E porté par la lumière excitatrice, P_0 étant la polarisation permanente du matériau considéré et $\chi^{(i)}$ les susceptibilités électriques d'ordre i (Equation 1) :

$$P_i = P_0 + \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots \quad \text{Equation 1}$$

Pour une description moléculaire de cette interaction lumière-matière, qui nous intéressera plus particulièrement dans ce travail, une expression analogue à celle de la polarisation d'un matériau peut être écrite pour le moment dipolaire d'une molécule (Equation 2) :

$$\mu_i = \mu_0 + \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots \quad \text{Equation 2}$$

Où μ_0 est le moment dipolaire permanent de la molécule considérée, α sa polarisabilité, β son hyperpolarisabilité quadratique et γ son hyperpolarisabilité cubique.

Les termes d'ordre 0 et 1 de ces équations rendent compte des propriétés optiques classiques de la matière : on parle d'optique linéaire lorsque la fréquence de l'onde sortante reste égale à celle de l'onde incidente. Les effets alors observés sont la réfraction des ondes et la biréfringence. Les termes d'ordre 2 et plus quant à eux représentent un comportement non linéaire, on parle alors d'optique non linéaire (ONL). On peut ainsi définir l'ONL comme l'étude des phénomènes optiques pour lesquels une molécule, ou un matériau, présente une réponse qui n'est pas proportionnelle au champ électrique de l'onde électromagnétique qui induit cette réponse. La première démonstration expérimentale d'un processus d'ONL a été réalisée en 1961 par Franken *et al.* ^[2] lorsqu'ils ont mis en évidence la génération de second harmonique par un cristal de quartz.

Si le champ électrique E est faible, comme c'est le cas pour la plupart des sources lumineuses classiques à l'exception des lasers, les termes d'ordre supérieur à 1 sont négligeables et la réponse est donc linéaire (Equations 3 et 4) :

$$P_i = P_0 + \chi^{(1)}E \quad \text{Equation 3}$$

$$\mu_i = \mu_0 + \alpha E \quad \text{Equation 4}$$

Les propriétés optiques linéaires sont donc liées à la susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$ au niveau macroscopique et à la polarisabilité α au niveau microscopique. Dans le cas de sources lumineuses beaucoup plus intenses, les termes d'ordre supérieur à 1 ne sont plus négligeables, et l'on peut observer l'apparition de nouveaux phénomènes relevant de l'ONL. Les termes de second ordre β et $\chi^{(2)}$ sont à l'origine de phénomènes d'ONL dit du second ordre (ou quadratiques), dont le plus connu est la génération de second harmonique. Il est intéressant de noter à ce stade que cette dépendance quadratique vis à vis du champ électrique impose des conditions de symétrie bien particulières : seul des systèmes ne présentant pas de centre de symétrie (tant au niveau moléculaire que macroscopique) peuvent présenter de telles propriétés. L'absorption à deux photons (ADP) est le phénomène qui nous plus particulièrement intéressé lors de notre travail. La théorie montre que ce phénomène est lié à γ ou à $\chi^{(3)}$ et découle donc d'un processus d'ONL du troisième ordre.

1.1.2. Théorie de l'absorption à deux photons

L'absorption à deux photon (ADP) est définie comme l'excitation d'une molécule induite par l'absorption quasi-simultanée d'une paire de photons d'énergies identiques ou différentes^[3]. Ce phénomène a d'abord été prédit théoriquement par Maria Göppert-Mayer en 1931^[4] (Figure 1) qui a calculé la probabilité d'une transition d'un état fondamental à un état excité par ADP.



Figure 1 : *Maria Göppert-Mayer a introduit la théorie de l'absorption à deux photons dans les années 1930, à la fin de son doctorat. Elle a reçu le prix Nobel de Physique en 1963 pour d'autres travaux théoriques sur la structure des noyaux atomiques.*

La mise en évidence expérimentale de l'ADP n'a été possible que 30 ans plus tard grâce au développement des lasers comme nouvelles sources lumineuses extrêmement intenses dans les laboratoires. Kaiser et Garret^[3] ont en effet décrit en 1961 la luminescence d'un cristal de CaF_2 dopé par des ions Eu^{2+} induite par excitation à deux photons à partir d'un laser à rubis.

L'ADP est donc un processus durant lequel, pour rejoindre un état excité, une molécule absorbe quasi simultanément 2 photons d'énergie $h\nu'$ au lieu d'absorber un seul photon

d'énergie $h\nu$ comme dans le cas de l'absorption monophotonique (*Figure 2*). Les deux photons absorbés peuvent soit présenter une énergie identique (dans ce cas $h\nu' = h\nu/2$) soit différente ($h\nu' = h\nu_1 + h\nu_2$). En ce qui nous concerne dans notre travail, nous n'avons étudié que l'absorption de deux photons de même énergie.

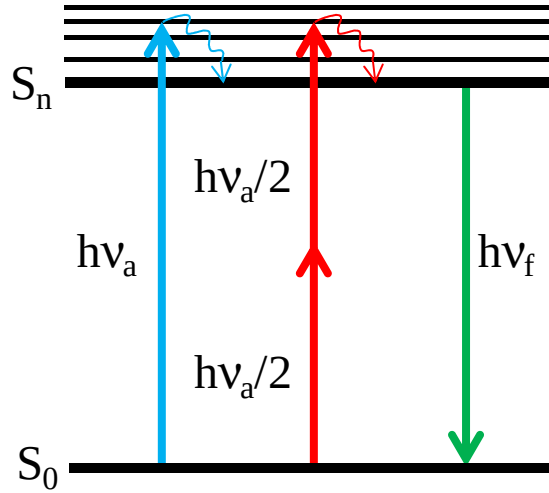


Figure 2 : Schéma décrivant la *fluorescence* après une absorption à *un* et à *deux* photons.

Cette absorption à deux photons n'est en fait qu'un cas particulier d'absorption multiphotonique où 3, 4... photons peuvent être absorbés simultanément. La probabilité d'observer une absorption multiphotonique peut être exprimée en fonction de l'intensité lumineuse I de la lumière excitatrice (*Equation 5*).

$$P = \frac{1}{n} \sigma_n I^n \quad \text{Equation 5}$$

Où P est la probabilité de la transition par l'excitation multiphotonique, n le nombre de photons absorbés, et σ_n est la section efficace d'absorption à n photons. Dans le cas de l'ADP ($n = 2$) qui nous intéresse, on peut noter une dépendance quadratique entre P et I comme le montre l'*Equation 6*, bien qu'il s'agisse d'un phénomène d'ONL du troisième ordre.

$$P = \frac{1}{2} \sigma_2 I^2 \quad \text{Equation 6}$$

Où σ_2 est la section efficace d'absorption à deux photons exprimée le plus souvent en GM ($1\text{GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$) pour rendre hommage à Maria Göppert-Mayer qui a prédit cette propriété en 1930. Selon la théorie de l'ADP, la section efficace d'absorption à deux photons est directement proportionnelle à la partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité γ mentionnée

plus haut, et qui est décrite par une expression complexe en mathématique ^[1]. C'est la propriété la plus utilisée pour caractériser l'efficacité d'une absorption biphotonique.

1.1.3. Mesure de la section efficace d'ADP

Une connaissance précise de la variation de la section efficace d'ADP en fonction de la longueur d'onde est indispensable pour déterminer l'efficacité de l'ADP et comparer différentes molécules entre elles ^[5]. Ces valeurs permettront d'orienter l'ingénierie moléculaire que nous réaliserons afin d'obtenir des molécules présentant de fortes sections efficaces d'ADP. Plusieurs techniques ont été mises au point pour déterminer la section efficace d'ADP ^[6], mais les deux méthodes les plus utilisées sont la méthode de Z-Scan ^[7] et la méthode de la fluorescence induite par excitation à deux photons ^[6].

La méthode Z-Scan

La méthode Z-Scan consiste à déplacer un échantillon tout au long du trajet d'un faisceau laser focalisé et de mesurer l'intensité lumineuse transmise au niveau du détecteur en fonction de la position de l'échantillon sur l'axe z ^[7] (Figure 3).

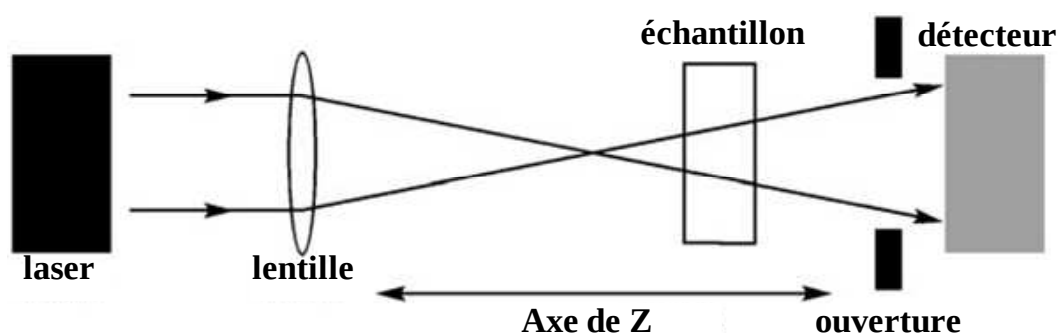


Figure 3 : Schéma du Montage expérimental utilisé dans la méthode Z-scan ^[8].

La transmittance normalisée $T(Z)$ peut être exprimée en fonction de la position en Z (Figure 4) selon l'Equation 7 ^[9]:

$$T(z) = 1 - \frac{\beta I_0 (1 - e^{-\alpha L})}{2^{\frac{3}{2}} \alpha (1 + \frac{z^2}{z_0^2})} \quad \text{Équation 7}$$

Où L est l'épaisseur de l'échantillon, z_0 est la longueur de Rayleigh, z est la position de l'échantillon par rapport au plan focal, I_0 est l'intensité incidente du pulse laser, α le coefficient d'absorption linéaire et β est le coefficient non linéaire (attention, ce β est

différent de l'hyperpolarisabilité du premier ordre notée elle aussi β). A chaque position z , T est mesuré et en connaissant les autres paramètres, β peut être calculé par régression non linéaire.

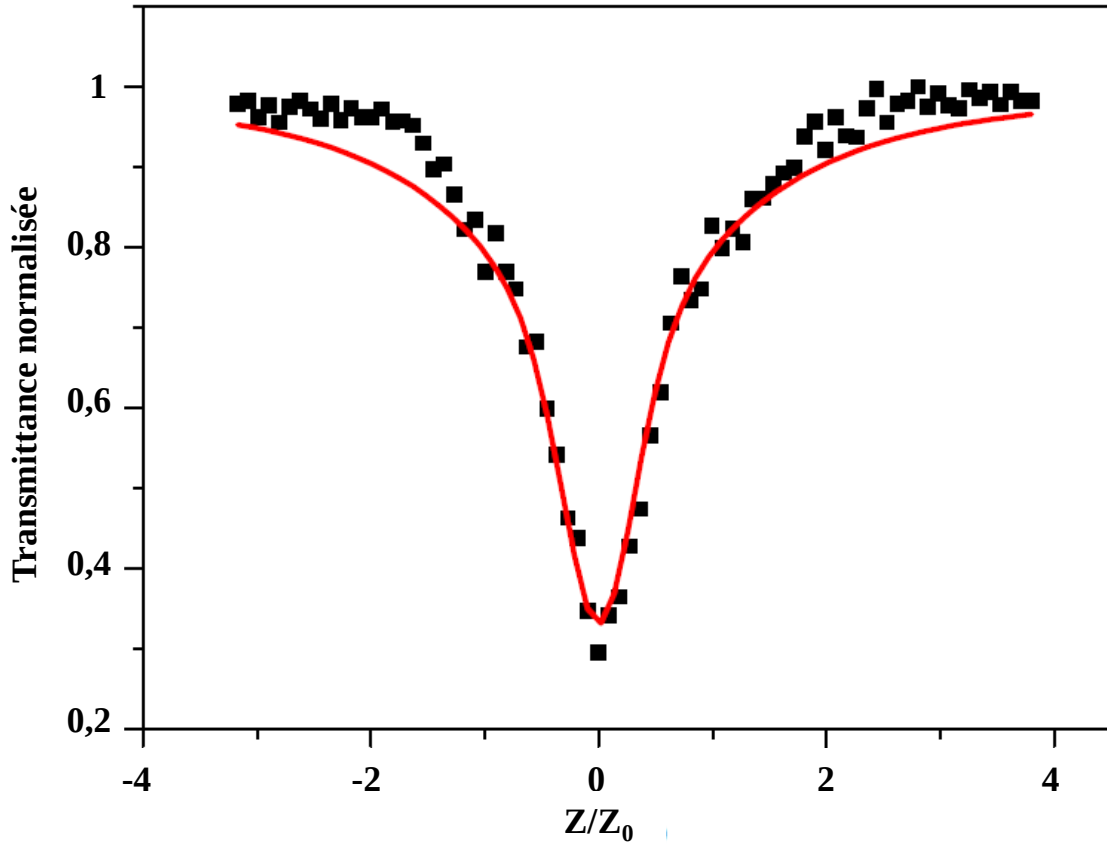


Figure 4 : Courbe de transmittance obtenue en utilisant la méthode Z-scan (en noir les points expérimentaux et en rouge la courbe modélisée) ^[10]

Une fois β déterminé, la section efficace d'ADP σ_2 peut être calculée grâce à l'Equation 8 :

$$\sigma_2 = \frac{\beta h \nu \times 10^3}{Nc} \quad \text{Equation 8}$$

Où $h \nu$ est l'énergie des photons utilisés, N est le nombre d'Avogadro et c la concentration du chromophore dans le solvant utilisé.

En plus du pur phénomène d'absorption à deux photons, deux autres effets peuvent perturber les mesures des sections efficaces d'ADP par la méthode Z-scan ^[7, 11]

- Une perte de signal due à une auto-défocalisation du laser (si l'ouverture du détecteur est trop étroite ou trop éloignée de l'échantillon) ou à une diffusion non linéaire de la lumière.

- Une accumulation des molécules dans l'état excité (par absorption d'un ou de deux photons) peut aussi conduire à une transmission non linéaire faussée à cause d'une nouvelle absorption directement à partir l'état excité (AEE). La contribution de l'AEE peut être réduite par l'utilisation de longueurs d'onde où l'absorption monophotonique est négligeable ou en utilisant des impulsions laser très courtes (<1 ps), et de faibles taux de répétition de façon à limiter la contribution de l'AEE.

L'avantage majeur de cette technique est la possibilité de déterminer les σ_2 d'espèces à l'état solide ou liquide ^[7] même si elles ne sont pas luminescentes. Cependant, les deux problèmes mentionnés ci-dessus étant difficiles à éviter cela conduit généralement à une surévaluation de la section efficace d'ADP ^[11]. De nouvelles méthodes de traitement des données de Z-scan sont en cours de développement et permettent de limiter cette surestimation.

La méthode de fluorescence par excitation à deux photons

La méthode de fluorescence par excitation à deux photons a été décrite pour la première fois par Xu and Webb en 1996 ^[6]. Ces deux auteurs ont déterminé les sections efficaces d'ADP de plusieurs fluorophores utilisés en spectroscopie de fluorescence à un photon. Cette technique a ensuite été optimisée par Drobizhev *et al.* ^[12] en 2005 puis en 2008 et son équipe a déterminé les sections efficaces d'ADP d'une large gamme de colorants commerciaux à de nombreuses longueurs d'onde ^[13]. La fluorescence par excitation à deux photons est une méthode de choix pour déterminer σ_2 , à condition que la molécule soit fluorescente et que son rendement quantique de fluorescence (Φ) soit connu. L'intensité de fluorescence fournit des informations directes sur l'efficacité d'ADP, bien que la mesure directe de σ_2 soit généralement difficile car seule une petite fraction des photons est absorbée dans le processus à deux photons. La détermination précise de σ_2 est toujours entravée par la forte dépendance de l'intensité de fluorescence vis à vis de plusieurs paramètres tels que la puissance du laser, la durée d'impulsion, la distribution temporelle d'intensité, l'efficacité du détecteur, de la longueur d'onde... Cependant, en utilisant un composé de référence qui présente un spectre d'ADP bien caractérisé et un Φ connu, on peut alors déterminer le σ_2 d'une molécule en comparant son intensité de fluorescence par excitation à deux photons à celle de la référence, un peu comme on le fait pour la détermination des rendements quantiques de fluorescence en spectroscopie à un photon. Les intensités de fluorescence de la molécule à étudier et d'une référence sont mesurées et σ_2 peut être calculée en utilisant l'Equation 9.

$$\sigma_{2mes} = \frac{\phi_{ref} C_{ref} \sigma_{2ref} n_{ref} \langle F \rangle_{mes}}{\phi_{mes} C_{mes} n_{mes} \langle F \rangle_{ref}} \quad \text{Equation 9}$$

Où C est la concentration des solutions à étudier, n est l'indice de réfraction du solvant utilisé et $\langle F \rangle$ est la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence. Les indices ref et mes des différents paramètres correspondent à la référence et au fluorophore étudié respectivement.

Il existe deux principales limites à cette technique : 1) elle ne peut pas être appliquée dans des régions spectrales où l'absorption à un photon est présente, mais ce problème est général pour toutes les techniques de mesures fiables de σ_2 . 2) l'échantillon doit être fluorescent.

Dans la pratique, il faut être très attentif à la méthode utilisée pour la détermination des σ_2 . En effet, la plus grande partie des résultats obtenus par la méthode Z-scan semblent être surestimés par rapport aux valeurs déterminées par la méthode de fluorescence, et l'on observe souvent des facteurs 10 à 100 entre les deux valeurs. Dans notre cas, les valeurs obtenues par la méthode de fluorescence se rapprochent plus de l'utilisation future de ces fluorophores en microscopie de fluorescence.

I.2. APPLICATIONS DE L'ABSORPTION A DEUX PHOTONS

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la probabilité d'absorber simultanément deux photons dépend quadratiquement de l'intensité du laser. Ce phénomène ne peut donc s'observer que là où l'intensité lumineuse est maximale. Les dispositifs expérimentaux actuels utilisent des sources laser pulsées et focalisées pour induire une absorption bi-photonique. Ceci permet d'une part une concentration temporelle des photons (avec un laser de faible puissance moyenne, on peut bénéficier de pulses où l'intensité maximale est extrêmement importante, de l'ordre de 100000 fois plus importante, sur une durée très brève, de l'ordre la fs) et d'autre part une concentration spatiale de ces derniers (les photons qui occupaient le diamètre du faisceau laser se retrouvent focalisés dans une section de l'ordre du μm^2). Ceci permet une excitation biphotonique confinée dans une région de l'espace très réduite, typiquement au point focal du système optique utilisé pour focaliser le laser (de l'ordre du μm^3) [7].

Cette résolution spatiale intrinsèque engendrée par la nature non linéaire de l'ADP a trouvé rapidement de nombreuses applications dans différents domaines, de la physique à la biologie en passant par les sciences des matériaux. Citons par exemple le stockage optique de données,

la microfabrication 3D, la limitation optique, la thérapie photodynamique à deux photons, la photoactivation bi-photonique ou encore l'imagerie de systèmes biologiques par fluorescence à deux photons.

1.2.1. Stockage optique tridimensionnel de données

Les dispositifs optiques actuels de stockage de données, comme les CD et DVD, utilisent des processus optiques à un photon pour écrire et lire des informations sur une surface bidimensionnelle. La localisation spatiale très précise de l'excitation à deux photons permet de stocker les données en trois dimensions, menant ainsi à une augmentation énorme de la densité de données (Figure 5) ^[14].

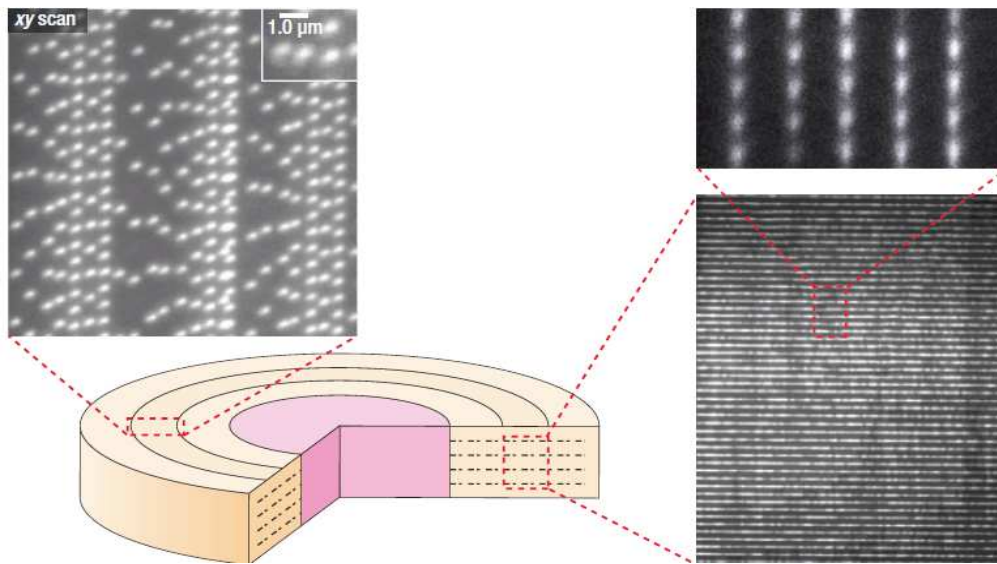


Figure 5 : Disque de stockage à deux photons ^[15]

Ces dernières années, l'utilisation de l'ADP pour le stockage optique de données a fait des progrès significatifs. Les chercheurs de la société Call/Recall ont réussi à stocker l'équivalent de 200 DVD dans un disque d'1 mm d'épaisseur et de 120 mm de diamètre ^[15]. Ceci donne une densité totale de 1 Tbyte par disque. Les matériaux utilisés pour le stockage optique 3D doivent répondre à plusieurs critères : avoir de fortes sections efficaces d'ADP, des rendements quantiques de fluorescence élevés, et bien sûr être stables thermiquement et photophysiquement ^[15]. Avant qu'un tel disque ne soit commercialisé, il y reste quelques défis à surmonter. Par exemple, cette technologie a besoin de systèmes de lentilles avec des grandes ouvertures numériques et peu coûteux, de diodes laser impulsionnelles courtes très puissantes et de médias d'enregistrement plus sensibles.

I.2.2. Microfabrication 3D

Récemment la photopolymérisation induite par absorption à deux photons a été très étudiée à cause de son importance dans la fabrication de micro-objets pour les nanotechnologies, les technologies de l'information...^[16]. Grâce à ce processus, il est possible de produire des structures 3D complexes avec une résolution spatiale très importante (120 nm). Une résine, qui contient principalement un monomère à base d'acrylate de méthyle et un photoinitiateur (PI), est soumise à un balayage dont le trajet est contrôlé par ordinateur. Ce balayage induit l'initiation d'une réaction de polymérisation et la formation d'une résine solide. Pour obtenir une polymérisation efficace et des structures de grande qualité, une forte section efficace d'ADP du PI est nécessaire^[17]. Des structures 3D complexes et de très petite taille (< 100 μm) ont été fabriquées par Zhiquan Li *et al.* (Figure 6) en utilisant 3,6-B3FL comme photoinitiateur (Figure 6d). Ces objets démontrent la grande précision spatiale obtenue avec cette technique^[18].

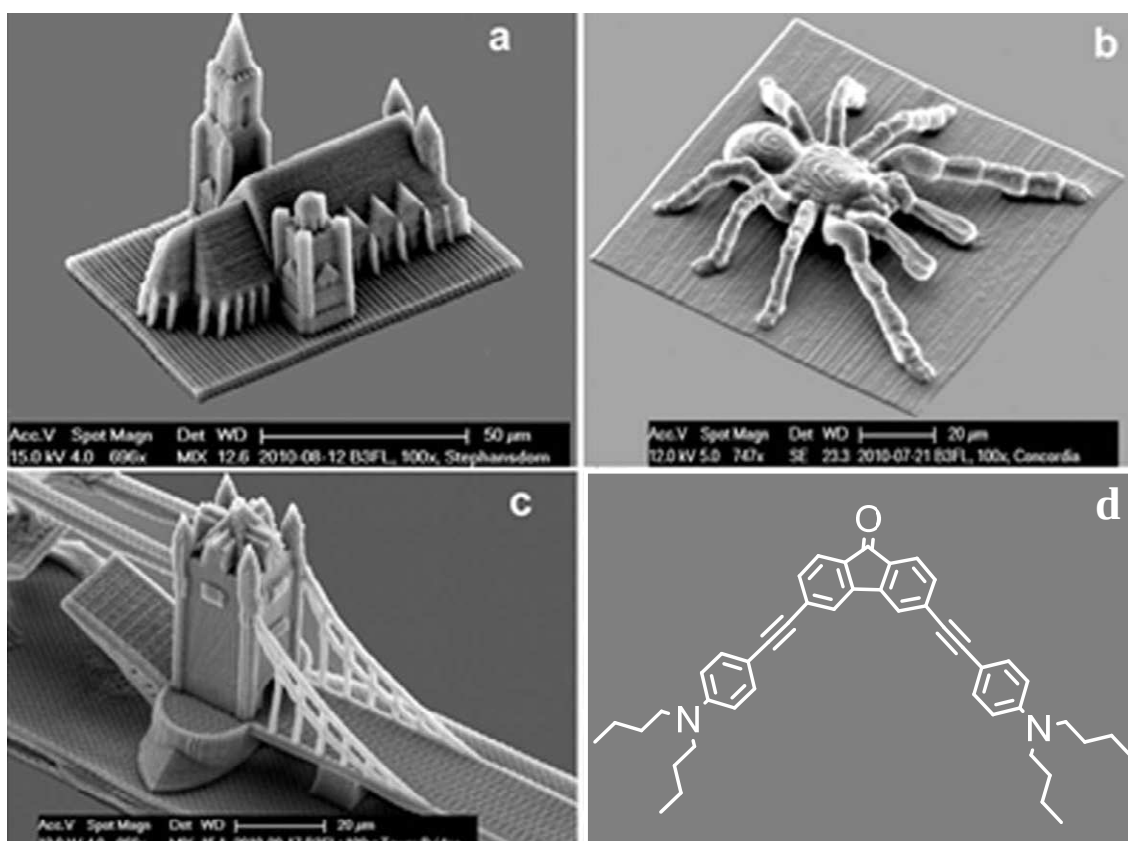


Figure 6 : Structures 3D (résine ETA/TTA 1:1, B3FL comme initiateur): (a) Cathédrale de St. Stephen; (b) L'araignée *Theraphosidae*; (c) Détaill du pont de la tour de Londres; (d) Structure moléculaire d'un nouveau photoinitiateur (3,6-B3FL) efficace à deux photons.^[18]

I.2.3. La limitation optique

Le développement rapide des différentes technologies laser a conduit à des systèmes extrêmement puissants et couvrants une large gamme de longueurs d'ondes. En effet, de nombreux lasers sont présents dans notre vie quotidienne, comme dans les lecteurs et graveurs de DVD, dans les pointeurs laser, dans les applications domotiques... ainsi que dans différents autres domaines comme la médecine, l'armement...

Cette présence accrue des lasers induit un véritable danger, notamment pour l'œil humain, mais aussi pour les capteurs électroniques. Il est donc nécessaire de pouvoir les protéger en utilisant un système qui serait capable de laisser passer la lumière ambiante et permettre une vision correcte, mais qui pourrait bloquer un rayonnement laser pouvant endommager ou aveugler un capteur ou un œil. Un tel système est appelé limiteur optique. Il repose sur un matériau qui présente une absorption dépendante de l'intensité de la lumière incidente, et doit être transparent à faible intensité, mais opaque avec une lumière intense, il s'agit typiquement d'un comportement non linéaire ^[19]. La Figure 7 montre la réponse en limitation optique du dérivé stilbénique BDBAS soumis à des impulsions de 5 ns à 600 nm ^[20]. A basse énergie incidente, 95% de la lumière est transmise ($T = 0,95$), mais quand l'énergie incidente augmente, l'énergie transmise reste au-dessous de 20 μJ et la plupart de la lumière est absorbée.

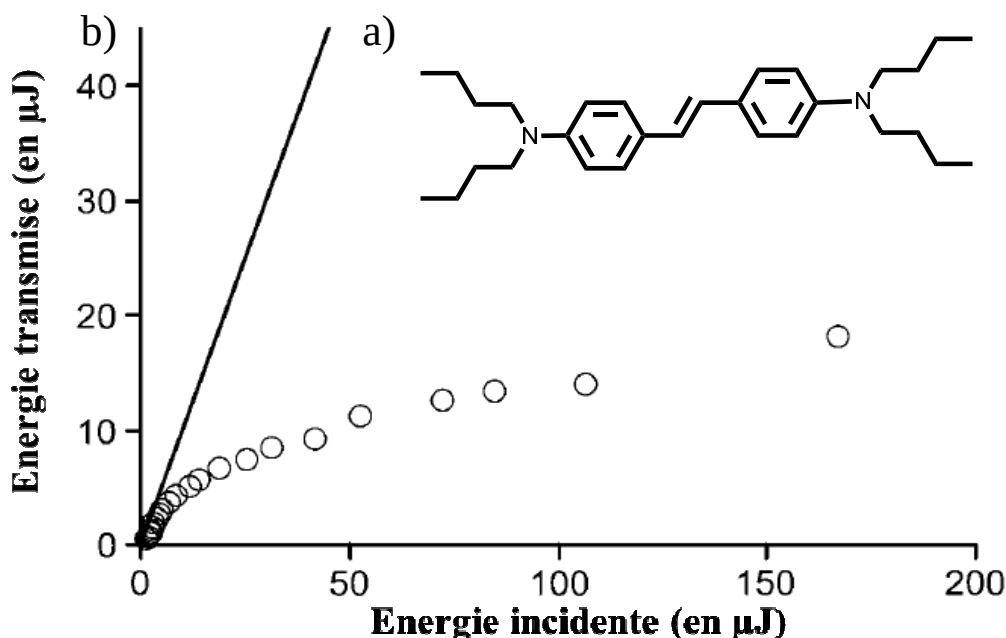


Figure 7 : a) Formule du 4,4'-bis-(dibutylamino)stilbène (BDBAS), chromophore utilisé dans des matériaux pour la limitation optique. b) limitation optique par BDBAS (dans l'acétone, 0,14 M, pour impulsions laser 5 ns à 600 nm). La ligne droite correspond à la transmission linéaire d'une solution, à $T=0,95$ ^[20].

I.2.4. La thérapie photodynamique à deux photons (TPD 2P)

La thérapie photodynamique (TPD) à un photon est actuellement largement utilisée pour traiter les cancers de la peau et d'organes creux, mais est aussi très efficace dans le traitement d'affections oculaires comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge ^[8]. Cette méthode de traitement utilise l'action combinée d'un photosensibilisant et de lumière pour induire un photodommage irréversible à des tissus tumoraux par exemple. Une concentration adéquate de l'oxygène moléculaire est elle aussi nécessaire, impliquant une vascularisation importante du tissu à traiter ^[21]. L'effet toxique ne sera présent que dans les régions de l'espace où ces 3 paramètres (photosensibilisateur, lumière et dioxygène) seront présents.

Un photosensibilisant absorbe l'énergie d'une source lumineuse, qu'il transfère alors soit au dioxygène pour former de l'oxygène singulet soit à une autre molécule pour former des radicaux libres. Ce sont cet oxygène singulet ou ces radicaux libres qui agissent en tant qu'agent cytotoxique entraînant la mort cellulaire et par conséquent la destruction de la tumeur ^[21] (Figure 8).

L'utilisation de TPD à deux photons a pour but de limiter l'excitation du photosensibilisant au volume focal, ce qui devrait permettre un contrôle très fin des zones à traiter, sans affecter les tissus sains voisins. De plus les longueurs d'onde voisines de l'IR nécessaires pour une excitation à deux photons permettent aussi une pénétration plus profonde de la lumière dans les tissus vivants que dans le cas de la lumière visible bleue ou UV proche utilisée en excitation à un photon ^[22]. Ces avantages donnent à la TPD 2P un intérêt particulier, surtout en neurologie et en ophtalmologie, où il y a un besoin croissant de résolution spatiale des ciblages thérapeutiques ^[8].

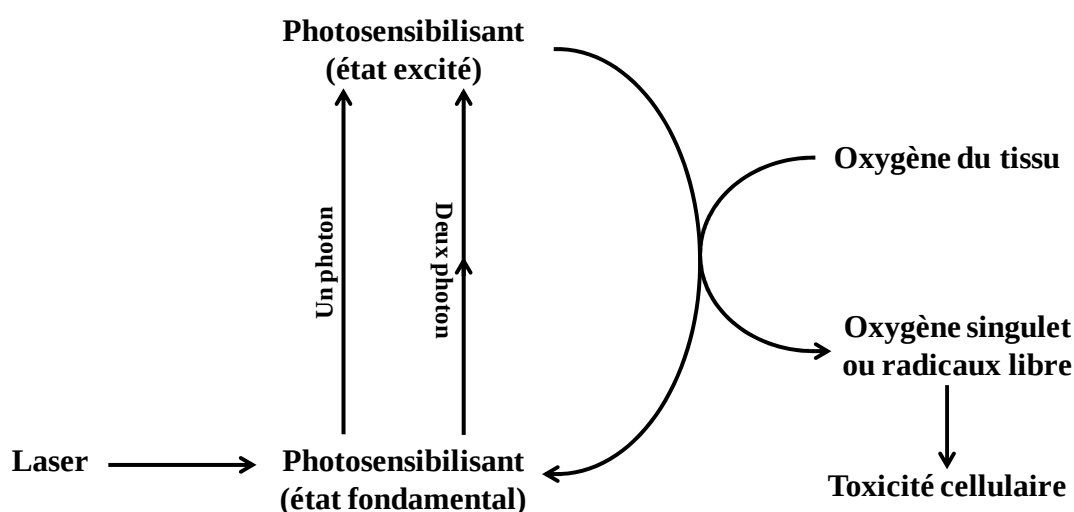


Figure 8 : Mécanisme d'action de la thérapie photodynamique.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons peu élevées des photosensibilisants destinés pour l'absorption à un photon, nécessitent l'utilisation de puissances élevées des lasers pour aboutir à une excitation biphotonique, qui limitent les avantages d'une telle technique. Il est apparu ainsi nécessaire de mettre au point de nouveaux photosensibilisants présentant de fortes sections efficaces d'ADP, pour permettre de réduire l'intensité et le temps des irradiations, minimisant ainsi les photodommages vis à vis des tissus environnant la zone à traiter. Plusieurs photosensibilisants ont été optimisés spécifiquement pour la TPD à deux photons, comme ceux à base de porphyrine ^[23], ou différentes autres structures organiques biocompatibles (solubles dans l'eau par exemple) ^[22, 24] (Figure 9).

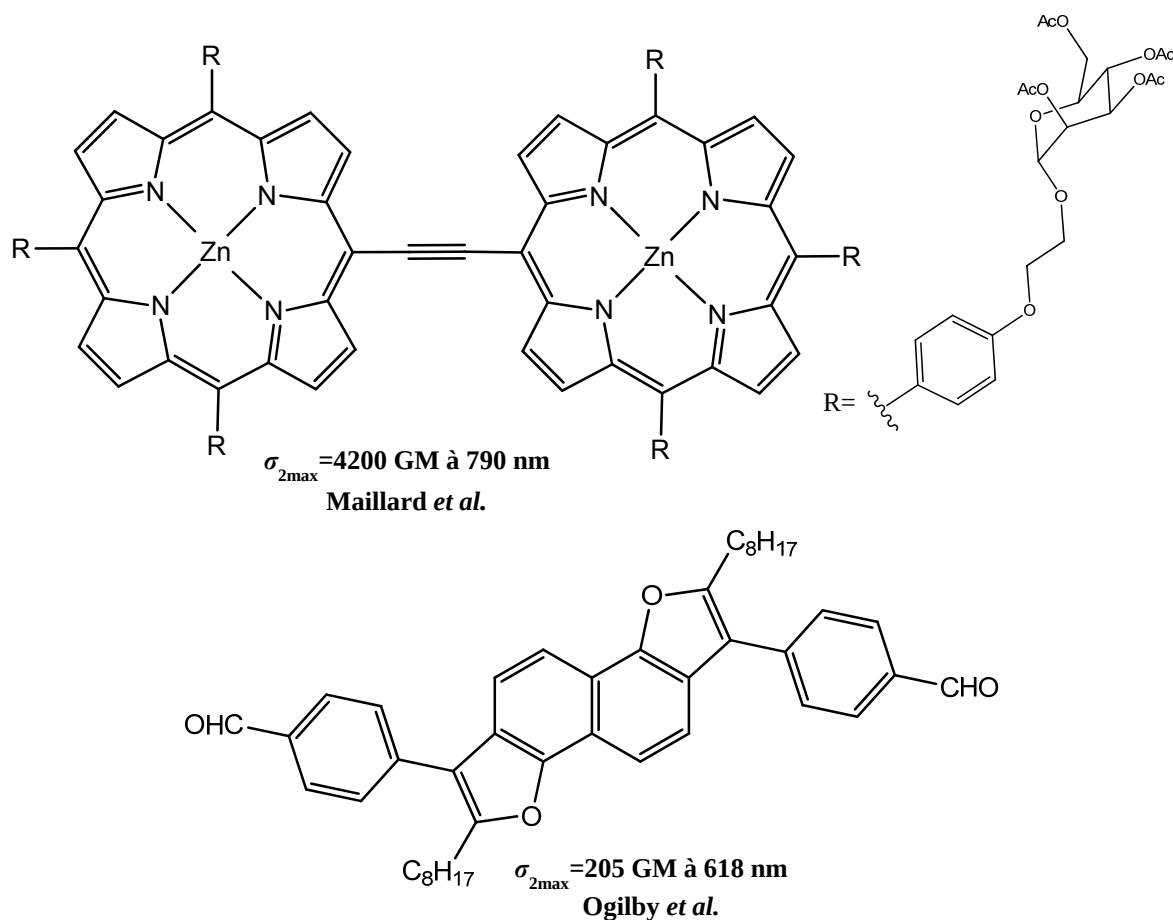


Figure 9 : Exemples de molécules utilisées en thérapie photodynamique à deux photons.

I.2.5. Photoactivation à deux photons

Un cas particulier de photoactivation, appelé « uncaging », repose sur l'activation rapide par une irradiation lumineuse d'une biomolécule dont l'activité était masquée par liaison covalente avec un groupement photolabile. La photolyse du groupement photolabile (qui est assimilé à une cage...), régénère la biomolécule sous sa forme active qui peut par la suite reconnaître son récepteur pour induire une réponse biologique (Figure 10). Cette biomolécule

« cagée » est généralement inactivée grâce à une liaison covalente à un groupement protecteur photolabile organique. Cette approche peut être appliquée à de nombreux domaines de la biologie en utilisant des neurotransmetteurs, des seconds messagers, des ligands d'enzymes ou de récepteurs, des facteurs d'activation ou de répression de gènes...

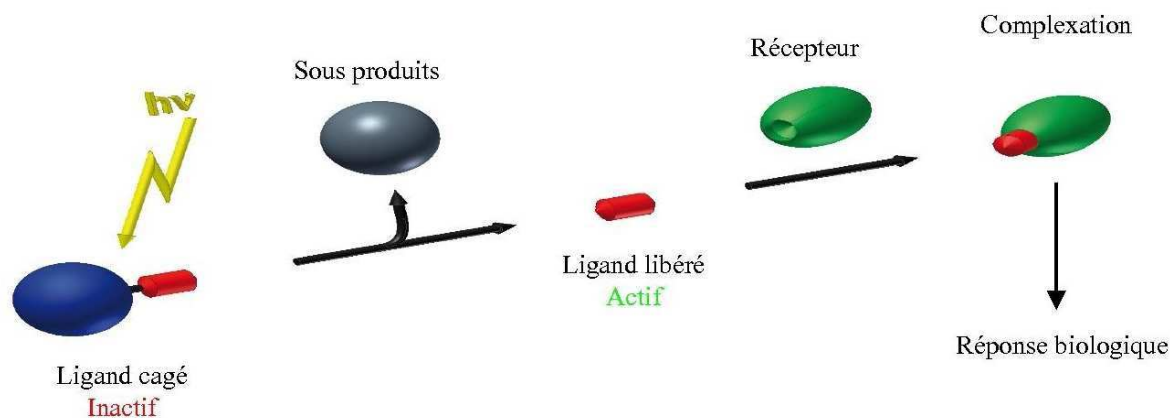


Figure 10 : Principe du « uncaging » de molécules biologiquement actives.

L'excitation à un photon, qui est classiquement utilisée pour induire cette photoactivation de biomolécules, ne permet pas un contrôle spatial très fin, alors que l'utilisation de l'ADP permet une réaction de photolyse avec une excellente résolution spatiale. De plus l'excitation par des lasers IR lors de l'ADP permet de réduire les photodommages sur les cellules ou les organes traités, mais aussi permet une pénétration plus profonde du faisceau lumineux dans les tissus vivants par rapport à celle observée en photoactivation monophotonique qui utilise des lasers UV.

L'utilisation d'une excitation à deux photons pour induire l'uncaging de biomolécules a été décrite pour la première fois en 1999 ^[25] et connaît depuis un développement croissant.

La majorité des cages utilisées actuellement pour l'uncaging à deux photons ont des faibles sections efficaces d'ADP car elles ont été optimisées pour la photoactivation traditionnelle à un photon. Ces dernières années, plusieurs groupements protecteurs photolabiles ont été optimisés spécifiquement pour la photoactivation à 2 photons. Par exemple, pour cager des neurotransmetteurs comme le glutamate (Glu) ou l'acide γ -aminobutyrique (GABA) notre équipe et celle du professeur Goeldner ont développé ensemble des groupements protecteurs photolabiles basés sur un système aromatique de type biphényle ^[26] ou fluorényle ^[27] (Figure 11).

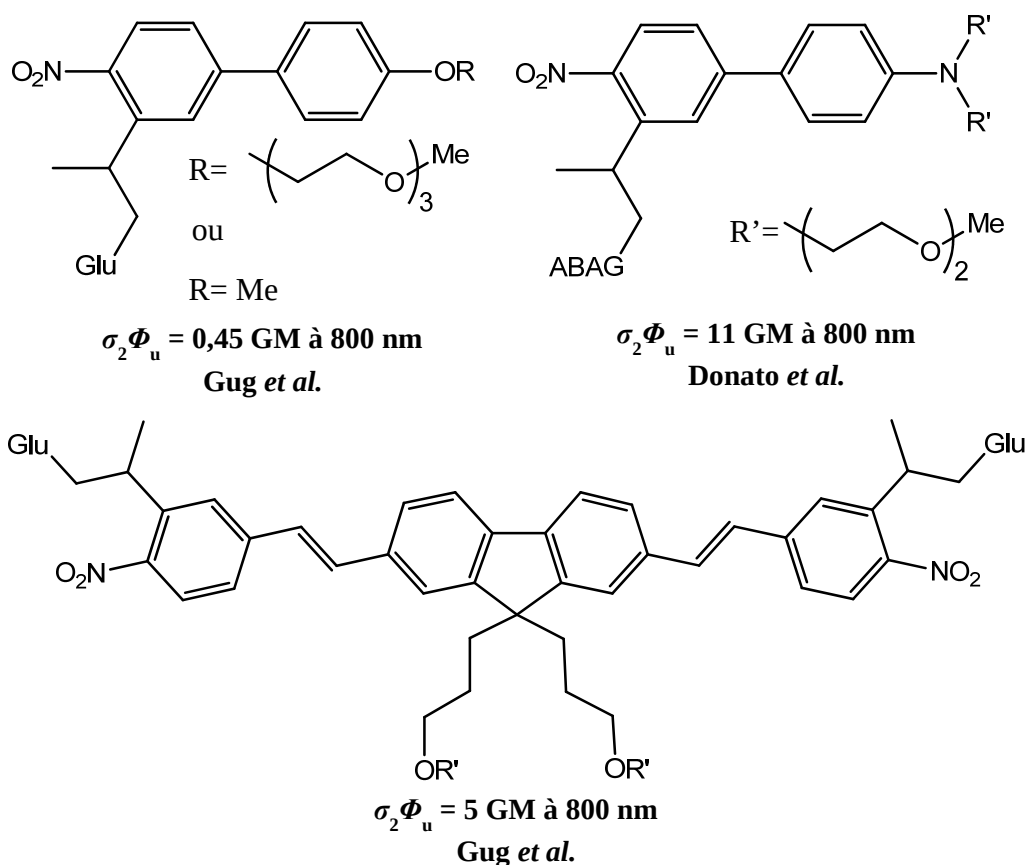


Figure 11 : Exemples de molécules utilisées en photoactivation à deux photons.
 (Φ_u : rendement quantique de la réaction photochimique)

La dernière application en biologie que nous allons décrire est la microscopie de fluorescence induite par excitation à deux photons. Comme notre travail de thèse a porté sur l'optimisation de fluorophores spécifiquement conçus pour cette technique, elle fera l'objet d'un chapitre distinct.

I.3. LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE INDUITE PAR EXCITATION A DEUX PHOTONS

I.3.1. Vision historique

Le premier microscope optique a été mis au point au XVII^{ème} siècle par Van Leeuwenhoek (1632-1723). Ce système permet à l'œil humain, au moyen d'une lentille ou une combinaison de lentilles, d'observer des images agrandies d'objets minuscules, et il est très utilisé en biologie pour observer les cellules, les tissus... Son principe repose sur l'illumination de l'échantillon par-dessous grâce à une source de lumière et l'œil observe par-dessus une image à travers deux lentilles (l'objectif et l'oculaire). On obtient ainsi un contraste qui provient de l'absorption de l'échantillon. Une amélioration de ce système a été obtenue en utilisant la

fluorescence de certaines molécules pour aboutir à une nouvelle méthode de contraste. Celle-ci permet d'obtenir une image microscopique d'un échantillon en détectant la lumière émise par fluorescence au sein de cet échantillon. La première apparition sur le marché de microscopes basés sur ce principe date du début du 20^{ème} siècle, avec l'émergence des microscopes à épifluorescence. La technique de microscopie en épifluorescence consiste à exciter l'échantillon par un faisceau de lumière provenant de l'objectif et de recueillir la lumière émise par fluorescence par ce même objectif grâce à un filtre dichroïque (*Figure 12*). Les fluorophores présents dans l'échantillon sont excités simultanément et toute la lumière produite est recueillie. On observe ainsi une image globale de l'échantillon sans possibilité d'obtenir une vision tridimensionnelle de l'objet étudié sans traitement mathématique des images obtenues.

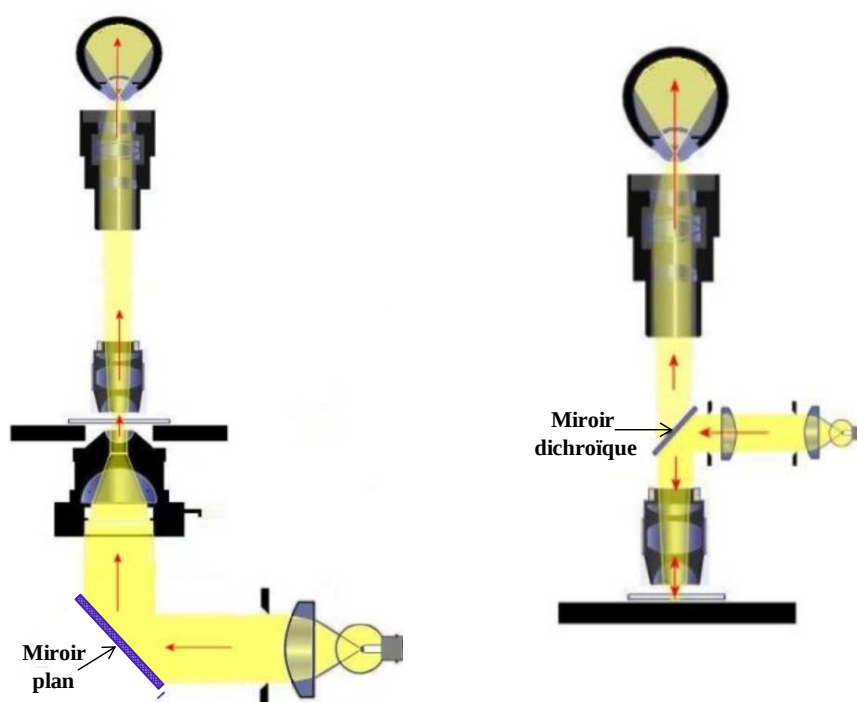


Figure 12 : Schémas de montage d'un microscope optique en transmission (à gauche) et d'un microscope à épi-illumination (à droite).

Pour résoudre ces problèmes de résolution spatiale, Minsky a mis au point en 1961 une nouvelle technique de microscopie de fluorescence : la microscopie confocale à balayage laser ^[28]. Cette méthode dans laquelle l'échantillon est éclairé par un faisceau laser, permet d'éliminer physiquement la fluorescence qui ne provient pas du plan focal de l'objectif utilisé en utilisant un diaphragme (trou d'épingle) disposé devant le détecteur. De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal franchissent le diaphragme et participent à la formation de l'image. Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant

uniquement au plan focal. En balayant le plan en z on obtient une succession de coupes permettant ensuite de reconstruire l'image en 3 D (Figure 13).

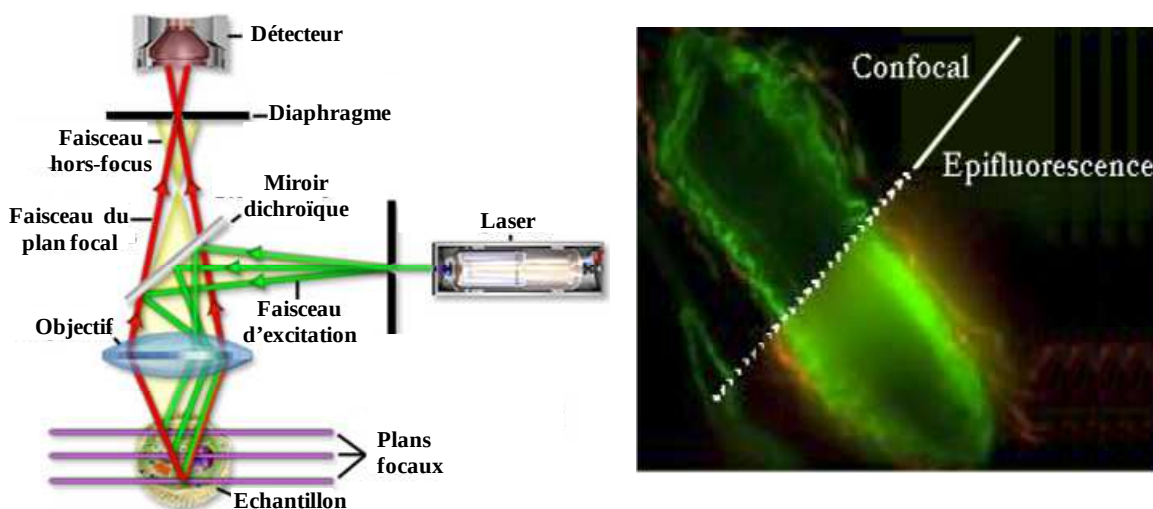


Figure 13 : Principe de la microscopie confocale (à gauche), comparaison de l'image d'une cellule obtenue par microscopie confocale et par microscope en épi-fluorescence (à droite).

La microscopie en épifluorescence ainsi que la microscopie confocale utilisent toutes deux une source lumineuse émettant dans la zone UV-visible du spectre électromagnétique (assez énergétique), ce qui entraîne une toxicité importante vis à vis des tissus biologiques étudiés, mais aussi un photoblanchiment du colorant. De plus ces longueurs d'ondes sont fortement diffusées et absorbées par les tissus vivants, limitant leur utilisation à la surface des échantillons (moins de $100\ \mu\text{m}$)^[29]. Pour éviter ces problèmes et pour accéder à des profondeurs plus importantes, l'idée d'utiliser des phénomènes non-linéaires a vite gagné la communauté des physiciens puis des microscopistes.

La microscopie de fluorescence par excitation à deux photons (ou microscopie à deux photons MDP) est basée sur l'absorption de deux photons, phénomène non-linéaire dont la probabilité dépend quadratiquement de l'intensité lumineuse, bénéficiant donc d'une résolution spatiale intrinsèque, sans avoir à ajouter de trou d'épingle stoppant les photons ne provenant pas du point focal. D'autre part, pour chaque transition vers l'état excité, deux photons de même énergie sont absorbés simultanément, divisant ainsi par deux l'énergie des photons nécessaires pour la transition, et en conséquence, pour des fluorophores classiques absorbant à un photon dans l'UV ou le bleu, la transition bi-photonique se produira avec des photons rouge ou proche infrarouge (IR).

Depuis sa première démonstration en 1990 par Denk, Strickler et Webb^[30], les applications de la MDP sont en plein essor, surtout pour l'imagerie en profondeur de tissus sur des animaux vivants. Elle a ainsi été utilisée en neuroscience pour étudier profondément la dynamique du calcium dans des coupes de cerveau,^[31] et beaucoup d'autres domaines ont bénéficié de ses développements comme par exemple en oncologie^[32], en immunologie^[33] ou encore en embryologie^[34] où les organes ou les organismes peuvent être examinés jusqu'à plus d'un millimètre de profondeur^[35].

I.3.2. Avantages de la MDP par rapport à la microscopie confocale

Il apparaît que toutes les techniques de microscopie non-linéaire exigent des systèmes laser pulsés très couteux pour atteindre des puissances d'excitation suffisantes, mais deux avantages majeurs rendent l'investissement rentable :

Premièrement, la plupart des marqueurs fluorescents généralement utilisés pour la MDP, absorbent 2 photons à des longueurs d'onde plus élevées que celles utilisées à 1 photon, et sont donc moins diffusées au sein d'un organisme vivant^[29]. De plus elles appartiennent à la gamme de longueur d'ondes proche de l'infrarouge (700-1.000 nm) qui correspond à la fenêtre de transparence optique (*Figure 14*) des tissus vivants où l'absorption par le matériel biologique, provenant principalement de la mélanine, de l'hémoglobine, des protéines mais aussi de l'eau est minimale^[36].

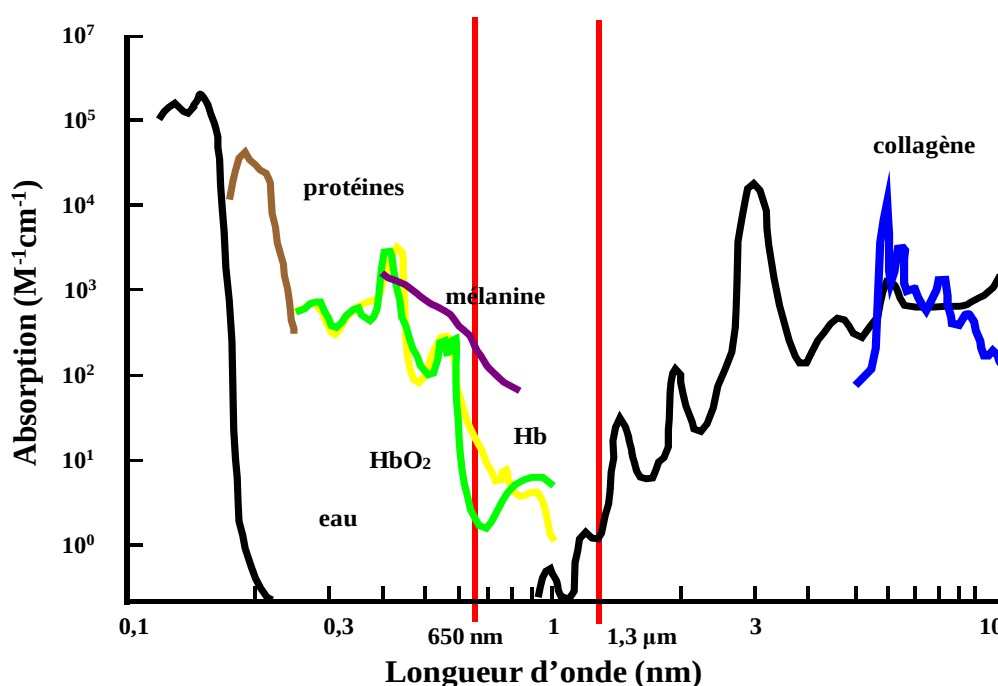


Figure 14 : Coefficient d'absorption molaire des principaux constituants des tissus biologiques.

Le deuxième avantage majeur de cette excitation biphotonique est la dépendance quadratique de l'ADP d'un chromophore vis à vis de l'intensité de la lumière excitatrice. L'excitation ne se fait qu'au point focal où l'intensité de laser est maximale et pas sur tout le trajet optique comme dans le cas de la microscopie confocale ^[37] (Figure 15).

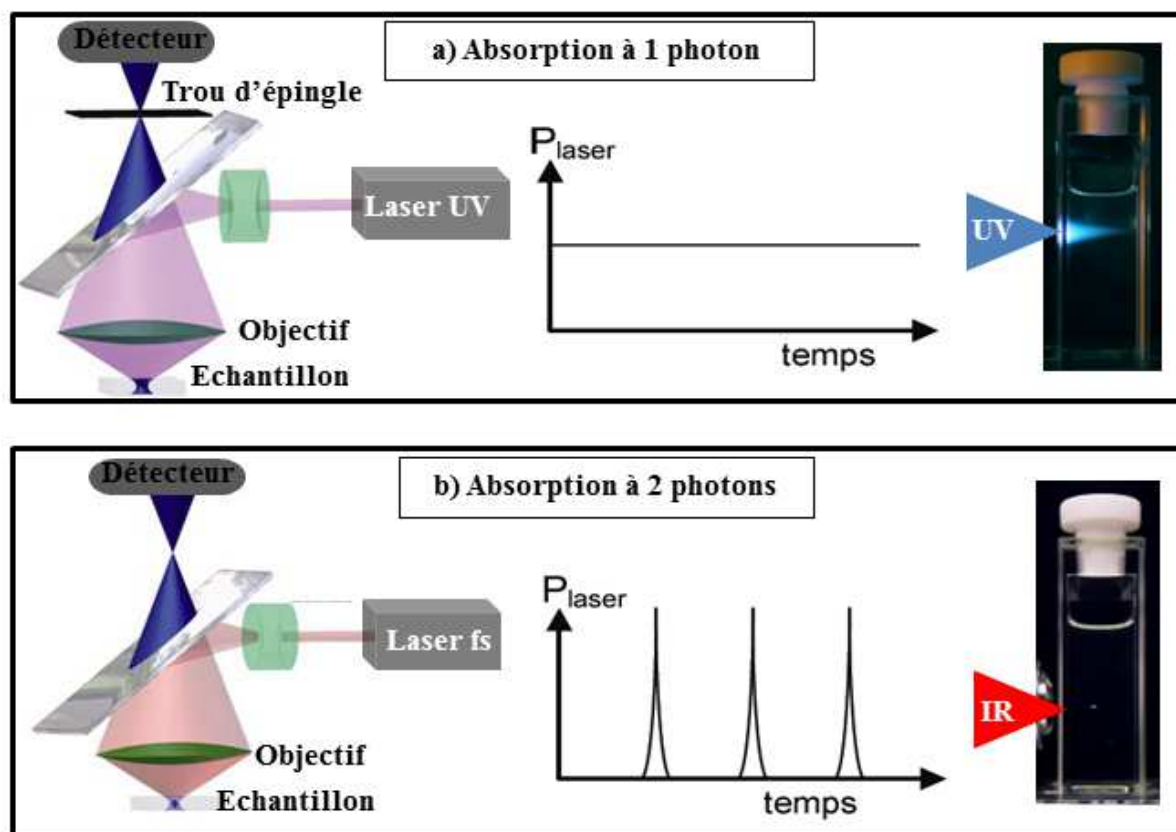


Figure 15 : **a.** Montage schématique d'un microscope confocal à balayage laser (à gauche) et une solution contenant un chromophore sous excitation à un photon à l'aide d'un laser continu (à droite). **b.** Montage schématique d'un microscope à deux photons (à gauche) et la même solution sous excitation à deux photons par un laser impulsionnel (à droite).

Cette localisation spatiale précise induit une résolution tridimensionnelle intrinsèque, sans avoir besoin d'insérer le « trou d'épingle » ^[29] utilisé en microscopie confocale pour obtenir la résolution tridimensionnelle en bloquant les faisceaux lumineux qui ne proviennent pas du plan focal. Cependant ce « trou d'épingle » bloque aussi les photons diffusés (non balistiques) provenant pourtant du plan focal. Ainsi, en MDP tous les photons sont collectés car ils proviennent tous forcément du point focal, l'excitation ne se produisant qu'en ce point, augmentant considérablement le rapport signal/bruit ^[38].

La résolution optique d'un microscope multiphotonique semble à première vue être dégradée d'un facteur de 2 par rapport à un microscope confocal car la longueur d'onde utilisée est 2

fois plus grande (loi de Abbé). C'est vrai si l'on se base sur un microscope confocal hypothétique « parfait » avec un trou d'épingle infiniment petit ^[39], mais ce n'est plus rigoureusement exact avec un microscope « réel » avec un trou d'épingle plus grand, et, si cette perte de résolution est présente, elle n'est jamais aussi drastique ^[37].

Enfin, il faut mentionner que la localisation de l'excitation seulement au point focal permet aussi de limiter les photodommages causés à l'échantillon observé et le photoblanchiment des sondes utilisées dans un volume de l'ordre du femtolitre autour de ce point, point qui est crucial pour l'imagerie longue durée ^[40] sur animal vivant, mais aussi pour les images qui nécessitent des reconstructions tridimensionnelles grâce à un balayage en z du plan focal.

1.3.3. Le microscope de fluorescence par excitation biphotonique

En général, un microscope à deux photons ressemble à un microscope confocal, mais avec une table optique supplémentaire pour accueillir le laser pulsé infrarouge. Il y a quelques années, beaucoup de laboratoires ont fabriqué leurs systèmes par eux-mêmes (*Figure 18*), généralement en se basant sur un microscope confocal modifié ^[30]. Le premier microscope à deux photons commercial a été introduit sur le marché en 1996 par BioRad Microscience puis tous les grands constructeurs de microscopes comme Zeiss, Leica et d'autres compagnies ont développé leurs propres produits. Actuellement, la majorité des plateformes d'imageries offrent cette modalité supplémentaire d'excitation sur leurs microscopes confocaux.

Les deux différences majeures entre un microscope confocal et biphotonique sont le système d'excitation laser et le système de détection ^[41].

Le laser

Un microscope à deux photons exige une source laser pulsée. Historiquement, l'utilisation des interactions non-linéaires entre la matière et la lumière dans un microscope, n'est devenue possible qu'après le développement des lasers pulsés ultrarapides ^[29]. Des systèmes laser femtoseconde dans le proche infrarouge ne sont en effet devenus commercialement disponibles que dans les années 90s ^[8]. Le développement des microscopes à deux photons est intimement lié aux innovations effectuées sur les lasers commerciaux, et si les premiers lasers fs commercialisés devaient être manipulés par des physiciens expérimentés, les lasers actuels sont entièrement pilotés par ordinateur et sont quasiment sans entretien.

Les paramètres clés qui doivent être pris en considération en choisissant un système laser sont la puissance disponible à la longueur d'onde désirée et la durée de l'impulsion. Le système le plus utilisé est le laser Titane:Saphir avec une fréquence de répétition typique de l'ordre de 100 Mhz. Il est ajustable dans une large gamme de longueurs d'onde de 650 à 1100 nm, ce qui permet l'excitation de la plupart des chromophores utilisés en biologie ^[6]. La puissance moyenne du laser Ti:Saphir dépend de la puissance du laser de pompe. Une puissance de 5W dans le système de pompe fournit jusqu'à 1 W de puissance moyenne aux longueurs d'ondes où le laser Ti:Saphir est le plus efficace (~800 nm) et quelques centaines de milliwatts en limite de gamme (700 nm et 1000 nm) ^[37].

Dans notre laboratoire, nous utilisons un système laser de marque Spectra-Physics, avec un laser Millennia Vs de 5W pour pomper le laser Ti:Saphir, et 0,7 W de puissance moyenne à la sortie du laser Ti:Saphir à 800 nm. La fréquence de répétition est de 80 MHz et les durées d'impulsion de 120 fs (*Figure 16*).

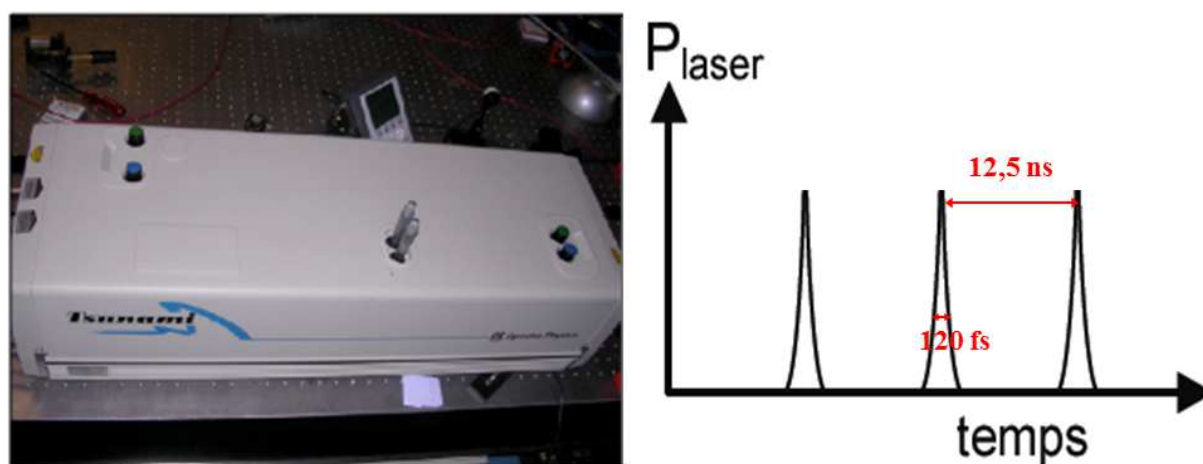


Figure 16 : *Laser Tsunami (Spectra-Physics) utilisé dans notre montage (à gauche) et profil temporel des pulses (à droite)*

La détection

En MDP tous les photons émis par l'échantillon sont collectés par le détecteur, il n'y a plus besoin de « trou d'épingle », la fluorescence est directement détectée à travers l'objectif (épiscollection) ^[42]. Le développement de détecteurs de plus en plus sensibles améliore l'efficacité de la détection, ce qui permet de diminuer significativement l'intensité de l'excitation nécessaire pour obtenir un signal détectable; de plus cela augmente la viabilité des échantillons ^[37] et diminue le photoblanchiment des colorants.

Deux types de détecteurs sont utilisés communément dans les systèmes faits maison ou les systèmes commerciaux : les tubes photomultiplicateurs (PMT) et les photodiodes d'avalanche (PDA) ^[37]. Les PMTs possèdent une efficacité quantique (EQ) de l'ordre de 40% tandis que pour PDA elle est de plus de 80 %, ce qui la rend plus efficace pour les cas où les niveaux de fluorescence sont extrêmement bas. La EQ est maximale pour le PMT à des longueurs d'ondes $< 500 \text{ nm}$ ^[43] tandis que les PDA sont plus efficaces pour des longueurs d'ondes $\lambda > 500 \text{ nm}$ ^[44].

Cependant, les PDA présentent une réponse lente ce qui pose de sérieux problèmes pour les applications en vidéomicroscopie rapide ^[42].

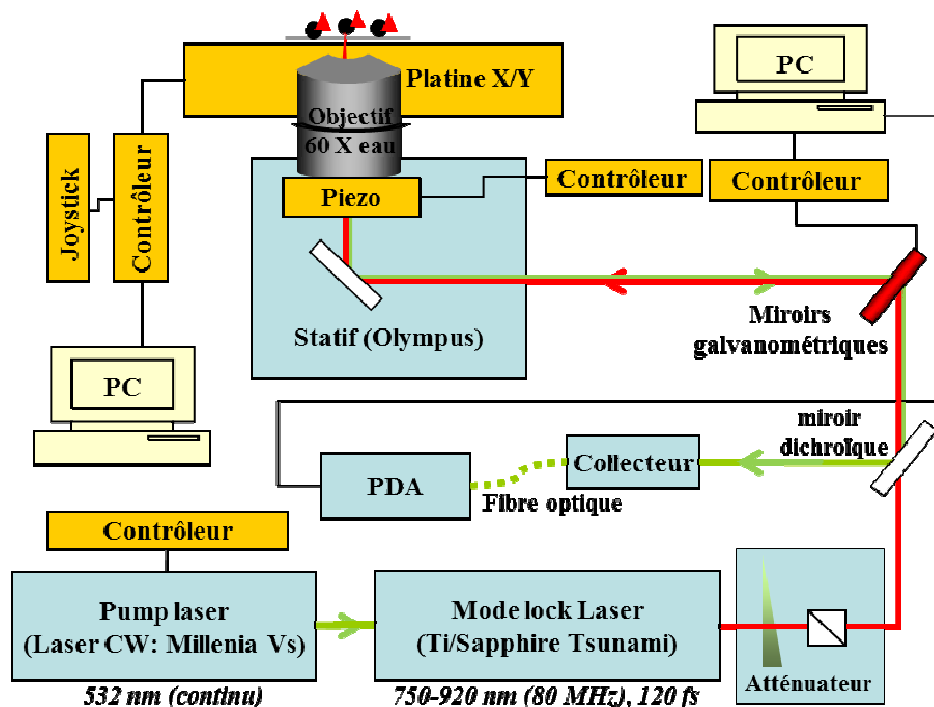


Figure 17 : Schémas du microscope à deux photons construit au sein de notre laboratoire

1.3.4. Optimisation pour l'imagerie en profondeur dans les tissus vivants

Plusieurs facteurs influent aussi bien sur l'intensité de la fluorescence que sur l'efficacité de la détection de ce signal. De nombreux groupes travaillent à l'optimisation des systèmes de microscopie pour ce type d'imagerie. Les principaux axes de recherches pour l'amélioration des profondeurs d'imagerie sont les suivants :

Longueur d'onde d'excitation ^[29, 45]

Pour imager dans la profondeur, un signal suffisant doit être généré, c'est à dire qu'une quantité suffisante de lumière doit atteindre le point focal sans qu'elle soit diffusée (la fraction « balistiques »). La probabilité et la distribution de la diffusion dépendent à la fois de la longueur d'onde et de la variation de l'indice de réfraction du milieu. Plus la longueur d'onde est grande moins elle sera diffusée, puisque la diffusion est proportionnelle à λ^{-4} . Cependant la longueur d'onde optimale d'excitation est aussi dictée par le spectre d'absorption à deux photons du chromophore utilisé, et par le fait que les lasers sont moins puissants aux extrêmes de leur gamme de longueurs d'ondes.

Correction de l'inhomogénéité du tissu

L'inhomogénéité des indices de réfraction dans le tissu, due par exemple à la présence des vaisseaux sanguins ou des organites cellulaires agissant comme des microlentilles, augmente la distorsion de la lumière ^[29]. Cette distorsion, une fois mesurée, peut être corrigée en utilisant des miroirs déformables ^[46].

Taille du faisceau ^[29].

Parce que le profil d'intensité radial d'un faisceau laser est de forme gaussienne, le remplissage exact de la pupille d'entrée du microscope est impossible. Une diminution de la taille du faisceau améliore la transmission de la puissance, mais elle élargit le volume focal. Alors un compromis entre la résolution et la puissance transmise doit être trouvé.

Largeur de l'impulsion ^[29, 37, 47]

Les impulsions ultracourtes s'élargissent temporellement en se propageant dans la matière, ce qui réduit la puissance crête du pulse laser, et donc réduit aussi la probabilité de l'absorption à deux photons. Ce problème peut être minimisé en pré-compensant la fréquence de manière à ce que les composantes tout au long du spectre d'impulsion arrivent en même temps. Cette pré-compensation peut être faite en utilisant de prismes ou de réseaux optiques. L'inconvénient majeur de cette pré-compensation est qu'en ajoutant des composants optiques, cela peut conduire à une perte de puissance.

Le taux de répétition des impulsions (f_R)

La probabilité d'ADP peut également être augmentée en abaissant f_R par l'utilisation d'un amplificateur régénératif, tout en maintenant des niveaux de puissance moyenne raisonnables. La puissance crête augmente de l'ordre de 10^8 dans les cas extrêmes là où le taux de répétition

est abaissé à environ 1 Hz ^[48]. Cependant pour les applications en imagerie, la f_R ne peut pas être inférieure à 100 kHz, sachant qu'au moins une impulsion et 10 μ s de temps d'acquisition par pixel sont nécessaires ^[29]. Cette approche peut être utilisée pour améliorer la pénétration dans la profondeur ^[45a] et a été démontrée aussi pour l'imagerie *in vivo* ^[49].

La collection de fluorescence

Autre facteur aussi important que la génération du signal, l'efficacité de détection et de collection est primordial. Les photons de fluorescence sont plus diffusés que ceux de l'excitation vu que la diffusion est plus importante pour les courtes longueurs d'ondes et cette diffusion devient de plus en plus importante avec la profondeur. Alors la voie de détection confocale devient inutile et la détection de la lumière diffusée devient nécessaire. Par conséquent, même si le champ de vision imagé est petit, une détection efficace de fluorescence nécessite la détection d'un grand champ de vision. Parce qu'un grand champ de vision correspond à un faible grossissement, les objectifs spécifiques qui combinent grandes ouvertures numériques à des faibles grossissements ont des rendements de collections particulièrement élevés ^[45b]. Pour un grand champ de vision, la voie de détection post-objectif doit être soigneusement conçue pour guider toute la lumière vers le détecteur ^[29].

La limite de profondeur

La profondeur maximale réalisable en imagerie dépend de la diffusion, de la puissance, de la probabilité d'ADP et de l'efficacité de collection ^[45b]. Avec une impulsion d'environ 100 fs la profondeur maximale est généralement limitée par la puissance moyenne disponible ; par exemple pour 1 W de puissance, des profondeurs d'environ 600-800 μ m dans le néocortex peuvent être atteintes ^[50]. Avec la présence d'un amplificateur régénératif, il est possible d'augmenter la profondeur, par exemple Theer *et al.* ont pu faire des observations jusqu'à une profondeur de 1mm dans le néocortex d'une souris ^[49]. De plus la profondeur d'imagerie réalisable dépend fortement des propriétés des tissus tels que l'organisation microvasculaire, l'arrangement cellulaire, le contenu en collagène ou en myéline, qui affectent plus ou moins la focalisation du laser et limitent la génération de signal dans la profondeur du tissu. Si des structures plus profondes doivent être atteintes, la pénétration mécanique ou l'exérèse de tissu qui couvre la cible demeurent nécessaires ^[51-53].

I.3.5. Marqueurs fluorescents pour la MDP

Il existe principalement deux types de marqueurs utilisés en imagerie de fluorescence à deux photons: les marqueurs exogènes (colorants organiques) et les marqueurs endogènes (GFP, NADH, protéines fluorescentes ...). Les protéines fluorescentes ont révolutionné l'imagerie en biologie. En effet elles peuvent être produites par l'organisme lui-même par ingénierie génétique. Ainsi pratiquement toutes les protéines d'un organisme peuvent être associées à une protéine fluorescente (protéine de fusion) permettant leur localisation précise par microscopie. La plus connue est la protéine fluorescente verte (GFP = Green Fluorescent Protein) issue d'une méduse (*Aequorea victoria*). D'autres protéines fluorescentes issues de la modification génétique de la GFP ont été mises au point: BFP (Blue Fluorescent Protein), YFP (Yellow Fluorescent Protein), RFP (Red Fluorescent Protein)... l'amélioration de leurs propriétés photophysiques a conduit à d'autres protéines fluorescentes de plus en plus utilisées (e-GFP).

Les chromophores organiques sont généralement plus efficaces et offrent une grande variété spectrale (variété de longueurs d'onde d'excitation et d'émission) et de fonctionnalités (sensibilité à l'environnement chimique, au potentiel transmembranaire ...) ^[54]. Des colorants qui ont été développés pour marquer certaines structures et organites subcellulaires, sont utilisés en MDP ^[8]. Citons par exemple le DAPI (DiAmidinoPhenylIndole) qui marque spécifiquement l'ADN et qui possède un $\sigma_2 < 1$ GM à 800 nm ^[55]. Pour visualiser les radeaux lipidiques Kim *et al.* ^[56] ont développé le CL2 (un dérivé d'aminonaphtalène) avec $\sigma_2 = 80$ GM à 800 nm. Il y a aussi la rhodamine B ($\sigma_2 = 100$ GM à 800 nm) et la fluorescéine ($\sigma_2 < 100$ GM à 800 nm) ^[55] qui peuvent être fixées sur des anticorps spécifiques pour localiser un antigène ciblé (*Figure 18*).

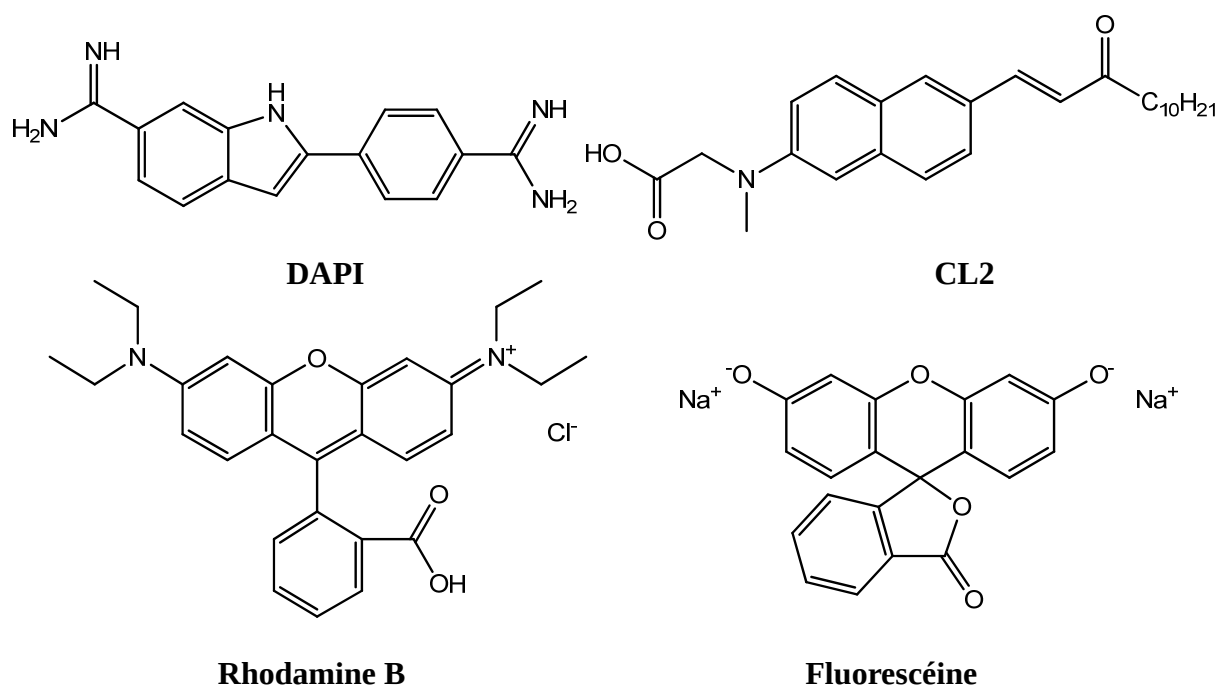


Figure 18 : Quelques exemples de colorants utilisés en MDP

La plupart des fluorophores ne sont pas optimisés pour la MDP. Plusieurs paramètres influent sur l'efficacité des fluorophores en MDP, le plus important est la brillance ($\phi_F \sigma_2$) qui est le produit de la section efficace à 2P (σ_2) par le rendement quantique de fluorescence (ϕ_F)^[8]. Comme l'efficacité de l'ADP dépend à la fois de la source laser d'excitation et de la molécule excitée, alors en améliorant la brillance on peut diminuer l'intensité du laser utilisé afin de réduire le photo-blanchiment et le photo-dommage produits par une forte intensité pendant une illumination pulsée^[57]. Un autre facteur important est la longueur d'onde d'émission. En la décalant vers le rouge on diminue la diffusion dans les tissus et la lumière émise pourra être recueillie plus facilement. D'autres critères sont nécessaires surtout pour l'utilisation *in-vivo* comme la solubilité dans l'eau, la photo-stabilité et la faible toxicité...

L'objet de cette thèse est la synthèse des nouveaux fluorophores optimisés pour la MDP et l'amélioration des leurs propriétés d'absorption biphotonique et de leur compatibilité avec des applications biologiques en jouant sur l'ingénierie moléculaire du fluorophore.

I.4. INGENIERIE MOLECULAIRE DE FLUOROPHORES ABSORBANT BIPHOTONIQUES

L'absorption à deux photons par des colorants organiques a été démontrée expérimentalement en 1963,^[58] mais ce n'est que plusieurs années plus tard que des études sur la relation

structure-propriétés sont apparues afin d'orienter l'ingénierie moléculaire pour le « design » de nouveaux chromophores ADP.

Ils existent plusieurs modèles de chromophores selon la géométrie de la structure générale : les chromophores de géométrie unidimensionnelle 1D, de géométrie bidimensionnelle 2D et des systèmes plus complexes dont la géométrie est tridimensionnelle 3D. Nous nous intéressons au laboratoires aux petits systèmes 1D, qui sont quasi linéaires.

En 1997, Marder, Perry ont étudié l'effet des substituants électroactifs sur l'efficacité de l'ADP. Ils ont étudié des systèmes linéaires symétriques basés sur un cœur E-stilbène avec 3 substituants périphériques différents ^[59]. La section efficace à deux photons du dérivé avec $X = NPh_2$, est 10 fois plus élevée que celle du stilbène non substitué $X = H$ (Figure 19).

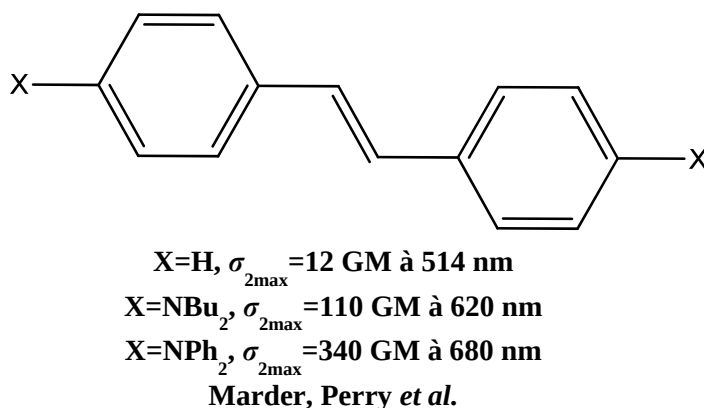


Figure 19 : Structures du E-stilbène et ses deux dérivés comportant un groupe électro-donneur périphérique.

Cette mise en évidence de valeurs de σ_2 élevées induite par des groupement électrodonneurs placés aux extrémités de composés centrosymétriques a conduit à une approche générale pour le design de chromophores pour l'ADP : on recherche des molécules présentant au moins deux groupements périphériques électrodonneurs (D) ou électro-accepteurs (A) reliés entre eux par un système π -conjugué plus ou moins long^[60]. Alors que Marder, Perry *et al.* ont commencé par explorer des chromophores centrosymétriques de type D- π -D ou A- π -A, Reinhardt, Prasad, *et al.* ont mis au point des composés dipolaires polarisables non-centrosymétriques de type D- π -A^[61] (Figure 20).

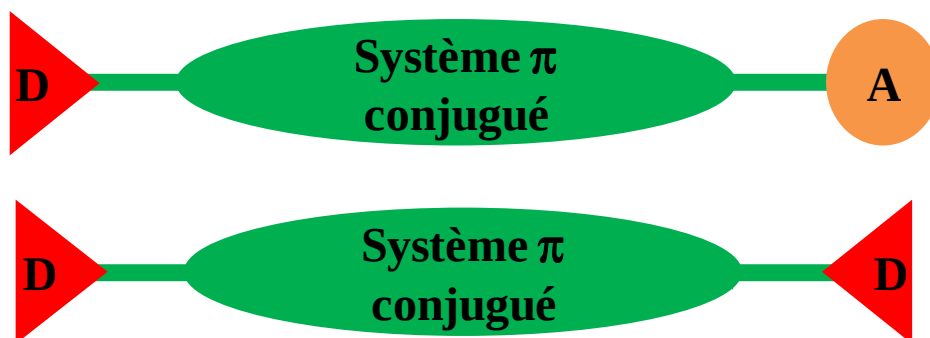


Figure 20 : Schéma représentatif du modèle non-centrosymétrique de type D- π -A (en haut) et du modèle centrosymétrique de type D- π -D (en bas).

Quelques systèmes dipolaires présentant des σ_2 assez élevés ont été publiés ^[13, 62] (Figure 21), mais ces systèmes semblent présenter en général des σ_2 plus faibles que les colorants centrosymétriques de la même taille et complexité ^[8].

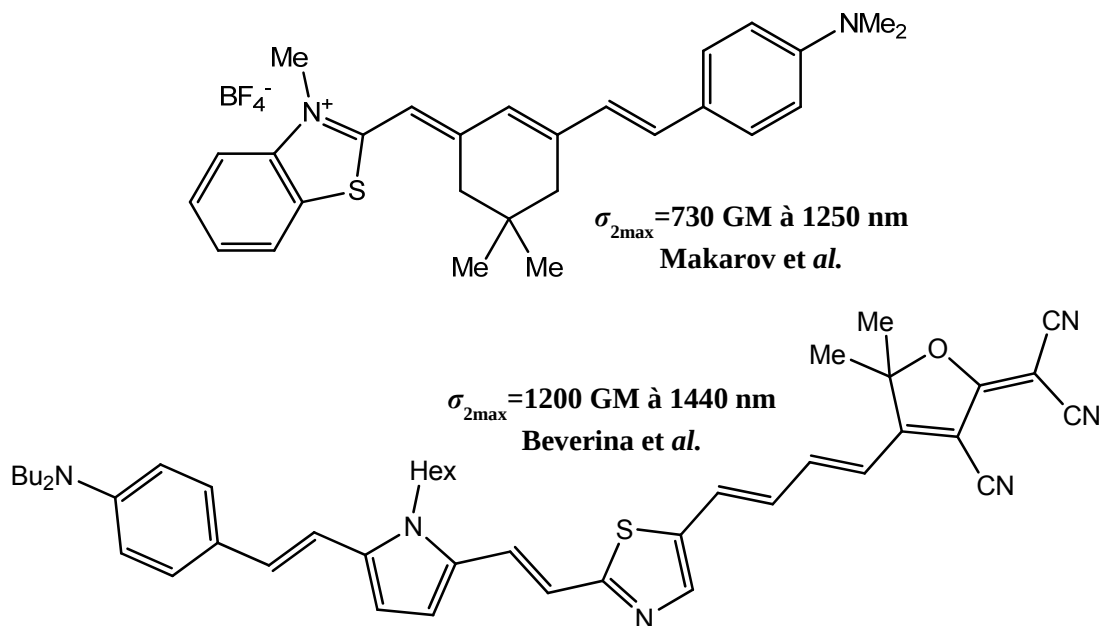


Figure 21 : Exemples de chromophores ADP de structure non-centrosymétrique D- π -A.

Les groupes de Marder, Perry ^[5, 60, 62-63] et Prasad ^[61, 64] sont les précurseurs dans le domaine de l'ingénierie moléculaire de la section efficace d'ADP, mais de nombreux autres groupes de recherche ont apporté des contributions importantes ^[65]. Il est important d'identifier des relations simples structure-propriétés, bien que les facteurs qui influent sur l'absorption à deux photons soient fortement interdépendants, et qu'il est difficile de les traiter séparément. Ci-dessous, nous allons illustrer quelques exemples des principaux facteurs qui influencent l'efficacité de l'ADP dans les chromophores organiques.

I.4.1. Choix des groupes terminaux

La modulation des substituants électro-donneurs (D) et électro-accepteurs (A) est devenue une approche populaire pour la mise au point de nouveaux colorants pour l'ADP. La force d'un groupement électrodonneurs ou électro-accepteur a été étudiée et quantifiée par Hammett, et le coefficient de Hammett ^[66] σ , qui prend en compte les effets mésomères et inductifs d'un substituant électro-donneur ou électro-attracteur donne une bonne indication de l'efficacité du substituant à donner ou accepter des électrons (Tableau 1). ^[67]

<i>Groupements donneurs</i>	<i>Coefficients de Hammett σ</i>	<i>Groupements attracteurs</i>	<i>Coefficients de Hammett σ</i>
N(CH₃)₂	-1,70	NO₂	0,79
OH	-0,92	SO₂CH₃	0,73
OMe	-0,78	CN	0,66
Me	-0,31	Br	0,15

Tableau 1 : Valeurs des coefficients de Hammett pour différents groupes donneurs et accepteurs étudiés en ONL.

Groupements électro-donneurs

Les groupements électro-donneurs à base d'oxygène (-OR) sont généralement moins efficaces que les groupements dialkyl- et diaryl-amino qui sont des groupements terminaux donneurs largement utilisés. Par exemple la substitution d'un groupement terminal OMe par un NBU₂ (Figure 22) a permis une augmentation d'un ordre de grandeur des sections efficaces d'un dérivé de fluorène.^[68] Cette observation est corrélée avec les coefficients de Hammett ($\sigma = -1,70$ pour NMe₂ et $-0,78$ pour OMe). Comme prévu le groupement phénolate, qui est un groupement fortement électro-donneur ($\sigma = -4,27$), induit des sections efficaces très élevées^[69] par rapport aux groupements OMe ou NBU₂ (Figure 22).

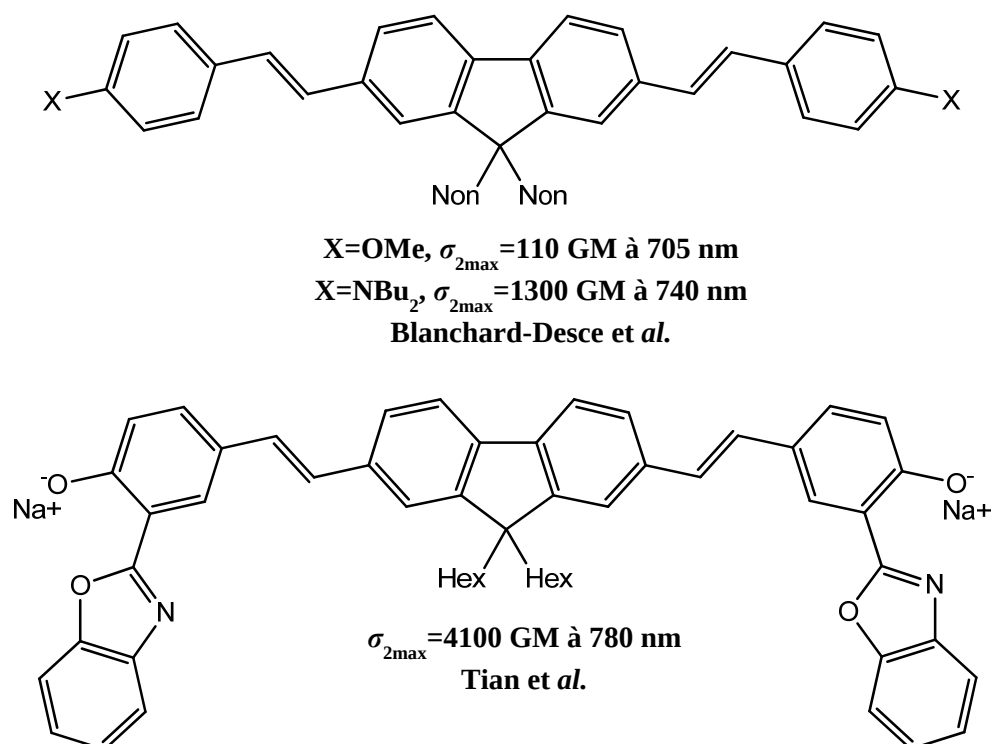


Figure 22 : Exemples des chromophores ADP avec plusieurs types de groupements donneur.

Cependant, des exceptions ont été mises en évidence, par exemple un groupement NPh_2 possédant un coefficient de Hammett de -1,40, plus faible que celui de NBu_2 , conduit à une section efficace plus importante (Figure 19). Ceci pourrait être attribué à leur plus grand nombre d'électrons π .

Groupements électro-accepteurs

Des groupes terminaux électro-accepteurs très variés ont été étudiés [1a, 70]. Cependant, il semble que les structures de type D- π -D et D- π -A- π -D sont généralement plus efficaces que les systèmes A- π -A et A- π -D- π -A, comme illustré dans la Figure 23. En substituant un groupement SO_2CF_3 par un groupement NHex_2 la section efficace est passé de 83 à 1200 GM [68].

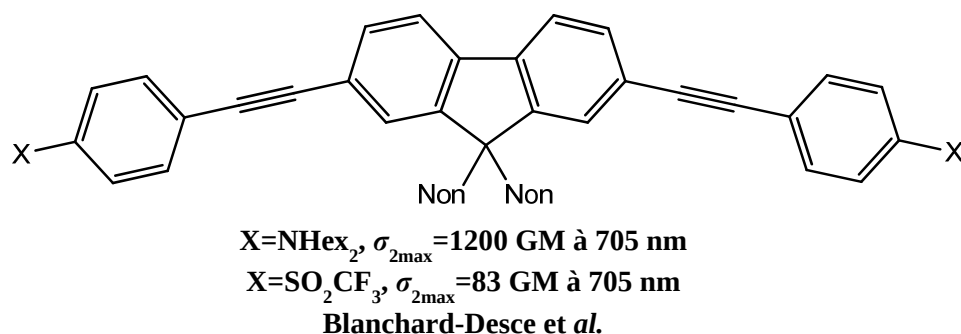


Figure 23 : Exemples de chromophores ADP de structure A- π -A et D- π -D.

I.4.2. Le cœur central et la longueur du système π conjugué

Deux paramètres principaux concernant le cœur central sont à prendre en compte : les propriétés électroniques accepteur/donneur et la nature du système conjugué (longueur, rigidité, nature...).

Propriétés électro-donneur/accepteur du cœur central

La modification du cœur central, en augmentant sa capacité à donner ou à accepter des électrons, est une approche largement explorée dans l'optimisation des propriétés d'ADP de fluorophores. Par exemple le remplacement d'un hydrogène par un groupement électro-attracteur, comme le groupement nitrile, sur un cœur central pour aboutir à des systèmes D- π -A- π -D, a conduit à une augmentation d'un facteur 3 de la section efficace d'ADP d'un dérivé quadripolaire de bis(styryl)benzène ^[60, 63b] et d'un facteur 5 pour un dérivé d'anthracène ^[71] (Figure 24).

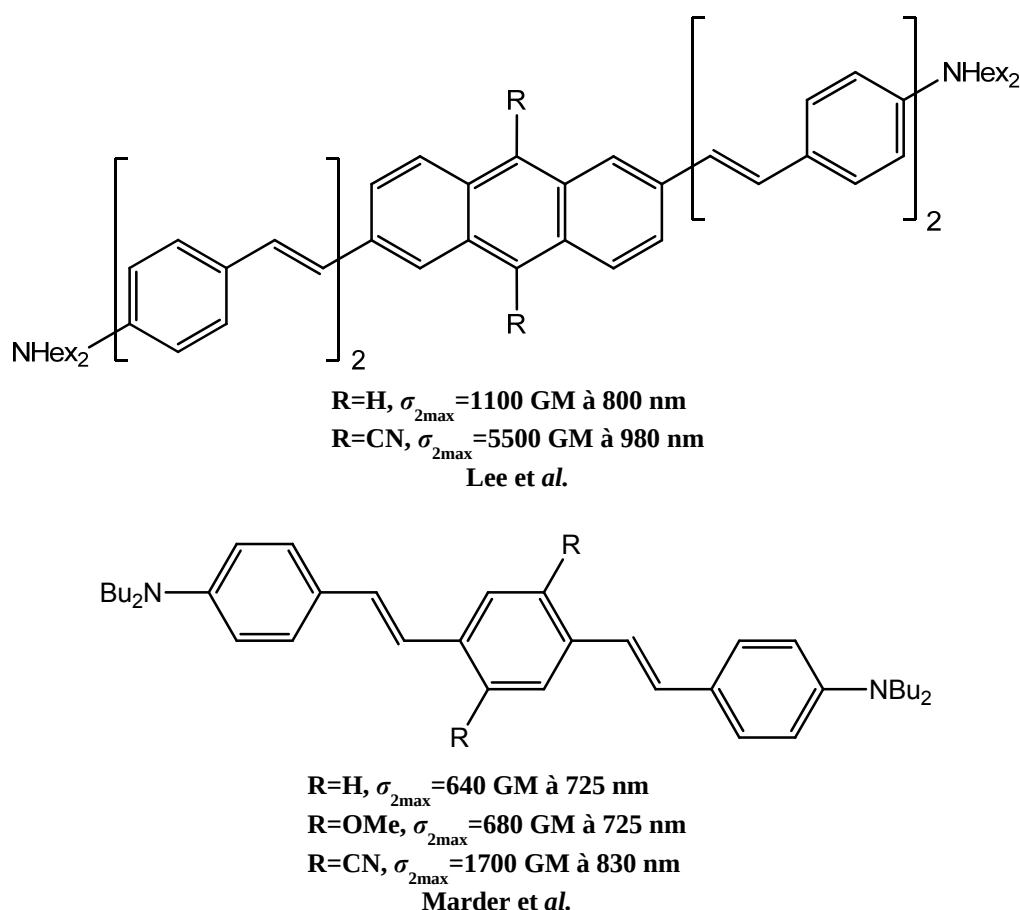


Figure 24 : Structures des chromophores d'ADP dérivés d'anthracène (en haut) et dérivés de bis(styryl)benzène (en bas)

En revanche, des chromophores du type D- π -D- π -D ne sont pas notablement plus efficaces que les systèmes comportant un cœur central non électroactif.

Enfin les chromophores du type D- π -A- π -D avec un cœur déficient en électrons présentent généralement des sections efficaces d'ADP plus fortes que ceux de type A- π -D- π -A^{[8] [23a]}.

La nature du système conjugué

Le couplage électronique au sein d'un système conjugué est optimisé lorsque le système π possède une géométrie plane, ce qui maximise le chevauchement des orbitales π et améliore la section efficace d'ADP. L'absorption à deux photons est donc sensible à la conformation du cœur central. Par exemple le remplacement d'un cœur central biphenyle par un fluorényle (ou la liaison centrale est bloquée et maintient le système plan) induit une augmentation de la section efficace d'ADP de 275 à 400 GM (Figure 25)^[72].

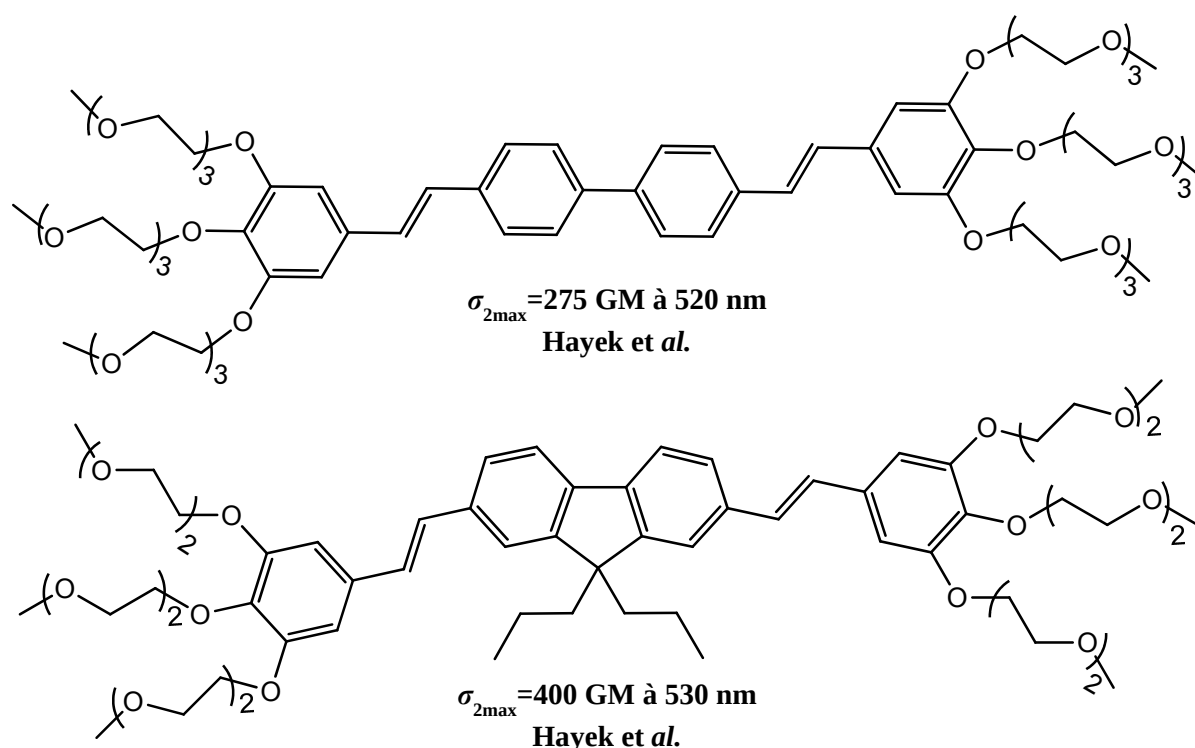


Figure 25 : Structures des chromophores d'ADP dérivés de biphenyle (en haut) et dérivés de fluorényle (en bas)

La longueur du système π conjugué a un effet très important sur l'efficacité de l'absorption à deux photons. Par exemple en augmentant la longueur du système conjugué d'un dérivé de dihydrophénanthrène, il est possible de doubler la valeur de la section efficace d'ADP (Figure 26).^[65f]

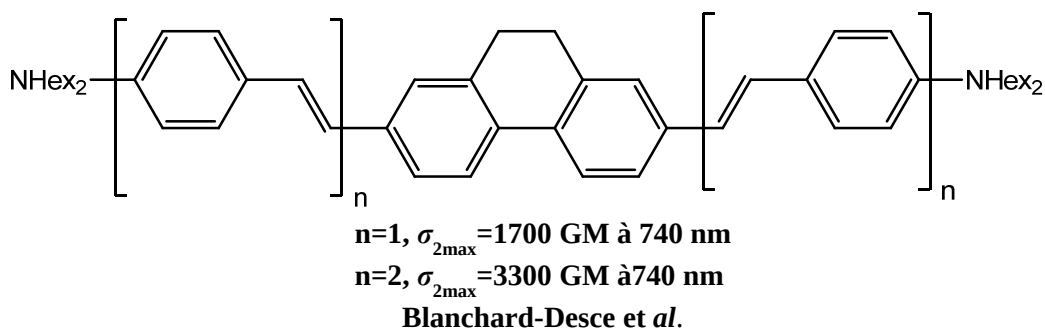


Figure 26 : Structures des chromophores d'ADP dérivés de dihydrophénanthrène.

La nature du système π a aussi un effet sur l'efficacité de l'ADP. En général les systèmes comportant une double liaison ($-C=C-$) sont plus conjugués que les systèmes similaires comprenant une triple liaison ($-C\equiv C-$)^[73]. Cependant, cela n'a pas un effet important sur l'ADP (Figure 27). Par exemple, le σ_2 du dérivé de fluorényle avec une double liaison est de 8 % supérieure celui de la même molécule mais avec triple liaison, et dans le cas du biphényle il est de 15 % supérieure (l'erreur expérimentale dans la détermination de la valeur σ_2 est d'environ 10 %)^[68].

Lorsque l'encombrement stérique peut jouer un rôle important, comme dans le cas de porphyrines méso-liées, les systèmes acétyléniques ont tendance à être plus conjugués, car contrairement à la liaison vinyène, un acétylène ne peut pas trop se tordre.^[74]

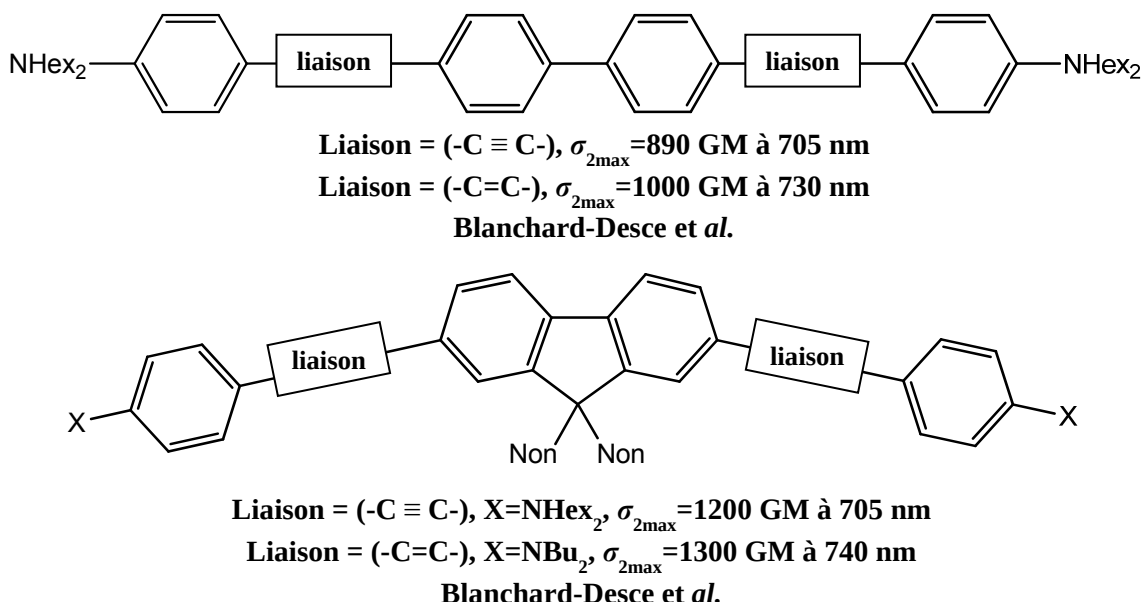


Figure 27 : Structures des chromophores ADP avec différents types de liaison

Pour les processus liés à l'ONL, des systèmes conjugués (selon Lewis) ne sont pas forcément nécessaires et d'excellents fluorophores multiphotoniques ont été obtenus en utilisant des systèmes pseudo-conjugués ^[75].

Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur l'ingénierie moléculaire de fluorophores pour l'ADP et ses applications biologiques. Une thèse précédente a permis de mettre au point de bons fluorophores ADP émettant dans le bleu. Le but de notre travail de thèse sera de concevoir de nouveaux fluorophores présentant à la fois une bonne section efficace d'ADP, une solubilité dans l'eau importante, une émission décalé vers le rouge ainsi qu'une bonne photostabilité afin d'aboutir à de nouveaux colorants utilisables en microscopie de fluorescence par excitation bi-photonique dans des milieux biologiques.

Dans une première partie, nous décrirons la synthèse et la caractérisation de nouveaux fluorophores unidimensionnels symétriques basés sur un cœur dicéto-pyrrolopyrrole (DPP) aquo-soluble relié à des systèmes organiques électro-actifs par différents liens conjugués. Dans une seconde partie, nous présenterons des modifications sur les fluorophores précédents de manière à pouvoir les conjuguer à des molécules d'intérêt biologique, comme des protéines. Dans une troisième partie, nous décrirons la mise au point de nouvelles sondes multimodales pour la microscopie corrélative biphotonique/électronique et pour l'imagerie corrélative IRM/fluorescence.

REFERENCES

- [1] a) F. Terenziani, C. Katan, E. Badaeva, S. Tretiak, M. Blanchard-Desce, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4641-4678; b) R. W. Boyd, *Elsevier*, **2008**.
- [2] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, G. Weinreich, *Phys. Rev. Lett.*, **1961**, *7*, 118-119.
- [3] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.*, **1961**, *7*, 229-231.
- [4] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.*, **1931**, *401*, 273-294.
- [5] M. A. Albota, C. Xu, W. W. Webb, *Appl. Opt.*, **1998**, *37*, 7352-7356.
- [6] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.*, **1996**, *13*, 481-491.
- [7] M. Sheik-Bahae, A. A. Said, T. H. Wei, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, *IEEE J. Quantum Electronics*, **1990**, *26*, 760-769.
- [8] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3244-3266.
- [9] Nag, Amit, D. E. Arijit Kumar, Goswami, Debabrata, *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.*, **2009**, *42*, 065103.
- [10] L. Tian, Z. Hu, P. Shi, H. Zhou, J. Wu, Y. Tian, Y. Zhou, X. Tao, M. Jiang, *J. Lumin.*, **2007**, *127*, 423-430.
- [11] K. Kamada, K. Matsunaga, A. Yoshino, K. Ohta, *J. Opt. Soc. Am. B*, **2003**, *20*, 529-537.
- [12] M. Drobizhev, Y. Stepanenko, Y. Dzenis, A. Karotki, A. Rebane, P. N. Taylor, H. L. Anderson, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 7223-7236.
- [13] N. S. Makarov, M. Drobizhev, A. Rebane, *Opt. Express*, **2008**, *16*, 4029-4047.
- [14] S. Kawata, Y. Kawata, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1777-1788.
- [15] E. Walker, P. M. Rentzepis, *Nat. Photonics*, **2008**, *2*, 406-408.
- [16] M. Rumi, S. Barlow, J. Wang, J. W. Perry, S. R. Marder, *Adv. Polym. Sci.*, **2008**, *213*, 1-95.
- [17] Y. Ren, X.-Q. Yu, D.-J. Zhang, D. Wang, M.-L. Zhang, G.-B. Xu, X. Zhao, Y.-P. Tian, Z.-S. Shao, M.-H. Jiang, *J. Mater. Chem.*, **2002**, *12*, 3431-3437.
- [18] Z.-Q. Li, M. Siklos, N. Pucher, K. Cicha, A. Ajami, W. Husinsky, A. Rosspeintner, E. Vauthey, G. Gescheidt, J. Stampfl, R. Liska, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2011**, *49*, 3688-3699.
- [19] C. W. Spangler, *J. Mater. Chem.*, **1999**, *9*, 2013-2020.
- [20] J. E. Ehrlich, X. L. Wu, I. Y. S. Lee, Z. Y. Hu, H. Rockel, S. R. Marder, J. W. Perry, *Opt. Lett.*, **1997**, *22*, 1843-1845.
- [21] S. B. Brown, E. A. Brown, I. Walker, *Lancet Oncol.*, **2004**, *5*, 497-508.
- [22] P. K. Frederiksen, S. P. McIlroy, C. B. Nielsen, L. Nikolajsen, E. Skovsen, M. Jorgensen, K. V. Mikkelsen, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 255-269.

- [23] a) S. Achelle, P. Couleaud, P. Baldeck, M.-P. Teulade-Fichou, P. Maillard, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2011, 1271-1279; b) H. Ke, W. Li, T. Zhang, X. Zhu, H.-L. Tam, A. Hou, W. J. Kwong Daniel, W.-K. Wong, *Dalton Trans.*, **2003**, 41, 4536-4543; c) M. A. Oar, J. M. Serin, W. R. Dichtel, J. M. J. Frechet, T. Y. Ohulchanskyy, P. N. Prasad, *Chem. Mater.*, **2005**, 17, 2267-2275.
- [24] C. Fowley, N. Nomikou, A. P. McHale, P. A. McCarron, B. McCaughan, J. F. Callan, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 6456-6462.
- [25] a) E. B. Brown, J. B. Shear, S. R. Adams, R. Y. Tsien, W. W. Webb, *Biophys. J.*, **1999**, 76, 489-499; b) T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *PNAS*, **1999**, 96, 1193-1200.
- [26] a) M. Lovett-Barron, G. F. Turi, P. Kaifosh, P. H. Lee, F. Bolze, X.-H. Sun, J.-F. Nicoud, B. V. Zemelman, S. M. Sternson, A. Losonczy, *Nat. Neurosci.*, **2012**, 15, 423-430; b) S. Gug, S. Charon, A. Specht, K. Alarcon, D. Ogden, B. Zietz, J. Léonard, S. Haacke, F. Bolze, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *ChemBioChem*, **2008**, 9, 1303-1307.
- [27] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J.-F. Nicoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9525-9529.
- [28] M. Minsky, *Scanning*, **1988**, 10, 128-138.
- [29] F. Helmchen, W. Denk, *Nat. methods*, **2005**, 2, 932-940.
- [30] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science*, **1990**, 248, 73-76.
- [31] a) B. Lendvai, T. Zelles, B. Rozsa, E. S. Vizi, *Brain Res. Bull.* **2003**, 59, 257-260; b) B. Sabatini, K. Svoboda, *Nature*, **2000**, 408, 589-593.
- [32] a) A. K. De, N. N. Mutyal, D. Goswami, *Curr. Sci.*, **2011**, 100, 294-296; b) J.-L. Li, M. Gu, *Biomaterials*, **2010**, 31, 9492-9498; c) K. Wolf, I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E.-B. Brocker, P. Friedl, *J. Cell Biol.*, **2003**, 160, 267-277.
- [33] a) O. Acuto, *Sci STKE*, **2003**, 2003, PE28; b) G. Phan Tri, A. Bullen, *Immunol. Cell. Biol.*, **2010**, 88, 438-444.
- [34] a) X. Liu, P. Wang, J. Fu, D. Lv, D. Chen, Y. Li, W. Ma, *J. Microsc.*, **2011**, 241, 212-218; b) M. Wühr, N. D. Obholzer, S. G. Megason, H. W. Detrich, 3rd, T. J. Mitchison, *Methods Cell Biol.*, 2011, 101, 1-18.
- [35] F. Helmchen, W. Denk, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2002**, 12, 593-601.
- [36] K. König, *Journal of microscopy*, **2000**, 200, 83-104.
- [37] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 1369-1377.
- [38] C. Soeller, M. B. Cannell, *Microsc. Res. Tech.*, **1999**, 47, 182-195.
- [39] M. I. N. Gu, C. J. R. Sheppard, *Journal of microscopy*, **1995**, 177, 128-137.
- [40] J. M. Squirrell, D. L. Wokosin, J. G. White, B. D. Bavister, *Nat. Biotechnol.*, **1999**, 17, 763-767.
- [41] A. Dixon, *Aust. J. Phys.*, **1998**, 51, 729-750.

- [42] Z. F. Mainen, M. Maletic-Savatic, S. H. Shi, Y. Hayashi, R. Malinow, K. Svoboda, *Methods*, **1999**, 18, 231-239, 181.
- [43] D. Renker, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A*, **2009**, 598, 207-212.
- [44] R. Rusack, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A*, **1998**, 408, 181-190.
- [45] a) E. Beaupaire, M. Oheim, J. Mertz, *Opt. Commun.*, **2001**, 188, 25-29; b) M. Oheim, E. Beaupaire, E. Chaigneau, J. Mertz, S. Charpak, *J. Neurosci. Methods*, **2001**, 111, 29-37.
- [46] M. J. Booth, M. A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A*, **2002**, 99, 5788-5792.
- [47] a) C. Soeller, M. B. Cannell, *Pflugers Arch*, **1996**, 432, 555-561; b) J. Squier, M. Muller, *Rev. Sci. Instrum.*, **2001**, 72, 2855-2867.
- [48] H. Wang, S. Backus, Z. Chang, R. Wagner, K. Kim, X. Wang, D. Umstadter, T. Lei, M. Murnane, H. Kapteyn, *J. Opt. Soc. Am. B*, **1999**, 16, 1790-1794.
- [49] P. Theer, M. T. Hasan, W. Denk, *Opt. Lett.*, **2003**, 28, 1022-1024.
- [50] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, J. N. D. Kerr, F. Helmchen, *Nat. Meth.*, **2004**, 1, 31-37.
- [51] A. Mizrahi, J. C. Crowley, E. Shtoyerman, L. C. Katz, *J. Neurosci*, **2004**, 24, 3147-3151.
- [52] S. Sakadzic, E. Roussakis, M. A. Yaseen, E. T. Mandeville, V. J. Srinivasan, K. Arai, S. Ruvinskaya, A. Devor, E. H. Lo, S. A. Vinogradov, D. A. Boas, *Nat. Meth.*, **2010**, 7, 755-759.
- [53] M. Mank, A. F. Santos, S. Drenberger, T. D. Mrsic-Flogel, S. B. Hofer, V. Stein, T. Hendel, D. F. Reiff, C. Levelt, A. Borst, T. Bonhoeffer, M. Hubener, O. Griesbeck, *Nat. Meth.*, **2008**, 5, 805-811.
- [54] T. Pons, J. Mertz, *Images de la physique*, **2005**, 159-165.
- [55] C. Xu, R. M. Williams, W. Zipfel, W. W. Webb, *Bioimaging*, **1996**, 4, 198-207.
- [56] H. M. Kim, M. J. An, J. H. Hong, B. H. Jeong, O. Kwon, J.-Y. Hyon, S.-C. Hong, K. J. Lee, B. R. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 120, 2263-2266.
- [57] E. Niggli, D. W. Piston, M. S. Kirby, H. Cheng, D. R. Sandison, W. W. Webb, W. J. Lederer, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **1994**, 266, C303-C310.
- [58] W. L. Peticolas, J. P. Goldsborough, K. E. Rieckhoff, *Phys. Rev. Lett.*, **1963**, 10, 43-45.
- [59] J. E. Ehrlich, X. L. Wu, I. Y. S. Lee, Z. Y. Hu, H. Röckel, S. R. Marder, J. W. Perry, *Opt. Lett.*, **1997**, 22, 1843-1845.
- [60] M. Albota, D. Beljonne, 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, M. Rumi, G. Subramaniam, W. W. Webb, X.-L. Wu, C. Xu, *Science*, **1998**, 281, 1653-1656.
- [61] B. A. Reinhardt, L. L. Brott, S. J. Clarson, A. G. Dillard, J. C. Bhatt, R. Kannan, L. Yuan, G. S. He, P. N. Prasad, *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 1863-1874.
- [62] L. Beverina, J. Fu, A. Leclercq, E. Zojer, P. Pacher, S. Barlow, E. W. Van Stryland, D. J. Hagan, J.-L. Brédas, S. R. Marder, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 7282-7283.

- [63] a) S.-J. Chung, S. Zheng, T. Odani, L. Beverina, J. Fu, L. A. Padilha, A. Biesso, J. M. Hales, X. Zhan, K. Schmidt, A. Ye, E. Zojer, S. Barlow, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, Y. Yi, Z. Shuai, G. A. Pagani, J.-L. Brédas, J. W. Perry, S. R. Marder, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14444-14445; b) S. J. K. Pond, M. Rumi, M. D. Levin, T. C. Parker, D. Beljonne, M. W. Day, S. R. Marder, J. W. Perry, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *106*, 11470-11480.
- [64] a) S.-J. Chung, K.-S. Kim, T.-C. Lin, G. S. He, J. Swiatkiewicz, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 10741-10745; b) R. Kannan, G. S. He, T.-C. Lin, P. N. Prasad, R. A. Vaia, L.-S. Tan, *Chem. Mater.*, **2003**, *16*, 185-194.
- [65] a) R. Anemian, P. L. Baldeck, C. Andraud, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **2002**, 335-342; b) A. Hayek, F. d. r. Bolze, C. Bourgogne, P. L. Baldeck, P. Didier, Y. Arntz, Y. Mély, J.-F. o. Nicoud, *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 9112-9119; c) C. Katan, S. Tretiak, M. H. V. Werts, A. J. Bain, R. J. Marsh, N. Leonczek, N. Nicolaou, E. Badaeva, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 9468-9483; d) E. W. Seo, J. H. Han, C. H. Heo, J. H. Shin, H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 12388-12394; e) O. Varnavski, X. Yan, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, T. Goodson, *J. Phys. Chem. C*, **2006**, *111*, 149-162; f) L. Ventelon, S. Charier, L. Moreaux, J. Mertz, M. Blanchard-Desce, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2098-2101.
- [66] L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, *59*, 96-103.
- [67] a) I. G. Binev, R. B. Kuzmanova, J. Kaneti, I. N. Juchnovski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1982**, 1533-1536; b) N. S. Isaacs, *Longman Scientific & Technical*, **1995**.
- [68] O. Mongin, L. Porrès, M. Charlot, C. Katan, M. Blanchard-Desce, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 1481-1498.
- [69] Y. Tian, C.-Y. Chen, C.-C. Yang, A. C. Young, S.-H. Jang, W.-C. Chen, A. K. Y. Jen, *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 1977-1987.
- [70] a) G. S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng, P. N. Prasad, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 1245-1330; b) M. Rumi, S. Barlow, J. Wang, J. Perry, S. Marder, S. Marder, K.-S. Lee, *Springer*, **2008**, 213, 1-95.
- [71] S. K. Lee, W. J. Yang, J. J. Choi, C. H. Kim, S.-J. Jeon, B. R. Cho, *Org. Lett.*, **2004**, *7*, 323-326.
- [72] A. Hayek, F. Bolze, J.-F. Nicoud, P. L. Baldeck, Y. Mely, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, *5*, 102-106.
- [73] J. O. Morley, *Int. J. Quantum Chem.*, **1993**, *46*, 19-26.
- [74] H. L. Anderson, *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 972-981.
- [75] A. Hayek, J.-F. Nicoud, F. Bolze, C. Bourgogne, P. L. Baldeck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6466-6469.

CHAPITRE II

NOUVEAUX FLUOROPHORES POUR LA MICROSCOPIE BI-PHOTONIQUE BASES SUR UN CŒUR DICETOPYRROLOPYRROLE

II.1. INGENIERIE MOLECULAIRE DE NOUVEAUX CHROMOPHORES ABSORBANTS BIPHOTONIQUES

Dans ce chapitre, nous décrivons notre travail portant sur la conception et la synthèse de chromophores unidimensionnels centrosymétriques (*Figure 28*) utilisables comme fluorophores en microscopie par excitation à deux photons (MDP). Notre laboratoire travaille sur ce type de molécules depuis une dizaine d'année. Une des molécules mise au point au laboratoire basée sur un cœur central dérivé du fluorène (*Figure 25*) s'est avérée être très efficace en microscopie biphotonique. Elle présente une valeur de σ_2 de 400 GM à 740 nm et fluoresce dans le bleu à 450 nm. Ceci peut présenter un problème lors de l'étude de tissus épais, le bleu étant très absorbé et diffusé par les tissus vivants. Notre but a donc été de décaler l'émission vers le rouge ; pour cela nous avons choisi de préparer de nouveaux chromophores dans lesquels le cœur central est dérivé du système 1,4-dicéto-3,6-biphénylpyrrolo[3,4,c]pyrrole (DPP) et est lié à des groupements périphériques électroactifs par différents systèmes conjugués. En effet de nombreux dérivés de DPP sont connus pour présenter une intense fluorescence dans le rouge.

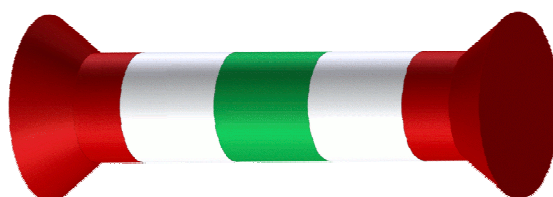


Figure 28: Schéma général des fluorophores centrosymétriques étudiés.

Ces chromophores peuvent être décomposés en trois parties principales:

- le cœur rigide en vert (DPP dans le cas qui nous intéresse ici)
- les groupes terminaux électroactifs en rouge
- les systèmes conjugués en blanc



II.1.1. Le cœur dicétopyrrolopyrrole (DPP)

En 1974, Farnum, *et al.* ^[1] ont annoncé la tentative de synthèse de 2-azétinones selon la réaction décrite dans la *Schéma 1*. La réaction n'a pas conduit au produit désiré mais à un dérivé dipyrrolique nommé dicétopyrrolopyrrole ou DPP qui a été isolé avec un rendement variant de 5 à 20 %.

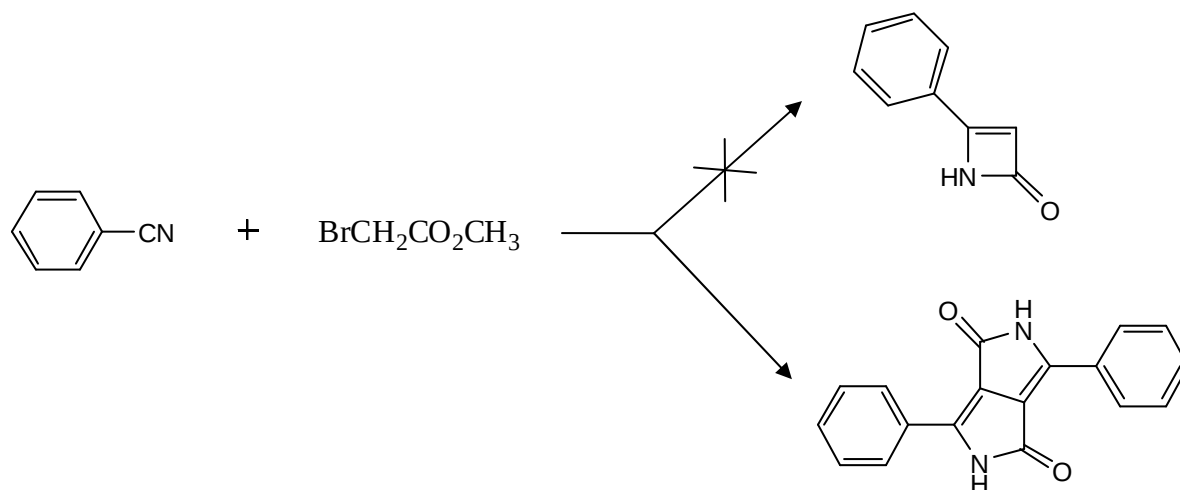


Schéma 1 : Préparation de DPP (Farnum, *et al.* 1974)

En 1980, les chercheurs de Ciba-Geigy ont développé cette réaction et ont réalisé une compilation de réactions menant elles aussi aux dérivés de DPP ^[2]. L'attention des chercheurs de Ciba-Geigy a été attirée par les propriétés particulières de cette molécule, comme leur forte coloration rouge et leur forte insolubilité, qui en faisaient d'excellents candidats pour le développement de pigments. Ainsi, en 1986 les premiers pigments à base de DPP ont été développés et mis sur le marché pour des applications à la coloration de peintures, plastiques, fibres ou encore des encres. ^[3] En plus du rapport original de Farnum ^[1], plusieurs méthodes ont été décrites pour la synthèse efficace de pigments DPP. Parmi toutes ces méthodes, celle qui utilise un ester succinique est considérée comme la plus efficace ^[4] tant au niveau de la simplicité de synthèse que des rendements. Dans une première étape, l'ester succinique est condensé sur un nitrile aromatique en présence d'une base forte (pseudo-condensation de Stobbe) pour obtenir le dérivé de DPP désiré avec un rendement supérieur à 60 % (*Schéma 2*). L'étape clé du mécanisme est la formation de l'ester de pyrrolinone à partir de l'énaminoester initialement formé. Ce dernier peut ensuite réagir avec une autre molécule de benzonitrile en conditions basiques. La fermeture ultérieure du cycle permet d'obtenir le diphenyl-DPP.

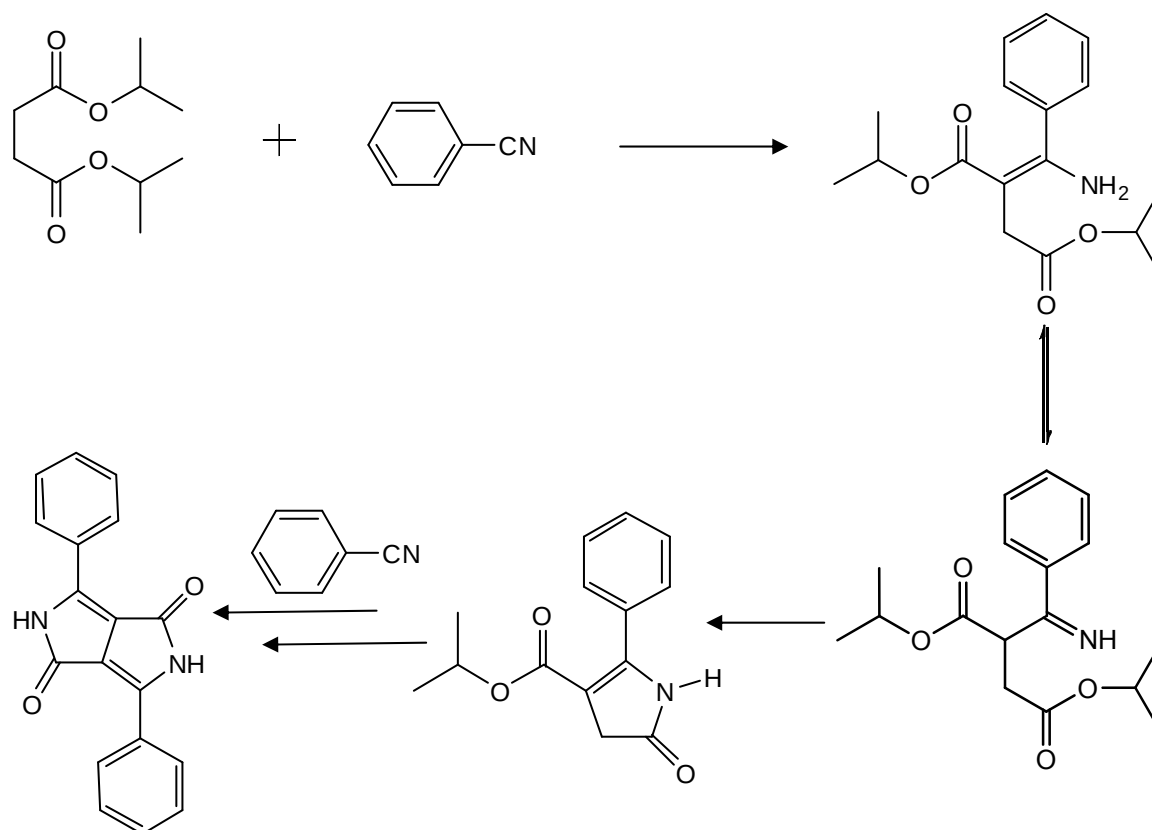


Schéma 2 : Préparation du DPP à partir de l'ester succinique.

Le dicéto-pyrrolo-pyrrole (DPP) est un système bicyclique formé de deux unités lactames contenant 8 électrons π . Les dérivés de DPP ont typiquement des points de fusion de plus de 350° C, ainsi qu'une solubilité très faible dans la plupart des solvants, en raison de liaisons hydrogène intermoléculaires fortes dues aux groupes N-H et C=O. De nombreux dérivés alkylés sur les atomes d'azote pyrroliques ont été décrits, induisant une amélioration de la solubilité dans des solvants organiques grâce à la suppression des liaisons hydrogène intermoléculaires. Ces dérivés solubles ont permis des applications dans le domaine du photovoltaïque ^[5], de l'électroluminescence ^[6] ou encore pour des colorants lasers ^[7].

Les dérivés de DPP présentent en effet une forte luminescence avec un maximum d'émission entre 500 et 600 nm ^[8]. On remarque que peu de dérivés de DPP hydrosolubles sont décrits ; ces derniers consistent principalement en des polymères hydrosolubles contenant des unités DPP qui restent hydrophobes ^[9]. Malgré leurs propriétés de fluorescence très intéressantes, peu de travaux sur l'imagerie de fluorescence utilisant des sondes basées sur le DPP sont décrits ^[10]. D'autre part, des systèmes basés sur le DPP ont été récemment étudiés pour leurs propriétés optiques non-linéaires, tant théoriquement qu'expérimentalement ^[11].

Une nouveauté notable présentée par le cœur DPP est la mise en évidence de plusieurs chemins de conjugaison que l'on peut illustrer par des formes mésomères mettant en jeux les deux fonctions carbonyles ou les deux doubles liaisons du cœur.

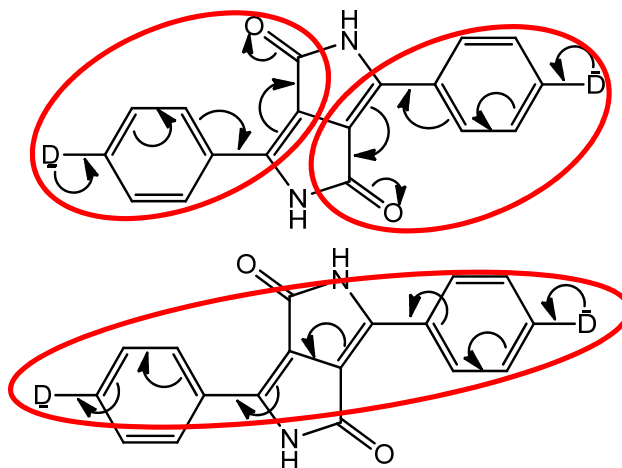


Figure 29 : Chemins de conjugaison possibles dans un dérivé DPP

Quelques applications biologiques de fluorophores basés sur des dérivés DPP ont été décrites, par exemple pour l'imagerie NIR *in vivo* ^[12] ou pour étudier l'élargissement de chaînes d'ADN ^[13]. Néanmoins, à notre connaissance, aucune utilisation de dérivés de DPP monomériques n'a été reportée en microscopie de fluorescence excitée à deux photons (MEDP) sur des cellules vivantes. Nous allons ainsi présenter l'ingénierie moléculaire (conception et synthèse) et la caractérisation de nouvelles séries de dérivés du DPP solubles dans l'eau, ainsi que leur utilisation en microscopie confocale et en microscopie par excitation à deux photons sur cultures de cellules HeLa vivantes. Pour rendre les dérivés DPP compatibles avec les systèmes biologiques, nous devons au préalable les rendre solubles dans l'eau. Pour ce faire, nous avons choisi d'introduire des chaînes oligoéthylèneglycol (OEG) directement sur le cœur DPP. Ces cœurs DPP ont ensuite été combinés à différents systèmes périphériques électroactifs.

II.1.2. Systèmes périphériques électroactifs et systèmes conjugués

Nous avons étudié l'effet de différents systèmes électroactifs comme des systèmes électro-donneurs tels que l'anisole (A), le dérivé tri-OEG de l'acide gallique (C) et des dérivés de l'aniline (D et E) ou électro accepteur comme la pyridine (B) (Figure 30).

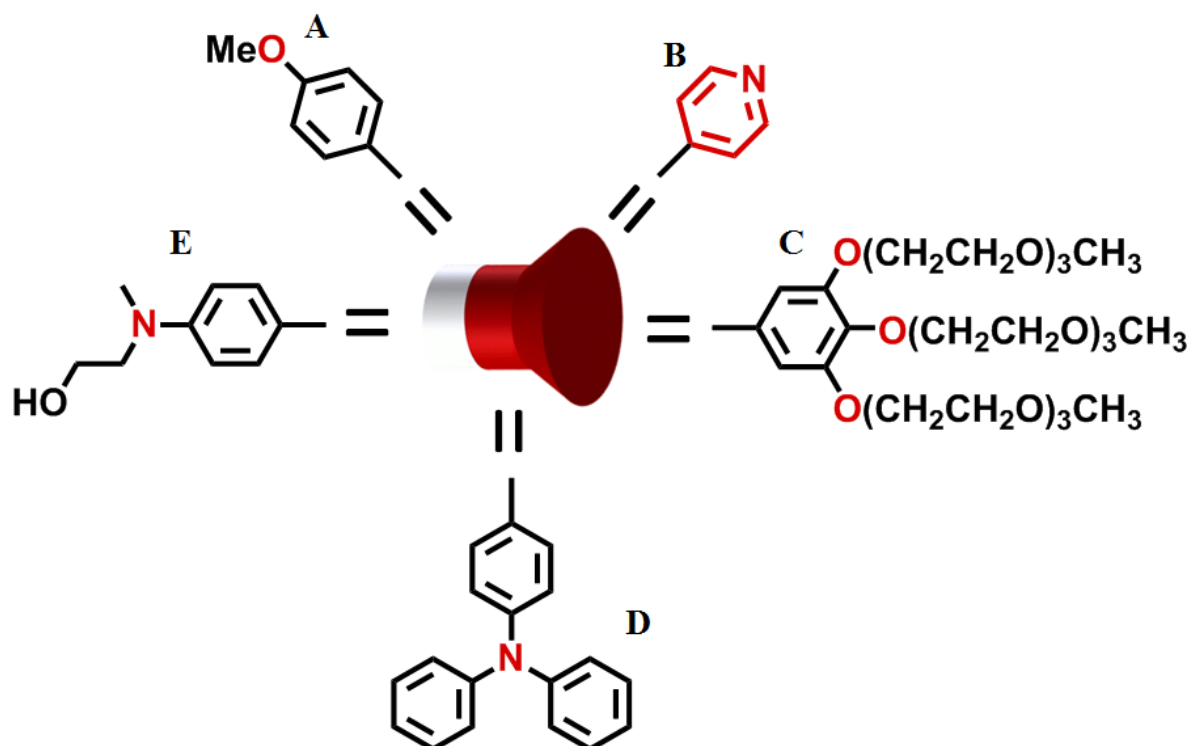


Figure 30 : Groupes électroactifs testés sur les fluorophores à cœur DPP.

Ces groupements électroactifs ont été greffés sur le cœur DPP via différents systèmes conjugués et participent ainsi à la délocalisation des électrons tout au long du système quasi unidimensionnel. Afin de moduler les propriétés photophysiques de ces fluorophores, différents systèmes conjugués ont été introduits entre les groupes électroactifs et le cœur DPP: phényle, stilbène, tolane et biphényle (Figure 31).

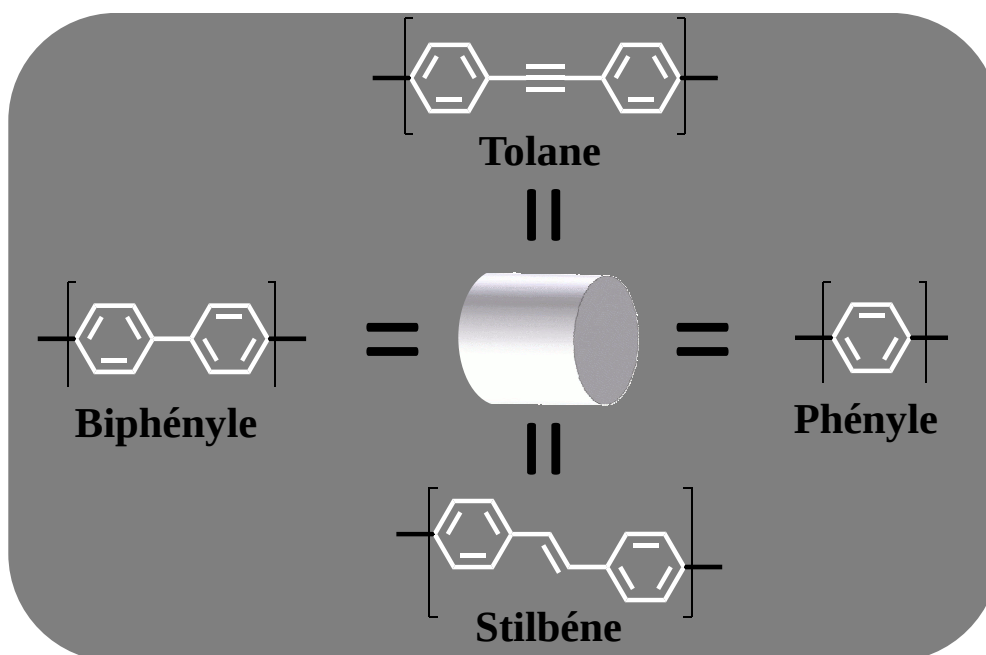


Figure 31 : Différents systèmes conjugués introduits pour les dérivés de DPP.

Les synthèses de ces différents systèmes conjugués sont toutes basées sur des couplages pallado-catalysés:

- Couplage de *Suzuki* pour former une liaison simple C–C entre 2 cycles aromatiques, conduisant à un motif biphényle.
- Couplage de *Heck*, pour introduire une double liaison (C=C), conduisant à un motif stilbène.
- Couplage de *Sonogashira*, pour introduire une liaison triple (C≡C,) conduisant à un motif tolane.

II.2. SYNTHÈSES ET CARACTÉRISATIONS PHYSICOCHIMIQUES

II.2.1. DPPs avec un système conjugué basé sur un phényle

Les chromophores de cette série sont les DPPs les plus simples (et par là les plus petits) des systèmes préparés. Ces DPPs sont préparés en utilisant la méthode de l'ester succinique développée par Ciba-Geigy Ltd ^[4b, 14]. Ainsi, la réaction du di-isopropyl succinate avec les nitriles aromatiques **1-4** en milieu basique conduit aux DPPs **6-9** (Schéma 3).

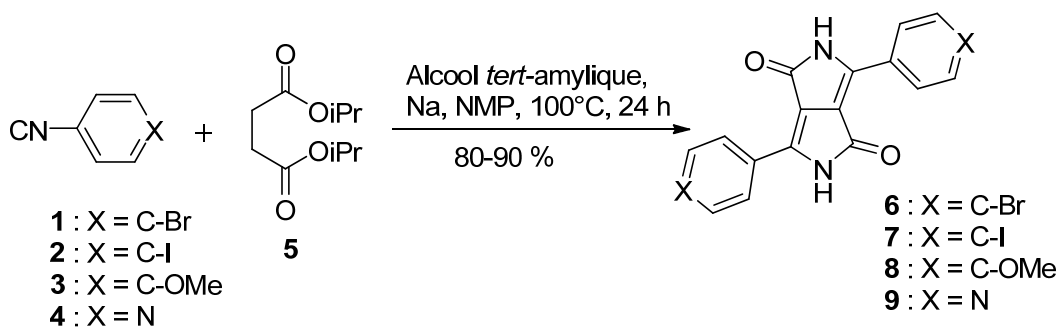


Schéma 3 : Préparations des DPPs 6-9

Ces DPPs présentent tous une très faible solubilité dans la plupart des solvants organiques classiques, ce qui permet une isolation facile par filtration et une purification par lavages successifs. Ils ont été utilisés sans autre purification ni caractérisation.

Ces colorants étant destinés à des applications en imagerie biologique, il est nécessaire de les rendre solubles dans l'eau. Pour ce faire, nous avons greffé des chaînes oligoéthylèneglycol (OEG) qui sont bien connues pour augmenter la solubilité dans l'eau, mais aussi dans les solvants organiques, facilitant ainsi le travail de synthèse et de purification. Cette méthode est efficace, simple de mise en œuvre et les molécules obtenues restent neutres contrairement à celles obtenues par les autres méthodes qui consistent à introduire des cations ou anions. Une réaction de substitution nucléophile est donc effectuée afin de remplacer les hydrogènes portés par les atomes d'azote du DPP par des chaînes OEG. Les DPPs **6-9** ont été traités en conditions basiques avec du 1-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy)-éthane ou du 1-bromo-2-(2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy)-éthane dans la N-méthylpyrrolidone (NMP) jusqu'à dissolution complète des solides initialement en suspension (*Schéma 4*). Les produits bruts ont ensuite été purifiés par chromatographie sur colonne de silice.

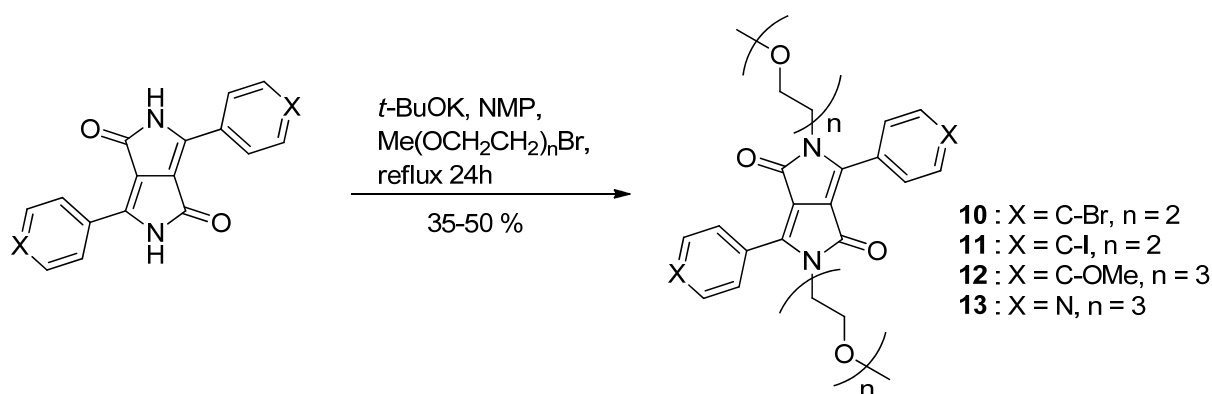


Schéma 4 : Greffage des chaînes OEG

Les DPPs disubstitués **10-12** ont été obtenus à partir de **6-8** tandis que la réaction avec le di-pyridyl DPP **9** a permis l'isolation des dérivés mono- et di-N-substitués **13** et **14**, respectivement (*Figure 32*).

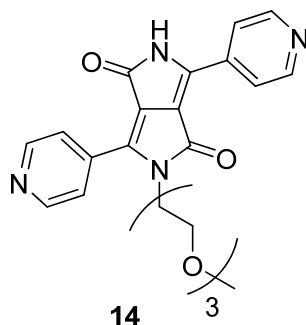


Figure 32 : Structure du dérivé di-pyridylDPP mono-N-substitué

Tous les nouveaux produits ont été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C , par spectrométrie de masse à haute résolution, par spectroscopie IR et leurs points de fusion ont été déterminés. Par ailleurs, la solubilité dans l'eau de ces nouveaux colorants a été déterminée en utilisant la méthode turbidimétrique^[15]. Elle est de plus de 20 mM (12 g/L) pour **13**, 10 mM (4,5 g/L) pour **14** et 3 mM (2 g/L) pour **12**.

II.2.2. DPP contenant un système conjugué basé sur un motif biphényle

Le couplage de Suzuki

Pour obtenir le motif biphényle, le couplage de Suzuki est une méthode de choix pour former une liaison σ entre deux phényles. Elle a été découverte conjointement par Suzuki et Miyaura en 1979^[16]. Elle permet, à l'aide d'un catalyseur à base de palladium, de réaliser un couplage carbone-carbone entre un halogénure d'aryle (ou un tosylate) et un acide ou ester boronique aromatique en présence d'une base (*Schéma 5*).

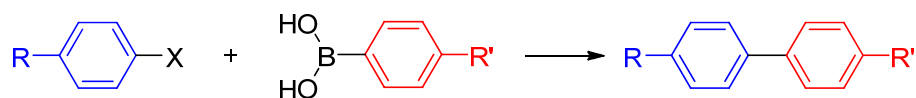


Schéma 5 : Synthèse d'un biphényle par la réaction de Suzuki.

Le cycle catalytique couramment admis pour la réaction de Suzuki (*Figure 33*) fait intervenir les trois étapes suivantes:

(a) Addition oxydante de RX sur le métal.

- (b) Transmétallation, c'est-à-dire transfert du ligand carboné R' du bore sur le Pd^{II} par substitution de X.
- (c) Elimination réductrice des ligands R et R' de Pd^{II} pour donner le produit de couplage et la régénération de l'espèce catalytique.

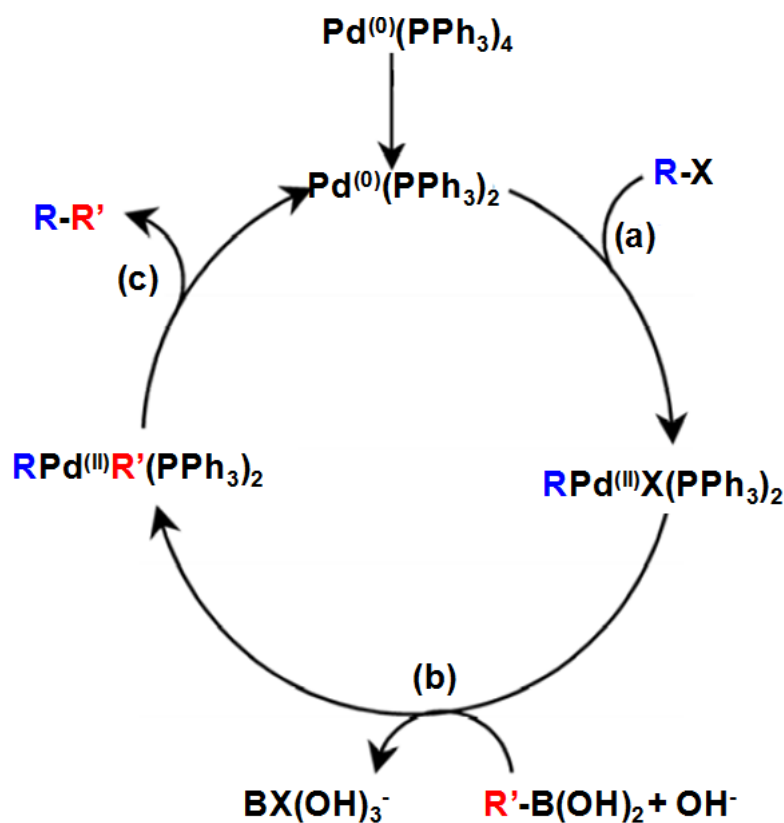


Figure 33 : Mécanisme proposé pour la réaction de Suzuki

Nous avons réalisé un couplage de Suzuki entre le cœur DPP dibromé **10** et l'acide 4-méthoxyphénylboronique **15** commercial (Schéma 6). Ceci conduit au chromophore **16** comportant un système biphenyle à la place du phényle du composé **10**.

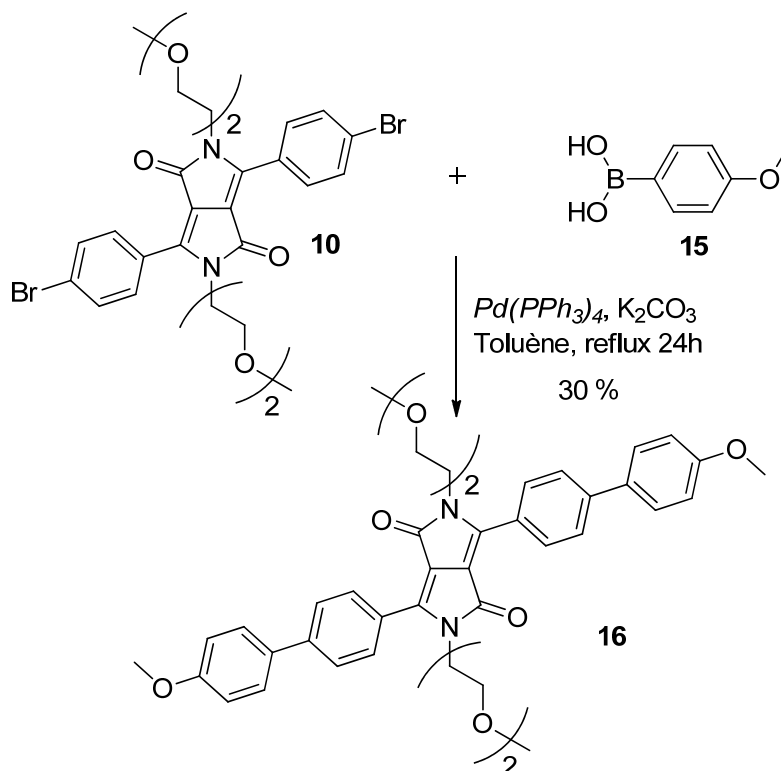


Schéma 6 : Synthèse du chromophore **16** par couplage de Suzuki.

La solubilité dans l'eau de **16** est 60 μM (42 mg/L). Cette diminution de la solubilité aqueuse est probablement due à l'augmentation de la partie hydrophobe de la molécule. Cette solubilité est néanmoins suffisante pour des applications en imagerie de fluorescence, les concentrations des solutions mères de fluorophores étant en général de l'ordre de 10^{-5} M.

II.2.3. DPPs contenant un système conjugué basé sur un motif stilbène

Le couplage de Heck

Pour ce type de molécule, nous avons opté pour le couplage de Heck afin d'obtenir le motif stilbène (Schéma 7).

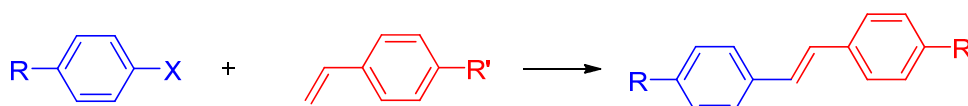


Schéma 7 : Synthèse d'un stilbène à l'aide de la réaction de Heck

La réaction de Heck ^[17], découverte en 1968, est une réaction de couplage carbone-carbone catalysée par le palladium entre un halogénure aromatique ou vinylique et un alcène. Un mécanisme réactionnel détaillé du couplage de Heck a été proposé par Amatore et Jutand ^[18] (Figure 34). Pour effectuer cette réaction, un mélange catalytique introduit dans le milieu

réactionnel génère *in situ* l'espèce active du palladium à l'état d'oxydation 0. L'acétate de palladium $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ et la tris(*o*-tolyl)phosphine (TOP) sont les précurseurs catalytiques les plus utilisés pour cette réaction.

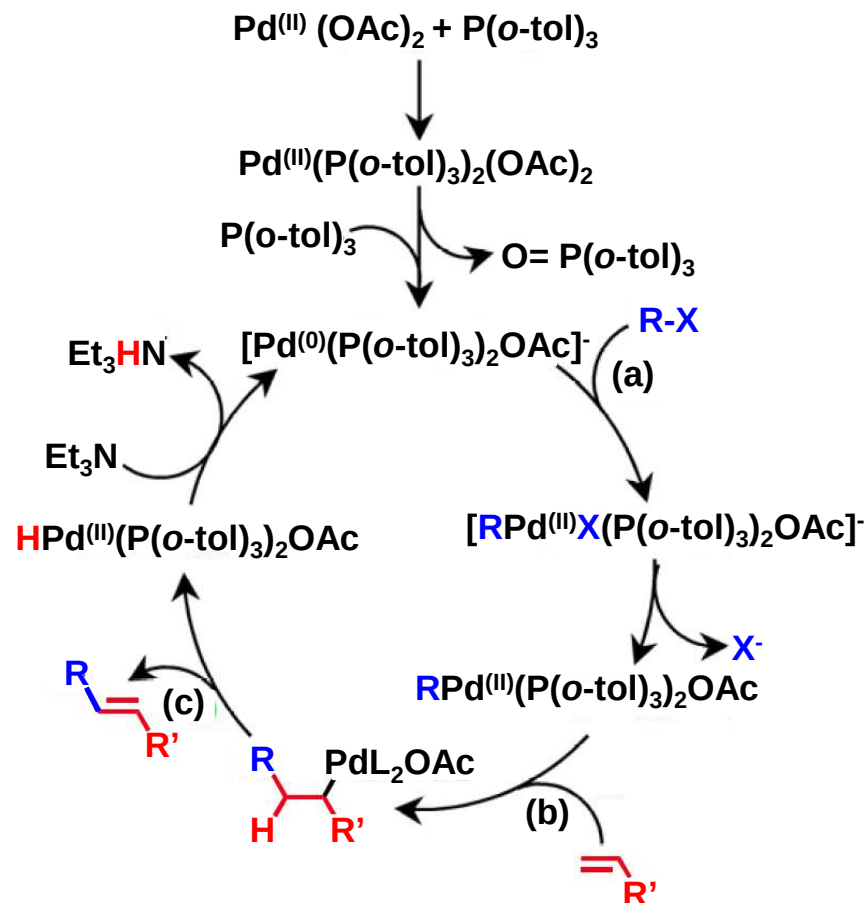


Figure 34 : Mécanisme proposé pour la réaction de Heck.

Le cycle catalytique de cette réaction comprend 3 étapes principales : L'addition oxydante (a) qui aboutit à la formation de l'espèce organopalladiée qui subit divers réarrangements. La seconde étape (b) est une insertion *syn* de l'alcène sur ce complexe. Enfin, la 3ème étape (c) est une β-élimination qui conduit à la libération du produit de couplage et à la régénération de l'espèce catalytique à base de Pd^0 .

Nous avons utilisé le dérivé dibromé **10** et diiodé **11** du cœur DPP couplés à des dérivés vinyliques comportant des systèmes électroactifs périphériques.

Préparation des groupements périphériques électroactifs

Pour cette série de fluorophores, cinq dérivés styréniques ont été greffés (figure 38) sur le cœur DPP dihalogéné (Figure 35).

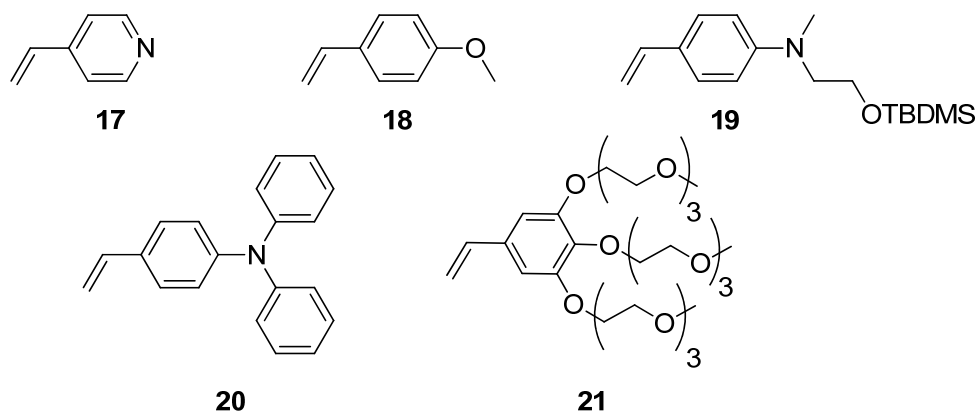


Figure 35 : Les systèmes périphériques utilisés pour le couplage de Heck.

La vinylpyridine **17** et le vinylanisole **18** sont commerciaux. La N,N-diphényl-4-vinylaniline **20** a été préalablement synthétisée au laboratoire. Le 3,4,5-tris(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy)-éthoxy)-5-vinylbenzène **21** a été préparé à partir du benzaldéhyde **22** par réaction de Wittig avec le bromure de bromométhyltriphenylphosphonium en milieu basique (Schéma 8). La présence de 3 chaînes OEG joue un rôle important dans l'amélioration de la solubilité dans l'eau. Ces trois chaînes oxygénées OEG en positions 3, 4 et 5 sur le noyau benzénique jouent aussi un rôle électronique global sur le chromophore, mais seule la chaîne en position 4 est réellement en position conjuguée pour exercer un effet mésomère électrodonneur.

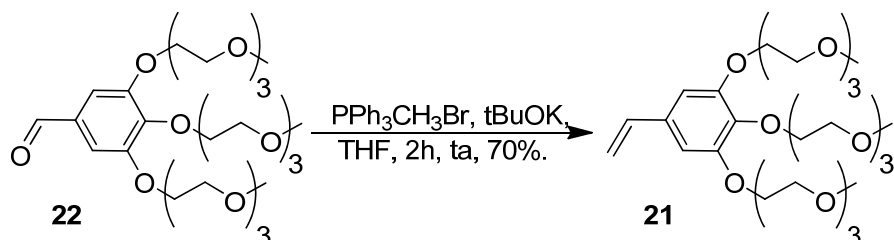


Schéma 8 : Synthèse du dérivé styrénique **21** par réaction de Wittig.

La N-(2-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)-N-méthyl-4-vinylaniline **19** a été préparée selon le schéma donné en Schéma 9.

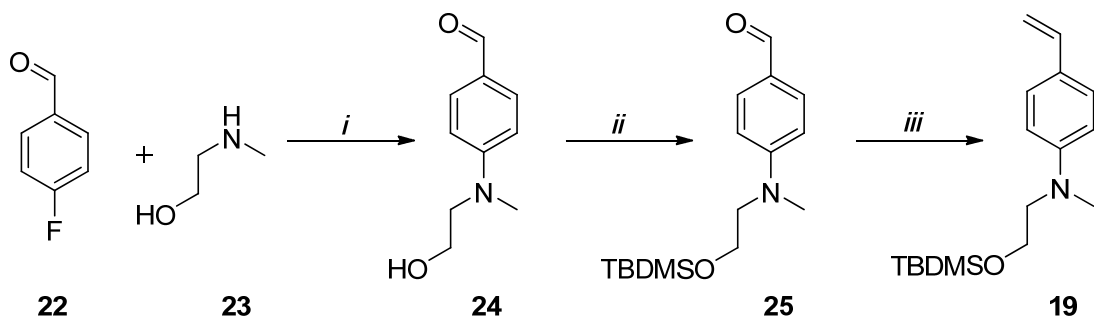


Schéma 9 : Schéma de synthèse du dérivé styrénique **19**.

(i) K_2CO_3 , DMSO, 100°C , 48h, 80% ; (ii) TBDMSO, Imidazole, THF, t_a , 4h ; (iii) BuLi, THF, $\text{PPh}_3\text{CH}_3\text{Br}$, 24h, t_a .

Premièrement, une réaction de substitution nucléophile aromatique entre la *N*-méthyléthanolamine et le 4-fluorobenzaldéhyde commercial conduit au 4-((2-hydroxyéthyl)méthylamino)benzaldéhyde **24** avec un rendement de 80 %. Le groupement OH a ensuite été protégé par le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS). Cette protection est nécessaire car dans une deuxième étape on forme le dérivé styrénique **19** en milieu fortement basique, ce qui pourrait conduire à la déprotonation de l'alcool et ce dernier polymérise spontanément à température ambiante. Dans une dernière étape la fonction aldéhyde de **25** a été transformée en groupement vinyle par une réaction de Wittig en présence de BuLi pour obtenir le produit **19** avec un rendement de 91 %.

Synthèse des chromophores finaux

Les dérivés styréniques **17-21** ont été greffés sur le cœur dibromé **10** par couplage de Heck, pour donner les chromophores **26-30** respectivement (Schéma 10).

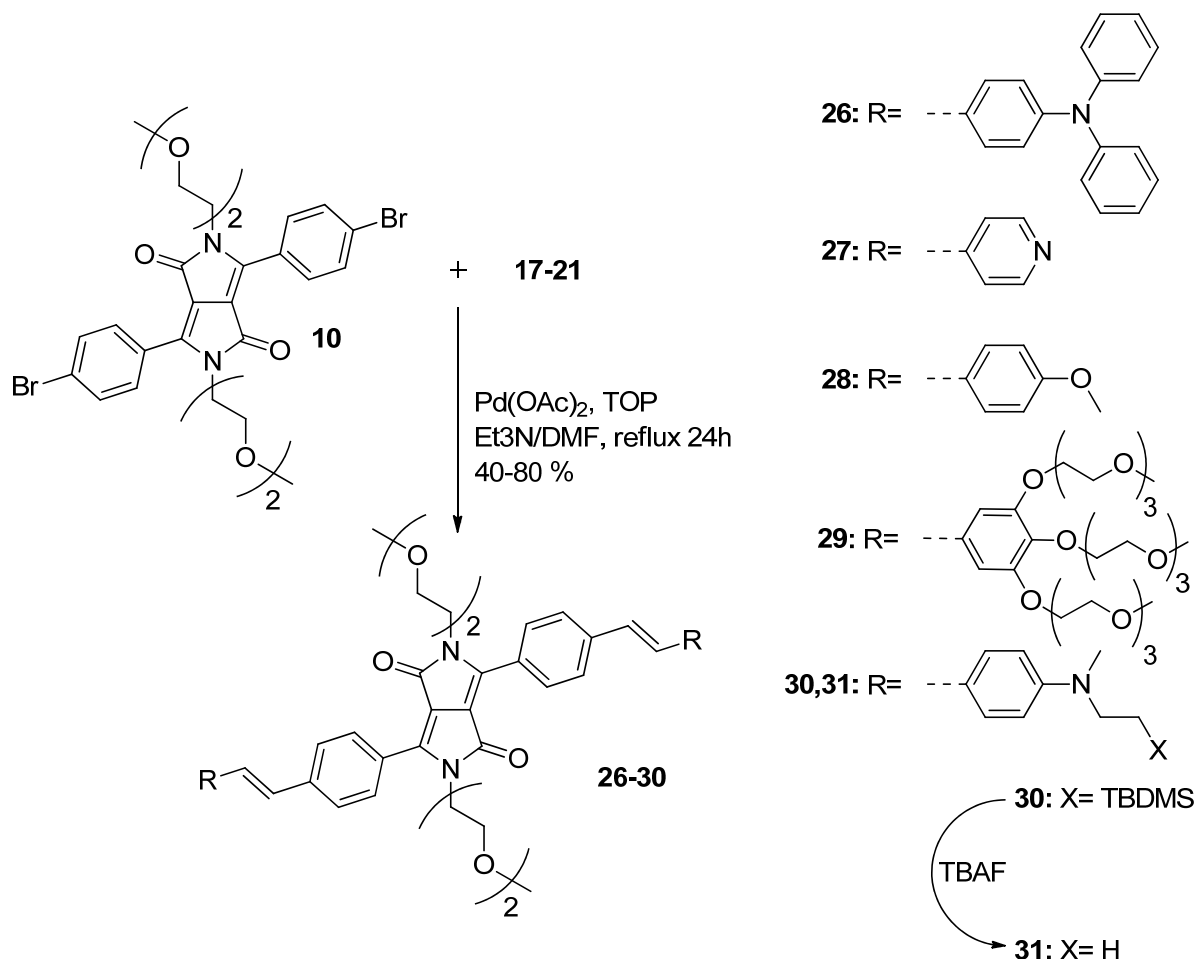


Schéma 10 : Synthèse des fluorophores **26-31**

Ce couplage aboutit à une augmentation de la taille du système conjugué par rapport au DPP **16**. Pour le DPP **30** la fonction alcool a été déprotégée en utilisant du fluorure de *tert*iobutylammonium (TBAF) en solution dans le THF. La molécule **31** obtenue sera utilisée d'une part comme colorant systémique et d'autre part pourra conduire à une série de chromophores bifonctionnels (microscopie à deux photons et IRM) utilisables en milieu biologique grâce à la fonction alcool réactive.

Les chromophores obtenus ont été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C , par spectrométrie de masse à haute résolution, par spectroscopie IR et leurs points de fusion ont été déterminés. La solubilité dans l'eau de ces colorants est de $30\ \mu\text{M}$ (31 mg/L) pour la molécule **26**, $40\ \mu\text{M}$ (28 mg) pour la molécule **27**, $150\ \mu\text{M}$ (114 mg/L) pour la molécule **28**, 3 mM (5 g/L) pour la molécule **29** et $20\ \mu\text{M}$ (17 mg/L) pour la molécule **31**.

II.2.4. DPPs contenant un système conjugué basé sur un motif tolane

Couplage de Sonogashira

La méthode la plus utilisée pour accéder au motif tolane est le couplage de Sonogashira ^[19] (Schéma 11).

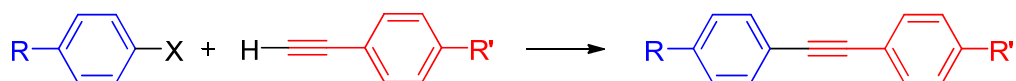


Schéma 11 : Synthèse d'un tolane à l'aide de la réaction de Sonogashira

Ce couplage représente un outil de synthèse extrêmement puissant et connaît un grand succès en synthèse organique, du fait de la grande disponibilité et de la stabilité de dérivés acétyléniques, et de la compatibilité de ce couplage avec de nombreux groupements fonctionnels. Cette réaction permet de coupler, par l'intermédiaire d'un complexe de palladium, un dérivé halogéné vinylique ou aromatique avec un alcyne vrai, en présence d'un excès de base, et d'une quantité catalytique de CuI. Le mécanisme proposé par Sonogashira et par d'autres passe par les trois étapes classiques des réactions pallado-catalysées (Figure 36) : **(a)** L'addition oxydante où l'espèce organopalladiée $\text{ArPd}^{(\text{II})}\text{X}(\text{PPh}_3)_2$ est formée puis **(b)** la transmétaallation où l'alcyne vrai migre du cuivre au palladium et enfin **(c)** l'élimination réductrice qui libère l'alcyne attendu et la régénère l'espèce catalytique Pd (0).

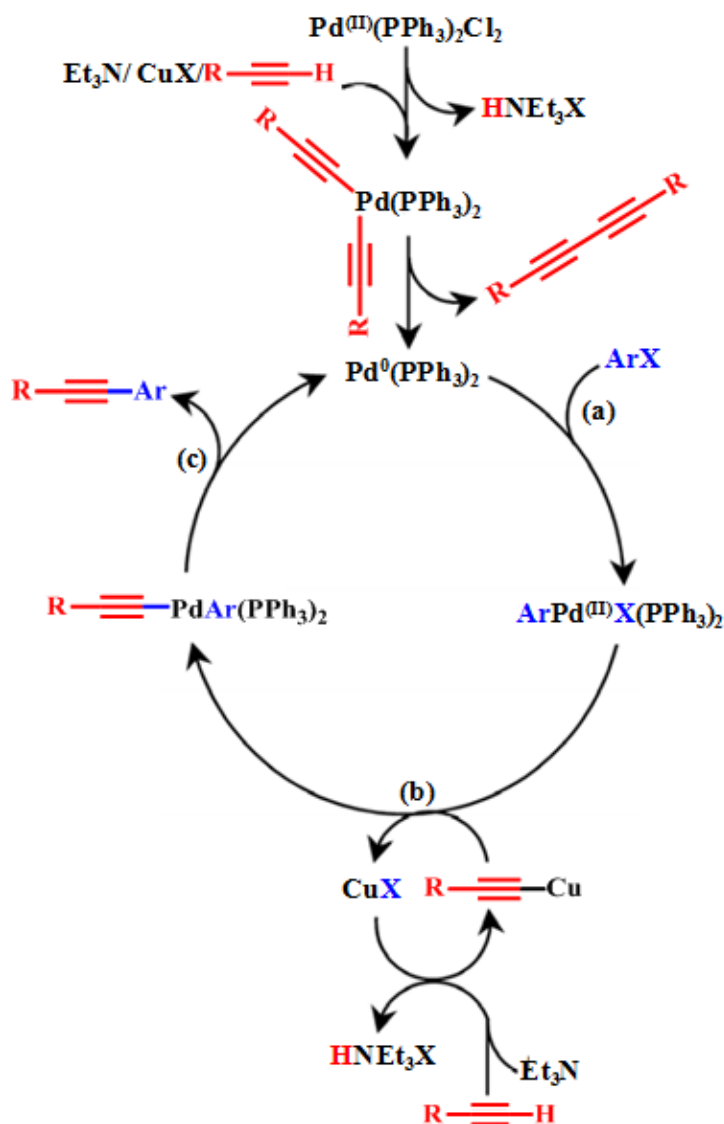


Figure 36 : Mécanisme proposé pour la réaction de Sonogashira.

Synthèse des chromophores finaux

Deux chromophores ont été synthétisés dans cette série. Le premier (**33**) a été synthétisé par un couplage de Sonogashira entre le DPP dibromé **10** et le 4-éthynylanisole commercial, avec un rendement 30% (Schéma 12). La solubilité du chromophore **33** dans l'eau est de 80 μM (60 mg/L).

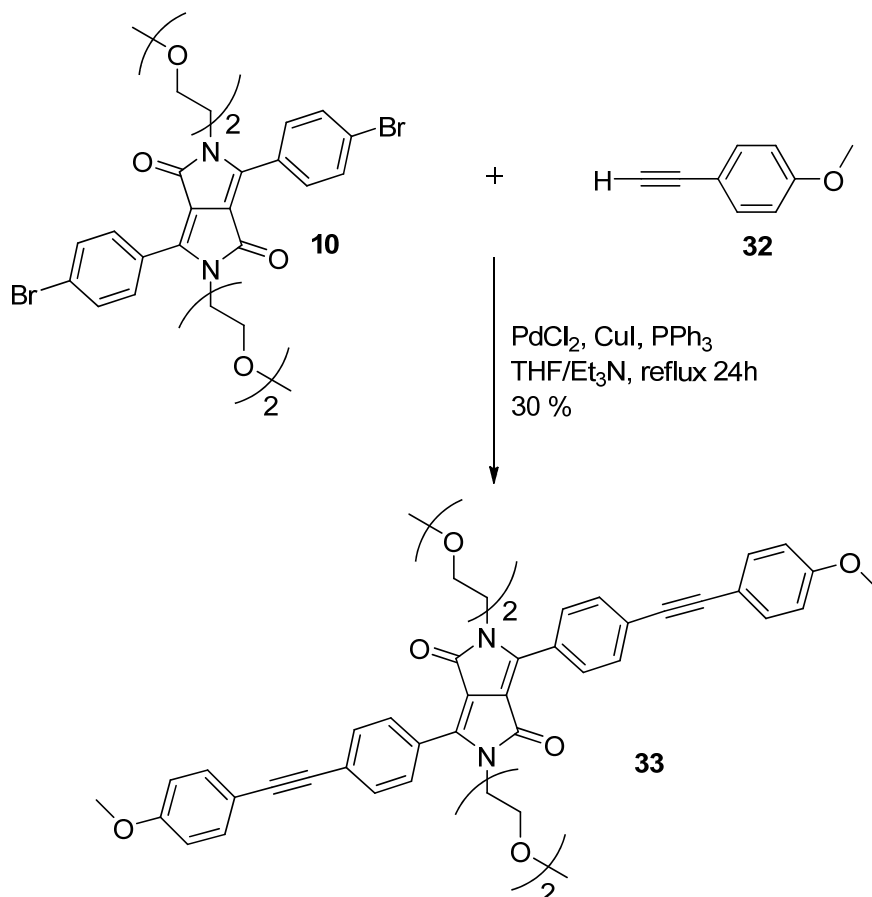


Schéma 12 : Synthèse du DPP **33** par le couplage de Sonogashira.

Pour le deuxième produit, nous avons choisi d'utiliser la pyridine comme groupement périphérique. La 4-éthynylpyridine commerciale étant très chère et toujours stabilisée sous forme de chlorhydrate de pyridinium, nous avons choisi de greffer le groupement alcyne sur le cœur central et de poursuivre par un couplage de Sonogashira avec un dérivé halogéné de la pyridine (*Schéma 13*). Dans une première étape le 2-méthyl-3-butyn-2-ol a été greffé par couplage de Sonogashira sur le DPP dibromé **10**. Les fonctions alcynes ont ensuite été déprotégées en milieu basique pour donner le DPP **35**, sur lequel nous avons greffé la 4-iodopyridine par réaction de Sonogashira pour obtenir le chromophore final **36**. La solubilité du chromophore **36** dans l'eau est de 40 μM (28 mg/L).

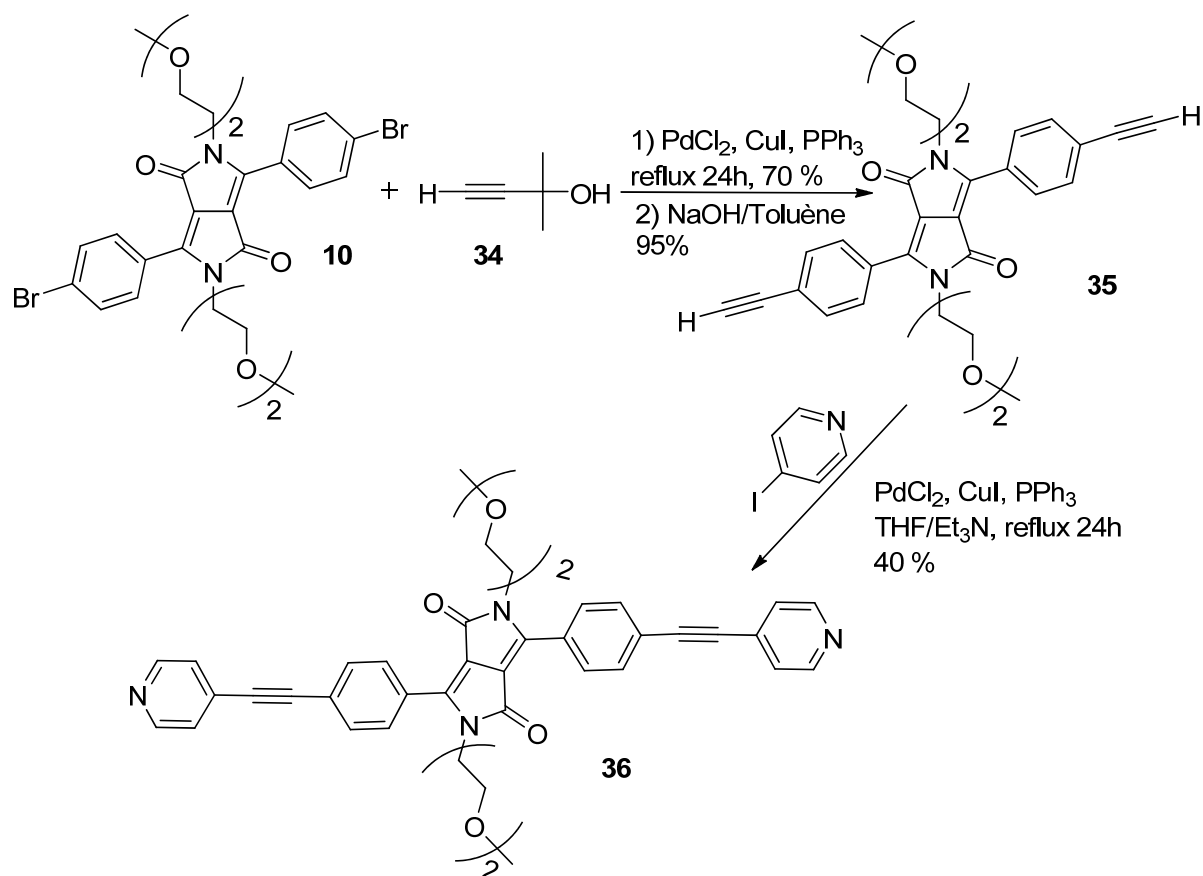


Schéma 13 : Synthèse du fluorophore 36

II.2.5. Conclusion

Nous avons réalisé la synthèse de 10 nouveaux colorants à cœur DPP qui peuvent être répartis en 3 groupes selon le système électroactif présent:

- Quatre chromophores possédant le groupement méthoxy comme groupement électrodonneur avec différents systèmes conjugués **12** (phényle), **16** (biphényle), **28** (stilbène) et **33** (tolane). Un cinquième colorant (**29**) qui possède trois chaînes oxygénées portés par un noyau phényle en périphérie du fluorophore, peut être rattaché à cette série.
- Trois chromophores possédant la pyridine comme groupement terminal électroaccepteur, reliée au cœur DPP par différents systèmes conjugués : **13** (phényle), **27** (stilbène) et **36** (tolane).
- Deux chromophores qui possèdent un dérivé d'aniline comme groupement terminal électrodonneur **26** (stilbène) et **31** (stilbène).

Tous les chromophores préparés sont solubles dans l'eau et leurs solubilités sont indépendantes de la force ionique même dans une solution physiologique saline, grâce au caractère non-ionique des chaînes OEG. Les valeurs des solubilités obtenues sont résumées dans le *Tableau 2*.

<i>Chromophores</i>	<i>Solubilité</i>	<i>Chromophores</i>	<i>Solubilité</i>
12	3 mM (2 g/L)	28	150 μ M (114 mg/L)
13	20 mM (12 g/L)	29	3 mM (5 g/L)
16	60 μ M (42 mg/L)	31	20 μ M (17 mg/L)
26	30 μ M (31 mg/L)	33	80 μ M (60 mg/L)
27	40 μ M (28 mg/L)	36	40 μ M (28 mg/L)

Tableau 2 : Solubilité dans l'eau pour les chromophores centrosymétriques synthétisés.

Les deux simples DPP **12** et **13** possèdent la meilleure solubilité dans l'eau car ils contiennent une partie hydrophobe plus petite que celle des autres chromophores et leurs chaînes OEG sont plus longues. Le chromophore **29** présente une solubilité plus importante dans l'eau que les autres composés de tailles équivalentes, cela est dû à la présence de 6 chaînes OEG de plus. Enfin ces chromophores sont suffisamment solubles pour les applications en imagerie de fluorescence, où la concentration des solutions mères de fluorophores est en général de l'ordre de 10^{-5} M.

II.3. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES

II.3.1. Généralités

Diagramme de Perrin-Jablonski

Les processus qui ont lieu lors de l'absorption et de l'émission de la lumière sont généralement illustrés par un diagramme de Perrin-Jablonski. Un tel diagramme, représentant les niveaux électroniques et vibrationnels d'une molécule ainsi que les transitions radiatives ou non radiatives pouvant se produire, est illustré dans la *Figure 37*.

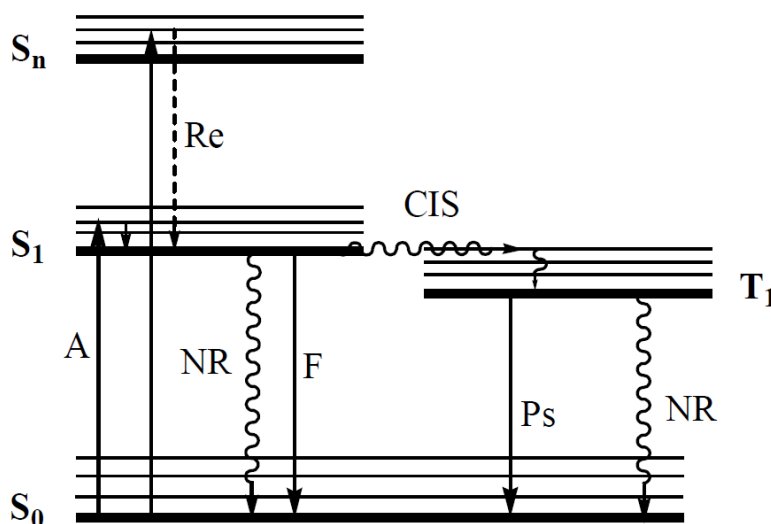


Figure 37 : Exemple de diagramme de Perrin-Jablonski

Après absorption (A) de la lumière, plusieurs processus peuvent se présenter. Une molécule à l'état singulet de basse énergie S_0 (état fondamental) est excitée à un état singulet d'énergie supérieure S_1 ou S_n (états excités). Généralement à l'état excité la molécule subit rapidement une relaxation non radiative (Re) pour atteindre le niveau vibrationnel de plus basse énergie de S_1 (processus très rapide $< 10^{-12}$ s). Ensuite la molécule se désexcite vers S_0 soit d'une manière non-radiative (NR) soit radiative (fluorescence « F »). La molécule au niveau S_1 peut aussi se désexciter vers un état triplet T_1 . La conversion de S_1 en T_1 se produit par une transition non-radiative appelée croisement inter-système (CIS). L'état triplet T_1 n'ayant pas le même spin que l'état S_0 , le phénomène de désexcitation vers l'état fondamental S_0 (plus stable) est plus lent car il correspond à une transition interdite de spin. Cette transition $T_1 \rightarrow S_0$, peut-elle être aussi non-radiative ou radiative (on parle alors de phosphorescence « Ps »).

Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission

Généralement pour caractériser une molécule fluorescente, ses spectres d'absorption, d'excitation et d'émission sont représentés.

Le spectre d'absorption représente la variation de l'absorbance ou du coefficient d'extinction molaire (ϵ) en fonction de la longueur d'onde de la lumière excitatrice. A une longueur d'onde donnée, le coefficient d'extinction molaire est relié linéairement à l'absorbance par la loi de Beer-Lambert (Equation 10).

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda).l.C \quad \text{Equation 10}$$

L'absorbance elle-même est définie comme le logarithme du rapport entre $I_0(\lambda)$ qui est l'intensité de lumière reçue par l'échantillon et $I(\lambda)$ qui représente l'intensité de lumière transmise par l'échantillon à la longueur d'onde λ (Equation 11).

$$A(\lambda) = \log\left[\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right] \quad \text{Equation 11}$$

Le spectre d'émission de fluorescence quant à lui correspond à la répartition spectrale de la lumière de fluorescence émise lorsqu'on excite la molécule. Le spectre d'émission ne varie généralement pas en fonction de la longueur d'onde d'excitation et il semble être l'image du spectre d'absorption à travers un miroir (Figure 38).

Le décalage entre les maxima d'excitation et d'émission est appelé déplacement de Stokes. Ce décalage correspond à la perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis, et il est dû à la relaxation vibrationnelle subie par la molécule à l'état excité.

Le spectre d'excitation est aussi important pour vérifier la pureté des produits étudiés. Il représente l'efficacité de la luminescence en fonction de la longueur d'excitation. Il doit se superposer avec le spectre d'absorption. Ces trois spectres ont été relevés pour tous les fluorophores synthétisés. Dans tous les cas, les spectres d'excitation se superposent aux spectres d'absorption indiquant la pureté des produits et l'absence d'agrégation en solution.

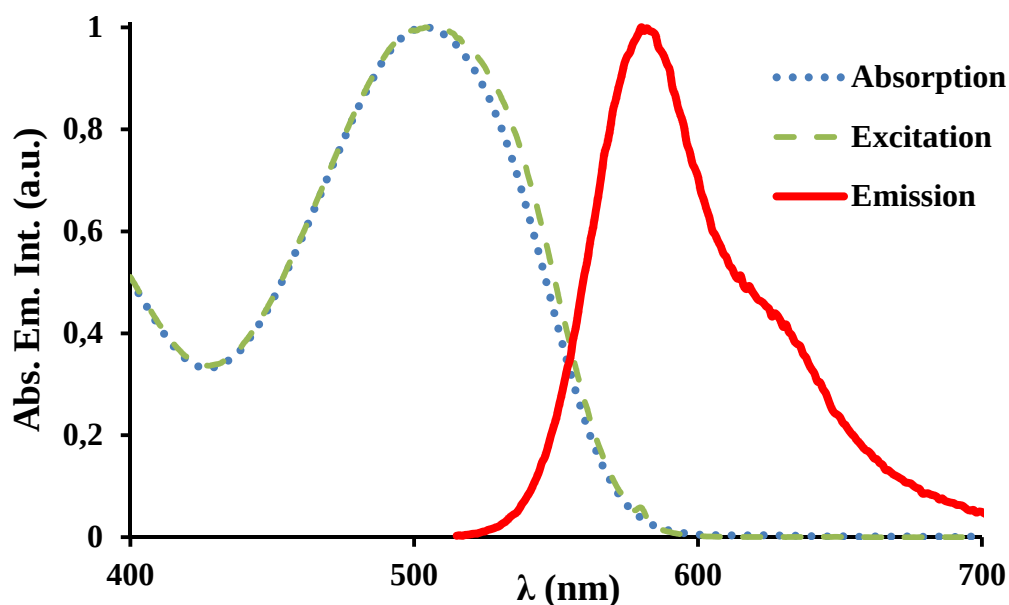


Figure 38 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de la molécule **28** dans le dichlorométhane.

Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence (Φ) correspond à l'efficacité d'une molécule à restituer sous forme lumineuse les photons qu'elle a absorbé. Plus précisément il correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par un chromophore. Généralement ce rapport est inférieur à 1, car les désexcitations radiatives sont souvent accompagnées de processus non-radiatifs. Moins il y a de voies de désactivation non-radiative, plus le rendement quantique est élevé.

En pratique, les mesures directes des rendements quantiques de fluorescence sont difficiles à réaliser. On le détermine généralement pour un chromophore d'une manière relative par rapport à une référence dont on connaît précisément le rendement quantique (rhodamine B, fluorescéine...). Après la mesure des intensités lumineuses émises par chromophore et par la référence, le rendement quantique est calculé selon l'Equation 12.

$$\phi_{mes} = \phi_{ref} \times \frac{I_{mes} A_{ref} n_{mes}^2}{I_{ref} A_{mes} n_{ref}^2} \quad \text{Equation 12}$$

Où n est l'indice de réfraction du solvant utilisé, A_{ref} et A_{mes} l'absorbance à une longueur d'onde donnée, et I l'intégrale de la bande d'émission obtenue par l'excitation à la longueur d'onde où nous avons mesuré les absorbances. Les indices *ref* et *mes* des différents paramètres correspondent à la référence et au fluorophore étudié respectivement^[20].

Le spectre d'excitation à deux photons et la section efficace d'absorption à deux photons

La valeur de la section efficace d'absorption à deux photons σ_2 est le facteur le plus important à déterminer pour caractériser l'efficacité d'un chromophore en absorption biphotonique, car la probabilité d'ADP est proportionnelle à cette valeur (voir chapitre I). Généralement on trace le spectre d'excitation à deux photons qui représente la variation de σ_2 en fonction de la longueur d'onde de la lumière excitatrice (Figure 39).

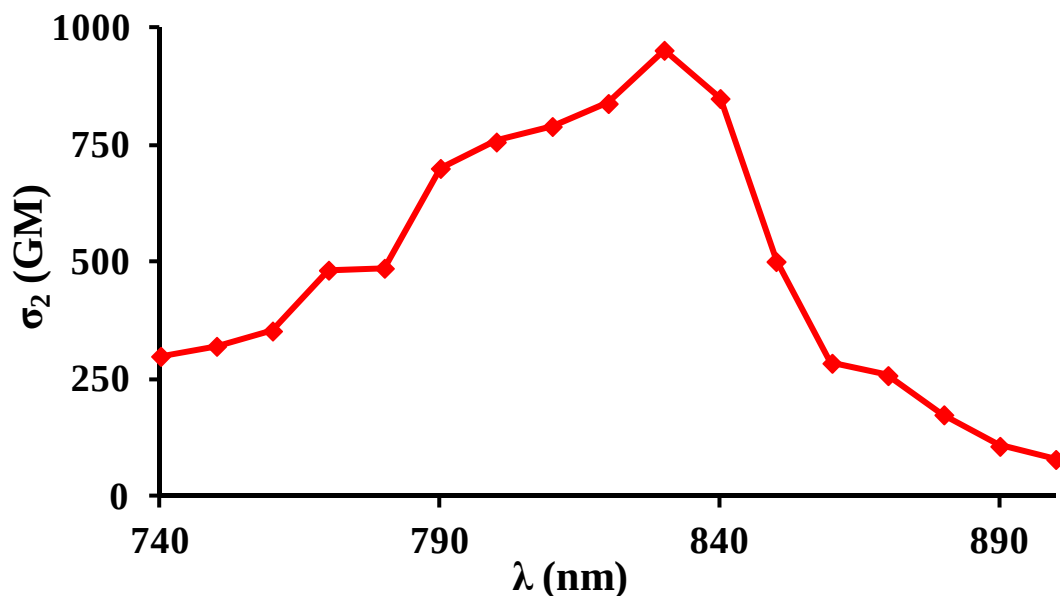


Figure 39 : Spectres d'excitation à deux photons de **29** dans le dichlorométhane.

II.3.2. Propriétés photophysiques des dérivés de la pyridine

Spectroscopie à un photon

Après avoir synthétisé les différents fluorophores, il est nécessaire de déterminer leurs caractéristiques photophysiques. Les spectres d'absorption, les spectres d'émission, le coefficient d'extinction molaire (ϵ), et le rendement quantique de fluorescence (Φ) sont donc les paramètres à étudier pour les fluorophores **13**, **14**, **27** et **36**, dans le dichlorométhane ainsi que dans l'eau.

Les spectres d'absorption UV-visible dans le dichlorométhane et dans l'eau pour les molécules **13**, **14**, **27** et **36** sont représentés dans la *Figure 40*.

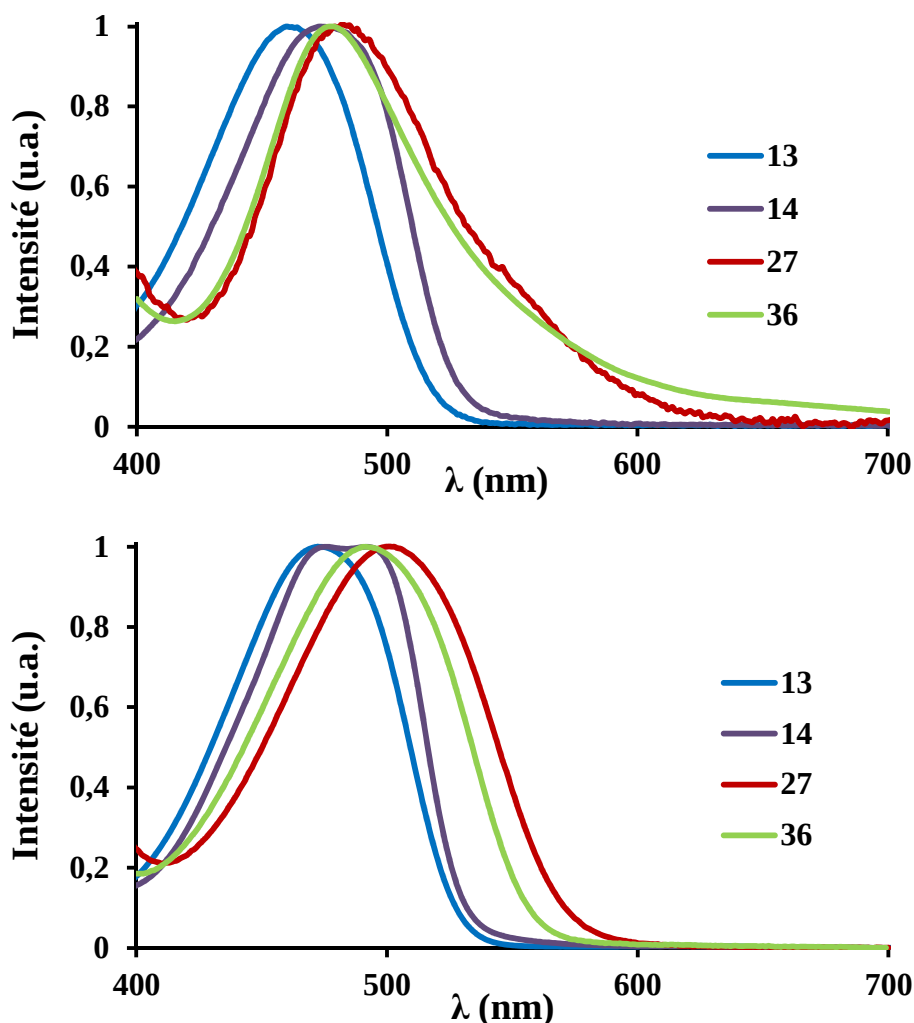


Figure 40 : Spectres d'absorption dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas) des dérivés de DPP à terminaison pyridine **13**, **14**, **27** et **36**.

La longueur du système conjugué affecte clairement la position du maximum d'absorption. Par l'augmentation de sa longueur nous avons observé pour les chromophores **27** et **36** un déplacement du maximum d'absorption vers le rouge (effet bathochrome) de 30 nm et 20 nm respectivement par rapport à **13**. En changeant la triple liaison (**36**) par une double liaison (**27**), la délocalisation des électrons est favorisée et conduit à un décalage vers le rouge de 10 nm dans le dichlorométhane.

Dans le même solvant, nous avons observé que le maximum d'absorption du chromophore mono-OEG **14** est décalé de 12 nm par rapport à celui du chromophore bis-OEG **13**. Nous pouvons expliquer cet effet par le changement dans l'angle de torsion des groupements pyridine. Une N-méthylation augmente l'angle de torsion dans **13** et induit un déplacement hypsochrome ^[21]. L'augmentation de l'angle de torsion diminue le recouvrement entre les

orbitales moléculaires et par la suite diminue la délocalisation des électrons tout au long du système et par conséquent diminue sa conjugaison.

Nous avons également relevé les spectres d'émission des différents chromophores dans les deux solvants dichlorométhane et eau. Comme cela a été mentionné auparavant, les chromophores qui ont des systèmes conjugués plus longs présentent les spectres d'émission les plus décalés vers le rouge. Nous avons observé une forte fluorescence dans le vert-jaune pour les molécules **13** et **14** et une fluorescence dans le jaune pour les chromophores **26** et **36**. Les spectres d'émission des chromophores dans le dichlorométhane et dans l'eau sont représentés dans la Figure 41.

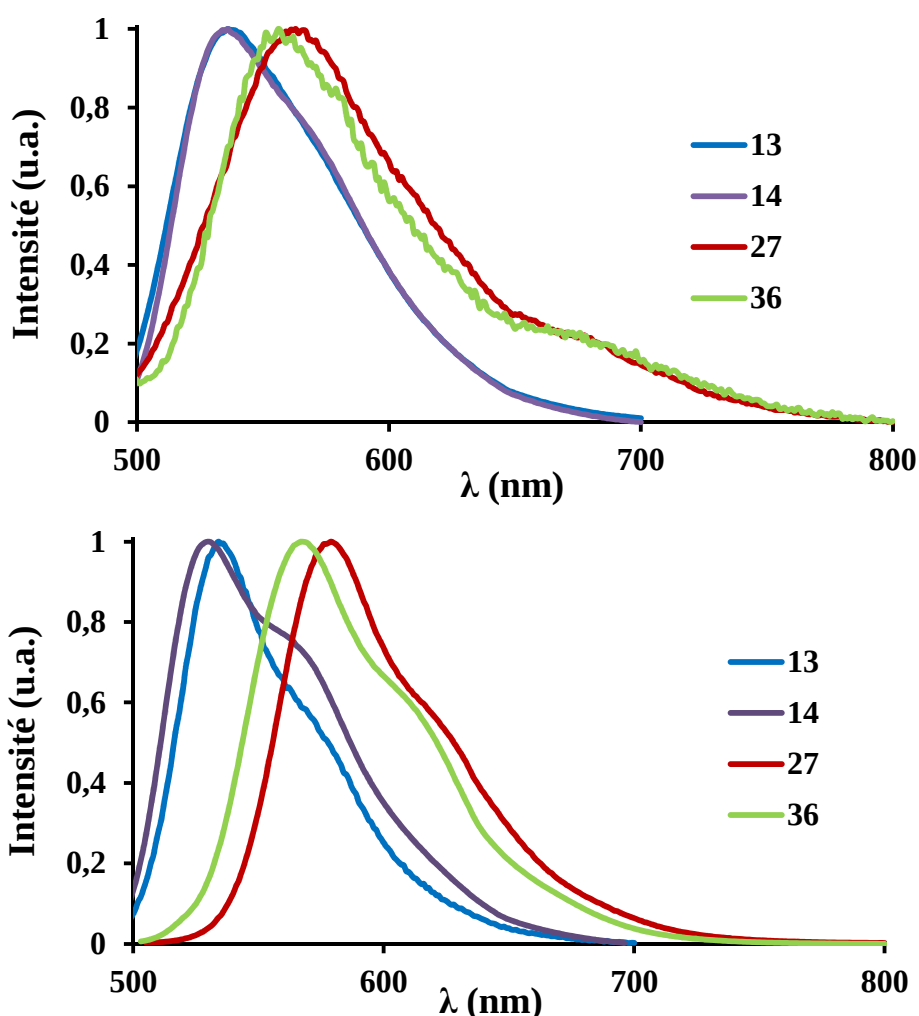


Figure 41 : Spectres d'émission dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas) des dérivés de pyridine **13**, **14**, **27** et **36**.

Les coefficients d'extinction molaire ainsi que les rendements quantiques des différents chromophores ont été mesurés l'eau et dans le dichlorométhane (Tableau 3)

Chromophore	λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	$\Phi(\%)^a$
13	473 (462)	11 800 (11 300)	534 (537)	62 (65)
14	485 (475)	13 000 (10 400)	530 (536)	67 (50)
27	503 (479)	19 200 (14 500)	579 (563)	55 (3)
36	492 (477)	18 300 (7 000)	567 (555)	93 (2)

^a Rhodamine B dans le méthanol comme standard

Tableau 3 : Données photophysiques des composés **13**, **14**, **27** et **36** dans le dichlorométhane et dans l'eau (entre parenthèse).

Les chromophores **13** et **14** ont de bons rendements quantiques, aussi bien dans le dichlorométhane que dans l'eau (50-70 %). En revanche les fluorophores **27** et **36** présentent des bons rendements quantiques dans le dichlorométhane (55 et 93 % respectivement), alors que ces valeurs baissent considérablement dans l'eau (~ 2 %). Cet effet on-off sur la fluorescence entre un solvant organique et l'eau pourrait être intéressant pour la détection des zones lipophiliques dans les cellules par microscopie de fluorescence. Le degré de liberté plus important autour de la double liaison par rapport à la triple liaison, favorise la relaxation non radiative et diminue le rendement quantique qui chute de 93% pour le fluorophore **36** à 55 % pour le fluorophore **27**.

Effet du pH sur le spectre d'émission de 27

Les groupements pyridinyles étant protonables en milieu acide, nous avons étudié l'effet du pH sur le spectre d'émission de **27**. Pour une solution de concentration 5.10⁻⁶ M de **27** dans de l'eau, nous avons progressivement modifié le pH à l'aide de solutions tampons, et les spectres d'émissions à chaque pH ont été tracés (*Figure 42*).

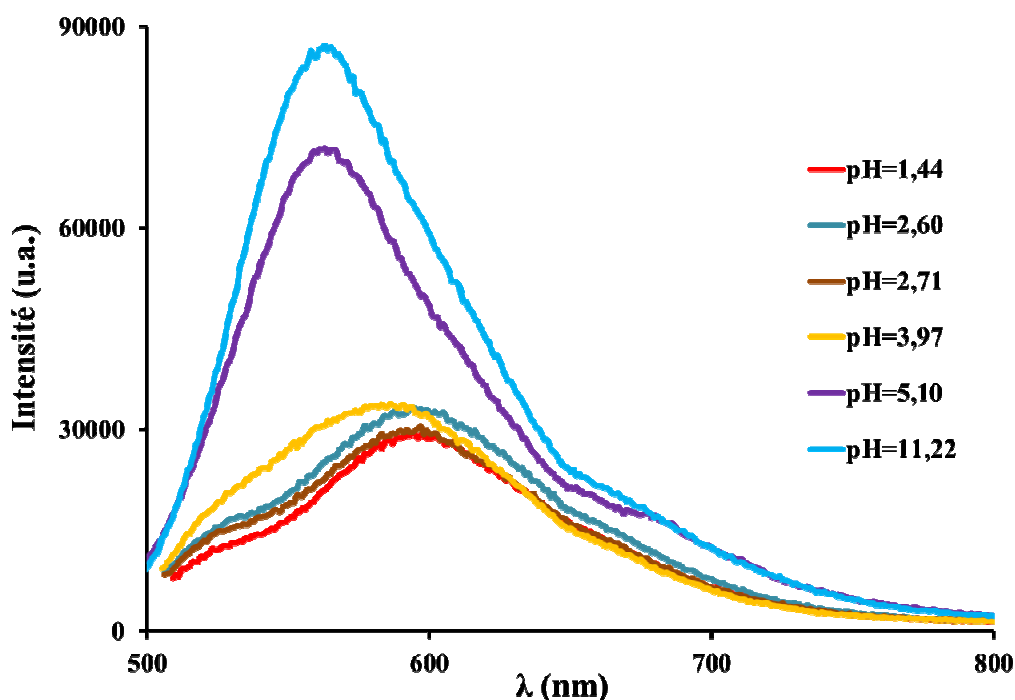


Figure 42 : Spectres d'émission du chromophore 27 en fonction du pH.

Nous pouvons supposer qu'à pH 11,22 la forme basique (bis-pyridine) prédomine en solution et à pH 1,44 la forme acide (bis-pyridinium) est à son tour prédominante. Nous avons observé un décalage du maximum d'émission vers le rouge d'environ 30 nm dans la solution la plus acide par rapport à la solution la plus basique. Ce décalage est dû à la protonation des groupements pyridine qui se transforment en pyridinium, augmentant ainsi la force du groupe électroaccepteur.

Propriétés photophysiques à deux photons

Nous avons déterminé les sections efficaces d'absorption à deux photons σ_2 de ces fluorophores dans le dichlorométhane, par la mesure de leur intensité de fluorescence par excitation à deux photons, dans une région comprise entre 740 et 900 nm, suivant le protocole expérimental décrit par Xu et Webb ^[22]. Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure 43.

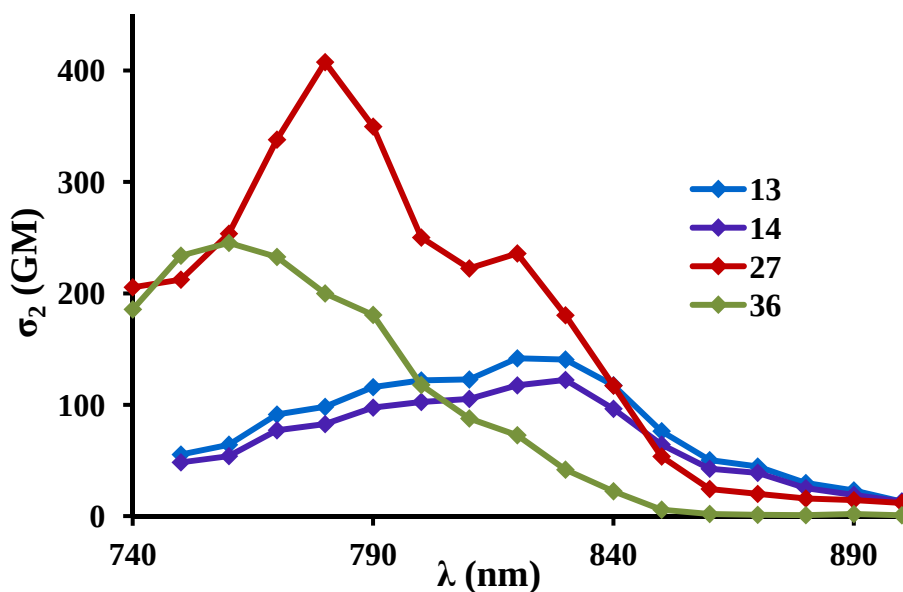


Figure 43 : Spectres d'absorption à deux photons de **13**, **14**, **27** et **36** dans le dichlorométhane.

Les valeurs de la section efficace d'absorption à deux photons pour les colorants **13** et **14** sont similaires. Nous avons observé un maximum d'absorption à 820 nm ($\sigma_2 = 140$ GM) pour **13** et à 830 nm ($\sigma_2 = 120$ GM) pour **14**.

D'autre part, l'augmentation de la longueur du système conjugué conduit bien à une augmentation de la section efficace d'ADP (chromophores **27** et **36** comparés à **13** et **14**). Le recouvrement plus important des orbitales moléculaires dans le cas de doubles liaisons permet au chromophore **27** d'avoir des valeurs de σ_2 plus importantes que celles de **36** ainsi qu'un décalage bathochrome du maximum d'absorption bi-photonique : 240 GM à 760 nm pour **36** comparé à 410 GM à 780 nm pour **27**.

Photostabilité

Pour étudier la photostabilité des chromophores des tests préliminaires ont été effectués. A l'aide d'une lampe d'un spectromètre de fluorescence, nous avons excité 100 μ L d'une solution 10^{-6} M de chaque molécule pendant 5000 s. La fluorescence a été détectée à la longueur d'onde maximale d'émission ; et les courbes d'intensité de fluorescence en fonction de temps pour chaque chromophore ont été tracées et comparées à celle de la fluorescéine (Figure 44).

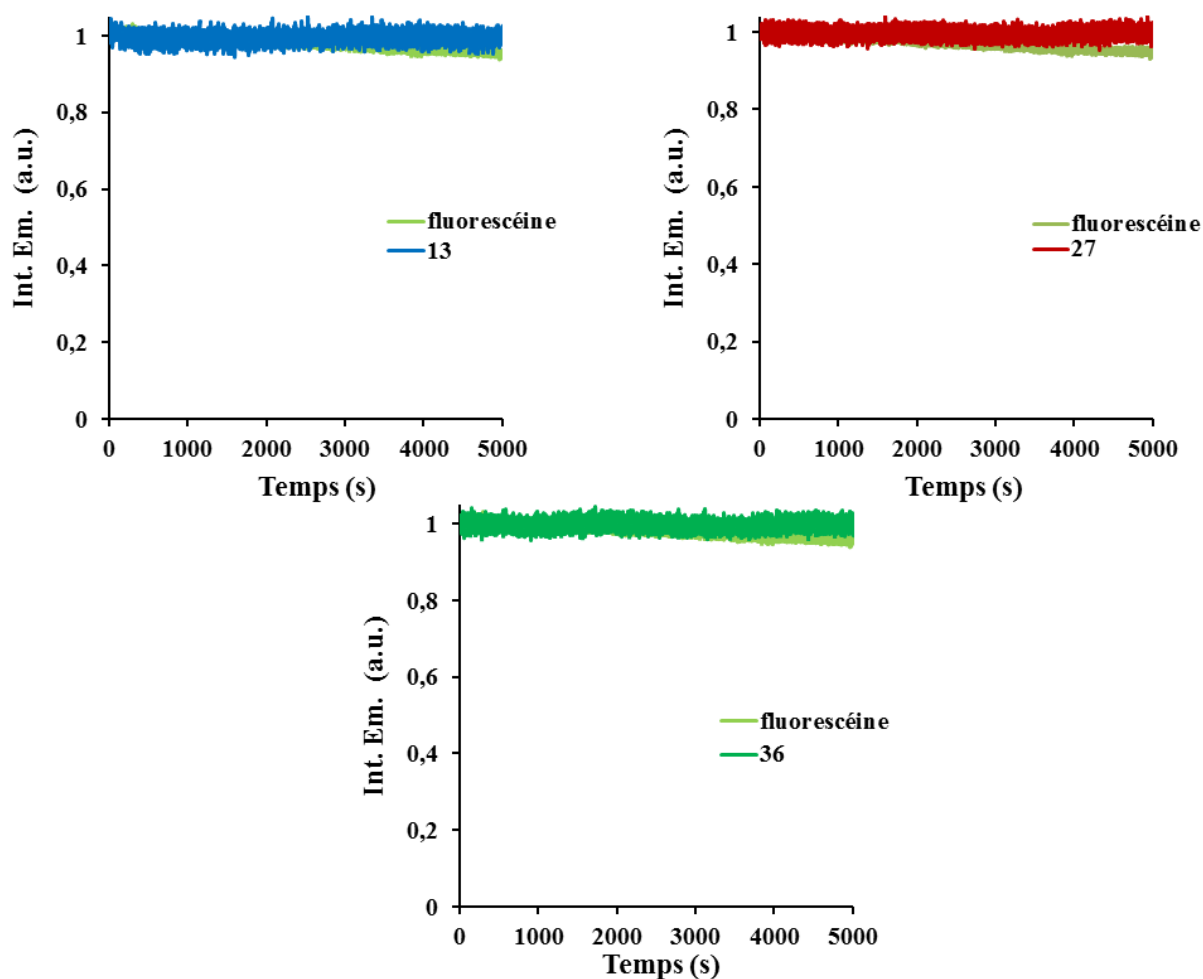


Figure 44 : Intensité de fluorescence relative de 13, 27, 33 et de la fluorescéine (rouge) lors d'une excitation continue à 446 nm.

On observe que l'intensité de fluorescence reste pratiquement constante au cours du temps, donc les chromophores préparés présentent une très bonne photostabilité par rapport à la fluorescéine qui présente une diminution d'intensité de fluorescence de 5 à 10 % irradiée dans les mêmes conditions.

II.3.3. Propriétés photophysiques des dérivés de l'anisole

Résultats expérimentaux à un photon

Pour cette série un groupement donneur méthoxy a été utilisé et la taille du système conjugué a été modifiée. Pour le chromophore 29, trois oxygènes sont présents aux deux extrémités du fluorophore. La Figure 45 illustre les spectres d'absorption UV-visible des composés 12, 16, 28 et 33 dans l'eau et dans le dichlorométhane.

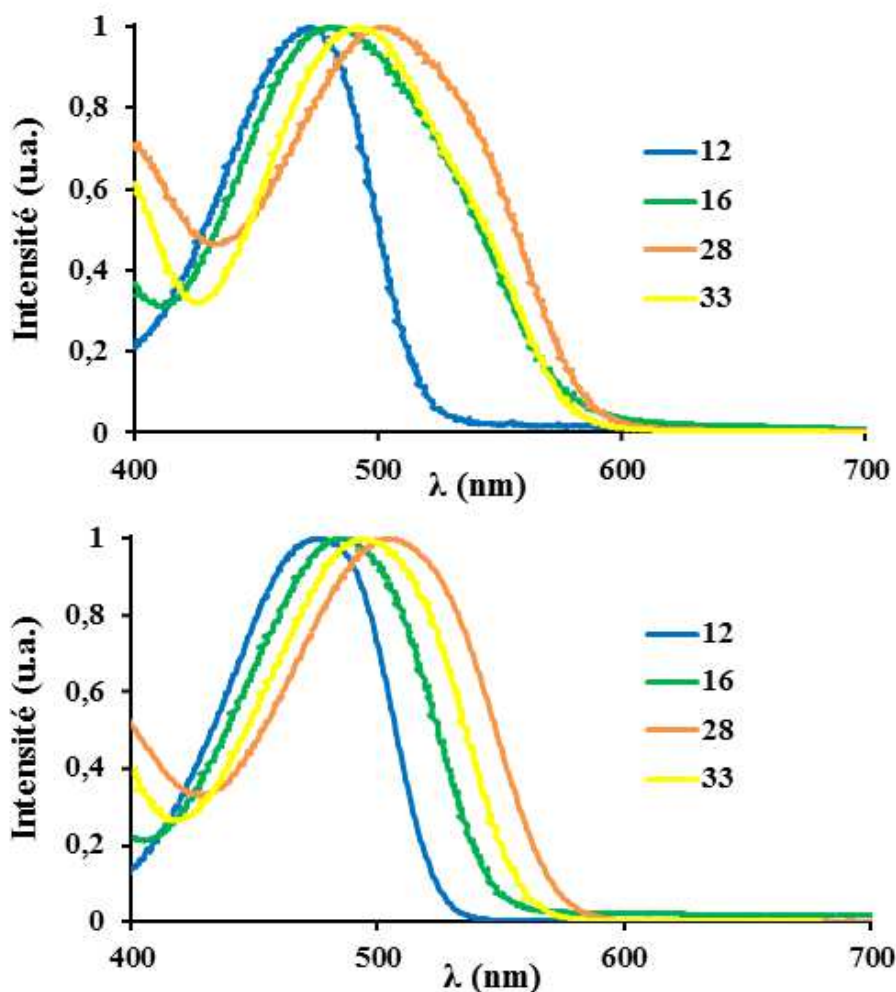


Figure 45 : Spectres d'absorption dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas) des chromophores 12, 16, 28 et 33.

Comme pour la série précédente, l'influence de la longueur du système conjugué d'une molécule est nette sur les propriétés photophysiques. Avec l'augmentation de la longueur du système conjugué, un déplacement vers le rouge a été observé. De même nous observons un décalage vers le rouge pour l'absorption du composé 33 (triple liaison) et le composé 28 (double liaison).

L'influence de la taille du système conjugué s'observe aussi sur les spectres d'émission de ces différentes molécules (Figure 46).

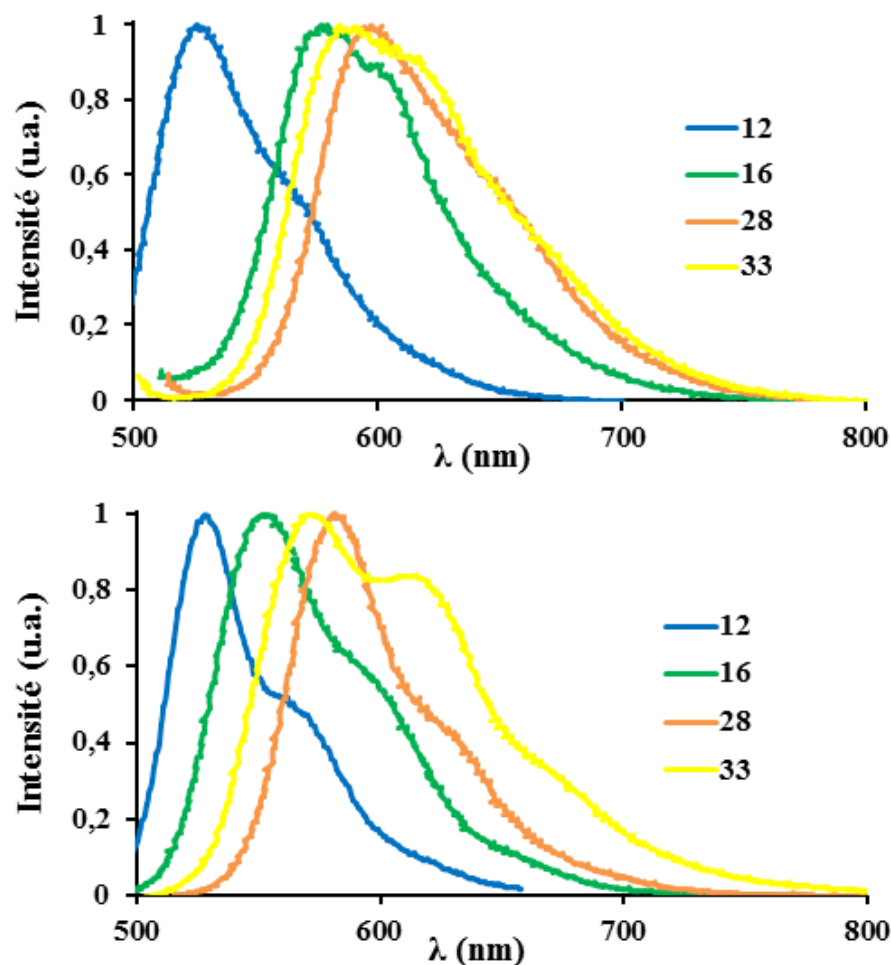


Figure 46 : Spectres d'émission dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas) des chromophores **12**, **16**, **28** et **33**.

Nous observons encore le même effet, une augmentation de la taille des systèmes conjugués entraîne un décalage vers le rouge des spectres d'émission des produits **12**, **16**, **33** et **28** dans l'eau ainsi que dans le dichlorométhane.

Afin d'étudier l'influence de l'augmentation de nombre du groupement donneur nous avons comparé les spectres d'absorption et d'émission des deux produits **28** et **29** illustré dans la Figure 47.

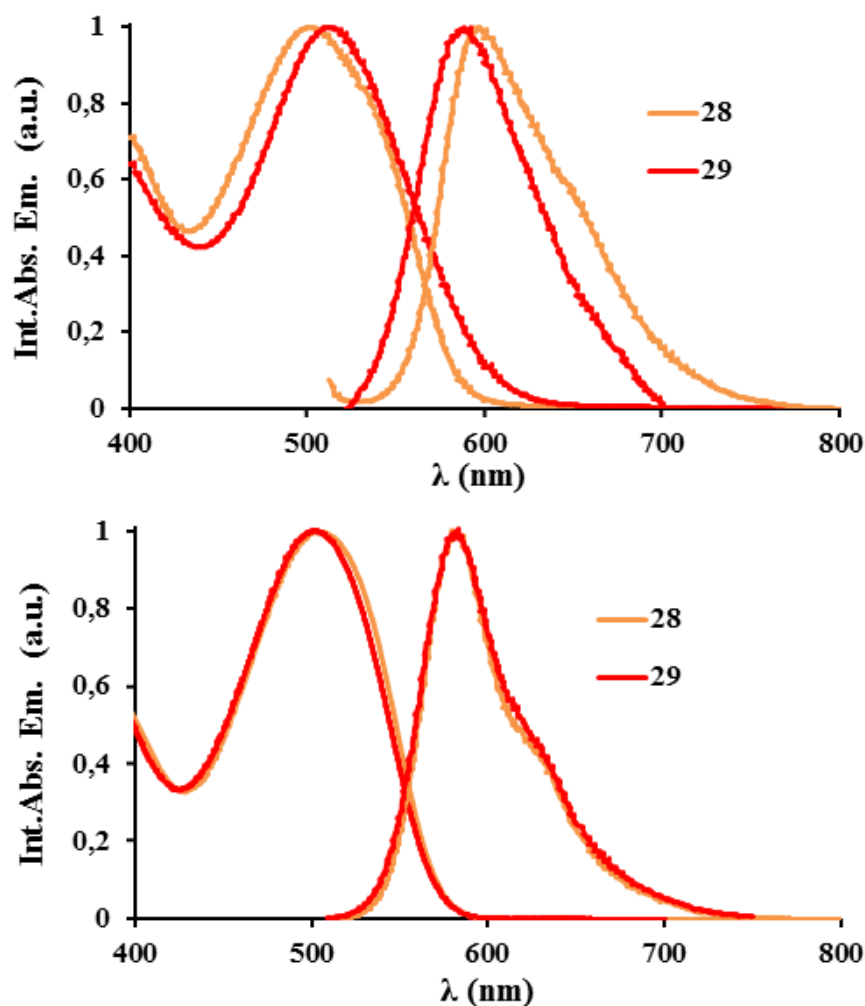


Figure 47 : Spectres d'absorption et d'émission dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas) des molécules **28** et **29**.

Pour la molécule **29** qui possèdent trois groupements oxygénés en position 3,4,5 sur le phényle, le spectre d'absorption dans l'eau est décalé de 10 nm vers le rouge, par rapport à la molécule **28** qui ne possède qu'un seul oxygène en position para sur le même noyau phényle. Cependant ce décalage n'apparaît pas dans le dichlorométhane. Nous n'avons pas observé le même effet sur les spectres d'émission dans l'eau où cette fois le décalage est vers le bleu.

Pour ces chromophores nous avons également mesuré le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique, dans le chlorure de méthylène et dans l'eau. Les données photophysiques sont présentées dans le *Tableau 4*.

Chromophore	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	Φ (%)
12	475 (473)	27 100	527 (527)	68 (70)
16	485 (481)	24000 (9000)	552 (578)	70 (2)
28	503 (501)	35000 (20000)	580 (597)	70 (5)
29	501 (510)	23 700 (4900)	581 (572)	52(2)
33	493 (512)	25300 (14100)	571 (588)	97 (2)

Tableau 4 : Données photophysiques des composés **12**, **16**, **28**, **29** et **33** dans le dichlorométhane (eau).

Les molécules **12**, **16**, **28**, **29** et **33** possèdent des coefficients d'extinctions molaires proches dans le dichlorométhane. C'est très différent dans l'eau et les coefficients d'extinction augmentent en passant des chromophores **29**, **16**, **33** à **28**. Les rendements quantiques de fluorescence dans le dichlorométhane eux aussi ne sont pas affectés significativement. Mais seul le fluorophore **12** présente un bon rendement quantique dans l'eau, alors qu'il est seulement de 2 à 5 % pour les autres fluorophores de cette série. Il faut noter que le produit **33** dont le système conjugué est semblable à celui du produit **36**, présente un excellent rendement quantique dans le dichlorométhane.

Résultats expérimentaux à deux photons

Comme pour les propriétés photophysiques linéaires, la variété des chromophores synthétisés a permis d'étudier l'influence de la nature du système conjugué sur l'efficacité de l'absorption biphotonique. Les sections efficaces des chromophores **12**, **16**, **28**, **29** et **33** ont été mesurées dans le dichlorométhane entre 740 et 900 nm. Les spectres d'ADP de ces chromophores sont présentés dans la Figure 48.

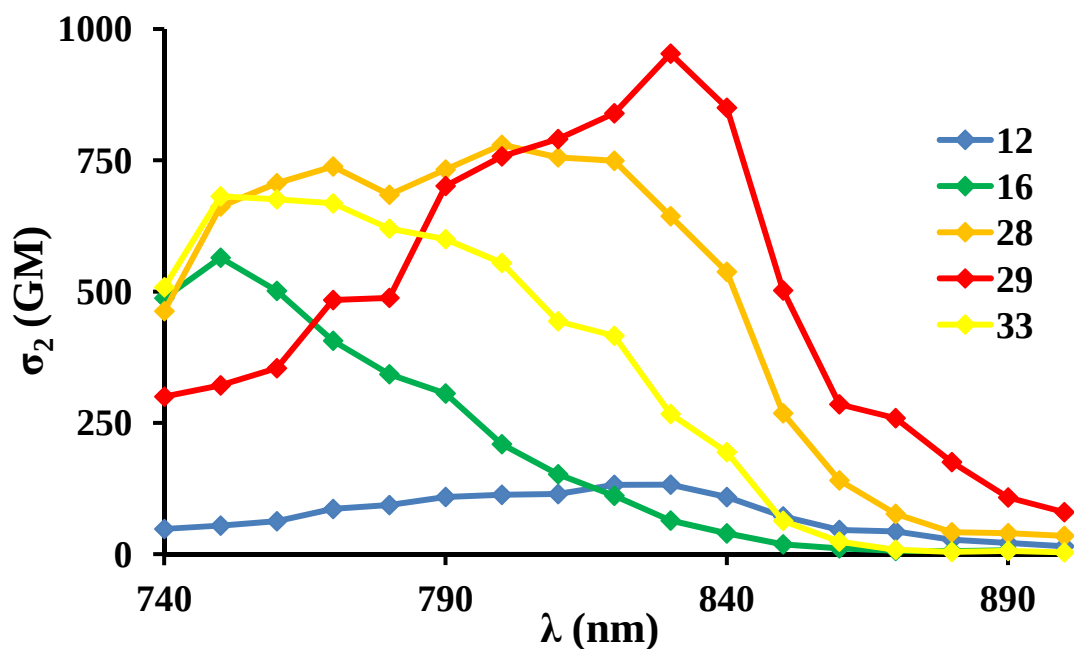


Figure 48 : Spectre d'absorption à deux photons des dérivés d'anisole dans le dichlorométhane.

La section efficace d'ADP augmente avec la taille du système conjugué : **12** (132 GM à 820 nm) < **16** (565 GM à 750 nm) < **28** (780 GM à 800 nm) ou **33** (680 GM à 750 nm).

Les chromophores **28** et **33** ont permis d'étudier l'influence de la substitution de deux doubles liaisons par des triples liaisons sur les propriétés ADP, en présence d'un même groupe électrodonneur (méthoxy). La section efficace maximale de **28** (stilbène, 780 GM à 800 nm) est plus importante et plus décalée vers le rouge que celle de **33** (tolane, 680 GM à 750 nm).

Pour la molécule **29** (950 GM à 830 nm), la présence de deux groupements OR de plus en position 3,5 par rapport à la molécule **28**, où il y a un seul groupe électrodonneur en position 4, augmente la section efficace d'absorption à deux photons, et induit quand même un décalage vers le rouge de la bande d'absorption à deux photons.

Pour étudier l'influence du type de groupement électroactif d'une molécule sur ses propriétés photophysiques, nous avons comparé les propriétés photophysiques des dérivés de la pyridine (groupement électro-accepteur) d'une part et ceux des dérivés de l'anisole (groupement électro-donneur) d'autre part. A titre d'exemple, pour deux molécules ayant deux systèmes conjugués identiques, mais avec deux groupements électroactifs différents (par exemple **27** et **28** ou **36** et **33**) nous observons dans l'eau un déplacement vers le rouge des spectres d'absorption et d'émission de l'ordre de 30 nm pour le groupement donneur, qui est dans ce

cas le groupe méthoxy. Nous avons également observé une augmentation des valeurs des σ_2 , ce qui confirme l'avantage d'utiliser des groupements électro-donneurs par rapport aux groupements électro-accepteurs pour l'ADP.

Photostabilité

Pour étudier la photostabilité des fluorophores préparés, nous avons choisi une longueur d'onde d'excitation pour laquelle la molécule étudiée et la fluorescéine utilisée comme référence possèdent à peu près le même coefficient d'extinction molaire. Pour ces expériences la détection de la fluorescence est effectuée à la longueur d'onde du maximum d'émission. Les courbes d'intensité de fluorescence en fonction de temps sont présentées dans la *Figure 49*.

Pour les molécules **12**, **16**, **28** et **33**, l'intensité de fluorescence reste quasiment inchangée au bout de 5000 s, en revanche nous avons observé une diminution de 5 à 10 % de cette intensité dans le cas de la fluorescéine irradiée dans les mêmes conditions. Pour la molécule **29**, l'intensité de fluorescence diminue 10 % quand celle de la fluorescéine diminue de 30 %.

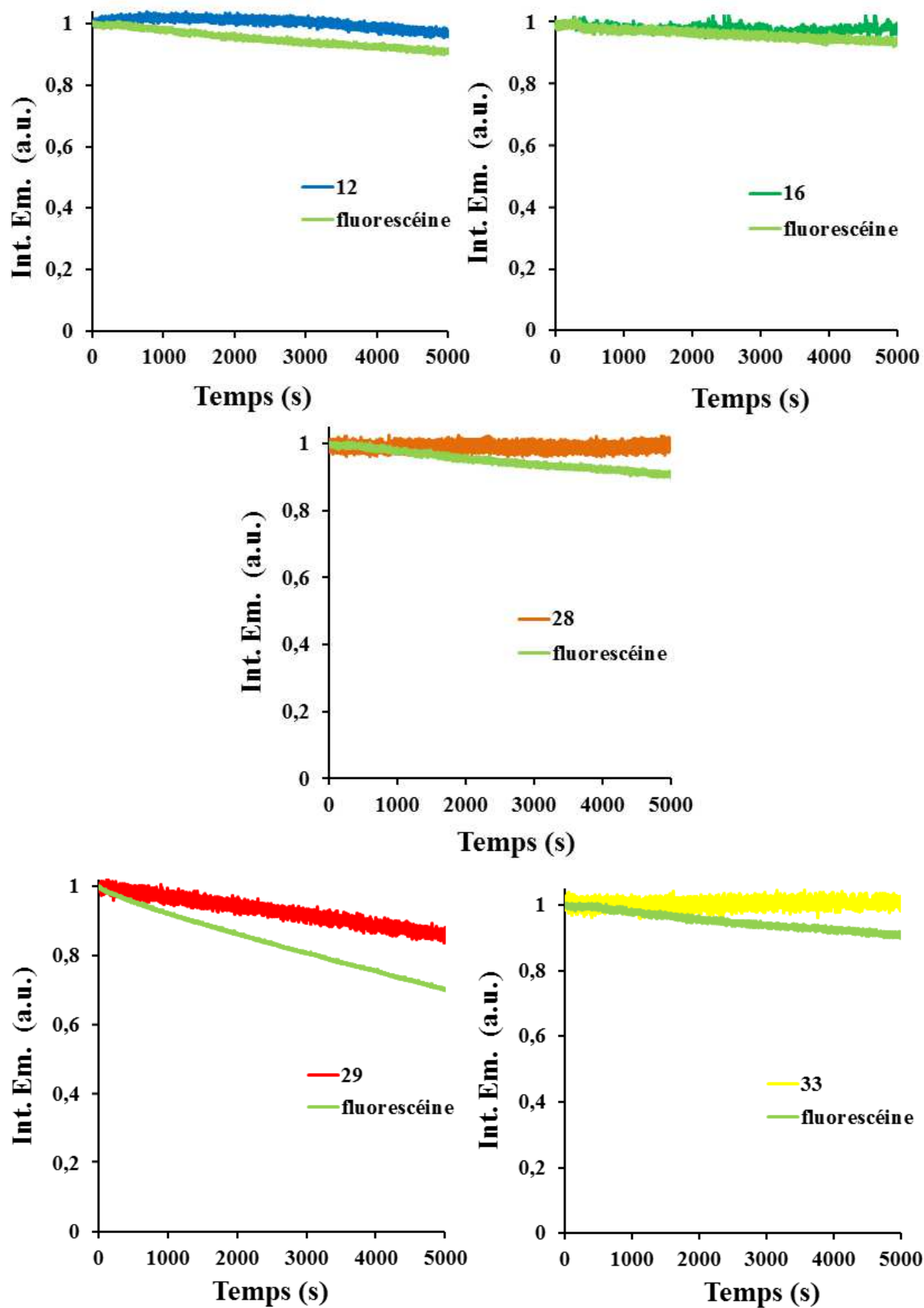


Figure 49 : Intensité de fluorescence relative de 12, 16, 28, 29, 33 et de la fluorescéine lors de l'excitation continue à 446 nm (pour 16), à 460 (pour 12, 28 et 33) et à 507 nm (pour 29).

II.3.3. Propriétés photophysiques des dérivés de l'aniline

Résultats expérimentaux à un photon

Les deux chromophores de cette série sont la molécule **26** qui possède le groupe diphénylamino comme groupement électrodonneur, et la molécule **31** dont le dialkylamino est un groupement électrodonneur. Les spectres d'absorption et d'émission des composés **26** et **31** dans l'eau et dans le dichlorométhane, sont présentés dans la Figure 50.

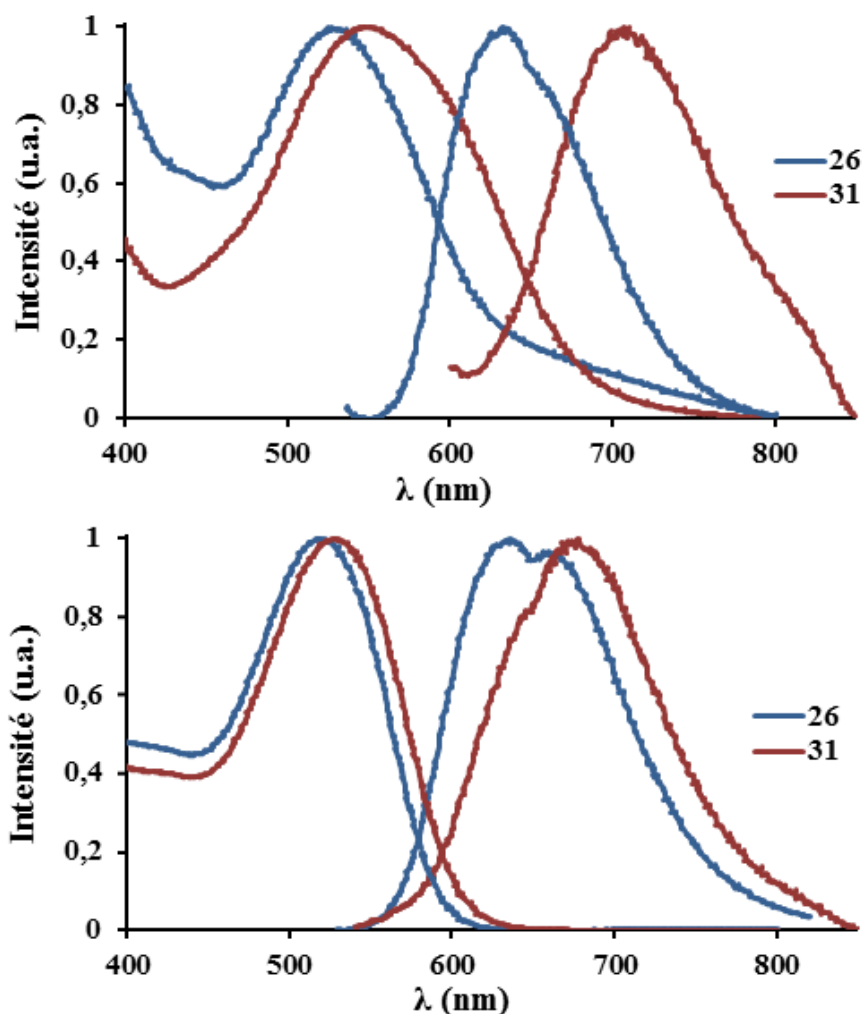


Figure 50 : Spectres d'absorption et d'émission dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas) des chromophores **26** et **31**.

Les spectres d'absorption et d'émission de la molécule **31** sont décalés vers le rouge par rapport à ceux de la molécule **26**, aussi bien dans l'eau que dans le dichlorométhane. Ces décalages vers le rouge sont bien plus prononcés que ceux des molécules des séries précédentes, principalement à cause du plus fort effet donneur des groupes amino. Nous avons également déterminé les coefficients d'extinction molaire, ainsi que les rendements

quantiques de fluorescence dans l'eau et dans le dichlorométhane. Ces données photophysiques linéaires sont présentées dans le *Tableau 5*.

Chromophore	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	Φ (%)
26	521 (527)	44000 (2500)	636 (630)	45 (13)
31	530 (550)	37000 (20200)	677 (707)	16 (1)

Tableau 5 : Données photophysiques des composés **26** et **31** dans le dichlorométhane (eau).

Dans le dichlorométhane le composé **26** a un coefficient d'extinction molaire plus important que celui de **31**. Mais dans l'eau au contraire il est beaucoup plus faible. Quant aux rendements quantiques, celui de **26** est plus élevé que celui de **31** dans les deux solvants.

Caractérisations photophysiques à deux photons

Les spectres d'ADP des chromophores **26** et **31** ont été mesurés dans le dichlorométhane entre 740 et 900 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la *Figure 51*.

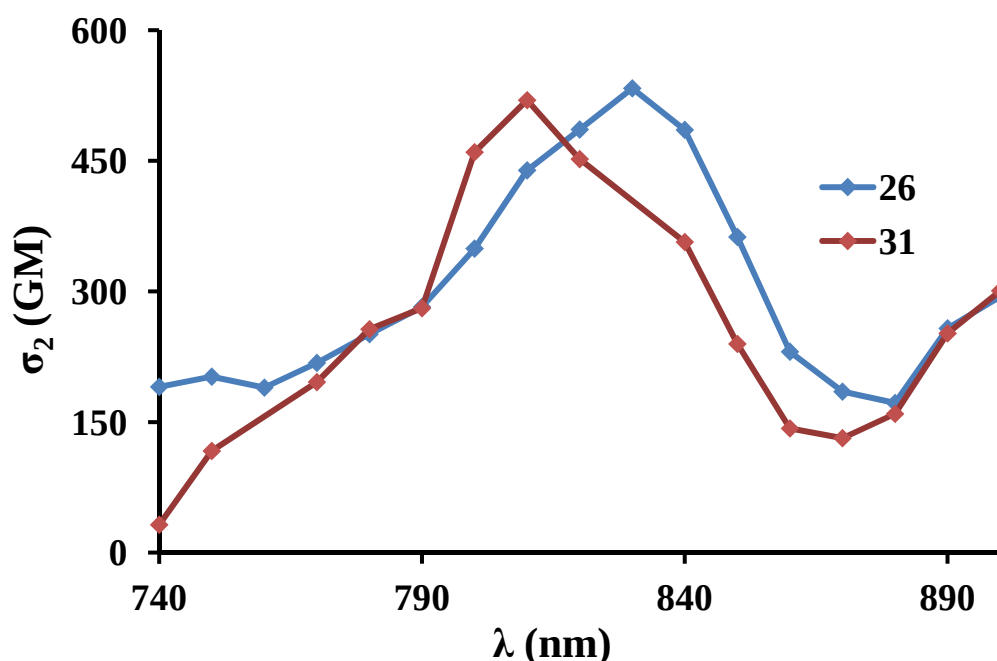


Figure 51 : Spectre d'absorption à deux photons des dérivés à groupes donneurs amino dans le dichlorométhane.

Les deux molécules possèdent des σ_2 similaires, $\sigma_2 = 530$ GM à 830 nm pour la molécule **26**, et $\sigma_2 = 520$ GM à 820 nm pour la molécule **31**. Normalement les groupements amino sont plus efficaces pour l'ADP que les groupements méthoxy, mais si on compare ces résultats avec

ceux de la série précédente on observe que ce n'est pas le cas. Peut être que les spectres d'ADP des deux molécules **26** et **31** présentent un autre maximum en dehors de la zone mesurée. Les spectres ADP semblent tendre vers un autre maximum au delà de 900 nm.

Photostabilité

Ces molécules présentent aussi une très bonne photostabilité. Les courbes présentées dans la Figure 52 montrent que pour les molécules **26** et **31**, l'intensité de fluorescence reste quasiment la même après une excitation continue à 446 nm pendant 5000 s, alors que celle de fluorescéine diminue de 5% dans les mêmes conditions.

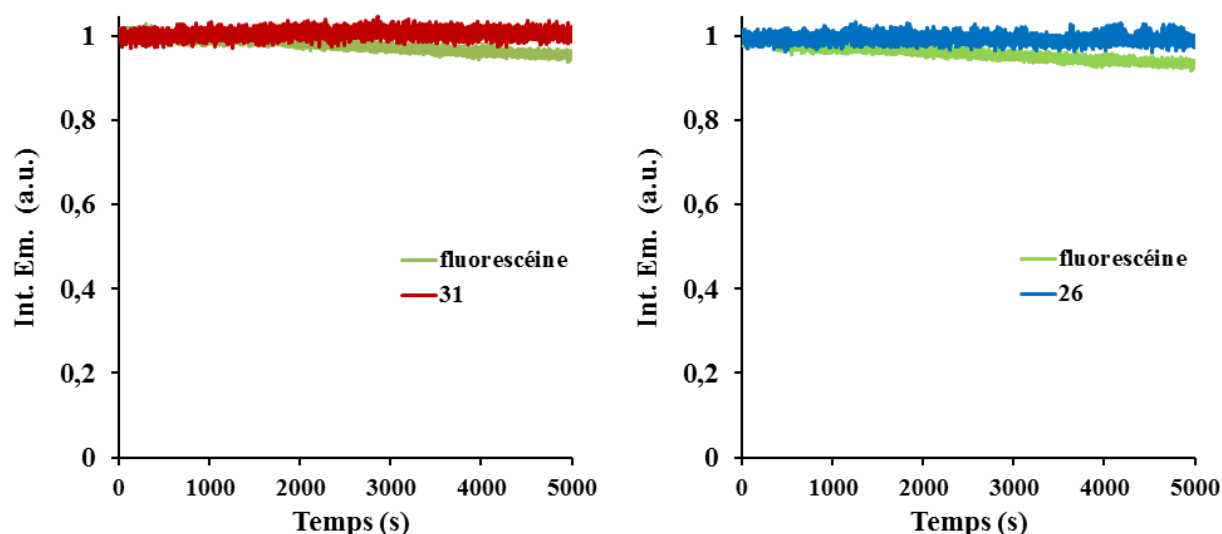


Figure 52 : Intensité de fluorescence relative de **26**, **31** et la fluorescéine lors de l'excitation continue à 446 nm.

II.4. IMAGERIES CELLULAIRE

II.4.1. Cellules HeLa

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse qui provient d'un prélèvement effectué sur Henrietta Lacks, une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus à développement très rapide et décédée en 1951. Ces cellules HeLa, qui forment la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine, sont très utilisées dans les laboratoires de recherche de biologie. Le stock des cellules est généralement gardé à des très basses températures (< -195 °C refroidit par l'azote liquide). Pour les imageries cellulaires, des boîtes de culture de cellules HeLa ont été préparées au laboratoire par nos collègues biologistes. Les boîtes utilisées (IBiDi) sont en plastique et contiennent chacune 5×10^4 cellules HeLa par mL.

de milieu de culture (D-MEM), elles sont gardées à 37 °C. Pour effectuer les imageries, le milieu de culture D-MEM est enlevé et les cellules sont rincées plusieurs fois à l'opti-MEM puis incubées dans une solution de 5 μ M du chromophore dans 1 mL d'opti-MEM pendant une heure d'incubation à 37 °C.

Les expériences d'imagerie cellulaire ont été effectuées au sein de notre laboratoire, en utilisant un MEDP « home made » pour l'imagerie à deux photons et un microscope commercial « Leica SPE II » pour l'imagerie confocale (*Figure 53*).

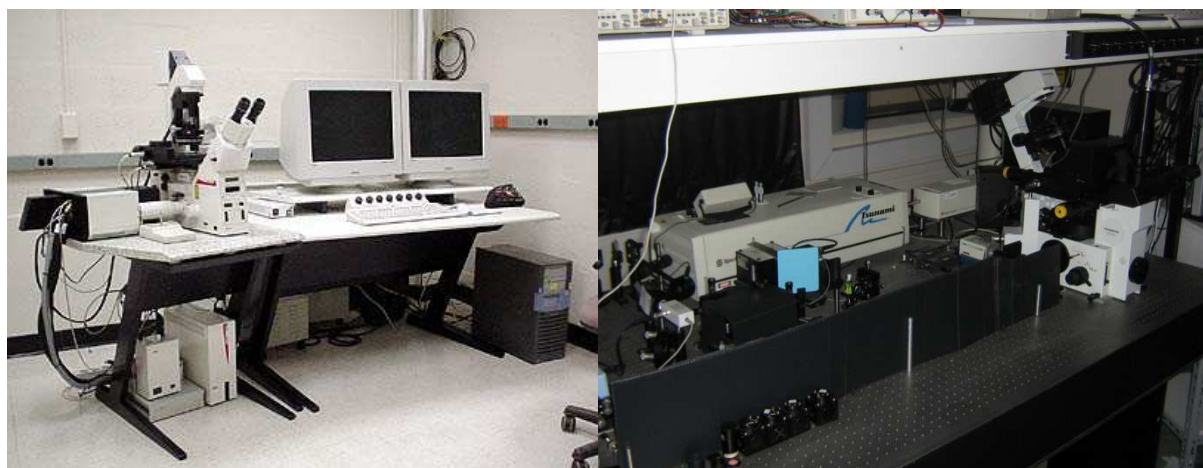


Figure 53 : Le microscope confocal à balayage laser Leica SPE II (à gauche) et le microscope à deux photons construit au sein de notre laboratoire (à droite)
(PIQ- Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie)

II.4.2. Imagerie cellulaire des dérivés de la pyridine

Le chromophore **13** a été utilisé pour colorer des cellules HeLa. Les cultures cellulaires ont été incubées avec une concentration $5 \cdot 10^{-6}$ M du chromophore dans le milieu de culture, puis observés avec le microscope Leica SP2 pour les images confocales et en champ clair et avec le microscope bi-photonique construit au laboratoire pour l'imagerie à deux photons. Dans ce dernier cas, l'excitation est effectuée à $\lambda_{ex} = 800$ nm avec une puissance laser de 5 mW. Avec la molécule **13** (*Figure 54*) on observe une pénétration rapide dans le cytoplasme (<15 min), et une coloration hétérogène avec une accumulation péri-nucléaire. Aucune pénétration dans le noyau n'est observée, même après 1h d'incubation.

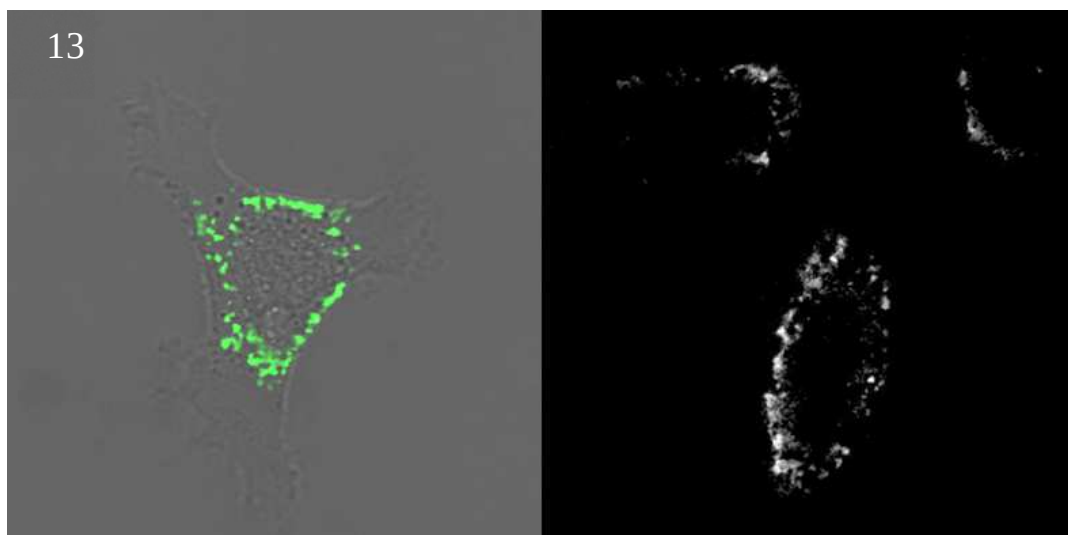


Figure 54 : *Imagerie de cellules HeLa marquées au chromophore 13. Superposition de l'image en champ clair et de l'image confocale (à gauche) et imagerie à deux photons (à droite) (excitation à 800 nm, $P = 5$ mW).*

Pour les molécules **27** et **36** les cellules sont incubées pendant 15 min dans une solution de concentration 5.10^{-6} mol.L⁻¹. Elles sont ensuite imagées par microscopie bi-photonique avec une longueur d'onde d'excitation de 800 nm et une puissance laser moyenne inférieure à 5 mW (*Figure 55*). Nous remarquons de nouveau que les deux fluorophores rentrent dans le cytoplasme mais ne rentrent pas dans le noyau; avec la molécule **36** on observe des spots d'accumulation dans le cytoplasme, alors qu'avec **27** on observe une localisation plus homogène dans le cytoplasme.

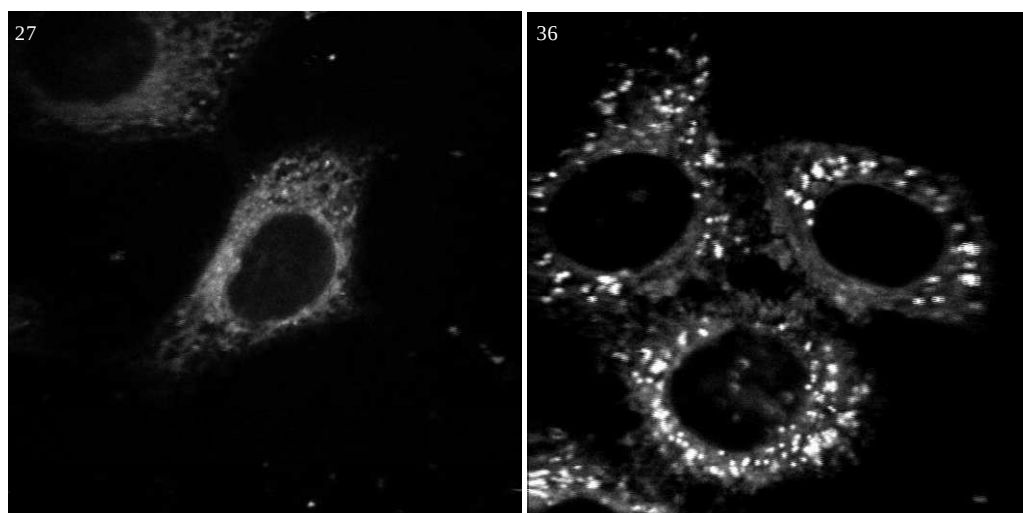


Figure 55 : *Imagerie à deux photons de cellules HeLa marquées au chromophore 27 (à gauche) et au chromophore 36 (à droite).*

Des images en durée de vie de fluorescence (FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) ont été réalisées. Par exemple pour **27**, on distingue nettement des agrégats colorés en orange qui ont précipité à l'extérieur de la cellule : ils ont une durée de vie plus courte ($\sim 1,2$ ns) que celle observée au sein du cytoplasme (~ 3 ns). Cette différence dans les durées de vie indique un micro environnement différent (*Figure 56*).

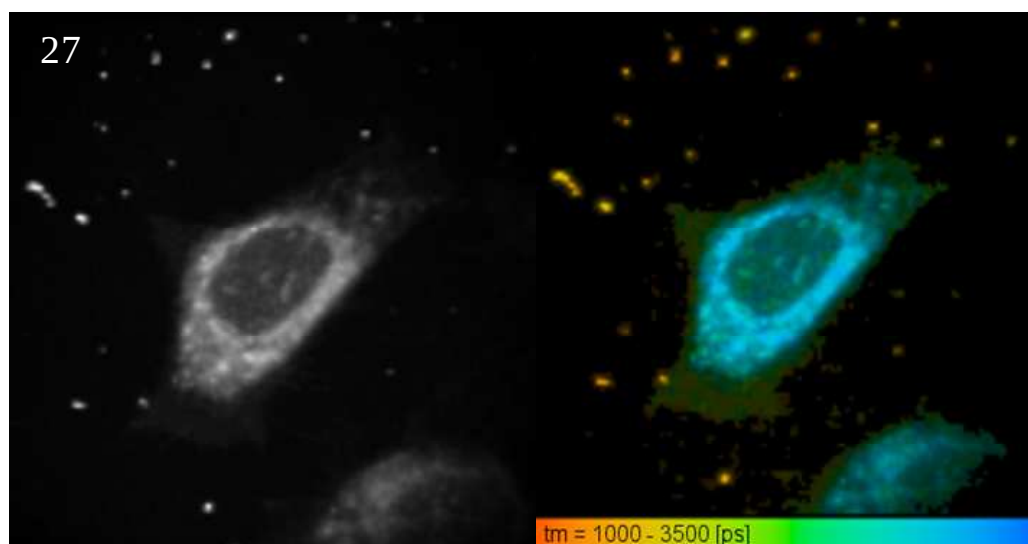


Figure 56 : Image des durées de vie moyennes de fluorescence (FLIM) de cellules HeLa incubées avec le chromophore **27**, en intensité (à gauche) et en couleurs (à droite).

Le microscope « Leica SPE II » de notre unité de recherche nous permet de mesurer le spectre d'émission d'un chromophore dans des endroits très précis au sein de la cellule. Ainsi, deux spectres d'émission du chromophore **27** ont été mesurés, le premier dans les agrégats à l'extérieur de la cellule et le deuxième dans une zone du cytoplasme (*Figure 57*). Nous avons remarqué que celui des agrégats est décalé de 100 nm vers le rouge par rapport à celui du cytoplasme, ce phénomène est typique des agrégats.

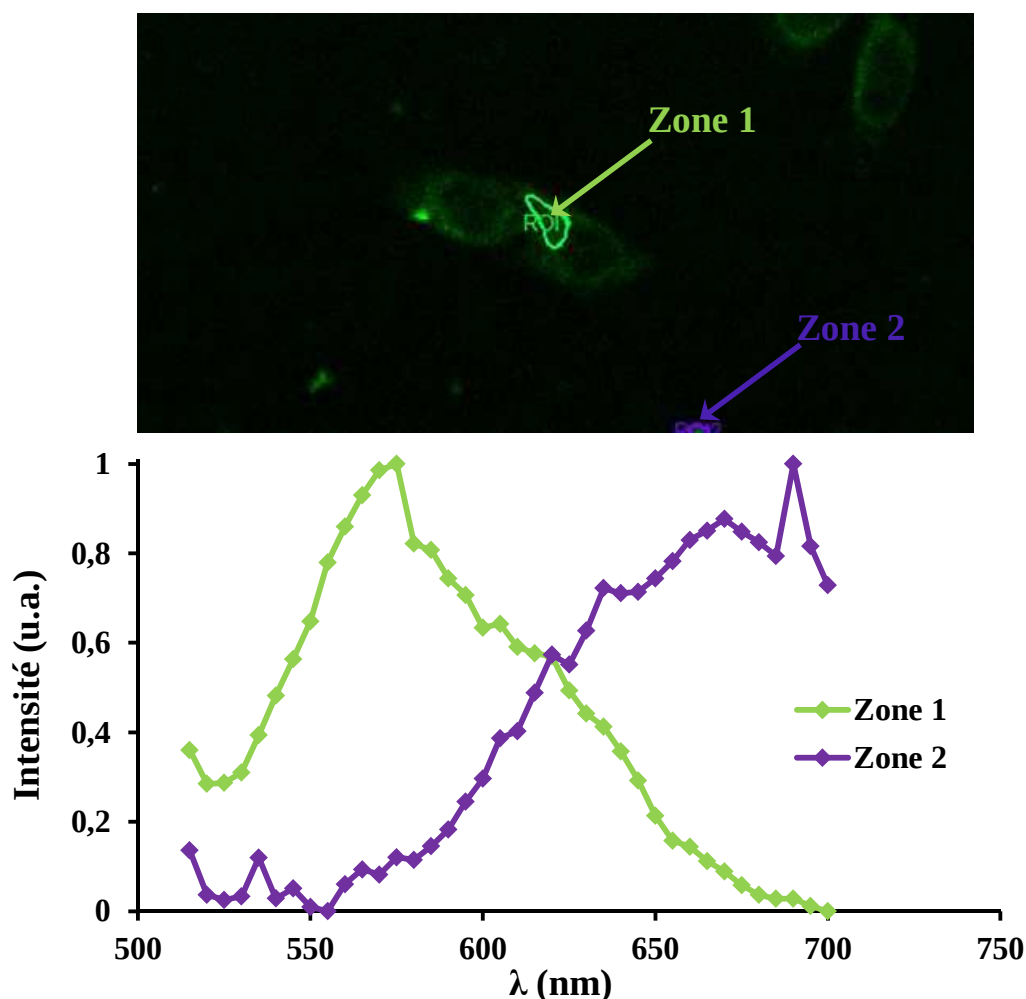


Figure 57 : Image confocale des cellules HeLa incubées avec le chromophore **27** (en haut) et les spectres d'émission mesurés dans les zones 1 (vert) et 2 (violet) de l'image.

Ce microscope permet aussi d'irradier localement une zone dans la cellule et de mesurer ensuite la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps. Ceci permet d'étudier la photodégradation d'un chromophore dans la cellule. Pour cela la cellule est irradiée à 488 nm et la puissance laser est poussée à 100%. Ensuite, la variation de l'intensité de fluorescence est mesurée pendant 120 s. La photodégradation du chromophore **27** a été comparée par celle de **BF3**, fluorophore biphotonique émettant dans le bleu synthétisé il y a quelques années dans notre laboratoire pour les mêmes types d'application^[23]. Le **BF3** perd plus de 60 % de son intensité de fluorescence après 120 s d'excitation, alors que **27** ne perd que 25 % seulement (Figure 58). Ceci confirme que les chromophores dérivés de DPP sont particulièrement photostables.

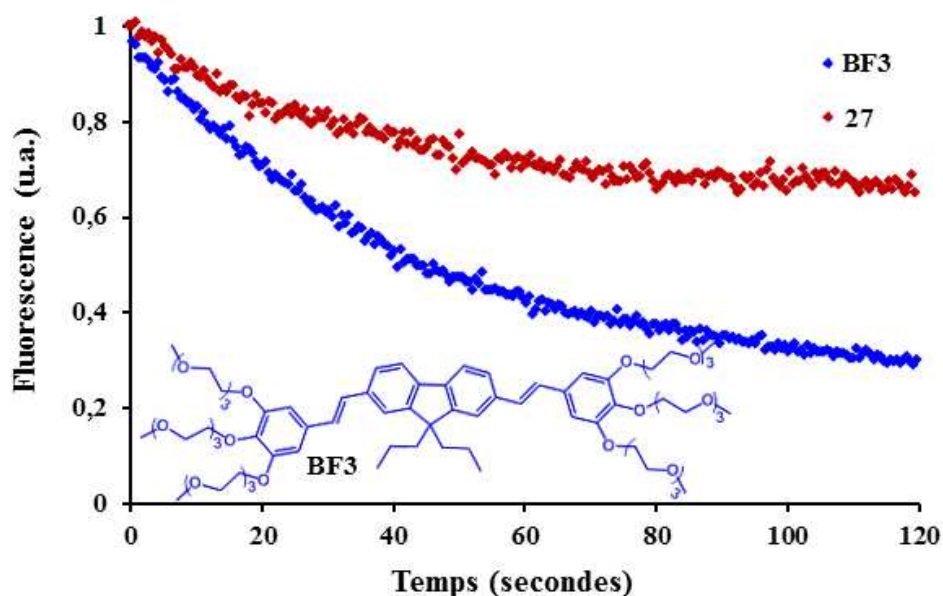


Figure 58 : Variation de l'intensité de fluorescence de la molécule 27 (en rouge) et la molécule BF3 (en bleu) en fonction du temps, dans une cellule HeLa.

II.4.3. Imagerie cellulaire des dérivés de l'anisole

Des cellules HeLa ont été incubées pendant 15 min dans une solution $5 \cdot 10^{-6}$ M du fluorophore 12. Elles sont ensuite imagées par microscopie confocale et par microscopie bi-photonique (Figure 59) avec une longueur d'onde d'excitation de 800 nm et une puissance laser moyenne de 5 mW.

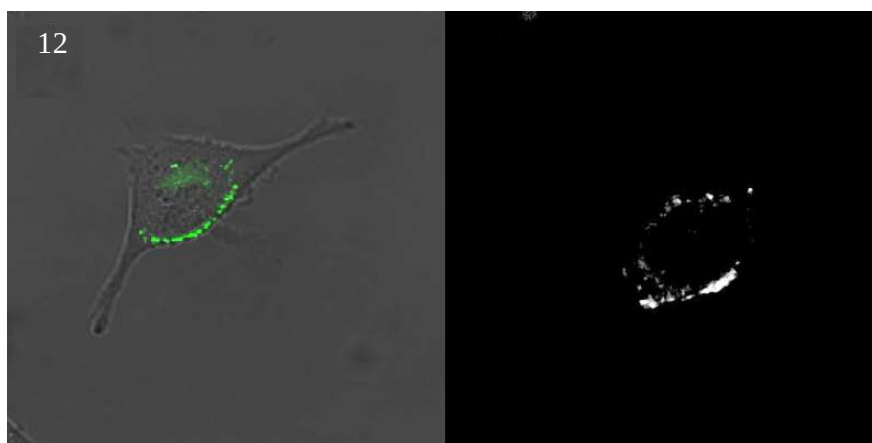


Figure 59 : Imagerie de cellules HeLa marquées au chromophore 12. Superposition de l'image en champ clair et de l'image confocale (à gauche) et imagerie à deux photons (à droite) (excitation à 800 nm, $P = 5$ mW).

Pour les molécules 16, 28 et 33 seules les images par microscopie bi-photonique ont été étudiées (Figure 60). Cette fois nous avons observé un signal de fluorescence plus important

avec une puissance laser faible (<5 mW ou 1 mW) grâce à la forte valeur de la section efficace d'ADP par rapport à celle de **12**.

Toutes ces molécules (**12**, **16**, **28** et **33**) franchissent la membrane cellulaire rapidement et s'accumulent dans certaines parties du cytoplasme (très probablement dans des endosomes) sans traverser la membrane nucléaire.

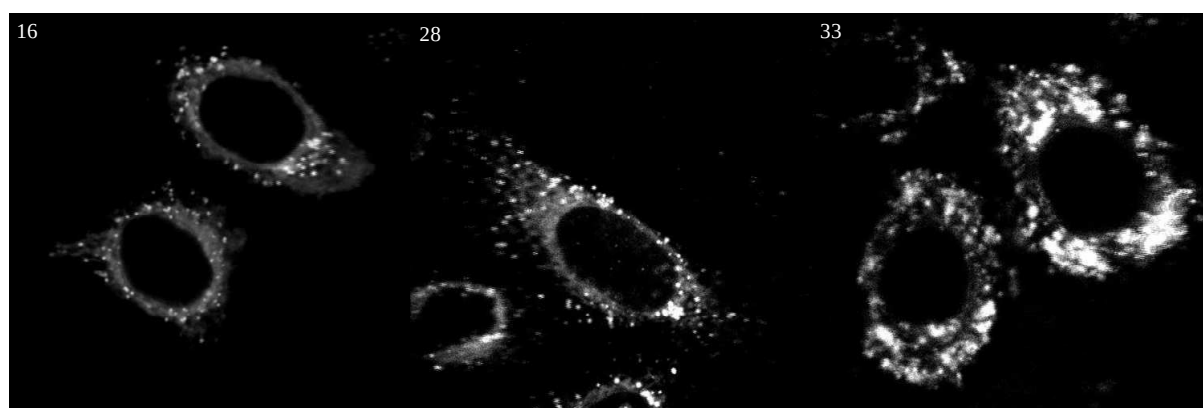


Figure 60 : *Imagerie à deux photons de cellules HeLa marquées avec les chromophores **16** (à gauche), **28** (au milieu) et **33** (à droite).*

Des images des mêmes cellules ont été réalisées en durée de vie de fluorescence (FLIM). Par exemple le chromophore **28** (Figure 61) présente un temps de vie qui varie de 1.5 ns (orange) à 3 ns (bleu) en fonction de la zone où il se trouve.

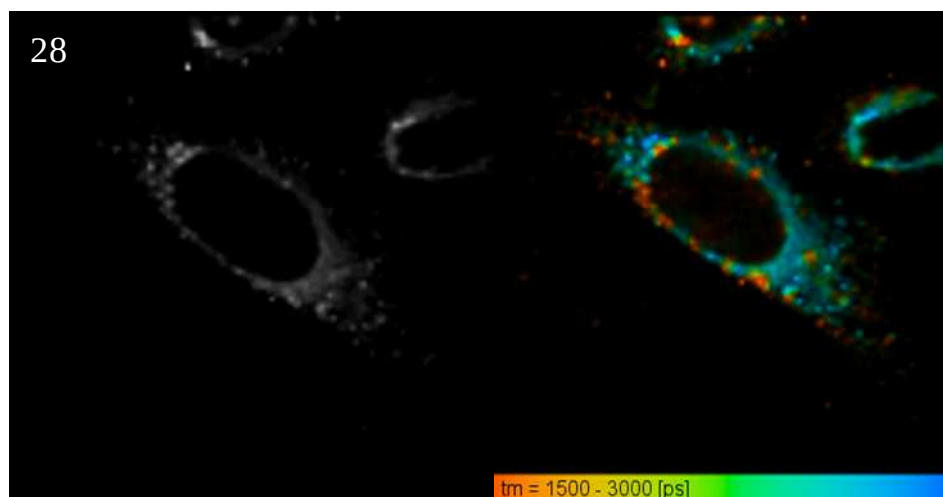


Figure 61: *Image des durées de vie moyennes de fluorescence (FLIM) de cellules HeLa en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) incubées avec le chromophore **28**.*

Pour étudier la photodégradation de **29** dans la cellule, la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps a été mesurée et comparée à celle de **BF3**. Nous avons observé que **29** perd seulement 20% de son intensité de fluorescence après 120 s d'excitation

à 488 nm à la puissance maximale du laser du microscope Leica SPE II, alors que **BF3** perd plus que 60 % de cette intensité après irradiation dans les mêmes conditions (*Figure 62*).

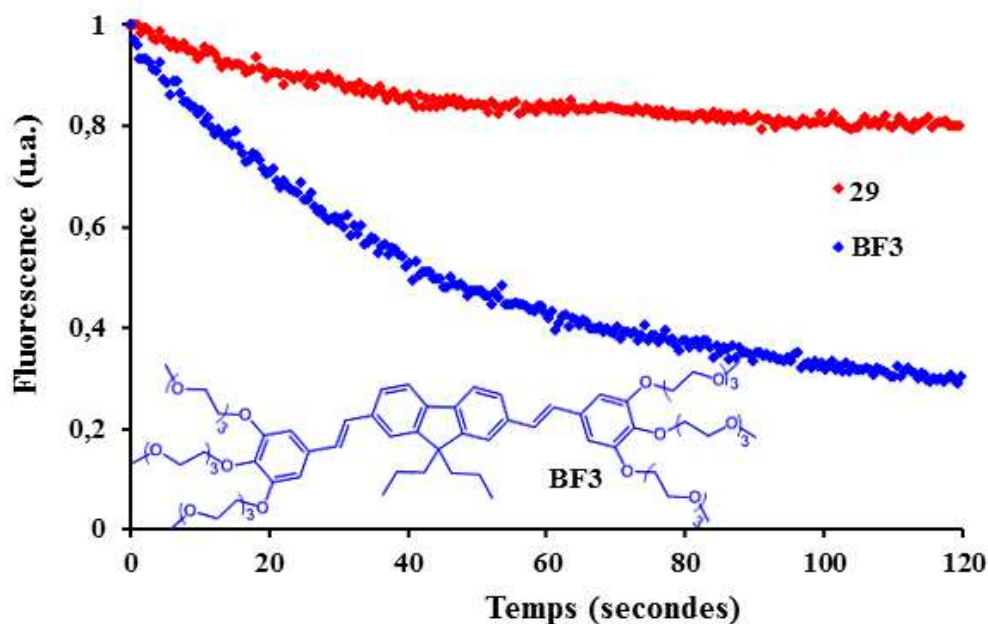


Figure 62 : Variation de l'intensité de fluorescence de la molécule **29** (en rouge) et de la molécule **BF3** (en bleu) en fonction du temps d'irradiation à 488 nm dans une cellule HeLa.

II.4.4. Imagerie cellulaire des dérivés de l'aniline

Comme pour les autres séries de fluorophores, des cellules HeLa sont incubées pendant 15 min dans une solution de concentration $5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ puis imagées par microscopie bi-photonique (*Figure 63*) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 800 nm et une puissance laser moyenne inférieure à 5 mW.

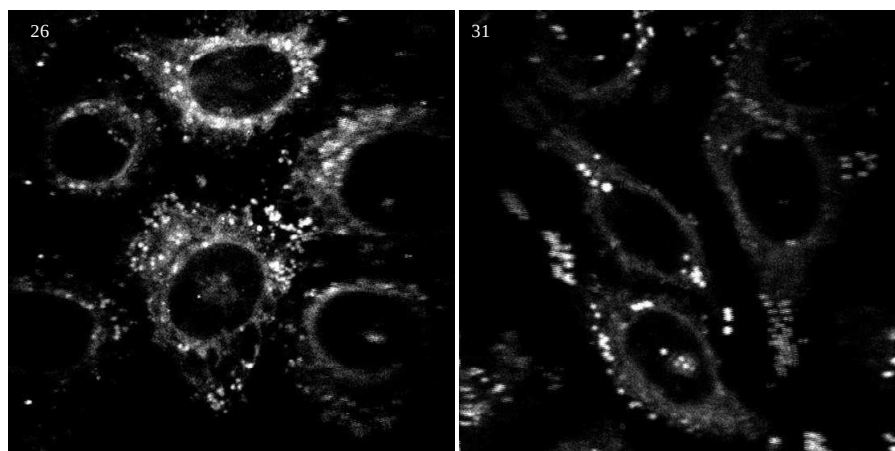


Figure 63 : Imagerie à deux photons de cellules HeLa marquées au chromophore **26** (à gauche) et au chromophore **31** (à droite).

Nous remarquons que les molécules **26** et **31**, comme les autres dérivés de DPP, pénètrent dans le cytoplasme et se concentrent dans des zones plus fluorescentes correspondant probablement à des endosomes.

II.5. CONCLUSION

Les nouveaux fluorophores décrits dans ce chapitre, chromophores symétriques basés sur un cœur rigide dicéto-pyrrolo-pyrrole, se sont avérés efficaces en microscopie à deux photons. Conformément à notre but exposé en introduction, ils fluorescent dans le rouge-orangé, possèdent des bons rendements quantiques d'émission ainsi que des bonnes sections efficaces d'absorption à deux photons. Ceci nous a permis de les utiliser à faible concentration (5.10^{-6} M), et de travailler avec une faible puissance laser (< 5 mW) en imagerie biologique. De plus on a montré que ces colorants présentent une photostabilité importante en la comparant à celle de la fluorescéine après une excitation continue par une lampe d'un spectromètre de fluorescence pendant 5000 s. (Tableau 6)

<i>Chromophores</i>	<i>Photostabilité^a</i>	<i>Chromophores</i>	<i>Photostabilité^a</i>
12	x 3	28	x 4,5
13	x 5	29	x 2,5
16	x 6	31	x 5
26	x 5	33	x 10
27	x 5	36	x 4

^a Comparé à la fluorescéine

Tableau 6 : Photostabilités des chromophores par rapport à la fluorescéine

Les expériences sur des cellules HeLa ont montré que ces fluorophores pénètrent rapidement dans le cytoplasme, mais ne traversent pas la membrane nucléaire. Ayant démontré l'intérêt en imagerie biologique de ces chromophores symétriques, nous nous sommes orientés vers la fonctionnalisation de ces fluorophores dérivés du DPP, dans le but de procéder à des greffages sur ses systèmes divers comme des peptides, nanoparticules, ou virus.

REFERENCES

- [1] D. G. Farnum, G. Mehta, G. G. I. Moore, F. P. Siegal, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 15, 2549-2552.
- [2] D. Ranganathan, S. Ranganathan, *Further challenging problems in organic reaction mechanisms*, Academic Press, **1980**.
- [3] a) A. Iqbal, L. Cassar, **1982**, p. 31 pp; b) L. Cassar, A. Iqbal, A. C. Rochat, **1984**, p. 22 pp.
- [4] a) A. Iqbal, M. Jost, R. Kirchmayr, J. Pfenninger, A. Rochat, O. Wallquist, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1988**, 97, 615-644; b) A. C. Rochat, L. Cassar, A. Iqbal, **1983**, p. 32 pp; c) F. Closs, R. Gompper, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 564-567.
- [5] a) B. P. Karsten, J. C. Bijleveld, R. A. J. Janssen, *Macromol. Rapid Commun.*, **2010**, 31, 1554-1559; b) J. C. Bijleveld, R. A. M. Verstrijden, M. M. Wienk, R. A. J. Janssen, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 9224-9231.
- [6] G. Zhang, K. Liu, Y. Li, M. Yang, *Polym. Int.* **2009**, 58, 665-673.
- [7] M. Fukuda, K. Kodama, H. Yamamoto, K. Mito, *Dyes Pigm.* **2004**, 63, 115-125.
- [8] a) J. Mizuguchi, G. Wooden, *Ber. Bunsen Ges. phys. Chem.* **1991**, 95, 1264-1274; b) J. Mizuguchi, G. Rihs, *ChemInform*, **1992**, 23, no-no; c) H. Langhals, T. Grundei, T. Potrawa, K. Polborn, *Liebigs Ann.*, **1996**, 1996, 679-682.
- [9] a) S. Lin, S. Liu, H. Zou, W. Zeng, L. Wang, R. Beuerman, D. Cao, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2011**, 49, 3882-3889; b) F. He, L. Liu, L. Li, *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, 21, 3143-3149.
- [10] L. Deng, W. Wu, H. Guo, J. Zhao, S. Ji, X. Zhang, X. Yuan, C. Zhang, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 9294-9304.
- [11] a) B. Zhang, H. Zhang, X. Li, W. Li, P. Sun, W. Yang, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2011**, 49, 3048-3057; b) E. Q. Guo, P. H. Ren, Y. L. Zhang, H. C. Zhang, W. J. Yang, *Chem. Comm.*, **2009**, 5859-5861.
- [12] M. Y. Berezin, W. J. Akers, K. Guo, G. M. Fischer, E. Daltrozzo, A. Zumbusch, S. Achilefu, *Biophys. J.* **2009**, 97, L22-L24.
- [13] F. Feng, X. Duan, S. Wang, *Macromol. Rapid Commun.*, **2009**, 30, 147-151.
- [14] Z. Hao, A. Iqbal, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, 26, 203-213.
- [15] A. Avdeef, B. Testa, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2002**, 59, 1681-1689.
- [16] N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1979**, 866-867.
- [17] R. F. Heck, *Accounts Chem. Res.*, **1979**, 12, 146-151.
- [18] C. Amatore, A. Jutand, *J. Organomet. Chem.*, **1999**, 576, 254-278.
- [19] K. Sonogashira, *J. Organomet. Chem.*, **2002**, 653, 46-49.

- [20] G. A. Crosby, J. N. Demas, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991-1024.
- [21] H. Langhals, M. Limmert, I.-P. Lorenz, P. Mayer, H. Piotrowski, K. Polborn, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 2000, 2345-2349.
- [22] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, 13, 481-491.
- [23] A. Hayek, F. Bolze, J.-F. Nicoud, P. L. Baldeck, Y. Mely, *Photoch. Photobiol. Sci.*, **2006**, 5, 102-106.

CHAPITRE III

NOUVEAUX CHROMOPHORES FONCTIONNALISES AMINO- REACTIFS

III.1. GENERALITES

Les fluorophores symétriques à cœur DPP ont montré une bonne solubilité dans l'eau, une efficacité en fluorescence induite par ADP et ainsi qu'une photostabilité remarquable. Nous avons alors décidé de valoriser ces fluorophores en les fonctionnalisant. Le but est d'introduire un groupe fonctionnel, comme un acide carboxylique par exemple, pour pouvoir réaliser une bioconjugaison avec des protéines, des nanoparticules, ou des virus par exemple ^[1]. Ces fluorophores fonctionnalisés permettent de localiser une espèce donnée ou de suivre un mécanisme déterminé en milieu biologique après conjugaison (*Figure 64*).

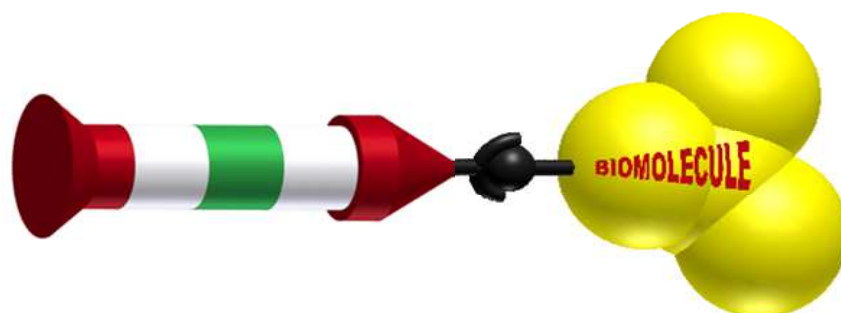


Figure 64 : Schéma d'un système bio-conjugué associant un chromophore ADP et une biomolécule.

Les fluorophores amino-réactifs sont des espèces capables de réagir facilement avec les fonctions amines, qui sont très communes au sein des systèmes biologiques ^[1a, 2]. Nous décrirons dans ce chapitre la synthèse et la caractérisation de nouvelles sondes fluorescentes amino-réactives basés sur le cœur DPP ainsi que leur bioconjugaison à un peptide du virus HIV synthétisé et étudié au laboratoire : le peptide TAT (Trans-Activator of Transcription).

III.2. SYNTHESE DES DERIVES DPP FONCTIONNALISES

Deux types de fonctionnalisation ont été utilisés: le type I pour lequel la fonction réactive est attachée au système périphérique du fluorophore et le type II pour lequel la fonction réactive est attachée au cœur central (*Figure 65*).

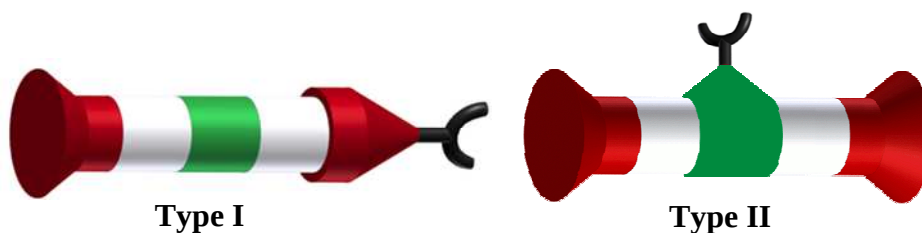


Figure 65 : Schéma des deux types de chromophores amino-réactifs synthétisés

III.2.1. Synthèse des fluorophores de type I

Le chromophore visé est dissymétrique : il est constitué d'un cœur rigide DPP lié à un synthon périphérique, comme un phényle, et à un autre synthon périphérique fonctionnalisé, comme un système gallique lié à un groupement acide (*Figure 66*).

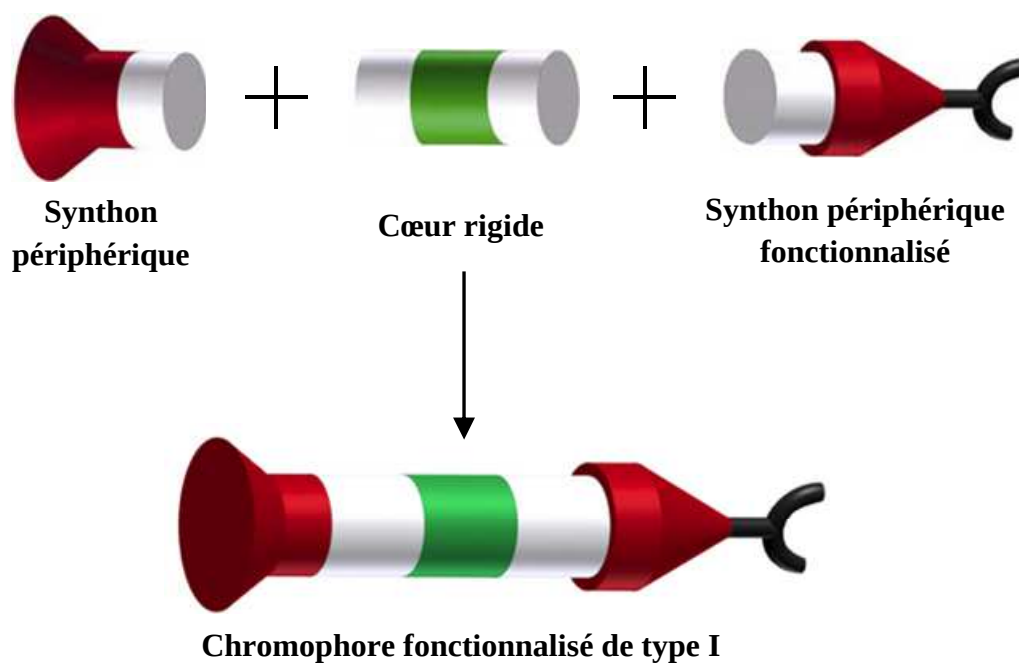


Figure 66 : Schéma de la préparation d'un chromophore dissymétrique fonctionnalisé de type I.

L'étape clé pour la synthèse de la molécule **41** est la formation d'un cœur DPP dissymétrique **38** substitué par un groupement phényle d'un côté et par un 4-bromophényle de l'autre côté, ce qui nous permettra de réaliser un couplage de Heck d'un seul côté. Généralement, les cœurs DPP sont obtenus par des réactions en cascade entre le di-*iso*-propylsuccinate et deux molécules de nitrile aromatiques^[3], tandis que pour la préparation des DPP dissymétriquement substitués la réaction se déroule en deux étapes bien distinctes *Schéma 14*. Premièrement l'ester de pyrrolinone (**37**) a été isolé par une réaction entre le benzoylacétate d'éthyle et le chloroacétate de méthyle en milieu basique, suivie d'une réaction avec un sel d'ammonium puis d'une réaction avec un nitrile aromatique en milieu fortement basique pour conduire à la molécule **38**^[4].

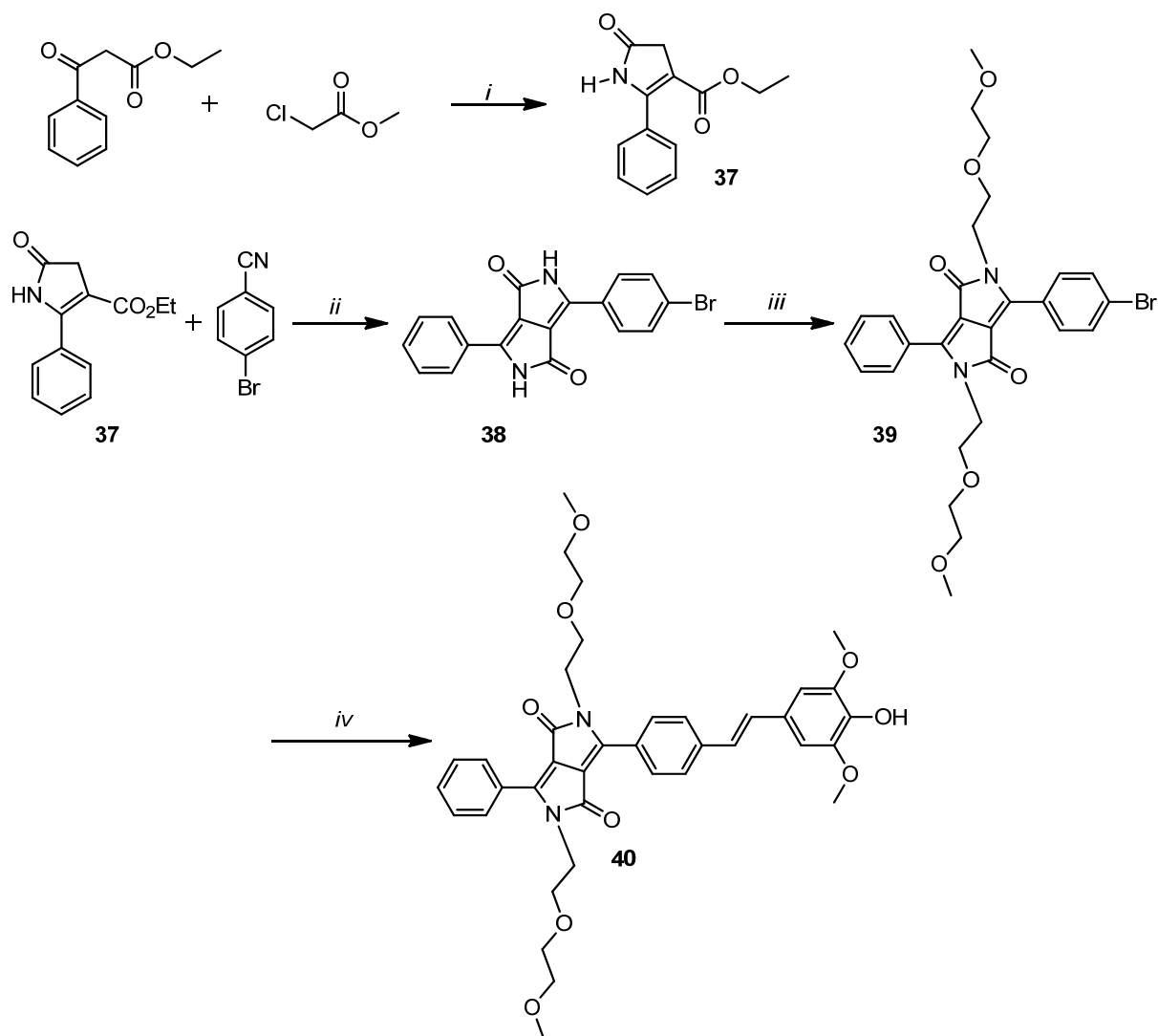


Schéma 14 : Synthèse de la molécule intermédiaire 40

(i) Na_2CO_3 , diméthoxyétane/acétone, acétate d'ammonium 33 % ; (ii) alcool t-amyle, Na, 70% ; (iii) NMP, t-BuOK, 1-Bromo-2-(2-méthoxyéthoxy)éthane, 36% ; (iv) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, TOP, DMF/ Et_3N , 4-(tert-Butyldiméthylsilyloxy)-3,5-diméthoxystyrène, TBAF, 76%.

Comme pour tous les DPP non substitués sur les atomes d'azote, **38** est très peu soluble dans les solvants classiques. Afin d'induire une bonne solubilité dans l'eau, nous avons introduit comme précédemment des chaînes oligoéthyléneglycol sur ces atomes d'azote, obtenant le produit **39** avec un rendement de 36 %. Ensuite nous avons effectué un couplage de Heck avec le 4-(tert-butyldiméthylsilyloxy)-3,5-diméthoxystyrène, suivi d'une déprotection *in situ* par le TBAF du groupement silylé pour donner la molécule **40** avec un bon rendement (76 %). Le groupement réactif est ensuite introduit sur le groupement phénolique libre par une réaction avec le bromoacétate de tertibutyle en milieu basique (Schéma 15). La liaison ester est ensuite clivée en utilisant de l'acide trifluoroacétique pour conduire à la fonction acide

libre avec un excellent rendement (97 %). La molécule finale **42** peut ainsi être couplée à une amine primaire d'une molécule cible. Par exemple elle peut être directement utilisée en synthèse peptidique sur phase solide.

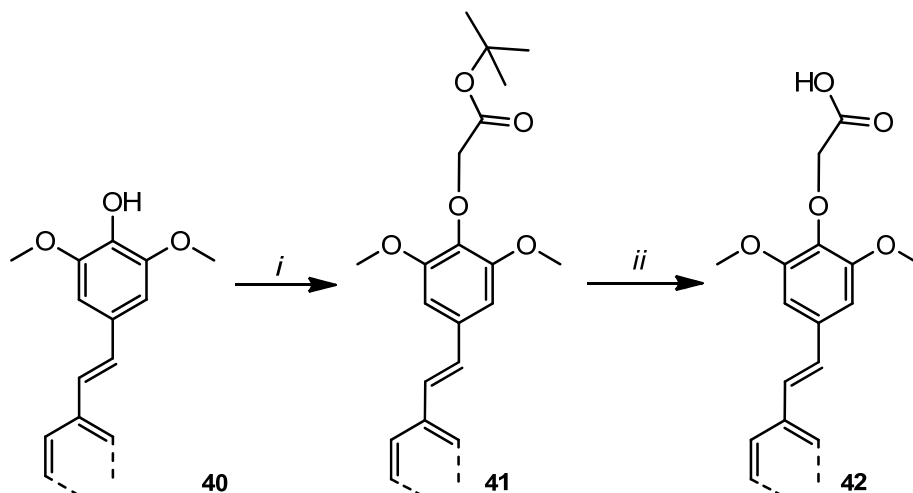


Schéma 15 : Synthèse du dérivé fonctionnalisé 42

(i) DMF, K_2CO_3 , bromoacétate de t-butyle, 30 % (ii) CH_2Cl_2 , TFA, 97 %.

III.2.1. Synthèse de systèmes bio-conjuguables de type II

La fonctionnalisation est effectuée directement sur le cœur rigide central qui ainsi reste lié à deux systèmes conjugués électrodonneurs, comme montre la Figure 67.

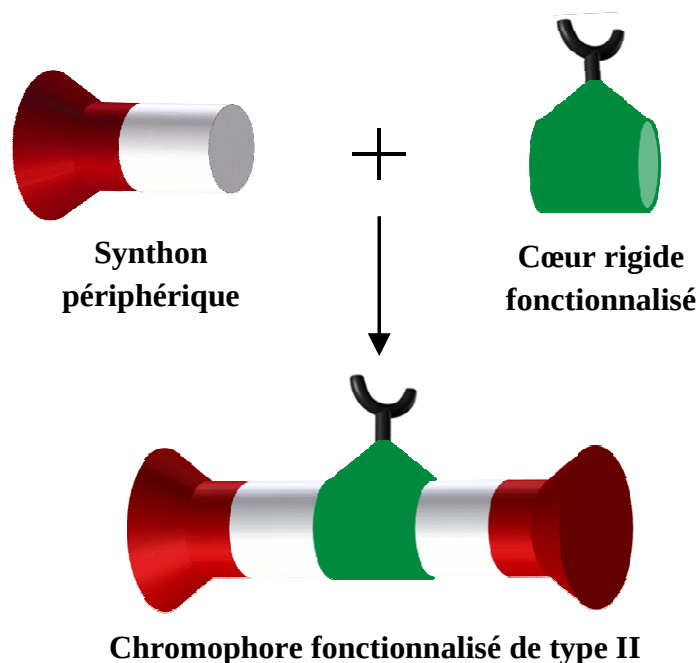


Figure 67 : Schéma des parties constituant un chromophore fonctionnalisé de type II.

La synthèse de ces composés débute comme pour les dérivés décrits dans le précédent chapitre par la préparation du dérivé DPP symétrique di-bromé **6** (Schéma 16). La substitution des atomes hydrogène de ce cœur DPP se déroule ensuite en deux étapes. Dans une première étape on introduit un seul groupe n-octyle, pour obtenir le DPP monosubstitué **43**. Ce long groupement alkyle a été choisi car c'est celui qui permet la séparation des différents produits (DPP non substitué et DPP disubstitué) le plus facilement et avec le meilleur rendement. L'introduction de chaînes oligoéthylèneglycol n'a pas permis de séparer les différents produits sur une échelle préparative. L'autre atome d'hydrogène a ensuite été substitué par le bromoacétate de t-butyle pour donner le synthon clé **44**, comme décrit précédemment ^[5]. Avec ce dernier nous avons effectué un bis-couplage de Heck avec le 4-vinylanisole pour obtenir le produit **45** avec un très bon rendement (87 %). Le fluorophore final est obtenu en déprotégeant la fonction acide par le TFA.

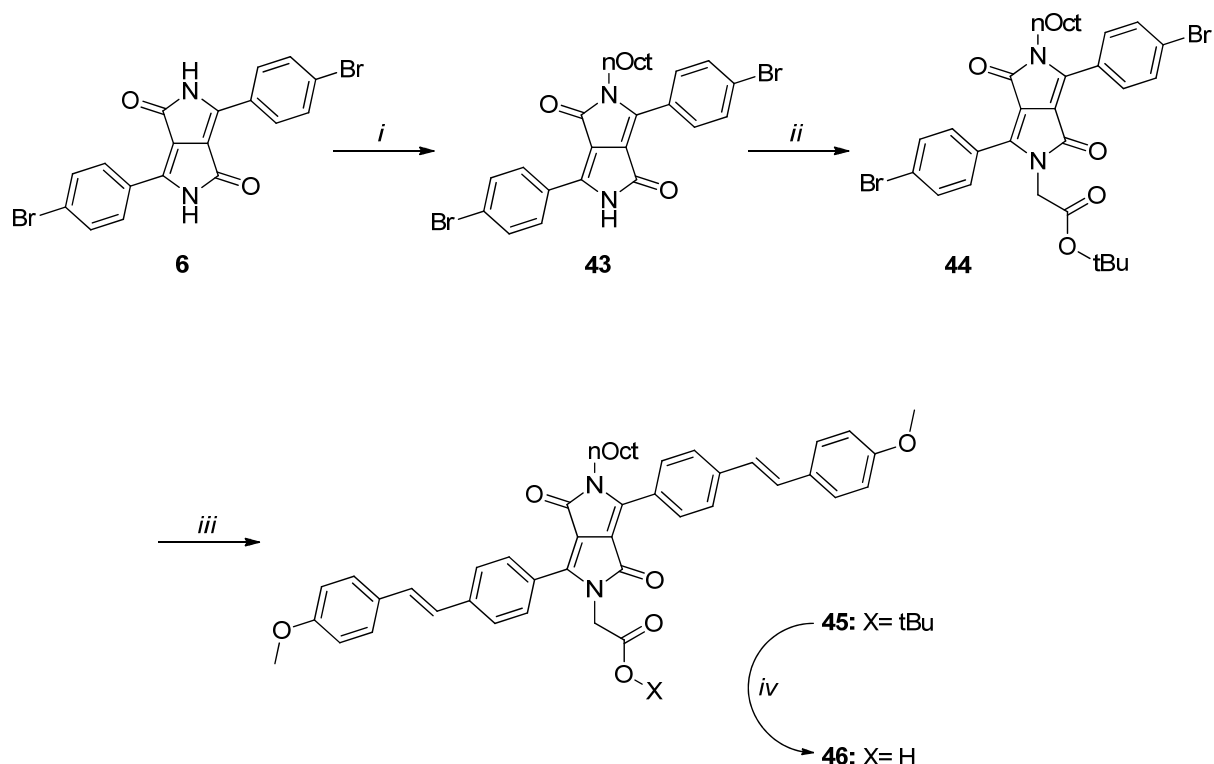


Schéma 16 : Synthèse du chromophore **46** fonctionnalisé de type II

(i) NMP, *t*-BuOK, 1-bromooctane, 36%; (ii) NMP, *t*-BuOK, bromoacétate de *t*-butyle, 47 %;
(iii) Pd(OAc)₂, TOP, DMF/Et₃N, 4-vinylanisole, 86% DMF; (iv) CH₂Cl₂, TFA, 85 %.

L'absence de groupements solubilisant dans l'eau est moins gênante que précédemment car ces composés ont vocation à être conjugués à des macromolécules ou des nanosystèmes solubles dans l'eau.

III.3. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES

III.3.1 Propriétés photophysiques à un photon

Les propriétés photophysiques des fluorophore **41** et **45** ont été étudiées par spectroscopie UV-visible et de fluorescence. Les spectres d'absorption et d'émission correspondants sont présentés dans la Figure 68).

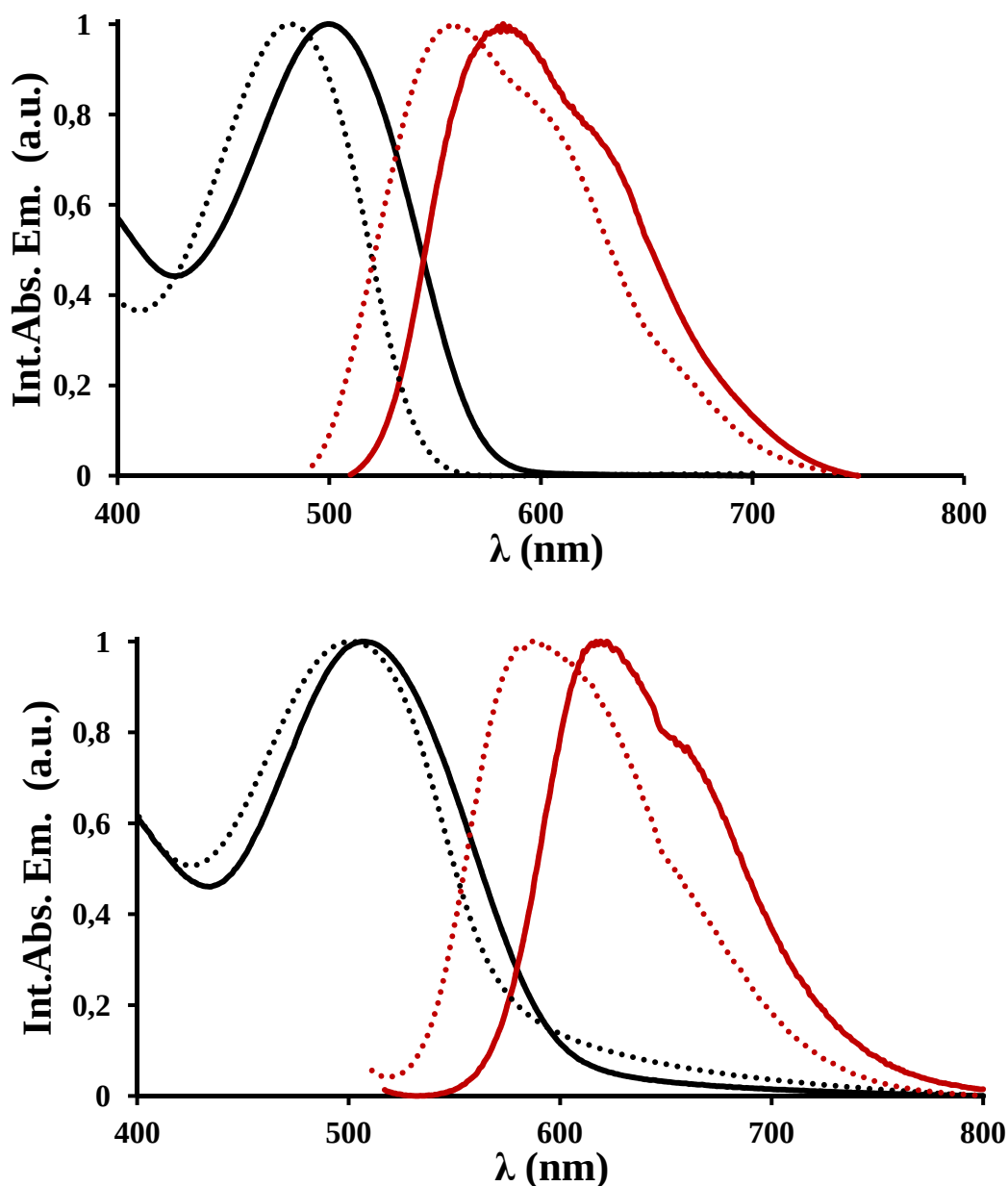


Figure 68 : Spectres d'absorption (noir) et d'émission (rouge) pour la molécule **41** (pointillé) et la molécule **45** (en trait plein) dans l'eau (en haut) et dans le dichlorométhane (en bas).

Les fluorophores **41** et **45** montrent une forte absorption aux alentours de 500 nm et fluorescent dans l'orange (vers 600 nm). Sur les spectres d'absorption et d'émission le produit **45** présente un décalage bathochrome par rapport au produit **41** dont le système conjugué est plus court. Les coefficients d'extinction et les rendements quantiques ont été déterminés dans l'eau et le dichlorométhane. Les paramètres photophysiques sont résumés dans le *Tableau 7*. Le chromophore **45** possède un rendement quantique et un coefficient d'extinction plus importants que ceux de **41**, comme attendu pour une molécule symétrique avec un groupement donneur supplémentaire. La molécule **45** et la molécule symétrique **28**, qui possèdent la même structure moléculaire et ne diffèrent que par les substituants sur les azotes, possèdent des propriétés photophysiques très similaires. En conclusion l'introduction de la fonction acide réactive utilisable pour la bioconjugaison n'affecte pas d'une manière significative les propriétés photophysiques par rapport aux colorants parents, car elle n'est pas en position conjuguée.

Chromophore	λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	Φ (%)
41	482 (501)	15000 (16000)	561(586)	34 (6)
45	500 (507)	30000 (12000)	582 (619)	68 (9)
28	503 (501)	35000 (20000)	580 (597)	70 (5)

Tableau 7 : Données photophysiques des composés **28**, **41** et **45** dans le dichlorométhane et dans l'eau (entre parenthèse).

III.3.2 Propriétés photophysiques à deux photons

Les propriétés d'ADP des fluorophores **41** et **45** ont été étudiées expérimentalement par la méthode de fluorescence à deux photons décrite précédemment. Les spectres d'ADP sont illustrés dans la *Figure 69*. L'allure des spectres d'ADP de ces deux colorants est similaire, mais la section efficace d'ADP σ_2 maximale de la molécule **45** (~700 GM à 800 nm) est environ deux fois celle de la molécule **41** (~350 GM à 800 nm). La section efficace d'absorption à deux photons du chromophore **45** est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour la molécule de référence **28** (780 GM à 800 nm).

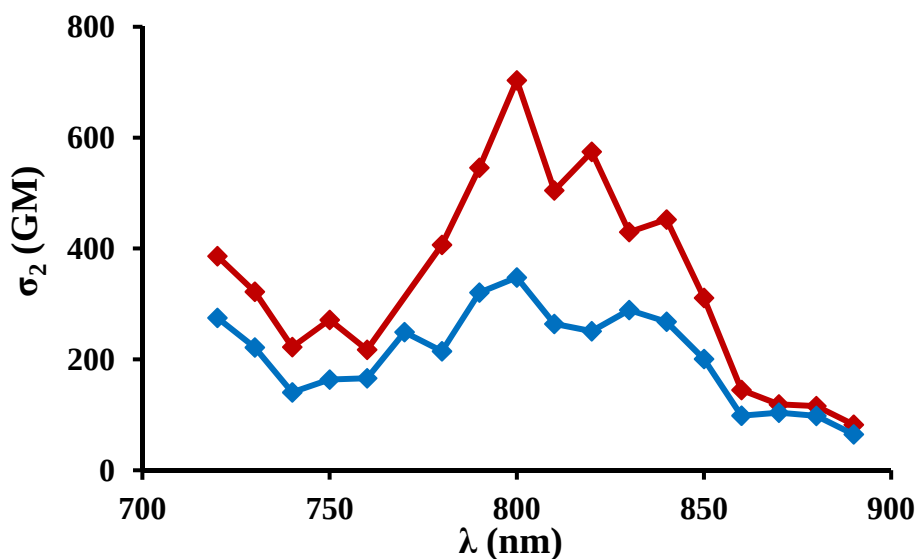


Figure 69 : Spectre d'excitation à deux photons de la molécule **41** (en bleu) et la molécule **45** (en rouge) dans le dichlorométhane.

III.4. MARQUAGE DE LA PROTEINE ACTIVATRICE DE TRANSCRIPTION DU VIH-1 (TAT)

III.4.1. Généralités

Trans-Activator of Transcription protein (TAT)

La protéine **TAT** sécrétée par les cellules infectées par le virus VIH-1, joue un rôle clé dans l'induction de l'apoptose des lymphocytes T sains. **TAT** est une petite protéine basique modulaire de 86 à 106 résidus, d'environ 14-15 kDa ^[6]. Notre laboratoire étudie plus particulièrement la partie de **TAT**, située entre les acides aminés 44 et 61. Ainsi, **TAT** (44-61) a été préparé par synthèse peptidique sur phase solide au sein de notre laboratoire (*Figure 70*).

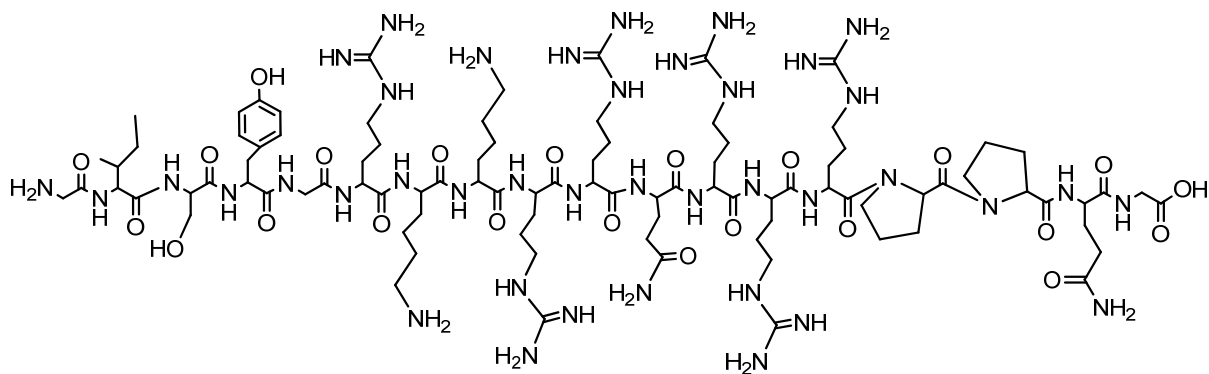


Figure 70 : *Structure moléculaire de la protéine TAT (44-61).*

La Synthèse Peptidique sur Phase Solide ^[7]

Le principe de la synthèse sur phase solide est la croissance d'une chaîne protéinique (peptidique) sur un support polymérique solide (résine). La 1^{ère} étape est la fixation du premier acide aminé (AA) sur le support solide. La fonction -NH₂ terminale de l'AA ainsi que les fonctions réactives du groupement R de l'AA sont préalablement protégées. La 2^{ème} étape consiste en la déprotection de la fonction -NH₂ terminale du premier AA fixé. Ensuite dans une 3^{ème} étape une addition ou couplage du second (ou n^{ième}) AA protégé sur le premier (ou n-1) AA fixé est effectuée. Le groupement -CO₂H de l'AA additionné est activé pour faciliter la réaction d'amidation. Dans une dernière étape, les chaînes latérales (fonctions réactives des groupements R des AA introduits) de la protéine synthétisée sont déprotégées et la protéine est finalement libérée de son support solide. La protéine ainsi libérée est purifiée par chromatographie liquide haute performance préparative. Un des principaux avantages de cette méthode est la facilité de l'élimination des réactifs n'ayant pas réagi ainsi que des sous-produits par simple filtration et lavage, sans perte de la protéine en croissance. De plus un excès de réactifs permet d'atteindre des rendements élevés en un temps de synthèse optimum. Le groupe protecteur de la fonction amine doit être facilement déprotégé, mais doit être suffisamment stable pour résister aux conditions de couplage et des autres réactions. Les groupements les plus employés sont le BOC (*t*-ButOxyCarbonyl) et le FMOC (9-FluorenylMethylOxyCarbonyl) (Figure 71)

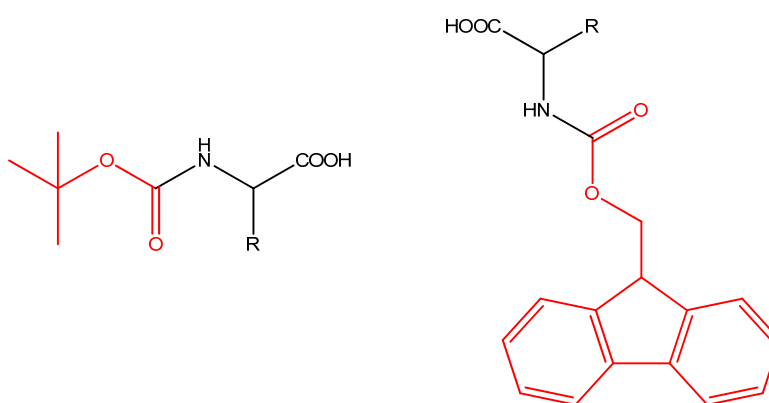


Figure 71 : Structures moléculaires des groupements protecteurs (en rouge) : le BOC (à gauche) et le FMOC (à droite).

III.4.2. La bioconjugaison avec TAT

La bioconjugaison a été effectuée directement avec **TAT** sur la partie N-terminale par synthèse peptidique sur phase solide. Un acide aminé β -Ala a été introduit sur l'extrémité N-

terminale du peptide pour augmenter sa stabilité. Le conjugué peptide-fluorophore a été clivé par traitement au TFA. Il a ensuite été purifié par HPLC et caractérisé par LC-MS. Nous avons ainsi obtenu deux peptides marqués par les fluorophores **42** (**42- β Ala-TAT**) et **46** (**46- β Ala-TAT** Figure 72).

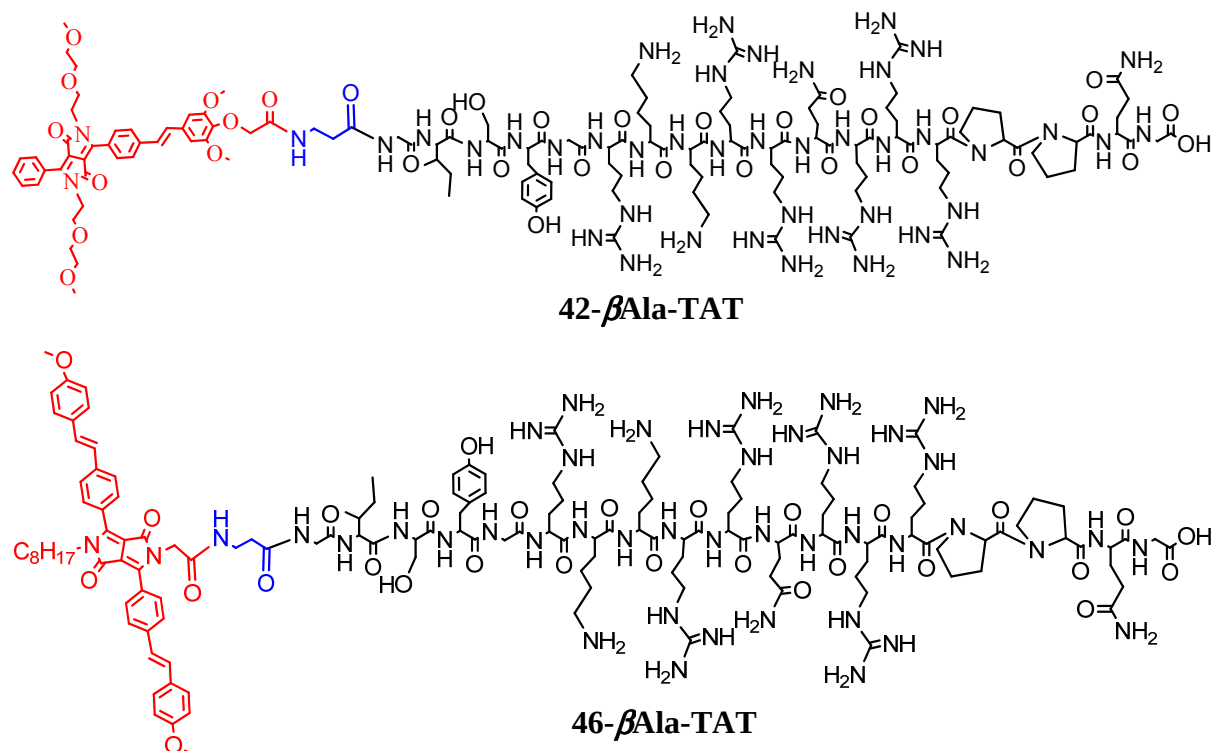


Figure 72 : Formule des peptides conjugués **42- β Ala-TAT** et **46- β Ala-TAT**.

III.4.3. Propriétés photophysiques et imageries cellulaires

Les spectres d'absorption des deux peptides conjugués sont très similaires à ceux des fluorophores non conjugués, ce qui indique que la conjugaison n'affecte pas les propriétés d'absorptions des deux chromophores. En revanche pour les spectres d'émission, on peut noter un fort décalage vers le bleu de 60 et 100 nm pour **42- β Ala-TAT** et **46- β Ala-TAT** respectivement. Par conséquent, les déplacements de Stokes des deux colorants sont considérablement réduits lors de la bioconjugaison (Figure 73).

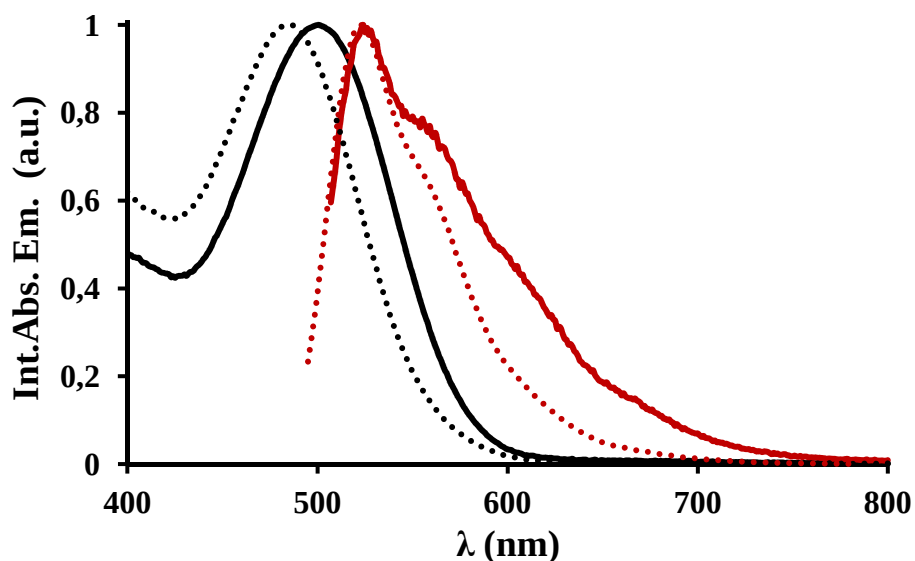


Figure 73 : Spectres d'absorption (noir) et d'émission (rouge) pour **42-βAla-TAT** (pointillé) et la **46-βAla-TAT** (en trait plein) dans l'eau.

Des cultures de cellules HeLa ont été incubées avec chacun des deux peptides **TAT** bioconjugués. Puis ces cellules ont été imagées par microscopie de fluorescence à deux photons. Dans un premier temps les cellules ont été incubées à 37 °C avec une solution 10 μM de **46-βAla-TAT** peptides conjugués pendant trois temps d'incubation différents, 15 min, 30 min et 1h,. Les images ont été relevées à 800 nm avec une puissance laser < 5 mW (Figure 74). Nous avons remarqué que les fluorophores greffés sur **TAT** n'ont pas empêché le peptide **TAT** de pénétrer dans les cellules et de se distribuer sous forme d'agrégats cytosoliques de forme arrondie dès 15 min d'incubation. De plus le greffage du chromophore n'a pas affecté la localisation de **TAT** qui est généralement située dans des compartiments périnucléaires et dans des structures endocytaires périphériques des cellules HeLa ^[8].

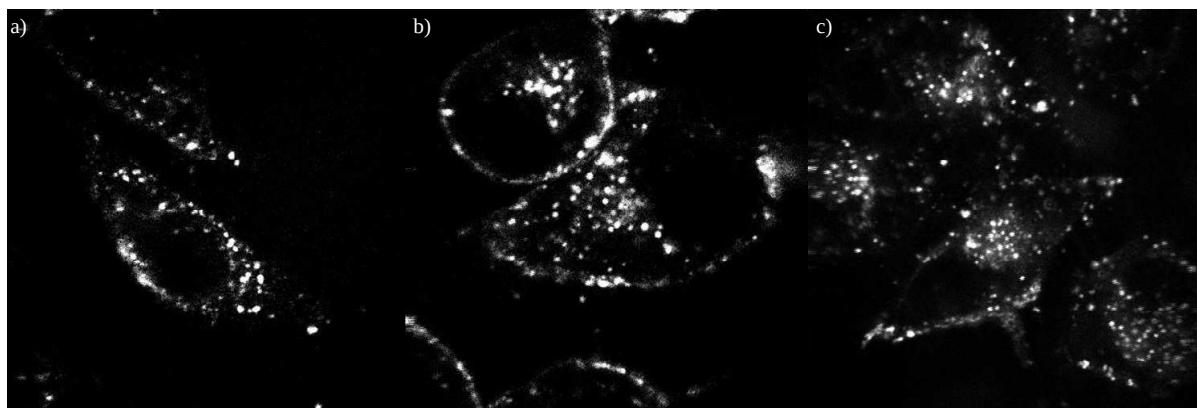


Figure 74 : Imagerie à deux photons de cellules HeLa incubées pendant 15 min (a), 30 min (b) et 1h (c) dans une solution 10 μM de **46- $\beta\text{Ala-TAT}$** (ex. 800nm, $P_{\text{laser}} < 5\text{mW}$)

Dans un deuxième temps, nous avons incubé les cellules HeLa pendant 1h à 37°C avec trois concentrations différentes (0,5, 1 et 10 μM) de **42- $\beta\text{Ala-TAT}$** et de **46- $\beta\text{Ala-TAT}$** . Même à de faibles concentrations (0,5 μM) nous avons pu obtenir des images bien contrastées, ce qui montre l'efficacité de ces fluorophores à des faibles concentrations (Figure 75).

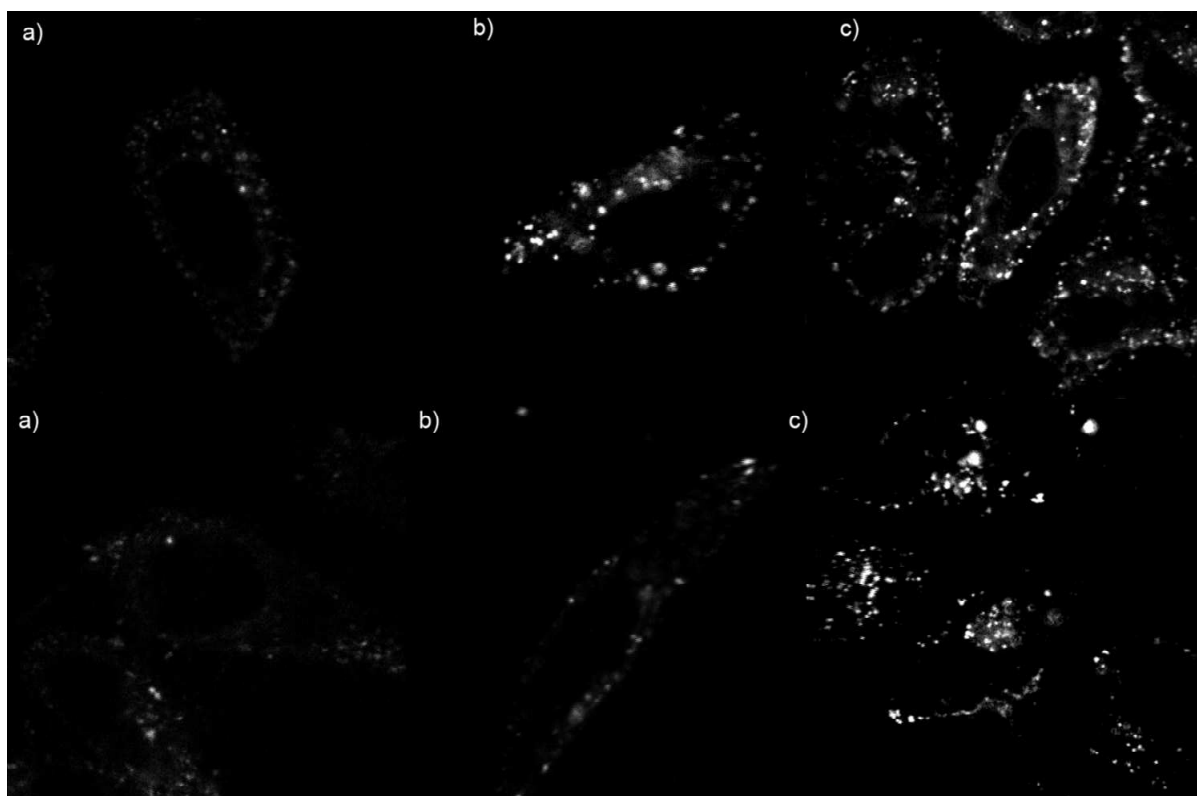


Figure 75 : Imagerie à deux photons de cellules HeLa incubées pendant 1h dans des solutions de 0,5 (a), 1 (b) et 10 μM de **42- $\beta\text{Ala-TAT}$** (en haut) et de **46- $\beta\text{Ala-TAT}$** (en bas) (ex. 800nm, $P_{\text{laser}} < 5\text{mW}$)

Afin de vérifier l'efficacité de ces chromophores même à faible puissance du laser, nous avons effectué des imageries à deux photons des cellules HeLa incubées pendant 1 h dans une solution de 1 μ M de **42- β Ala-TAT** et de **46- β Ala-TAT** en excitant à 800 nm et en utilisant une puissance laser moyenne inférieure à 1 mW. Les images obtenues sont très contrastées et sans bruit de fond (*Figure 76*). Il faut noter que de telles images avec les protéines fluorescentes classiques nécessitent des puissances laser de 15 à 30 mW.

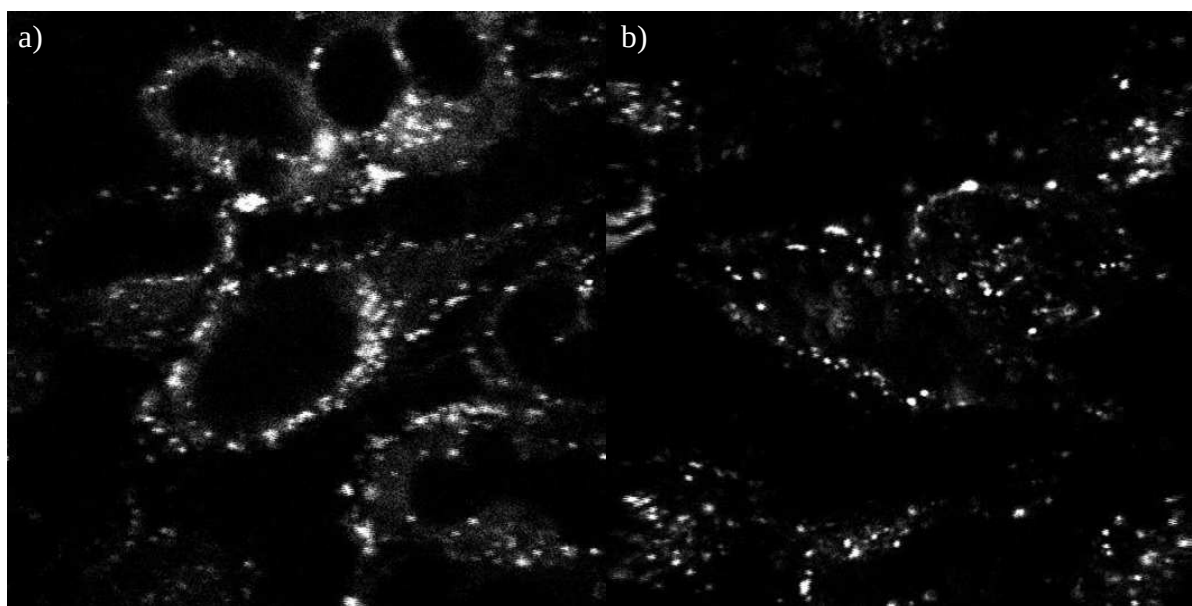


Figure 76 : *Imagerie à deux photons de cellules HeLa incubées pendant 1h dans une solution de 1 μ M de **42- β Ala-TAT** (a) et de **46- β Ala-TAT** (b) (ex. 800nm, $P_{laser} < 1$ mW).*

Des images en durée de vie de fluorescence (FLIM) ont été prises (*Figure 77*). Pour **42- β Ala-TAT**, la durée de vie est constante dans tous les compartiments de la cellule ($\sim 1,5$ ns), tandis que les agrégats colorés en vert à l'extérieur de la cellule ont une durée de vie un peu plus courte ($\sim 1,1$ ns) que celles observées au sein du cytoplasme. Cependant en ce qui concerne **46- β Ala-TAT**, nous avons remarqué qu'il possède une durée de vie qui varie entre 0,5 ns et 1,5 ns selon le milieu où se trouve le peptide.

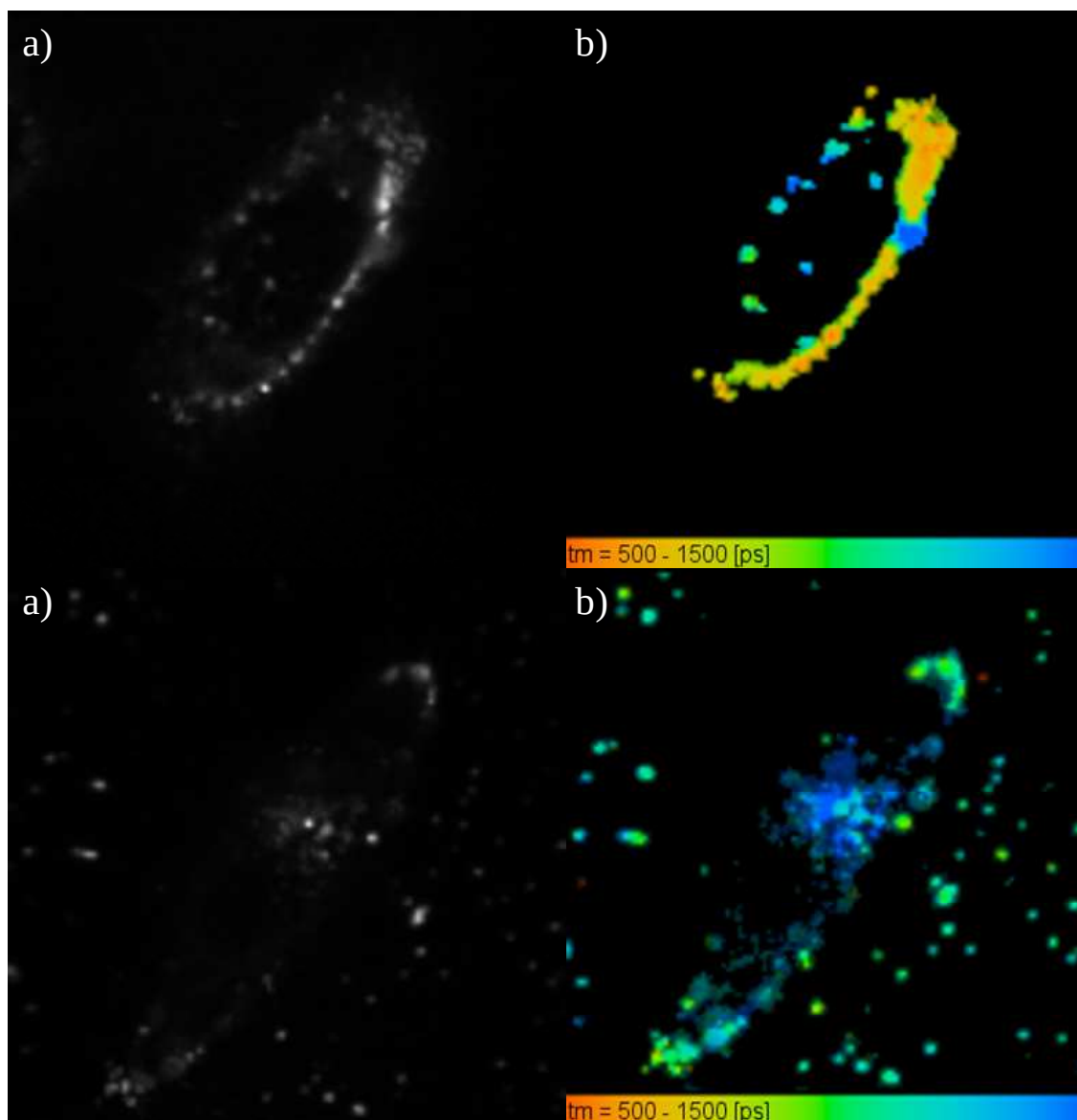


Figure 77 : Images des durées de vie moyennes de fluorescence (FILM) des cellules HeLa en intensités (a) et en couleurs (b) incubées avec **42-βAla-TAT** (en haut) et **46-βAla-TAT** (en bas).

III.5. CONCLUSION

L'imagerie par microscopie à deux photons a montré que le greffage des fluorophores fonctionnalisés sur le peptide **TAT** n'affecte pas la pénétration de ce dernier dans la cellule, et qu'il pénètre probablement par endocytose. Ces chromophores amino-réactifs se sont montrés très efficaces en absorption à deux photons. Leurs rendements quantiques de fluorescence et leurs sections efficaces d'absorption à deux photons élevées, nous ont permis de les utiliser à faible concentration ($0,5 \mu\text{M}$) et de travailler avec une faible puissance laser ($< 1 \text{ mW}$).

REFERENCES

- [1] a) A. Hayek, S. Ercelen, X. Zhang, F. Bolze, J.-F. Nicoud, E. Schaub, P. L. Baldeck, Y. Mély, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*, 844-851; b) A. R. Morales, C. O. Yanez, K. J. Schafer-Hales, A. I. Marcus, K. D. Belfield, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 1992-2000.
- [2] G. Barbarella, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 5072-5077
- [3] A. Iqbal, L. Cassar, **1982**, p. 31 pp.
- [4] J. Vyňuchal, S. Luňák Jr, A. Hatlapatková, R. Hrdina, A. n. Lyčka, L. Å. Havel, K. i. Vyňuchalová, R. Jirásko, *Dyes Pigm.*, **2008**, *77*, 266-276.
- [5] E. Q. Guo, P. H. Ren, Y. L. Zhang, H. C. Zhang, W. J. Yang, *Chem. Commun.*, **2009**, *39*, 5859-5861.
- [6] a) A. Gatignol, in *Advances in Pharmacology* , *Academic Press*, **2007**, pp. 137-159; b) L. Patel, J. Zaro, W.-C. Shen, *Pharm. Res.*, **2007**, *24*, 1977-1992.
- [7] a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154; b) R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **2006**, pp. 221-296.
- [8] T.-Y. Chao, R. T. Raines, *J. Biochem.*, **2011**, *50*, 8374-8382.

CHAPITRE IV

NOUVELLES SONDES MULTIMODALES POUR L'IMAGERIE CORRELATIVE

IV.1. INTRODUCTION

IV.1.3. L'imagerie corrélative

Le concept d'imagerie corrélative ou multimodale est apparu ces dernières années en partant du constat que la combinaison des avantages de plusieurs modalités dans un seul système d'imagerie pourrait mener à des images qui contiennent des informations significativement supérieures à celles produites par l'un des systèmes, grâce à des méthodes de contraste fondamentalement différentes^[1]. Nous mentionnerons ici deux exemples d'imagerie corrélative: la microscopie corrélative photonique/électronique (notée CLEM en anglais pour Correlative Light-Electron Microscopy) et l'imagerie corrélative imagerie par résonance magnétique (IRM) et microscopie de fluorescence.

La microscopie corrélative photonique/électronique

Cette technique très récente est en plein développement et suscite un intérêt croissant chez les biologistes^[2]. Elle repose sur l'observation d'un même objet à deux échelles différentes^[3]; dans notre cas à l'échelle cellulaire par la microscopie de fluorescence et à l'échelle subcellulaire par la microscopie électronique^[4].

Pour tirer le meilleur parti de telles techniques, il est indispensable que les agents de contraste soient incorporés au sein du même système, moléculaire ou nanostructuré. Les sondes bimodales utilisées doivent donc présenter simultanément différentes propriétés, comme une fluorescence détectable par microscopie optique et une densité élevée aux électrons induisant un contraste en microscopie électronique. Cependant on constate que les agents de contrastes bimodaux ne sont pas si nombreux. C'est pourquoi nous avons travaillé dans ce domaine, et nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus sur la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes utilisables à la fois en microscopie bi-photonique et en microscopie électronique.

L'imagerie corrélative IRM et microscopie de fluorescence

La combinaison de l'IRM avec la microscopie de fluorescence constitue un concept attractif pour la recherche préclinique, dont la finalité est en fait l'inverse de la précédente. En effet, en partant d'une imagerie au niveau cellulaire par microscopie de fluorescence, il est possible d'obtenir par IRM des informations au niveau de l'organe ou de l'animal entier. De plus l'IRM permet aussi d'accéder à des informations anatomiques et fonctionnelles, mais sa

résolution spatiale reste faible. Au contraire, la microscopie de fluorescence peut apporter des informations cellulaires précises avec une haute sensibilité, mais la zone d'étude reste limitée à quelques millimètres ^[1]. Ainsi la combinaison de ces deux types d'imagerie devrait permettre d'observer le même objet sous deux échelles différentes : anatomique et cellulaire^[5].

Les sondes destinées à ce type d'application doivent être à la fois fluorescentes et paramagnétiques. Dans la deuxième partie de ce chapitre nous présentons la synthèse de différents fluorophores qui devraient être également détectables en imagerie par résonance magnétique, conduisant ainsi à une corrélation entre les images cellulaires obtenues par microscopie de fluorescence et les images tissulaires obtenues par IRM.

IV.1.1. La microscopie électronique

Le premier microscope électronique a été construit par deux chercheurs allemands, Ruska et Knoll vers le début des années 1940. La plupart des matériaux peuvent maintenant être observés au moyen d'un microscope électronique qui est ainsi utilisé dans les domaines les plus variés allant de la chimie des matériaux, de la microélectronique jusqu'à la biologie en passant par la médecine légale.

La résolution maximale qu'il est possible d'atteindre avec un microscope optique dépend principalement de la longueur d'onde de la lumière utilisée et de l'ouverture numérique du système optique. Ceci constitue un facteur limitant pour les microscopies optiques, et il est généralement admis que l'ordre de grandeur de la taille minimale des objets imagés est voisine de la longueur d'onde de la lumière utilisée (de l'ordre du micromètre pour l'infrarouge, jusqu'à 400 nm pour le visible). Pour s'affranchir de ce facteur limitant, il est possible de remplacer la lumière par un faisceau d'électrons accélérés qui possèdent à la fois des propriétés corpusculaires (énergie de l'ordre de l'ordre de 50 keV) et ondulatoires (longueur d'onde associée de l'ordre de 0,025 nm)^[6]. Il existe plusieurs techniques de microscopie électronique, citons par exemple : la microscopie électronique en transmission (MET), la microscopie électronique à balayage (MEB).

Le microscope électronique à balayage

Dans un microscope électronique à balayage, les électrons ne traversent pas l'échantillon mais sont réfléchis et diffusés par la surface, ce qui permet d'obtenir des images de cette surface

(Figure 78). Lorsque le faisceau d'électrons interagit avec l'objet étudié, il génère des électrons secondaires de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur dédié qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Cette méthode permet alors l'observation du relief d'échantillons et apporte différents types d'informations sur la matière dont est constitué l'échantillon ^[7].

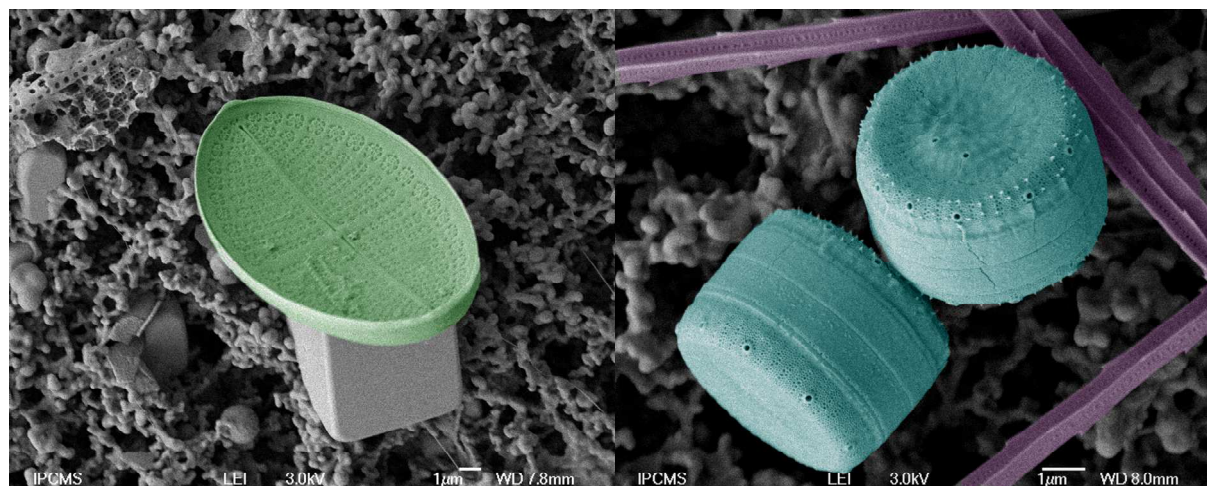


Figure 78 : *Diatomées centriques observées au microscope électronique à balayage*

Le microscope à balayage ne permet pas d'observer les cellules vivantes. En effet, l'échantillon doit toujours être placé sous vide, et les tissus ou les cellules doivent avoir subi un traitement préalable : fixés et déshydratés. Dans la plupart des cas ils sont ensuite recouverts par un matériau conducteur comme une fine couche de quelques nanomètres de carbone ou de platine, afin d'évacuer les électrons qui s'accumuleraient dans la matière et provoqueraient des distorsions d'images. De nouveaux appareils commencent à apparaître sur le marché spécifiquement conçus pour travailler avec un vide faible comparé aux systèmes classiques pour lesquels un ultra vide est indispensable. Cela permet de limiter la durée de préparation des échantillons et de travailler en milieu humide.

Le microscope électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Elle utilise un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons et accélérés sous haute tension. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur

l'échantillon. Celui-ci traverse l'échantillon qui doit par conséquent être très mince (épaisseur de l'ordre de 100 nm). Les électrons transmis sont alors analysés par un détecteur, qui traduit le signal en image contrastée. Cette technique très performante est la seule capable de révéler les détails des organites intracellulaires où la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre avec un grossissement qui peut atteindre un million de fois (*Figure 79*). Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis : des coupes ultrafines de l'échantillon sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (de 60 à 100 nanomètres). Ces coupes qui sont placées sous vide dans l'appareil doivent être préalablement déshydratées, fixées puis colorées par imprégnation avec des métaux lourds pour induire un contraste entre les éléments intracellulaires ^[8].

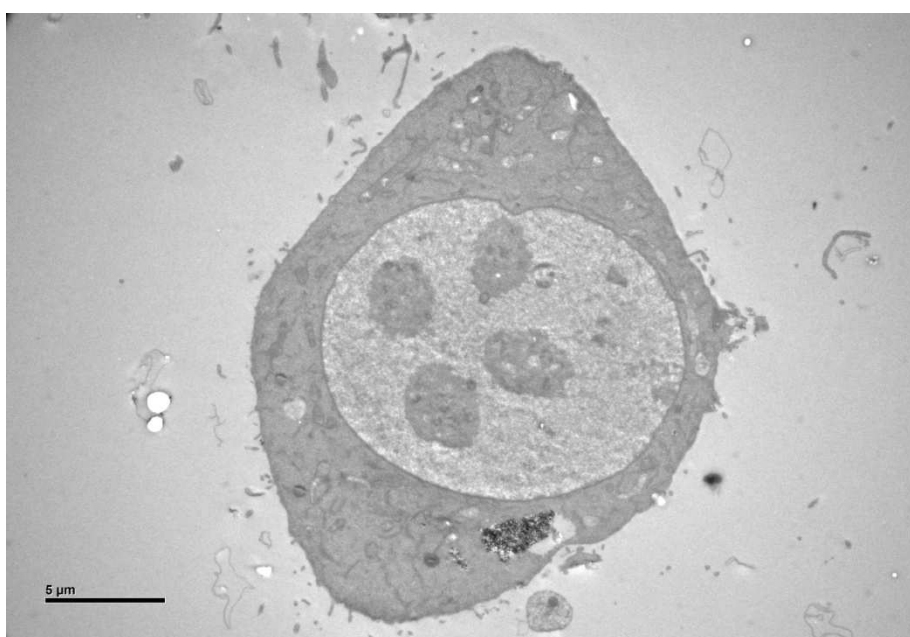


Figure 79 : Cellule HeLa observée au microscope électronique en transmission

IV.1.2. Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) ^[9]

Les techniques d'imagerie appliquées au domaine médical ont révolutionné le diagnostic d'un nombre de plus en plus important de pathologies aussi bien humaines qu'animales. La visualisation des organes, sans nécessiter de geste chirurgical invasif ou de rayonnement ionisant, a constitué un progrès considérable pour le diagnostic. Depuis les premières images obtenues par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) en 1973, son utilisation s'est développée au point de devenir une technique indispensable à la détection de pathologies graves (*Figure 80*)



Figure 80 : Appareil pour la réalisation d'IRM

L'IRM est une technique de diagnostic médical puissante et sans effets secondaires connus. Il s'agit simplement d'observer la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau, c'est à dire la réponse des noyaux d'hydrogènes ^1H soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. L'eau constituant environ 70 % des tissus vivants, et le proton ^1H étant à la fois naturellement abondant (99.985 %) et très facilement détectable en RMN, il est facile d'enregistrer son signal. L'intensité du signal recueilli pour un élément de volume dépend de la concentration de l'eau à l'endroit considéré et des relaxations longitudinales et transverses (T_1 , T_2) des protons contenus dans les tissus imagés. L'obtention d'une image tridimensionnelle de la répartition de l'eau dans le corps d'un patient est ainsi possible. Il est donc aisé d'observer des altérations des tissus (telles que des tumeurs) grâce aux différences de densité et de relaxation de l'eau. Malheureusement, la différence entre tissus sains et altérés est souvent insuffisante pour provoquer une variation significative de l'intensité du signal. C'est pourquoi des produits pharmaceutiques susceptibles d'augmenter le contraste entre les parties saines et malades des tissus ont été développés. Une façon très efficace d'influencer le signal IRM est d'utiliser des agents de contraste (ACs) basés sur des ions paramagnétiques. Ces ions créent un champ magnétique local permanent qui favorise la relaxation des protons des molécules d'eau et accroît ainsi le contraste. L'injection d'agents de contraste paramagnétiques a donc pour but d'accélérer les vitesses de relaxation $1/T_1$ et $1/T_2$ des protons des molécules d'eau, c'est-à-dire de raccourcir le temps pendant lequel les spins de ces protons regagnent leur état initial après excitation par l'onde de radiofréquence.

Le contraste du signal observé par IRM est alors augmenté. Il faut noter que ce n'est pas l'agent de contraste qui est visualisé en IRM mais bien son influence sur la relaxation des protons de l'eau situés à proximité. La capacité des agents de contraste à accélérer ainsi les vitesses de relaxation des protons de l'eau est mesurée par une grandeur appelée la relaxativité.

Parmi les ions paramagnétiques utilisés, le gadolinium (lanthanide) sous forme d'un complexe hydrophile représente la plus importante classe d'ACs (35 % des diagnostics cliniques). Les premiers ACs du gadolinium ont été introduits en 1988 (Gd-DTPA et Gd-DOTA *Figure 81*)

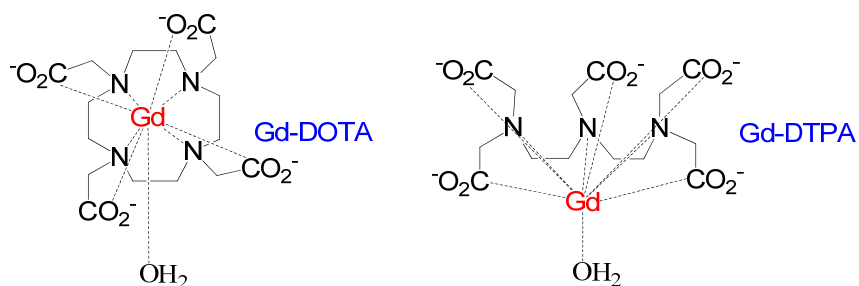


Figure 81 : Structures moléculaires des agents de contraste Gd-DOTA et Gd-DTPA

IV.2. SYNTHÈSE DE SONDES MULTIMODALES

IV.2.1. Dérivés de DPP liés à une nanoparticule d'oxyde de fer biocompatible

Synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer biocompatibles fonctionnalisées

Les nanoparticules d'oxyde de fer présentent un intérêt majeur pour les nanotechnologies, notamment pour leurs applications potentielles dans le domaine médical. Elles peuvent être utilisées par exemple pour le traitement par hyperthermie, comme agent de contraste pour l'IRM ou pour la microscopie électronique ou encore comme vecteur dirigé par un champ magnétique ^[10]. Il y a donc intérêt certain à greffer sur ces nanoparticules des fluorophores afin de profiter des avantages des deux propriétés.

Les nanoparticules d'oxyde de fer Fe₃O₄ utilisées pour ce travail ont été synthétisées par chimie douce en collaboration avec l'équipe de Jean-Luc Rehspringer de l'IPCMS à Strasbourg. Elles sont préparées en trois étapes (*Figure 82*).

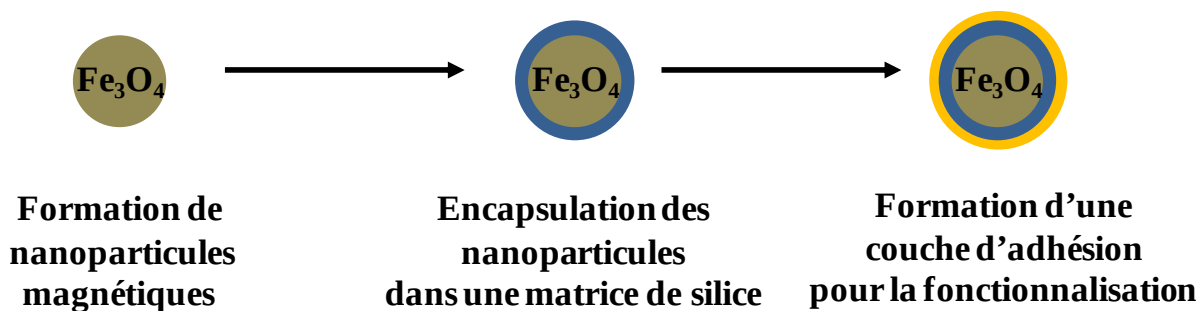


Figure 82 : Les trois étapes de préparation des nanoparticules de Fe_3O_4

La préparation des particules de magnétite Fe_3O_4 repose sur la coprécipitation de chlorure ferrique et de chlorure ferreux en milieu alcalin sous atmosphère inerte par la méthode dite de Massart ^[11] (Figure 83). Un précipité noir est obtenu puis séparé par décantation à l'aide d'un aimant permanent et rincé plusieurs fois à l'éthanol.

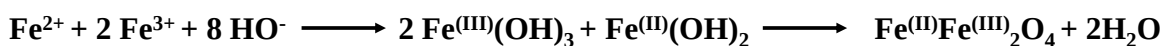


Figure 83 : Synthèse des nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 par la méthode de Massart.

Pour des applications médicales *in vivo*, ces nanoparticules magnétiques doivent être enrobées d'un matériau biologiquement inerte afin d'améliorer leur stabilité chimique, pour éviter leur biodégradation et aussi pour éviter toute agrégation qui engendrerait une perte de leurs caractéristiques magnétiques. Ces nanoparticules sont donc enrobées d'une couche de silice amorphe, matériau non magnétique et stable en milieu biologique. Pour ce faire une suspension de nanoparticules en milieu aqueux est traitée avec du tétraéthylorthosilane $\text{Si}(\text{OEt})_4$ dans l'éthanol en présence d'une base faible comme l'ammoniaque. Ce traitement permet de former une couche de silice portant des groupements OH libres en surface ^[12]. (Figure 84).

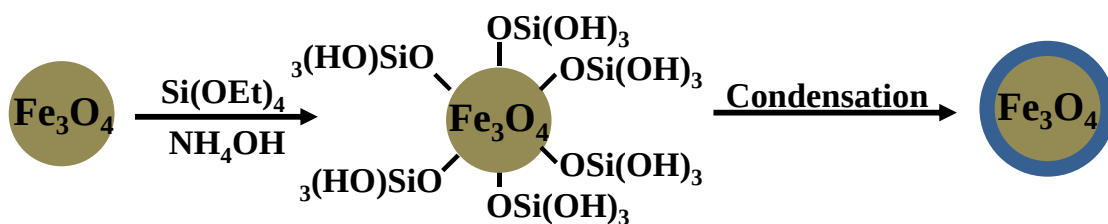


Figure 84 : Encapsulation des particules dans une matrice de silice.

Pour que la surface des particules magnétiques de Fe_3O_4 enrobées dans une matrice de silice soit fonctionnalisable, il est nécessaire dans un premier temps de la traiter pour former une couche d'adhésion qui servira d'ancrage. Cette couche d'adhésion est obtenue à partir de 3-aminopropyltriméthoxysilane $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{Si}(\text{OME})_3$ qui permet l'introduction de nombreuses fonctions amines à la surface des particules. Ensuite on peut faire réagir les fonctions amines avec différents groupements fonctionnels aminoréactifs comme des isothiocyanates^[13] ou des acides carboxyliques (Figure 85).

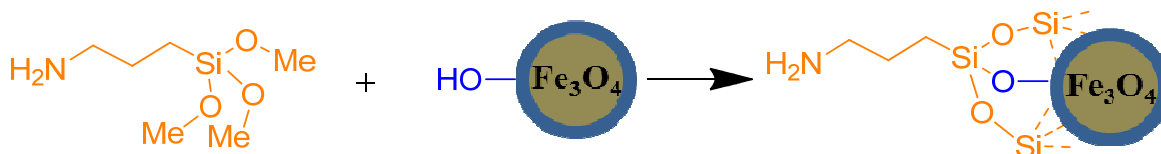


Figure 85 : Formation de la couche d'adhésion à la surface des particules de magnétite enrobées pour la fonctionnalisation

Des particules de magnétite encapsulées dans une couche de silice sphérique et possédantes des groupements amine primaire à leur surface ont ainsi été obtenues. Elles présentent une épaisseur relativement homogène avec une taille moyenne de l'ordre de 100 nm. Ces nanoparticules sont maintenant prêtes pour le greffage d'un fluorophore à leurs surfaces.

Greffage du chromophore 46 à la surface des nanoparticules fonctionnalisées

Afin d'ajouter la propriété de fluorescence à ces nanoparticules, le chromophore **46** a été greffé sur les groupements amines de la surface des nanoparticules. La fonction acide de **46** a été activée en présence de chlorure de thionyle (SOCl_2) pour former un chlorure d'acide qui réagit facilement avec l'amine primaire greffée à la surface des nanoparticules en formant une liaison amide. Nous obtenons ainsi un hybride organique-inorganique pour lequel plusieurs molécules **46** sont greffées de manière covalente à la surface (Schéma 17)

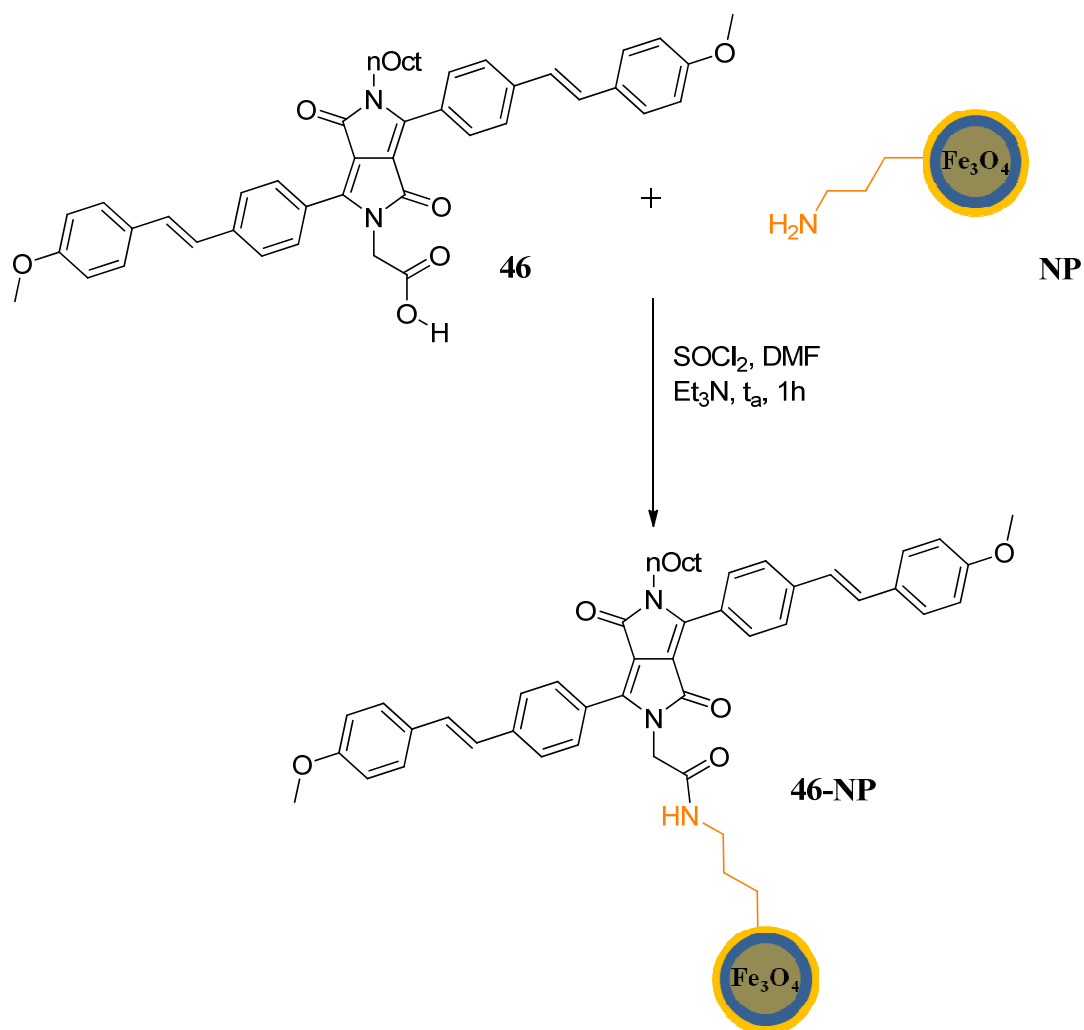


Schéma 17 : Greffage du chromophore **46** à la surface des nanoparticules

Caractérisations

L'analyse thermogravimétrique (ATG) effectuée sur les nanoparticules non greffées (**NP**) montre, pour des températures inférieures à 200°C , une perte de masse d'environ 7 % qui correspond à une évaporation des solvants résiduels. Ensuite, entre 300 et 450°C , on note une perte plus importante d'environ 20 %, correspondant à la dégradation des groupements organiques aminopropyle liés à la surface de la silice. Pour les nanoparticules greffées **46-NP** la perte de masse due au séchage des nanoparticules est d'environ 10 % et celle due à la dégradation de la partie organique (aminopropyle et fluorophore) est de l'ordre de 45 %. La différence de 25 % entre les valeurs obtenues pour les particules greffées et non greffées est due à la masse des fluorophores présents sur la nanoparticule (*Figure 86*). Ces valeurs correspondent à environ 0,3 mol/100g de nanoparticules avec fonctions amines libres et 0,035

mol/100g de nanoparticules ayant des fluorophores greffés, ce qui indique un taux de greffage de l'ordre de 15 %.

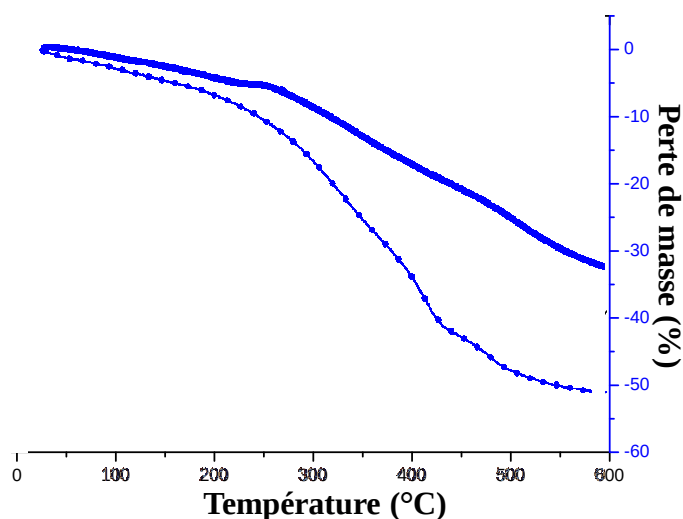


Figure 86 : Analyse thermogravimétrique des particules avant (trait plein) et après (trait pointillé) greffage des fluorophores.

La magnétisation de ces mêmes nanoparticules mais greffées avec un autre fluorophore organique a été explorée par la technique de SQUID (Superconducting Quantum Interference Device). Les résultats ont montré que même après greffage du chromophore les particules restent ferromagnétiques (*Figure 87*)^[13]. Les études avec nos fluorophores greffés sont en cours.

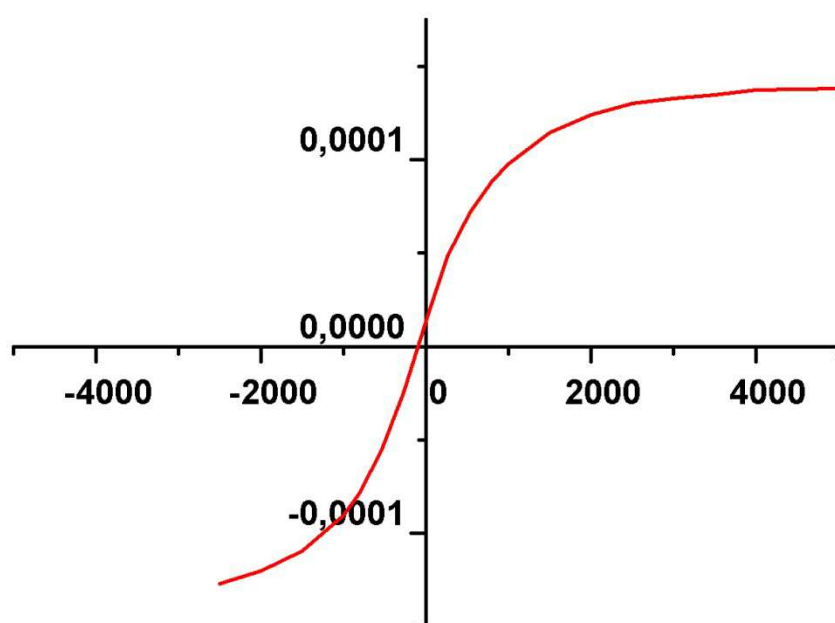


Figure 87 : Aimantation à saturation des nanoparticules

Des images MEB ont été réalisées pour **NP** et **46-NP** afin d'étudier la forme et la taille des nanoparticules obtenues. Elles montrent des tailles de particules d'environ 100 nm. Nous avons observé que les particules greffées **46-NP**, en suspension dans l'éthanol, ont tendance à s'agréger (*Figure 88*).

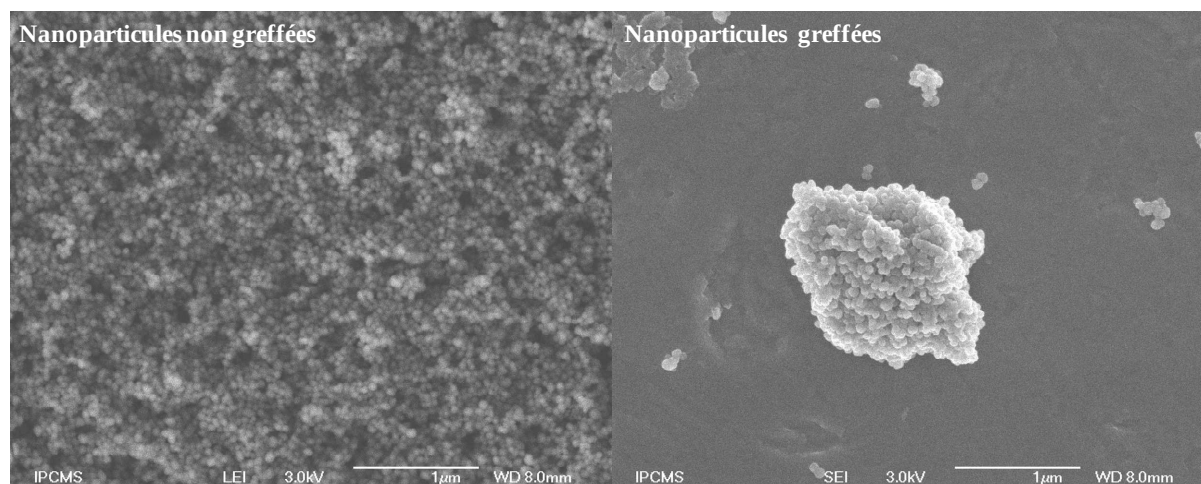


Figure 88: Images MEB des nanoparticules non greffées (à gauche) et des particules greffées (à droite)

Notre laboratoire disposant depuis peu d'un microscope AFM couplé à un microscope en fluorescence (ce qui correspond à une autre modalité de microscopie corrélative...) nous avons eu la possibilité d'imager ces nanoparticules par microscopie à force atomique AFM et par fluorescence (*Figure 89*).

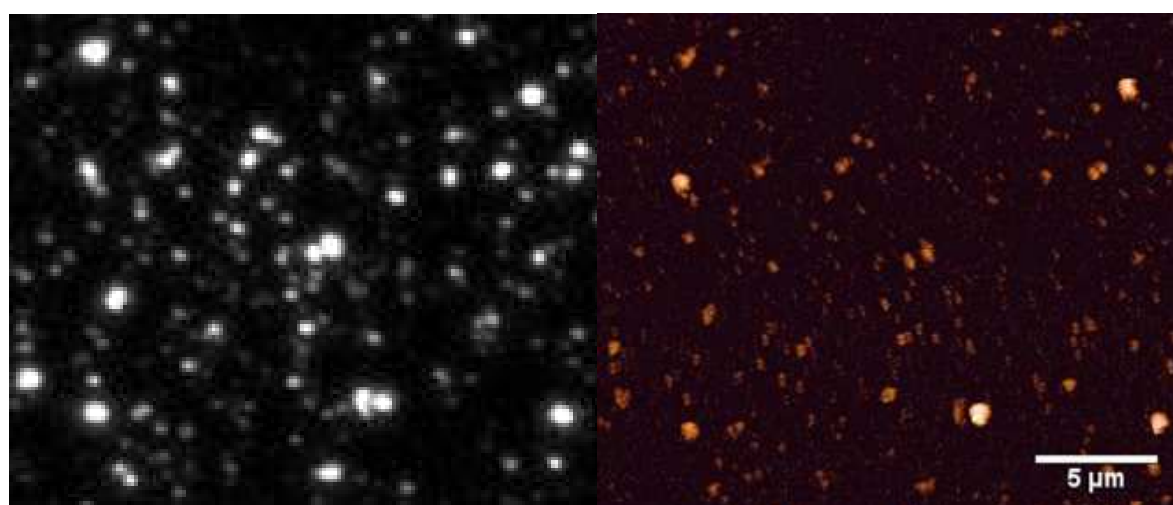


Figure 89 : Image en fluorescence (à gauche) et image AFM (à droite) des nanoparticules greffées **46-NP**

Une suspension dans l'eau de **46-NP** a été préparée et les spectres d'absorption et d'émission ont été mesurés (*Figure 90*). Le spectre d'absorption montre un épaulement vers 500 nm et le spectre d'émission montre une luminescence avec un maximum d'intensité vers 580 nm, ce qui correspond bien aux propriétés du fluorophore non greffé.

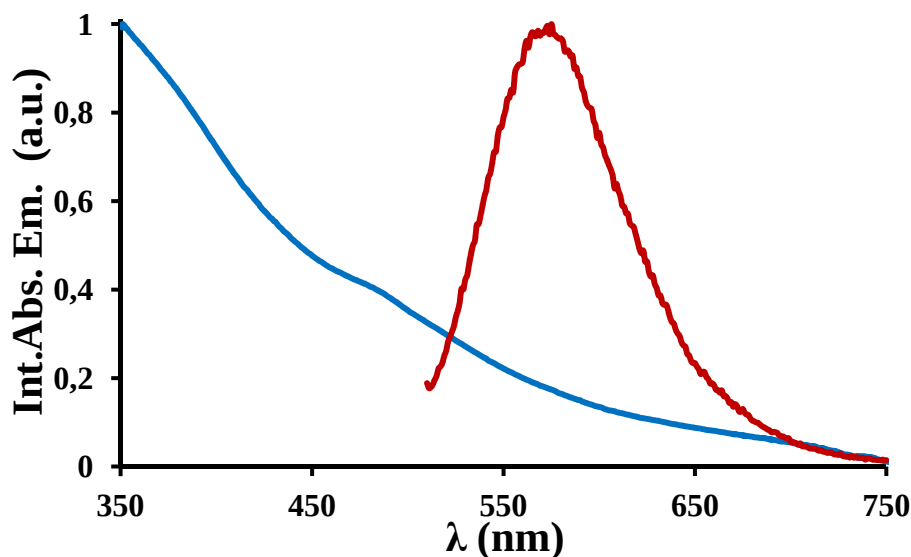


Figure 90 : Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) d'une suspension de **46-NP** dans l'eau.

IV.2.2. Dérivé d'un cluster de platine

Synthèse

Cette partie est le fruit d'une collaboration entre notre laboratoire et celui du professeur Leoni de l'université de Pise qui travaille sur les clusters de platine depuis plusieurs années. Nous avons utilisé un cluster hexanucléaire du platine de petite taille et présentant des propriétés électroniques utiles pour les applications dans le domaine de nanoscience et de nanoélectronique^[14]. La présence de plusieurs atomes lourds dans une région très localisée de l'espace, sa capacité à transférer les électrons^[15], sa stabilité chimique, sa richesse en électrons ainsi que la facilité d'y greffer des ligands organiques^[16] ont attiré notre attention. Ceci nous a conduits à introduire ce cluster dans un nouveau type de fluorophore multimodal pouvant combiner l'ADP et la microscopie électronique. Le précurseur $[\{Pt_6\}(CO)_4(\mu-PtBu_2)_4]Cl_2$ (**49**) a été obtenu grâce à la réaction entre le composé $[\{Pt_6\}(CO)_2](CF_3SO_3)_2$ (**48**) et le chlorure d'ammonium (NH_4Cl). Le produit **48** a été obtenu en traitant le cluster trinucéaire $[Pt_3(H)(CO)_2(\mu-PtBu_2)_3]$ (**47**) par l'acide triflique (CF_3SO_3H) sous un atmosphère de CO^[17] (*Schéma 18*).

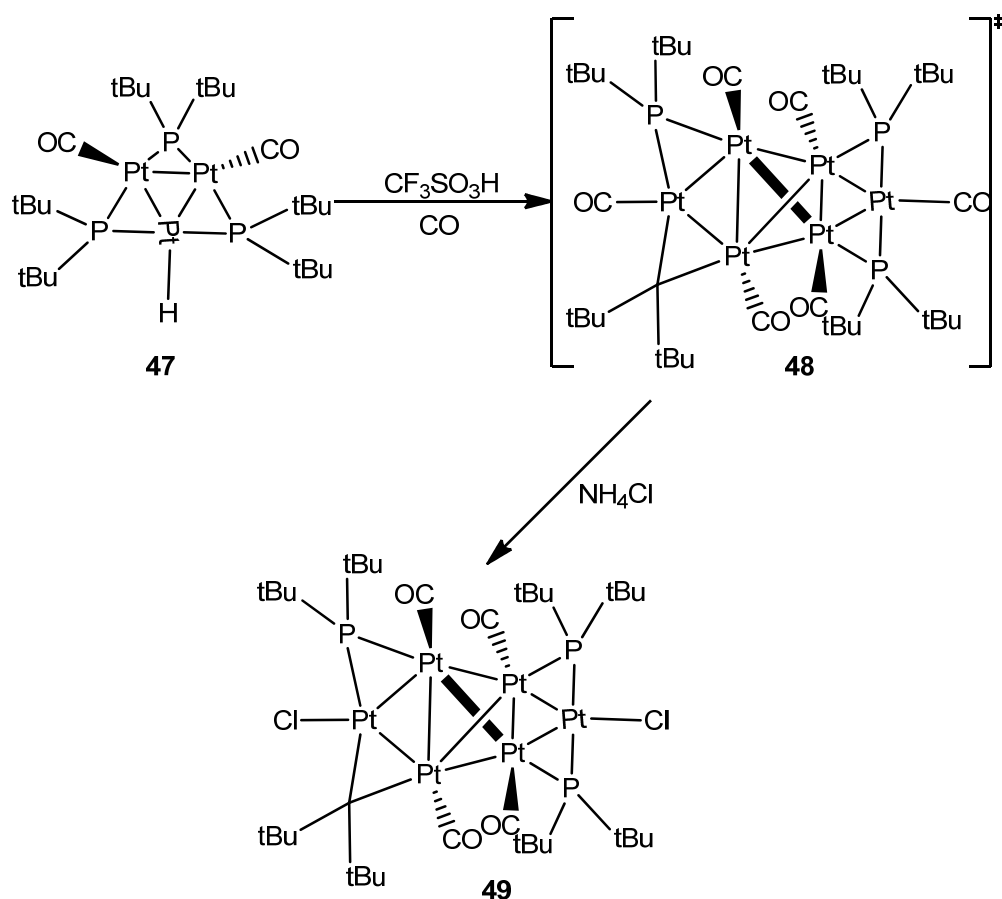


Schéma 18 : Préparation du cluster 49

Leoni a montré qu'on peut réaliser un couplage platine-carbone au niveau des liaisons Pt-Cl et un alcyne vrai par catalyse avec un sel de cuivre I (cela ressemble à un couplage de Stephens-Castro, mais avec formation de liaisons Pt-C). Ainsi nous avons réalisé la réaction de couplage entre **49** avec le dérivé de triphénylamine à terminaison éthyne **50** dans la diéthylamine en présence d'une quantité catalytique de CuI, qui conduit à la formation du nouveau chromophore **51**. Le schéma de synthèse est illustré dans la Schéma 19. Par cette méthode simple divers systèmes conjugués à terminaison éthyne ont été greffés sur ce cœur inorganique.

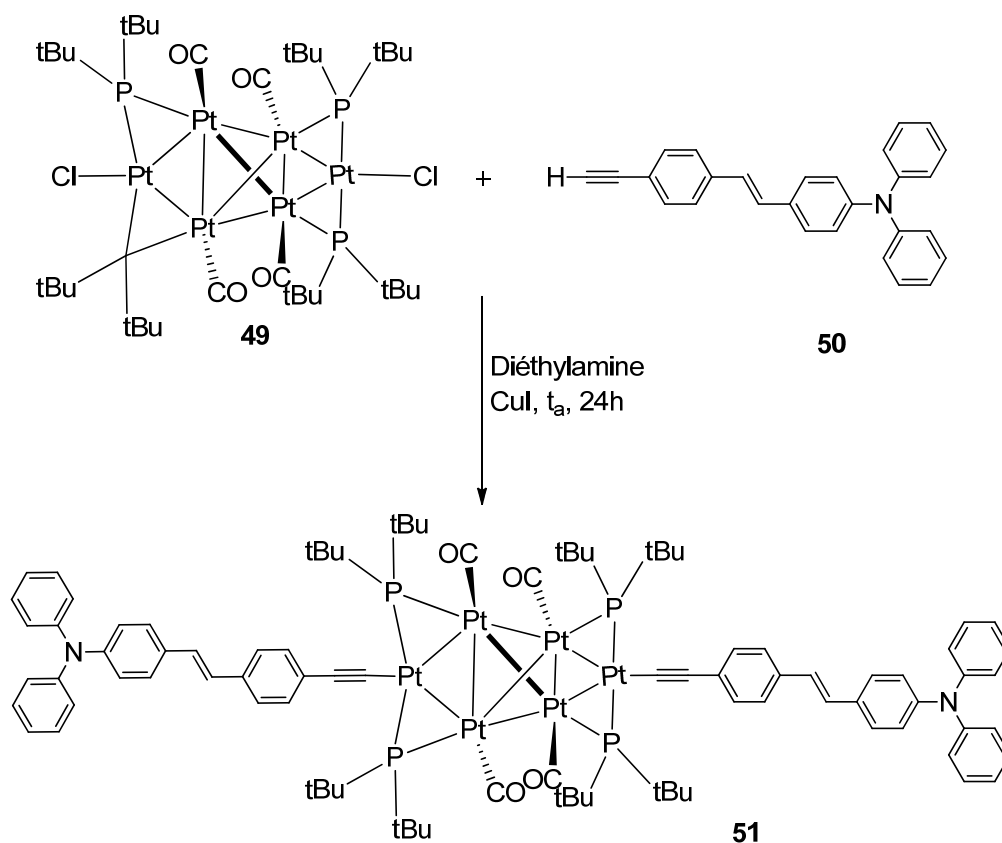
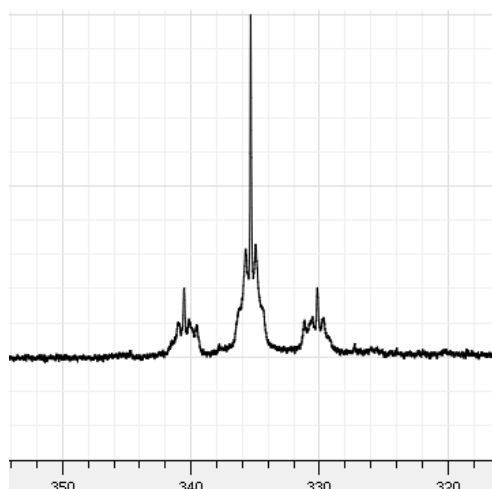


Schéma 19 : Synthèse du chromophore 51

Caractérisations

Après avoir effectué les caractérisations physicochimiques classiques (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C et SMHR), un spectre de RMN- ^{31}P a été relevé (Figure 91). Ce spectre montre la présence d'un singulet dû aux quatre atomes de phosphore, cependant on constate l'existence de signaux de faible intensité (les satellites), qui proviennent d'un couplage de ^{31}P avec les noyaux ^{195}Pt magnétiquement actifs (abondance naturelle 33,832% et spin = 1/2).

Figure 91 : Spectre RMN- ^{31}P de la molécule 51 dans CDCl_3

Afin de mieux cerner les propriétés photophysiques de ces composés, les spectres d'absorption et d'émission ont été relevés dans le 2-méthyl-THF pour 3 produits : le dérivé de triphénylamine **50**, le composé **49-d** comportant deux groupements phényléthynyles en périphérie du cluster de platine qui nous a été fourni par le professeur Leoni et le chromophore **51** (Figure 92).

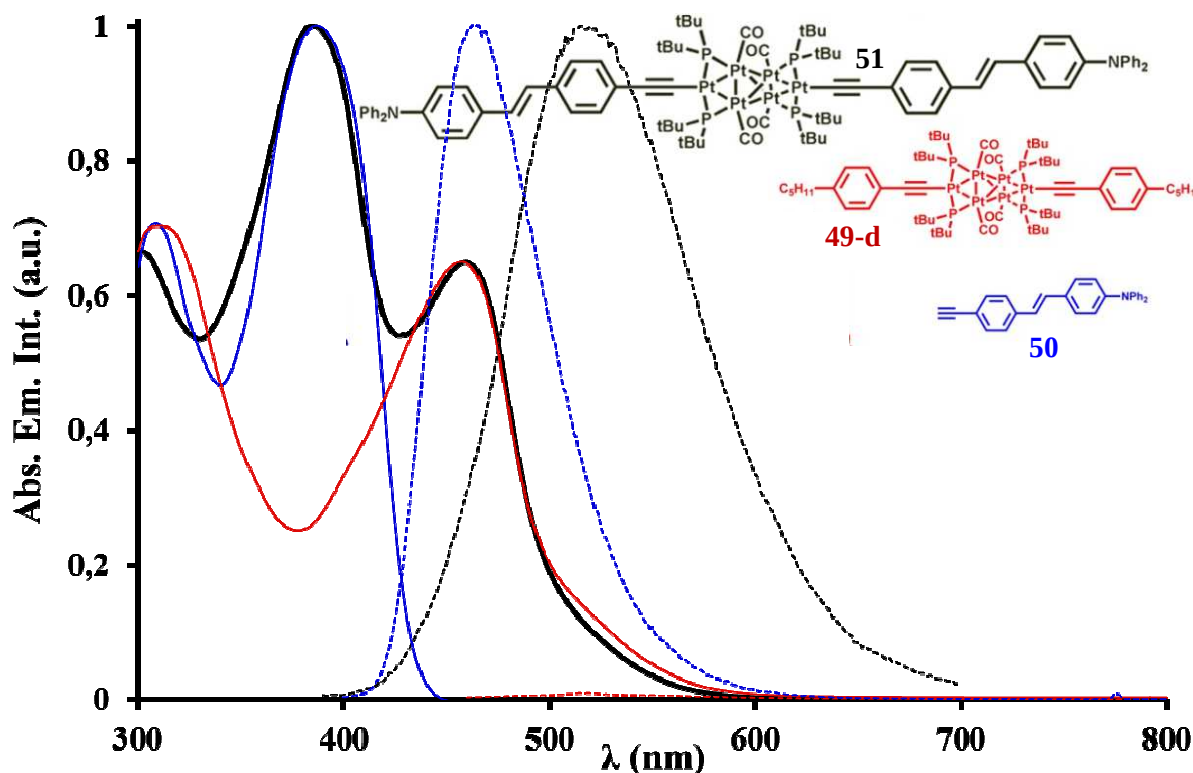


Figure 92 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (pointillé) de **50** (en bleu), **51** (en noir) et du produit **49-d** (rouge) dans le 2-MeTHF à 298 K.

Le spectre d'absorption du fluorophore **51** correspond à la superposition de l'absorption de la partie purement organique **50** ($\lambda_{\text{abs}} = 390$ nm) et la partie cluster métallique **49-d** ($\lambda_{\text{abs}} = 450$ nm). Ceci indique une faible interaction électronique à l'état fondamental entre les deux parties organiques, impliquant une faible délocalisation à travers le cluster de platine. Le chromophore organique périphérique **50** présente une forte fluorescence en solution à température ambiante, avec un maximum d'émission à 460 nm. La nouvelle sonde **51** présente une fluorescence modérée à 510 nm ($\phi = 0,5$ %), indiquant un fort quenching probablement dû à la partie inorganique. Cette bande de fluorescence est par ailleurs décalée vers le rouge de 50 nm par rapport à celle de **50**. Comme nous avons observé ce fort déplacement uniquement au niveau du spectre d'émission, nous en déduisons qu'une interaction électronique a lieu à l'état excité alors que la conjugaison à l'état fondamental

entre ces deux systèmes est faible. Cette interaction électronique non classique à travers le cluster de platine est peut-être semblable à celle mise en évidence par notre équipe avec un dérivé analogue à cœur cyclodiborazane^[18]. Ces résultats sont à confirmer par la modélisation des orbitales moléculaires.

Les dérivés du platine étant connus pour présenter une phosphorescence détectable, les spectres d'absorption et d'émission de ces 3 produits ont été relevés à 77K (*Figure 93*). Le composé organique **50** ne présente pas de phosphorescence significative, tandis que les deux produits organométalliques **51** et **49-d** présente une phosphorescence intéressante aux alentours de 670 nm.

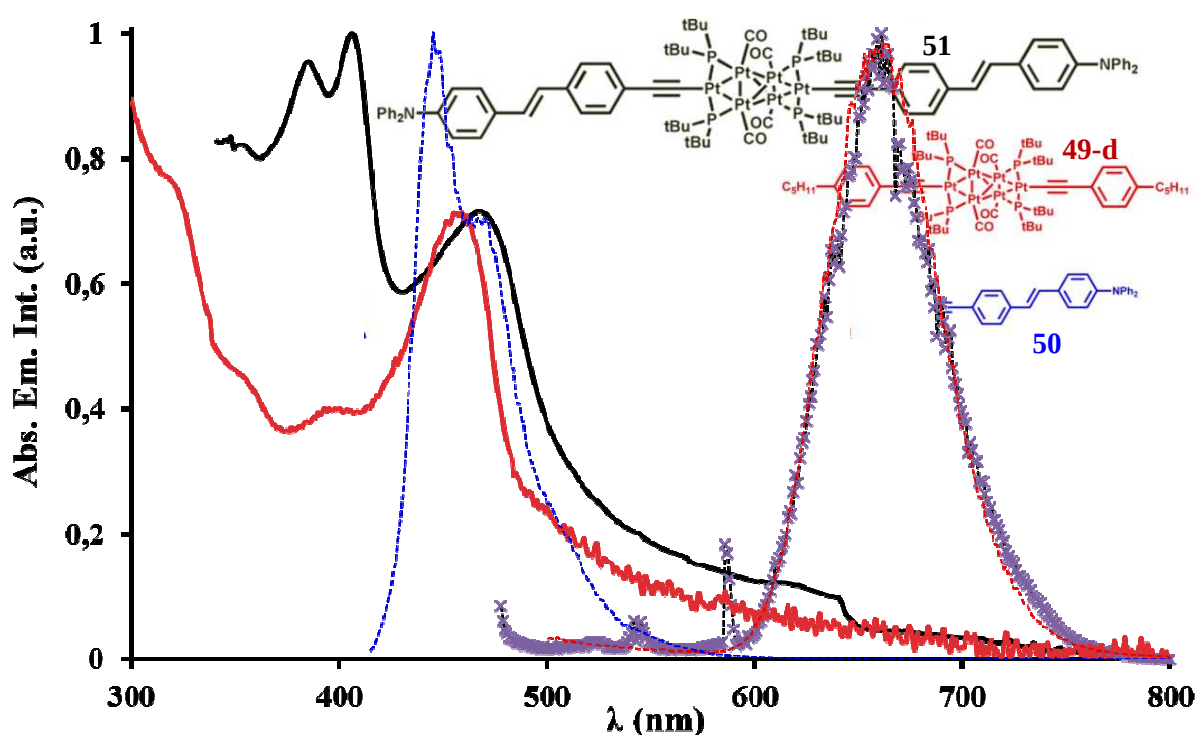


Figure 93 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (pointillé) de **50** (en bleu), **51** (en noir) et du produit de Leoni (rouge) dans le 2-MeTHF à 298 K.

Le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique de fluorescence ont été déterminés dans le dichlorométhane. Les résultats obtenus sont représentés dans le *Tableau 8*.

Chromophore	λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	Φ (%)
51	382	41000	510	0,5

Tableau 8 : Données photophysiques du produit **51** dans le dichlorométhane.

Les propriétés d'absorption bi-photonique du fluorophore **51** ont été déterminées expérimentalement par la méthode de fluorescence à deux photons décrite précédemment. Le spectre d'ADP est illustré dans la *Figure 94*. Nous avons obtenu une section efficace d'absorption à 2 photons σ_2 maximale ~ 750 GM à 800 nm. Cette valeur est le double de celle obtenue pour le précurseur organique **50**, indiquant la présence de deux systèmes quasiment indépendants.

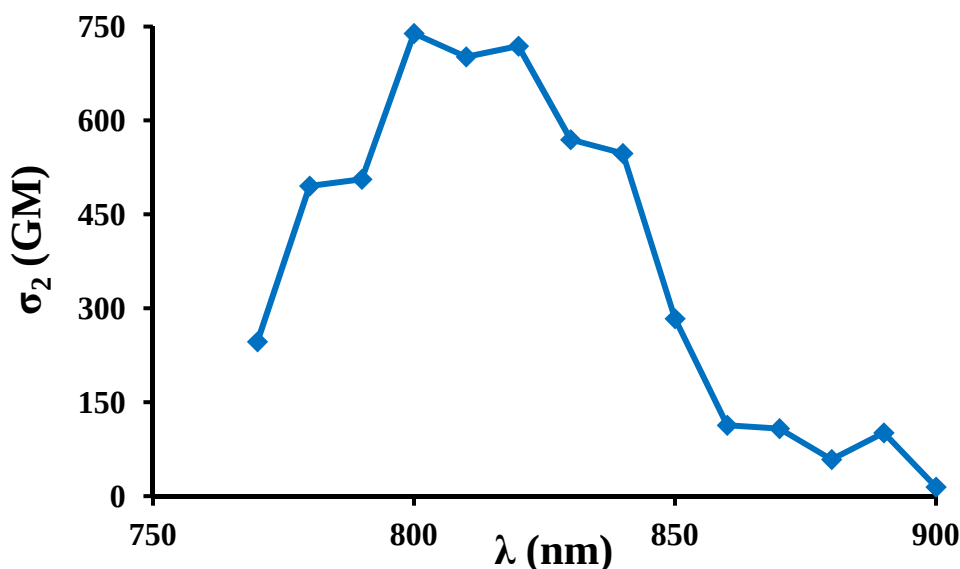


Figure 94 : Spectre d'excitation à deux photons de la molécule **51** dans le dichlorométhane

IV.2.3. Dérivé de DPP contenant de l'or

Synthèse

Une réaction possible entre la base conjuguée du cœur DPP et des complexes d'or, décrite par Langhals, Lorenz *et al.* ^[19], a attiré notre attention. Nous avons pensé l'utiliser pour introduire un métal lourd sur le cœur DPP et obtenir ainsi un système actif en fluorescence et pouvant induire du contraste en microscopie électronique grâce à l'atome lourd. Nous avons ainsi greffé un complexe d'or sur le DPP diiodé **7** préalablement déprotonné en présence d'une base forte pour former le dianion azoté. Ce dernier réagit avec Ph_3PAuCl pour donner le chromophore **52** (*Schéma 20*) qui peut servir de précurseur pour des couplages ultérieurs (introduction de doubles ou triples liaisons via des couplages paladocatalysés). Nous n'avons hélas pas eu le temps d'achever ce travail pendant la thèse.

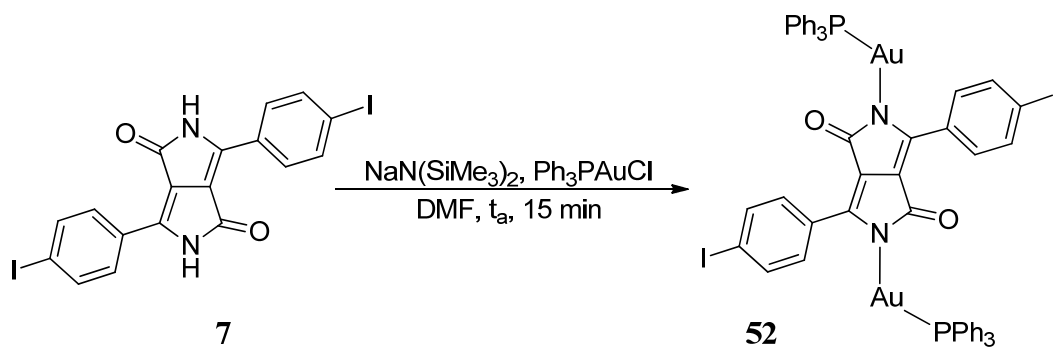


Schéma 20 : Synthèse du chromophore 52

Caractérisations photophysiques

Les spectres d'absorption UV-visible et d'émission dans le dichlorométhane et dans l'eau pour la molécule 52 sont présentés dans la Figure 95.

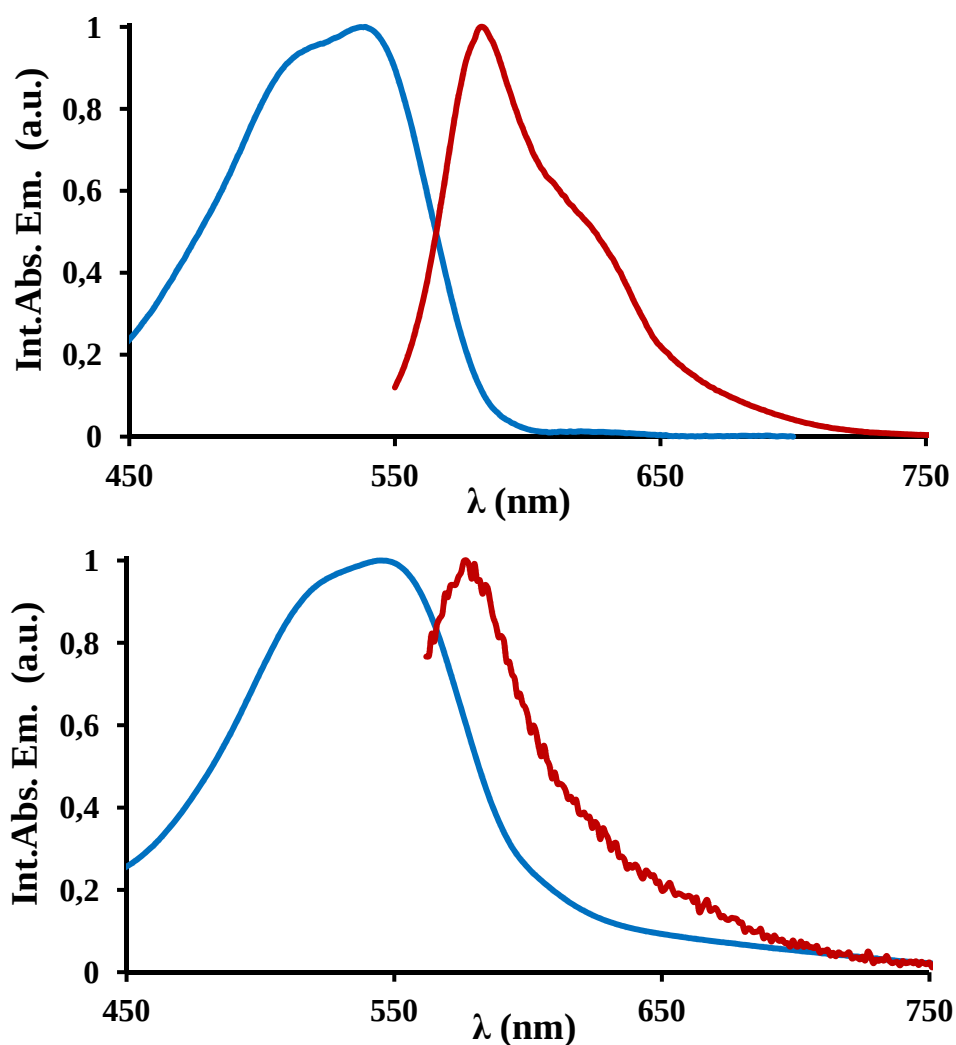


Figure 95 : Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) pour la molécule 52 dans le dichlorométhane (en haut) et dans l'eau (en bas)

Nous avons remarqué que l'incorporation du complexe d'or entraîne un effet bathochrome sur les spectres d'absorption par rapport à la molécule **11** qui possède des chaînes OEG à la place du complexe d'or. Un décalage vers le rouge de 65 et 60 nm dans les spectres d'absorption et d'émission respectivement, a ainsi été observé. Les données photophysiques sont présentées dans le *Tableau 9*. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par Langhals, Lorenz *et al.* sur des composés similaires ^[19].

Chromophore	λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	Φ (%)
52	540 (545)	17500 (7500)	583(577)	82 (2)
11	475	22000	536	79

Tableau 9 : Propriétés photophysiques des produits **52** et **11** dans le dichlorométhane et dans l'eau (entre parenthèses).

Nous avons par ailleurs mesurés les sections efficaces de ce fluorophore dans le dichlorométhane, dans une région comprise entre 740 et 900 nm. La référence utilisée a été la rhodamine B. Les résultats obtenus sont présentés dans la *Figure 96*.

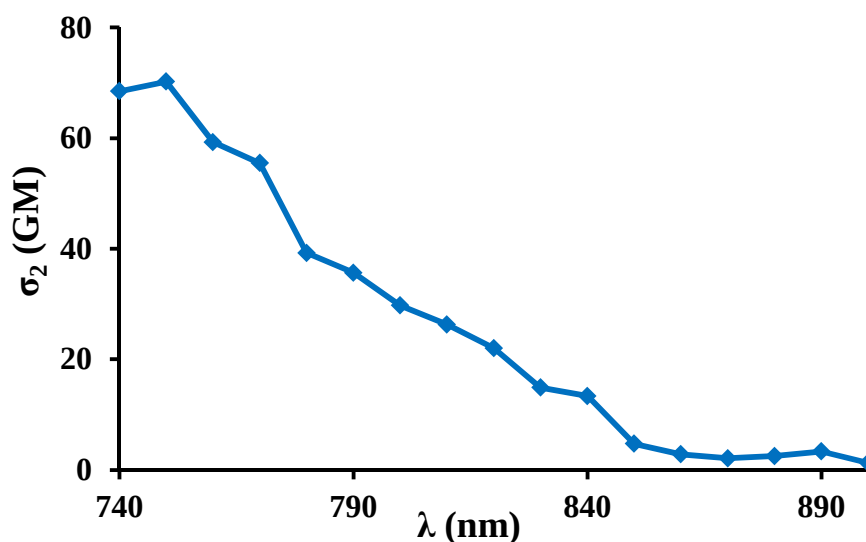


Figure 96 : Spectre d'excitation à deux photons de la molécule **52** dans le dichlorométhane.

Le chromophore **52** présente un σ_2 maximum de 75 GM vers 750 nm. Cette valeur est relativement faible mais ce n'est qu'une première étape, et nous allons nous attacher à l'améliorer en augmentant la longueur du système conjugué par couplage de Heck ou de Sonogashira par exemple.

IV.2.4. Dérivés de DPP liés à un cyclène

Le cyclène, nommé également 1,4,7,10-tétraazacyclododécane, est une molécule hétérocyclique saturée contenant quatre atomes d'azote espacés par quatre groupes $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (tétraazomacrocycle). Les quatre fonctions amine du cyclène sont secondaires et des réactions d'alkylation sont donc possibles.

Dans notre étude nous avons utilisé un dérivé commercial du cyclène comportant trois groupements carboxylates protégés appelé tri-*tert*-butyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-tri-acétate (DO3tBu, Chematec). Les fonctions acides carboxyliques sont très solubles dans l'eau sous forme carboxylate et combinées aux doublets libres des atomes d'azote présentent un fort pouvoir complexant vis à vis des lanthanides (elle complète la sphère de coordination de l'ion métallique). Les structures du cyclène et de son dérivé comportant trois fonctions acides protégés sont présentées dans la *Figure 97*.

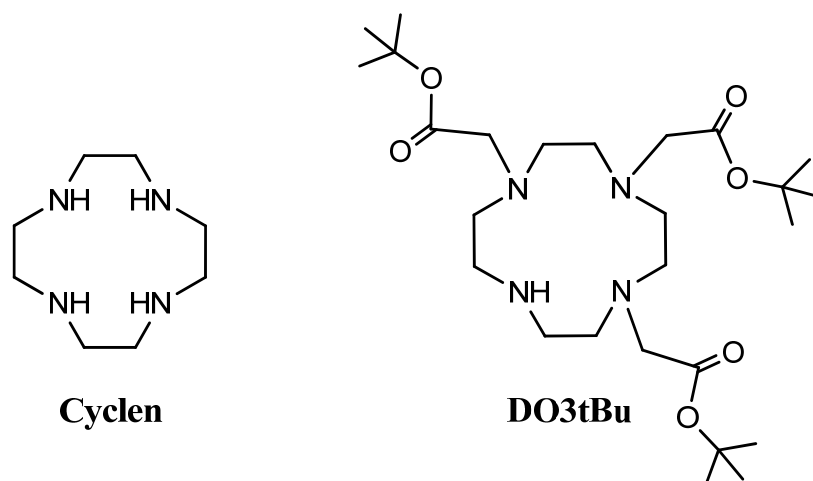


Figure 97 : Structures moléculaire du cyclène (à gauche) et de DO3tBu (à droite).

Le synthon de base pour coupler ce motif cyclène à un cœur central DPP est la molécule **31**. Le groupement hydroxyle porté par **31** (§ chapitre II) réagit avec le chlorure de chloroacétyle en milieu basique pour conduire à **53** (*Schéma 21*)^[20].

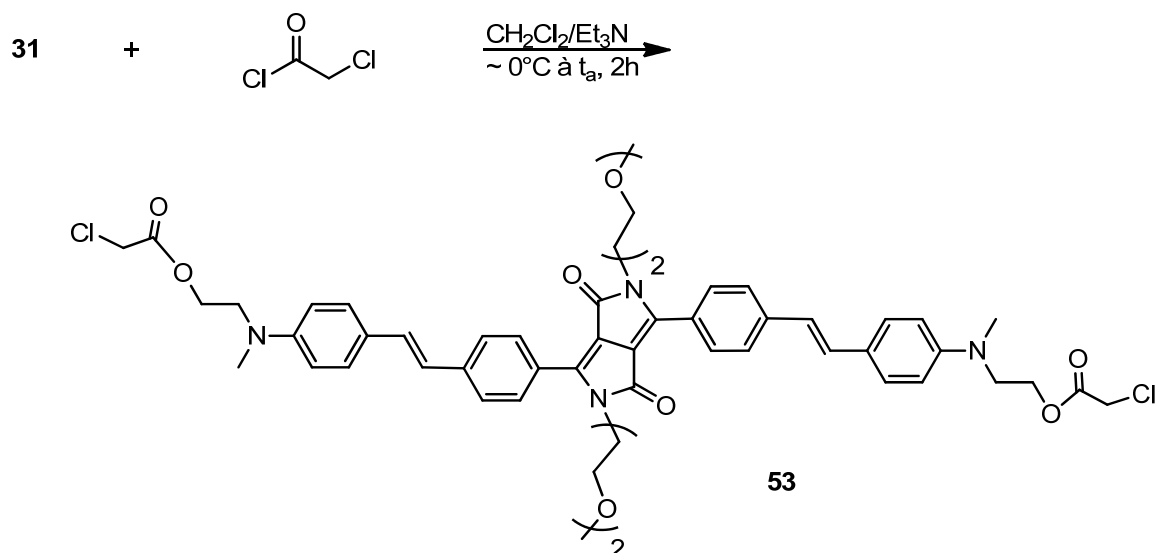


Schéma 21 : Synthèse de la molécule 53

L'amine secondaire libre du cyclène permet la substitution d'un fluorophore, la deuxième étape de synthèse est une substitution nucléophile de **53** sur l'azote secondaire du dérivé DO3tBu.^[18] Cette étape de synthèse conduit à la formation du chromophore **54** contenant deux DO3tBu protégé (Schéma 22). La déprotection des fonctions esters des dérivés du cyclène en milieu acide par de l'acide trifluoroacétique permet d'obtenir le produit **55**.

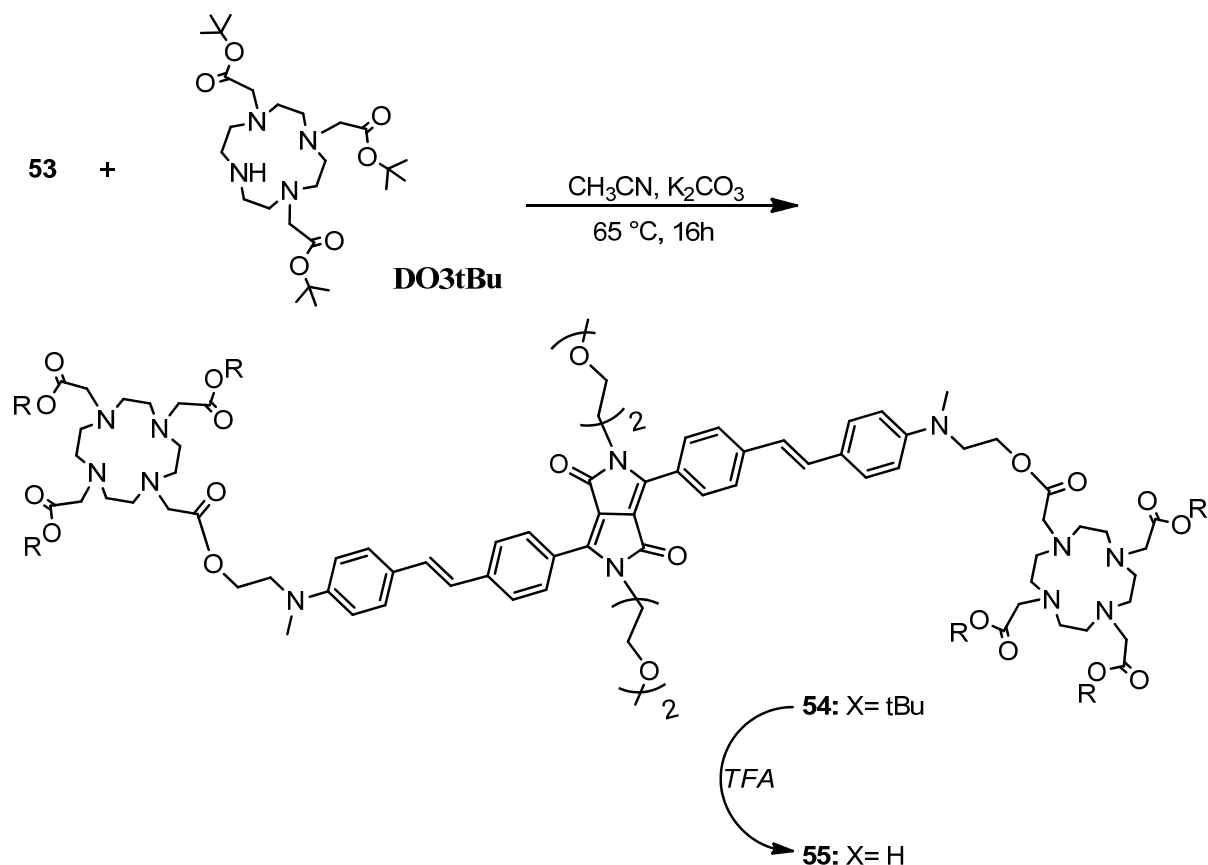


Schéma 22 : Synthèse de la molécule 55

Le rendement de cette réaction a été faible, et après avoir étudié les produits secondaires obtenus, nous avons pu isoler le composé **56** (Figure 98). qui résulte de l'hydrolyse d'une des deux liaisons ester. Cette hydrolyse peut être provoquée par la présence de traces d'eau dans le TFA utilisé, d'où la nécessité de refaire la réaction avec un TFA bien anhydre.

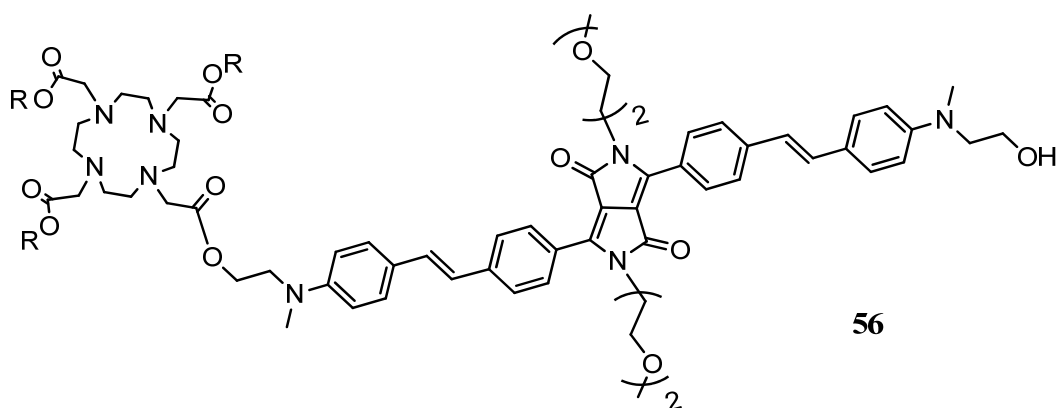


Figure 98 : Structure moléculaire du produit secondaire 56

Nous n'avons pas eu le temps en fin de thèse d'aller jusqu'à la complexation du gadolinium (III). Les dérivés déprotégés **55** et **56** peuvent réagir avec le trichlorure de gadolinium (III)

hexahydraté, en solution aqueuse de Na_2CO_3 pour conduire aux fluorophores désirés comportant une partie fluorescente et une partie paramagnétique.

IV.4. IMAGERIES CELLULAIRES

IV.4.1. Dérivé de DPP lié à une nanoparticule d'oxyde de Fer

Les nanoparticules greffées **46-NP** ont été testées en imagerie sur des cellules HeLa. Les cultures cellulaires ont été incubées pendant une heure avec une suspension de 0,1 mg de **46-NP**/mL dans le milieu de culture, puis observées en microscopie par excitation bi-photonique. L'excitation est effectuée à $\lambda_{\text{ex}} = 800$ nm et avec une faible puissance laser de l'ordre de 5mW (*Figure 99*).

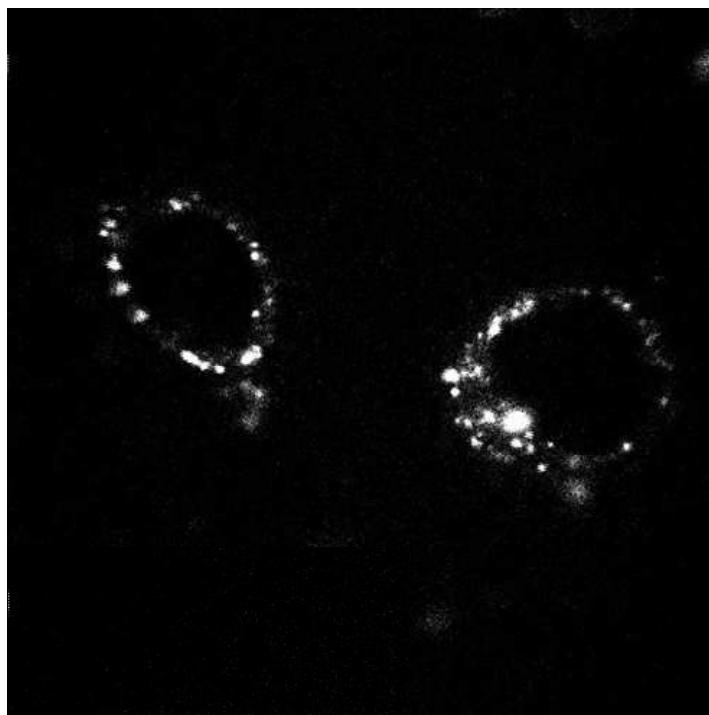


Figure 99 : *Imagerie à deux photons de cellules HeLa marquées aux 46-NP.*

Nous avons remarqué une pénétration rapide dans le cytoplasme et pas de pénétration nucléaire. Les nanoparticules s'accumulent dans des vésicules cytoplasmiques et forment des spots très brillants. En collaboration avec Yannick Schwab de l'IGBMC à Illkirch, ces cellules ont été fixées en les traitant par le glutaraldéhyde et du tétr oxyde d'osmium. Les boîtes de culture des cellules ont été découpées en lamelles très fines puis incluses dans une résine époxy. Ces échantillons ont ensuite été découpés en tranches très fines de l'ordre de 250 nm à l'aide d'un ultramicrotome, pour ensuite être imagées par microscopie électronique

en transmission. Plusieurs images ont été obtenues (*Figure 100*) sur lesquelles nous avons pu discerner très nettement les accumulations des nanoparticules dans des endosomes, ce qui prouve l'efficacité de ces nanoparticules en microscopie électronique. Ces nanoparticules nous ont permis de passer de l'échelle cellulaire à l'échelle subcellulaire. D'autre part, ces nanoparticules étant paramagnétiques, leurs propriétés magnétiques vont être étudiées et une collaboration avec B. van der Sanden du Grenoble Institut de Neurosciences nous permettra de tester leur efficacité en microscopie par excitation bi-photonique et en IRM sur le cortex de souris *in vivo*.

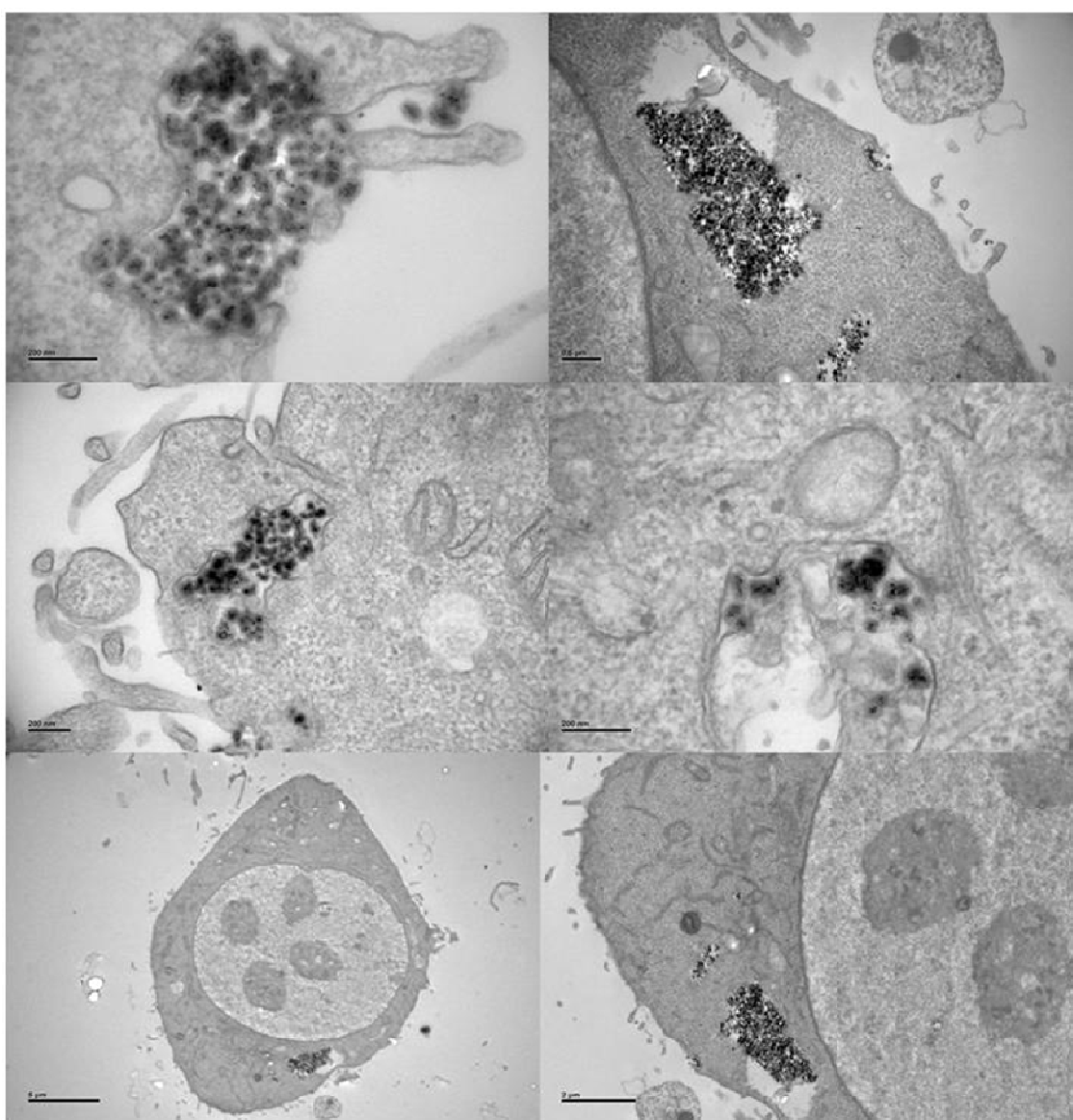


Figure 100 : *Imagerie par microscopie électronique en transmission de cellules HeLa marquées par des nanoparticules fonctionnalisées 46-NP.*

IV.4.2. Dérivé d'un cluster de platine

Des cellules HeLa ont été incubées dans une solution de $5 \cdot 10^{-6}$ M du dérivé de cluster de platine **51** et un suivi de la pénétration cellulaire en fonction du temps a été effectué par microscopie bi-photonique (*Figure 101*) avec une excitation à 800 nm et une puissance laser faible de l'ordre de 5 mW. Dès les premières minutes d'incubation le fluorophore commence à pénétrer dans la cellule et s'accumule dans ses vésicules endosomales, il ne pénètre pas dans le noyau même après 2 h d'incubation.

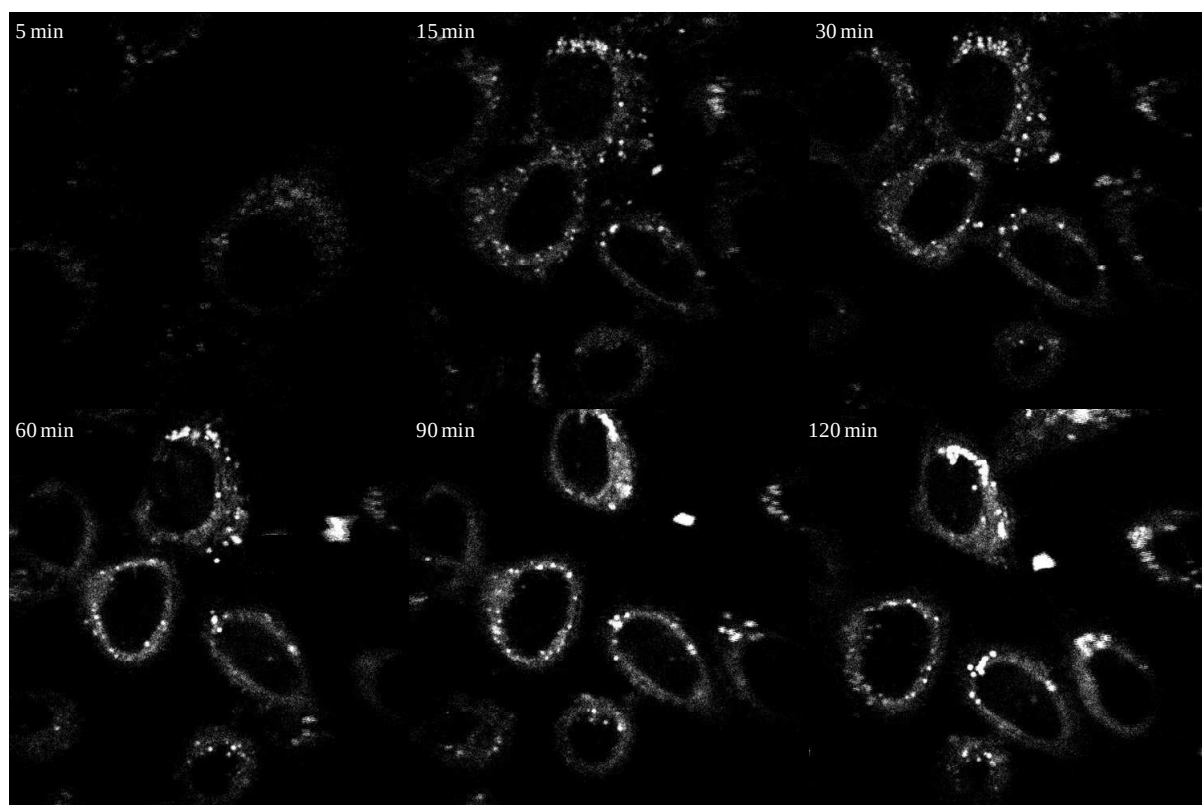


Figure 101 : Suivi de l'internalisation du fluorophore **51** dans des cellules HeLa, par imagerie à deux photons.

Il faut noter que pour les images précédentes, des solutions fraîchement préparées de **51** ont été utilisées. En utilisant des vieilles solutions, une localisation cellulaire totalement différente a été détectée (*Figure 102*). Le colorant ne s'accumule plus sous forme de vésicules dans le cytoplasme mais marque d'autres organites cytoplasmiques qui sont probablement les réticulum endoplasmiques. Ce changement de localisation est probablement dû à une décomposition du fluorophore lors du stockage.

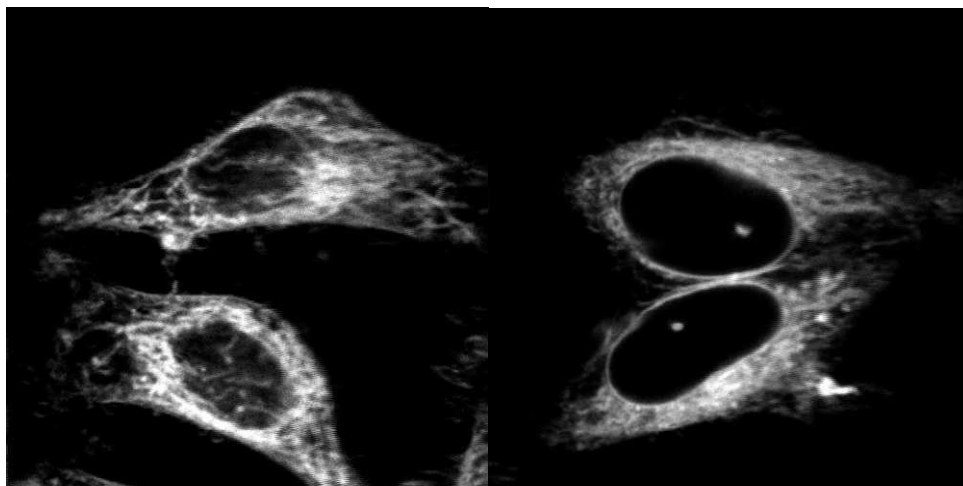


Figure 102 : *Imagerie à deux photons de cellules HeLa incubées dans une vieille solution du chromophore 51.*

Les expériences en microscopie électronique en transmission ne se sont pas avérées probantes, car aucun contraste n'a été détecté. Cela est peut être dû à ce que le chromophore n'a pas résisté au traitement par l'oxyde d'osmium qui est un oxydant très fort.

Cependant des images en MEB ont été réalisées, et en les observant avec inversion du LUT (Look Up Table), on distingue très nettement des vésicules très contrastées de même taille qu'en microscopie de fluorescence (*Figure 103*) ce qui peut être dû à l'accumulation du cluster de platine lipophile dans les vésicules lipidiques ou/et à la décomposition du tétr oxyde d'osmium qui a été facilitée par les propriétés redox du cluster de platine, donnant un net précipité. Des tests sont en cours en microscopie électronique à balayage en utilisant une méthode de microanalyse X EDS pour détecter le platine par son signal spectral caractéristique de fluorescence X.

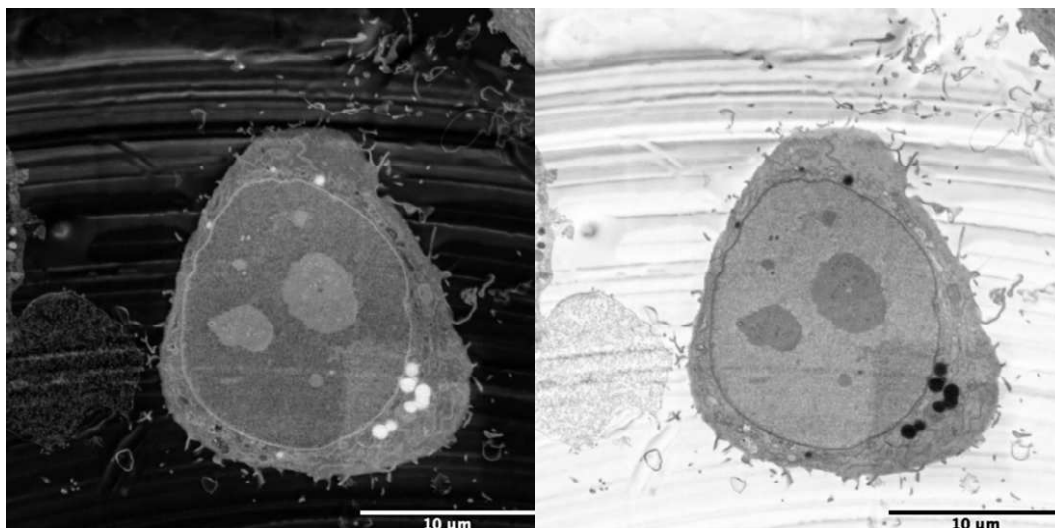


Figure 103 : Imagerie par microscopie électronique à balayage de cellules HeLa marquées au **51**. Image normale (à gauche) et en inversant le LUT (à droite).

Des images en durée de vie de fluorescence (FLIM) ont été relevées (Figure 104). Le chromophore **51** présente une durée de vie qui varie entre 2 et 2,5 ns selon l'environnement du fluorophore.

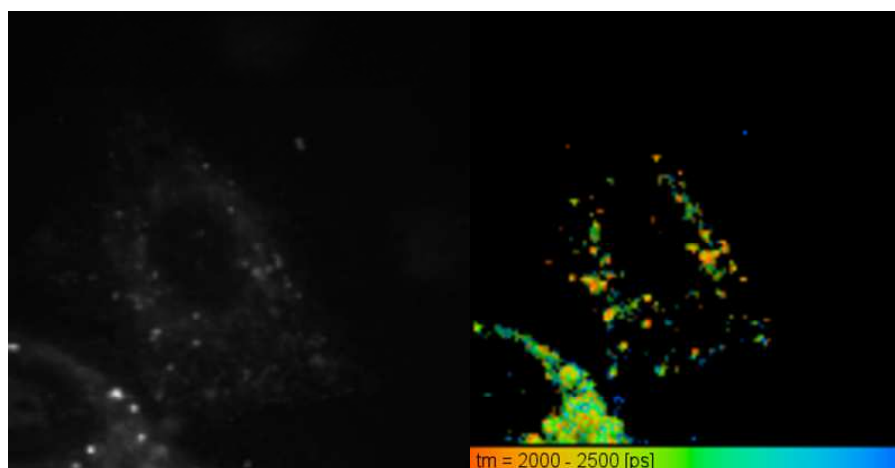


Figure 104 : Images des durées de vie moyennes de fluorescence (FLIM) des cellules HeLa en intensités (à gauche) et en couleurs (à droite) marquées avec **51**.

IV.3.3. Dérivé de DPP contenant de l'or

Comme pour les fluorophores précédents, des cellules HeLa ont été incubées pendant 1 h dans une solution 5 µM du fluorophore **52**, puis ont été imagées par microscopie bi-photonique. Les images obtenues sont représentées dans la (Figure 105). Là encore le fluorophore **52** pénètre dans le cytoplasme mais ne rentre pas dans le noyau.



Figure 105 : *Imagerie à deux photons de cellules HeLa incubées avec 52 pendant 1h.*

Les tests en microscopie électronique seront réalisés plus tard pour déterminer l'efficacité de ce chromophore dans ce type d'application.

IV.4. CONCLUSION

Nous avons élaboré de nouvelles sondes multimodales pour la microscopie corrélative biphotonique/électronique et pour l'imagerie corrélative IRM. Les nanoparticules greffées ont donné d'excellents résultats tant *in cellulo* par microscopie par excitation biphotonique que par microscopie électronique en transmission et à balayage. Par ailleurs un nouveau chromophore à cœur cluster de platine entouré de systèmes conjugués à terminaison triphénylamine a pu être exploité en microscopie par excitation bi-photonique. En MEB de petites vésicules contrastées ont été détectées, et des tests sont en cours en microscopie électronique à balayage en utilisant une méthode de microanalyse X pour confirmer ce résultat. Une autre molécule dérivée de DPP et contenant deux atomes d'or a été synthétisée et caractérisée. Des images à deux photons de cellules HeLa incubées par cette molécule ont été obtenues. Une tel fluorophore, dense aux électrons, devrait donner un bon contraste en microscopie électronique en transmission. Les tests sont en cours et nous permettront de répondre à une question fondamentale en microscopie corrélative : combien d'atomes lourds sont-ils nécessaires pour induire un contraste suffisant en microscopie corrélative.

REFERENCES

- [1] M. Niedre and V. Ntziachristos, *Proc. IEEE*, 2008, Vol. 96, No. 3.
- [2] S. Modla, K. J. Czymmek, *Micron*, **2011**, 42, 773-792.
- [3] F. Braet, W. J. Geerts, *J. Microsc.*, **2009**, 235, 239-240.
- [4] J. Caplan, M. Niethammer, R. M. Taylor, 2nd, K. J. Czymmek, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2011**, 21, 686-693.
- [5] F. Stuker, C. Baltes, K. Dikaïou, D. Vats, L. Carrara, E. Charbon, J. Ripoll, M. Rudin, *IEEE Trans. Med. Imaging*, **2011**, 30, 1265-1273.
- [6] A. Hayat, *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*, Cambridge University Press, **2000**.
- [7] J. I. Goldstein, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*, Kluwer Academic/Plenum, **2003**.
- [8] D. B. Williams, C. B. Carter, D. B. Williams, C. B. Carter, *The Transmission Electron Microscope Transmission Electron Microscopy*, Springer US, **2009**.
- [9] a) S. Aime, M. Botta, E. Terreno, *Adv. Inorg. Chem.*, **2005**, 57, 173-237; b) M. Bottrill, L. Kwok, N. J. Long, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 557-571; c) P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurphy, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293-2352.
- [10] C. C. Berry, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 543-547.
- [11] R. Massart, E. Dubois, V. Cabuil, E. Hasmonay, *J. Magn. Magn. Mater.*, **1995**, 149, 1-5.
- [12] D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 4990-4991.
- [12] F. Bolze, A. Niehl, M. Heinlein, N. Mjdasiri, J.L. Rehspringer, N. Schaeffer, P. Didier, Y. Arntz, Y. Mely, S. Gug, A. Specht, M. Goeldner, J. F. Nicoud, *Nonlinear Opt., Quantum Opt.*, **2010**, 40, 253-265.

- [14] E. Leary, H. Van Zalinge, S. J. Higgins, R. J. Nichols, F. Fabrizi de Biani, P. Leoni, L. Marchetti, P. Zanello, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 5198-5202.
- [15] A. Albinati, F. Fabrizi de Biani, P. Leoni, L. Marchetti, M. Pasquali, S. Rizzato, P. Zanello, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5701-5705.
- [16] P. Leoni, F. Marchetti, L. Marchetti, M. Pasquali, *Chem. Commun.*, **2003**, 2372-2373.
- [17] P. Leoni, F. Marchetti, L. Marchetti, M. Pasquali, S. Quaglierini, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3617-3618.
- [18] A. Hayek, J.-F. Nicoud, F. Bolze, C. Bourgogne, P. L. Baldeck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6466-6469.
- [19] I.-P. Lorenz, M. Limmert, P. Mayer, H. Piotrowski, H. Langhals, M. Poppe, K. Polborn, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 4047-4055.
- [20] C. Li, G.-L. Law, W.-T. Wong, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4841-4844.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse concerne l'ingénierie moléculaire de nouveaux fluorophores spécifiquement conçus pour la microscopie par excitation biphotonique. Cette thématique de recherche est multidisciplinaire, en effet elle n'est pas limitée à la synthèse organique mais est élargie pour inclure les caractérisations photophysiques à un et deux photons des fluorophores synthétisés ainsi que leurs applications biologiques.

Dans une première partie, nous avons mis au point de nouveaux fluorophores émettant dans le rouge en utilisant un système dicéto-pyrrolo-pyrrole en tant que cœur rigide relié à des systèmes organiques électro-actifs par différents liens conjugués. Nous avons utilisé des chaînes oligoéthylèneglycol pour préparer des cœurs DPP solubles dans l'eau. Nous avons ensuite caractérisé ces fluorophores qui présentent une fluorescence qui va du jaune orangé au rouge, avec des rendements quantiques de fluorescence élevés et des très bonnes sections efficaces d'absorption à deux photons. En comparant l'une des molécules que nous avons synthétisée avec le **BF3**, un fluorophore mis au point lors d'une thèse précédente au sein du laboratoire, nous voyons que nos objectifs ont bien été atteints (*Figure 106*).

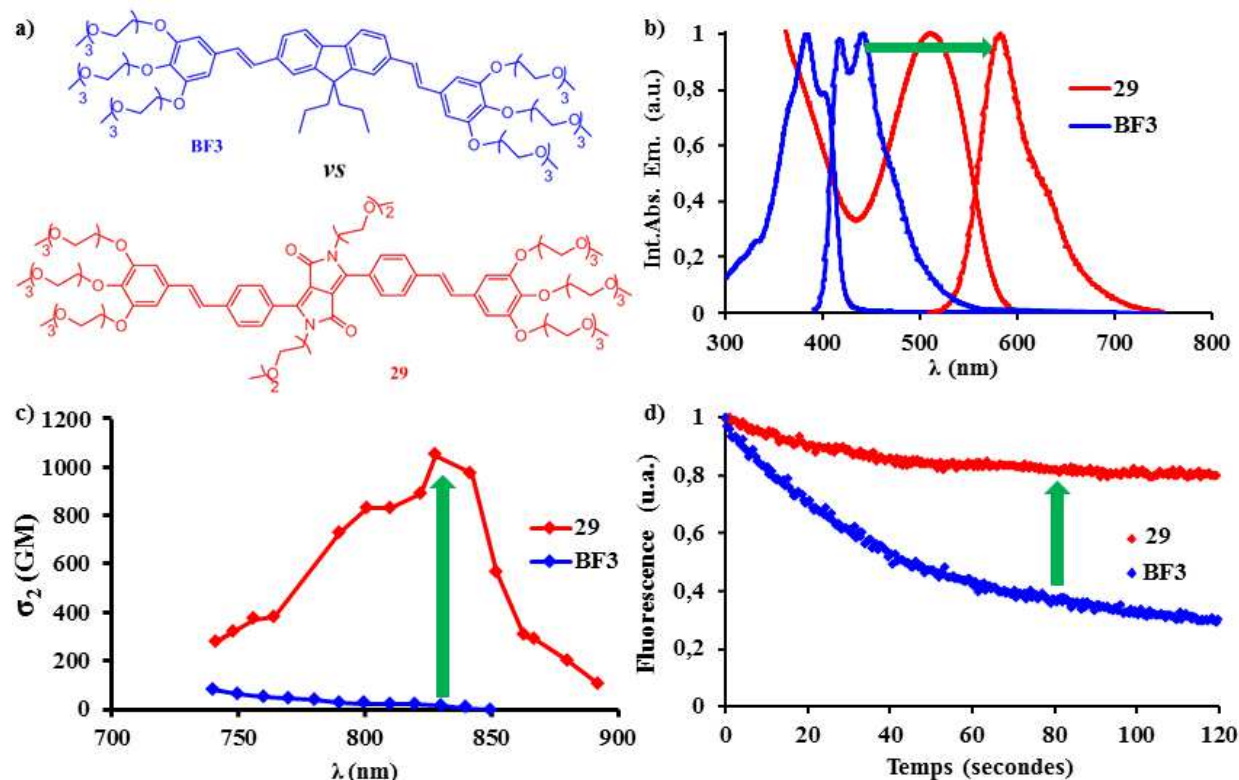


Figure 106: Structures des fluorophores **29** et **BF3** (a), spectres d'absorption et d'émission dans le dichlorométhane de ces deux composés (b), spectre d'excitation à deux photons dans le dichlorométhane de ces deux composés (c) et photostabilité de ces deux composés en conditions d'imagerie sur cellules HeLa (d).

Par exemple le spectre d'émission de produit **29** est décalé vers le rouge de 150 nm comparé à celui de la molécule **BF3**. La section efficace d'absorption à deux photons σ_2 dans la région qui nous intéresse (à 800 nm) est 15 fois plus élevée dans le cas de **29** que pour **BF3**. En ce qui concerne la photostabilité, **29** est au moins deux fois plus stable que le **BF3** en milieu cellulaire.

Les molécules synthétisées ont ensuite été testées en microscopie par excitation à deux photons sur des cultures de cellules. Nous avons mis en évidence une pénétration rapide des différents fluorophores dans le cytoplasme (< 5 min.) et pas de pénétration nucléaire. D'autre part, des faibles puissances laser de l'ordre du mW seulement ont pu être utilisées pour acquérir les images, indiquant la très bonne efficacité de ces nouvelles sondes. A l'aide d'une ingénierie moléculaire spécifique et en modifiant la nature du groupement électro-donneur, la nature et la longueur du système conjugué, nous avons obtenu une librairie de nouvelles sondes fluorescentes photostables émettant dans l'orange-rouge et présentant une bonne solubilité dans l'eau.

Dans une seconde partie de notre travail, nous avons synthétisé des fluorophores amino-réactifs en modifiant les fluorophores précédents. Nous avons introduit une fonction acide en différentes positions. Deux chromophores ont été synthétisés et caractérisés, les valeurs élevées de leurs rendements quantiques de fluorescence ainsi que leurs section efficace d'absorption à deux photons (σ_2) nous ont encouragé à les utiliser pour réaliser une bioconjugaison avec la protéine TAT (Trans-Activator of Transcription) étudiée au laboratoire. L'imagerie par microscopie biphotonique a été effectuée avec succès sur des cellules HeLa sans que les chromophores greffés modifient le comportement de la protéine dans la cellule.

Dans une troisième partie, nous avons élaboré de nouvelles sondes multimodales pour la microscopie corrélative biphotonique/électronique et pour l'imagerie corrélative IRM/microscopie de fluorescence. Plusieurs types de sondes multimodales ont été préparés et caractérisés. Le premier type est basé directement sur les travaux précédents portant sur les fluorophores à cœur DPP fonctionnalisés. Ces derniers ont été greffés sur des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées d'une couche de silice. Cette stratégie a donné d'excellents résultats et ces nanoparticules ont pu être étudiées *in cellulo* par microscopie par excitation biphotonique puis par microscopie électronique en transmission et à balayage. Une deuxième stratégie a aussi été envisagée qui repose sur l'introduction d'atomes lourds au sein du fluorophore. Ainsi nous avons préparé un nouveau type de fluorophore comportant un cluster

de platine dans le cœur, lié aux deux extrémités à une triphénylamine par un système conjugué. La molécule préparée a été caractérisée et présente une fluorescence qui a pu être exploitée en microscopie par excitation bi-photonique, les expériences en microscopie électronique à balayage sont en cours et un contraste important a été mis en évidence après coloration à l'osmium. Des tests sont en cours en microscopie électronique à balayage en utilisant une méthode de microanalyse X pour détecter le platine. Une autre molécule dérivée du DPP et contenant deux atomes d'or a été synthétisée et caractérisée. Des images en microscopie à deux photons sur des cellules HeLa incubées par cette molécule ont été obtenues. Une telle molécule, dense aux électrons, devrait donner un contraste en microscopie électronique en transmission et les tests sont en cours. Finalement un autre dérivé de DPP fluorescent lié à deux cyclènes a été synthétisé. Le cyclène permet en effet de complexer des cations lanthanides, pour aboutir à des chromophores magnétiquement actifs et utilisables en IRM.

En conclusion nos travaux ont permis la mise au point d'une librairie de nouvelles sondes (aussi bien systémiques que bio-conjugables) très efficaces en microscopie biphotonique et émettant entre le rouge et le proche infra-rouge. Certaines de ces sondes présentent une propriété supplémentaire qui permet leur détection par une autre technique que la microscopie de fluorescence, par exemple la microscopie corrélative optique-électronique avec des sondes greffées sur des nanoparticules d'oxyde de fer ou des sondes basées sur un cluster de platine. D'autre part, les nanoparticules utilisées étant paramagnétiques devraient aussi être détectables par imagerie par résonance magnétique, conduisant à une corrélation entre les images microscopiques obtenues par microscopie et les images au niveau tissulaire obtenues par imagerie par résonance magnétique.

PERSPECTIVES

Pour la première partie, les travaux futurs consisteront à effectuer des tests sur l'animal (embryons de poissons zèbres, de xénopes, souris), puis à améliorer la solubilité des chromophores dans l'eau en utilisant des chaînes OEG plus longues pour les greffer sur le cœur DPP ou bien de greffer des chaînes supplémentaires sur les systèmes périphériques. Il serait intéressant aussi d'améliorer les propriétés photophysiques des dérivés de la pyridine en effectuant des modifications comme en la transformant en pyridine-N-oxide qui est connue pour son pouvoir électro-donneur et électro-accepteur selon la molécule dans laquelle il est introduit. Il est aussi important de d'essayer des nouveaux groupements électro-actifs tels que les groupements nitrile, nitro, sulfonyl...

En ce qui concerne les chromophores amino-réactifs il sera intéressant d'utiliser des groupements fonctionnels plus actifs que la fonction acide carboxylique, comme le groupement isothiocyanate qui réagit facilement avec les amines primaires. De plus, une utilisation d'un groupement électro-donneur plus fort que le méthoxy, pourrait décaler l'émission plus vers le rouge afin de diminuer l'absorption et la dispersion de la lumière émise par les tissus biologiques.

Pour le dérivé à cœur cluster de platine, malgré une certaine lipophilie, les tests biologiques se sont révélés extrêmement prometteurs. Les tests sur de telles molécules ont été possibles grâce à la proximité immédiate de biologistes et du matériel nécessaire. Il reste néanmoins à le modifier pour le rendre aquo-soluble et bioconjuguable.

Pour le dérivé DPP **52** contenant de l'or il serait intéressant d'augmenter la longueur du système conjugué, par couplage de Heck ou de Sonogashira par exemple, afin d'améliorer ses propriétés photophysiques à 1 et à 2 photons. Des tests en microscopie électronique seront nécessaires pour vérifier son efficacité comme sonde multimodale, qui était notre objectif de départ.

Finalement en ce qui concerne le dérivé de DPP fluorescent lié à deux cyclènes qui a été synthétisé, la prochaine étape serait d'achever la complexation du gadolinium III, pour aboutir à un chromophore paramagnétique pouvant peut être utilisé à la fois en IRM et en microscopie par excitation bi-photonique. Dans le même ordre d'idée, les nanoparticules fluorescentes doivent être prochainement étudiées en microscopie par excitation bi-photonique et en IRM sur la souris en collaboration avec l'équipe de B. van der Sanden du Grenoble Institut de Neurosciences.

PARTIE EXPERIMENTALE

GENERALITES : APPAREILS ET SERVICES

Solvants et réactifs

Les réactifs utilisés pour les synthèses ont été commandés chez Sigma-Aldrich ou Acros Organics. Tous les solvants anhydres ont été obtenus par distillation sous argon sur un desséchant approprié (le THF sur sodium/benzophénone et la triéthylamine Et₃N sur KOH). Les autres solvants anhydres ont été commandés chez Sigma-Aldrich (DMF, éthanol absolu, méthanol absolu, toluène, benzène, acétonitrile, DMSO). Pour la synthèse en phase solide, les acides aminés protégés Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyl) ont été fournis par NeoMPS (Strasbourg, France) et la résine par Novabiochem (Darmstadt, Allemagne). Le dérivé de cyclène DO3tBu a été fournis par ChemaTech. Tous les produits et réactifs commerciaux ont été utilisés sans traitement préalable.

Supports chromatographiques

Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 (230-400 mesh, 0,040-0,063 mm) Merck. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur plaque d'aluminium recouverte de gel de silice 60 F254 Merck.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN du proton (¹H) et du carbone-13 (¹³C) de tous les produits ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Advance 400 (400 MHz) ou 500 MHz au sein de la faculté de pharmacie. Les déplacements chimiques (δ) ont été indiqués en ppm par rapport à la référence interne des spectres qui correspond au pic du solvant non deutéré (CD₂Cl₂ : 5,23 ppm ; THF : 1,7 et 3,55 ppm ; MeOH : 3,38 ppm ; DMSO : 2,49 ppm et CDCl₃ : 7,27 ppm en ¹H-RMN et 77,0 ppm en ¹³C-RMN). Les constantes de couplage *J* sont exprimées en Hertz. Les abréviations s, d, t, q, m, dd, tv (...) correspondent respectivement à singulet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, doublet dédoublé, triplet virtuel...

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse FAB ont été enregistrés par un instrument ZA-HF avec une matrice d'alcool 4-nitrobenzyl, et les spectres ESI ont été obtenus sur un appareil Bruker HTC ultra (ESI-IT).

Les spectres de masse (LCMS) ont été réalisés en mode électrospray sur un spectromètre Agilent 1200SL. La colonne utilisée est un Hypersil Gold C18 de 1.9 μ m de taille de

particules et de 1x30 mm de dimension. Les temps de rétention sont donnés en minutes et les produits ont été passés selon un gradient (MeCN 1 à 100% dans H₂O + 0.1% d'HCO₂H).

Mesures spectroscopiques

Mesures spectroscopiques à 1 photon

Tous les spectres d'absorption UV-visible ont été mesurés sur un spectrophotomètre à double faisceau Cary 400 dans des cuvettes en quartz de 1 × 0.4 cm. Le solvant pur a été utilisé comme référence. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire ϵ ont été obtenues en faisant le moyen d'au moins cinq mesures indépendant avec des absorbance dans la gamme 0,1-1.

Les spectres d'émission et d'excitation ont été mesurés sur un spectrofluoromètre Fluorolog (Jobin-Yvon) dans des cuvettes en quartz de 1 × 0.5 cm avec des solutions diluées (Abs. < 0,15).

Les rendements quantiques de fluorescence ont été mesurés par la méthode indiquée dans le paragraphe II.3.1 en utilisant la rhodamine B dans le méthanol comme référence. La longueur d'onde d'excitation a été choisie d'une façon à ce que le produit et la référence aient la même valeur d'absorbance (< 0,1) à la longueur d'onde de mesure.

Mesures spectroscopiques à 2 photons

Les spectres d'excitation à deux photons ont été obtenus par la méthode indiquée dans le paragraphe I.1.3. Le laser utilisé a été un laser Ti:Saphir à des longueurs d'onde comprises entre 740-900 nm. La fluorescence, collectée à 90°, a été focalisée dans une fibre optique reliée à un spectromètre. La calibration des spectres a été effectuée en prenant le spectre d'ADP de la rhodamine B comme référence.

Microscopie

Imagerie confocale

Le microscope utilisé est un microscope confocal à balayage laser commercial Leica SPE II. Ce système est équipé par un laser qui génère quatre longueurs d'onde d'excitation 405, 488, 561 et 635 nm. La focalisation du laser et la collection de signal sont effectués à l'aide d'un objectif optique à immersion dans l'huile HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS. Pour exciter nos chromophores, une excitation à 488 nm a été utilisée. La puissance laser a été ajustée d'une façon qu'elle excite suffisamment le chromophore en évitant la saturation de l'image.

Imagerie à deux photon

Ces imageries ont été effectuées par un microscope à deux photons construit au laboratoire. Ce système est basé sur un microscope à statif inversé Olympus IX70 avec un objectif à immersion dans l'eau Olympus 60x1.2NA. L'excitation à deux photons est induite par un laser pulsé femtoseconde (Tsunami, Spectra Physics). La fluorescence a été détectée par une photodiode à avalanche (APD SPCM-AQR-14-FC, Perkin-Elmer). Le temps typique d'acquisition d'une image a été de 20 ms avec une puissance moyenne de laser inférieure à 5 mW au niveau de l'échantillon à 800 nm. (Voir paragraphe I.3.3.)

Imagerie de microscopie par durée de vie de fluorescence (Fluorescence Lifetime Imaging microscopy FLIM)

La durée de vie de fluorescence est définie comme le temps moyen pendant lequel le fluorophore reste à l'état excité avant de revenir à son état fondamental. Cette durée, qui est indépendante de la concentration, peut être modifiée lors de l'interaction de la molécule avec son environnement proche (viscosité, pH, interaction avec un ion, transfert résonant d'énergie vers une molécule acceptrice FRET ...).

Le FLIM est une technique de microscopie permettant d'acquérir une image dont le contraste est donné par la durée de vie du fluorophore. Une approche élégante qui permet de s'affranchir de ces difficultés expérimentales réside dans l'utilisation d'un module de comptage de photon unique corrélé en temps (Time Correlated Single Photon Counting TCSPC).

Expérimentalement l'acquisition du déclin de fluorescence requiert une source pulsée dont la largeur temporelle des impulsions est très inférieure à la durée de vie de fluorescence du chromophore. Le module de comptage de photon unique corrélé en temps (Time Correlated Single Photon Counting TCSPC) est utilisé dans l'expérience est synchronisé sur le laser pulsé qui délivre une impulsion ($\sim 10^{-13}$ s) toutes les 12,5 ns (taux de répétition 80 MHz). Le module de comptage fonctionne en mode start-stop inversé : l'arrivée d'un photon fluorescence sur le détecteur déclenche le « chronomètre » de la carte qui s'arrête dès l'arrivée de l'impulsion laser suivante. De cette manière en accumulant un très grand nombre de photons (~ 5000) il est possible de reconstruire le déclin de fluorescence en un point de l'échantillon.

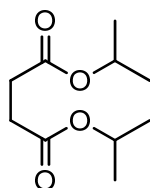
Les mesures ont été réalisées sur un microscope inversé Olympus IX70 utilisant un objectif à eau d'ouverture numérique 1,2. Le laser d'excitation est un laser titane-saphir (Tsunami

Spectra-Physics) qui délivre des impulsions d'une durée de 100 fs à une cadence de 80 MHz. La longueur d'onde d'excitation utilisée (800 nm). Les images sont obtenues en balayant l'échantillon avec le faisceau laser à l'aide de miroirs galvanométriques (Model6210, Cambridge technology). La fluorescence collectée repasse par le même trajet optique (mode descanné) puis est couplée dans une fibre optique et envoyée vers une photodiode à avalanche (SPCM-AQR-14-FC, Perkin Elmer). Cette dernière dont la résolution temporelle est de 0,6 ns est connectée à la carte de comptage pilotée par un logiciel commercial (SPC830, Becker & Hickl, Allemagne). En fonction des niveaux de fluorescence de l'échantillon, les images de durée de vie ont été obtenues en balayant de façon continue l'échantillon typiquement pendant 30 s. Les données brutes ont été analysées à l'aide d'un logiciel commercial utilisant une méthode de déconvolution itérative afin de déterminer la durée de vie du marqueur en un point (SPCImage V2.8, Becker & Hickl, Allemagne).

Microscopie à force atomique (AFM)

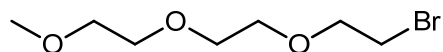
Les images simultanées de microscopie AFM et de microscopie TIRF ont été acquises par un instrument développé au laboratoire. Cet instrument est basé sur la combinaison d'un microscope AFM commercial composé d'une tête stand alone SNEMA ainsi que d'une électronique d'acquisition NTEGRA (NT mDT compagny, Moscou). Le microscope TIRF est constitué d'un bâti Olympus de microscope inversé X71 ainsi qu'un objectif 100X à immersion d'huile. La détection en champ large se fait grâce à caméra CCD Andor Ixon (TILL Photonics). Un laser Spectra (Spectra Tokyo Japan) de longueur d'onde 488nm de 50 mW permet l'excitation de l'échantillon. Les échantillons sont déposés sous forme de goutte sur une lamelle d'épaisseur 0,17mm. Après un temps d'incubation de 20 min la goutte est remplacée par un volume de 50µl de buffer. Les images AFM sont acquises en phase liquide en utilisant des cantilevers de constante de raideur 0,03N/m en mode Tapping (résonance entre 20 et 40 kHz). La résolution est de 512x512 avec une vitesse de balayage de 1Hz.

SYNTHESES

Di-isopropyl succinate (5):

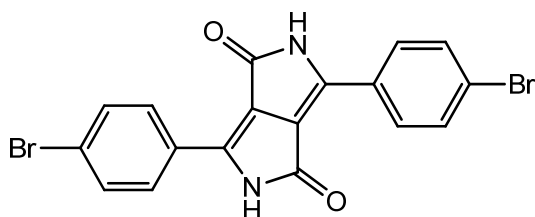
Dans un ballon bicol de 250 mL, ont été introduit introduit 30 mL d'isopropanol (0,4 mol ; 2,6 éq), avec 40 mL de dimethylaniline et 50 mL d'ether. Le mélange réactionnel a été porté à reflux pendant quelques minutes puis 17 mL de dichlorure de succinyle (0,15 mol ; 1 éq) ont été ajoutés. Le chauffage a été stoppé après addition de quelques gouttes puis, une fois l'addition de dichlorure de succinyle terminée le mélange réactionnel a été porté à 45 °c pendant 1h. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante, puis 50 mL d'eau ont été ajoutés et la phase organique a été séparée et lavée à l'eau puis séchée sur MgSO_4 . Le solvant a été évaporé sous pression réduite, puis le produit a été purifié par distillation sous vide pour donner une huile brune (22g; Rdt. = 75 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): 4,95-4,92 (m, 2H) ; 2,5 (s, 4H) ; 1,2 (d, 12H)

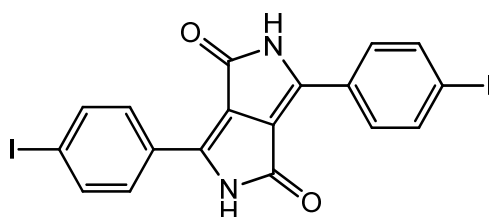
1-bromo-2-(2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy)-éthane :

Dans un ballon bicol, sous argon, de l'éther (200 mL) et du tris-(éthylèneglycol) monoethylether, ont été introduits. Le mélange à été refroidi à 0°C, à cette solution sont ajoutés lentement 12 mL de PBr_3 (125 mmol, 0,5 éq) puis le mélange réactionnel a été agité pendant 15 min à 0°C. Du méthanol (15 mL) a été ajouté puis le mélange a été agité pendant 30 min à température ambiante. Le mélange a été versé dans 50 mL d'eau, la phase organique a été lavée par une solution de 5% de bicarbonate de sodium puis par une solution de NaCl . Les trois phases aqueuses ont été mélangées puis extraites à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été mélangées et séchées sur MgSO_4 puis le solvant a été évaporé sous pression réduite pour donner une huile blanchâtre (17g, Rdt. = 30 %).

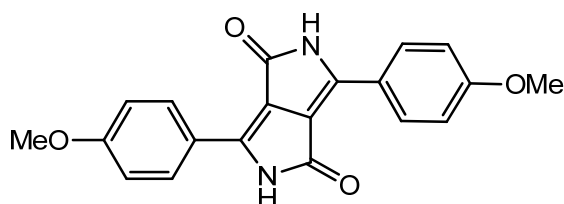
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 3,78 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,67-3,62 (m, 6H) ; 3,53 (m, 2H) ; 3,43 (t, J = 6,3 Hz, 2H) ; 3,36 (s, 3H).

1,4-Dicéto-3,6-bis-(4-bromophényl)-pyrrolo-[3,4-c]-pyrrole (6):

Dans un ballon bicol de 250 mL, sont introduit 24 mL d'alcool *tert*-amylique (0,219 mol), 1,1g de Na et 0,05 g de FeCl₃, Le mélange réactionnel est porté à 90 °C pendant 2 h jusqu'à que la totalité de sodium soit dissoute. Le mélange est ensuite refroidit à 50 °C, le 4-Bromobenzonitrile (24 mol ; 2,5 équ) a été ajouté. Le mélange réactionnel a été porté à 90 °C. Une solution de l'ester di-isopropylique de l'acide succinique (9,6 mol ; 1 équ) dans 10 mL d'alcool *tert*-amylique est ajouté très lentement pendant 1h. Le mélange est ensuite agité à 90°C. Après 24h 10 mL d'acide acétique ont été ajoutés et le mélange a été chauffé à 120 °C pendant 1h. Le précipité rouge formé a été isolé par filtration puis lavé plusieurs fois par de l'eau et du méthanol, pour donner une solide rouge (m = 3,50 g ; Rdt. = 80 %).

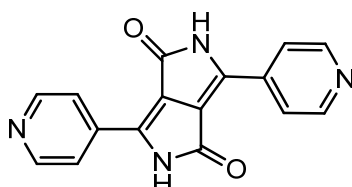
1,4-dicéto-3,6-bis-(4-iodophényl)-pyrrolo-[3,4-c]-pyrrole (7):

Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **6** en utilisant 25 mL d'alcool *tert*-amylique (0,22 mol, 22 équ), 1,4 g de sodium (0,06 mol , 4 équ), 0,05 g de FeCl₃, 7 g de 4-Iodobenzonitrile (0,03 mol ; 2,5 équ) et l'ester diisopropyle de l'acide succinique (2,4 g ; 0,01 mol ; 1 équ). Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre rouge m = 3,7 g (60 % de rendement).

1,4-dicéto-3,6-bis-(4-méthoxyphényl)-pyrrolo-[3,4-c]-pyrrole (8):

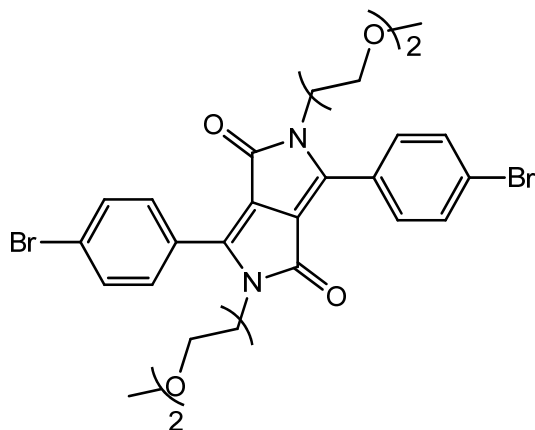
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **6** en utilisant 24 mL d'alcool tert-amylique (25 mL; 0,22 mol), 1,1 g de sodium, 0,05 g de FeCl₃, du 4-Methoxybenzonitrile (3,2 g ; 24 mol ; 2,5 éq) et l'ester diisopropyle de l'acide succinique (1,9 g ; 9,6 mol ; 1 éq). Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre rouge $m = 2,0$ g (60 % de rendement).

1,4-dicéto-3,6-bis-(4-pyridyl)-pyrrolo-[3,4-c]-pyrrole (9):



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **6** en utilisant 24 mL d'alcool tert-amylique (25 mL ; 0,22 mol), 1,1g de sodium, 0,05 g de FeCl₃, de la 4-cyanopyridine (2,5 g ; 24 mol ; 2,5 éq) et l'ester diisopropyle de l'acide succinique (1,9 g ; 9,6 mol ; 1 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre rouge $m = 3,5$ g (63 % de rendement).

3,6-bis(4-bromophenyl)-2,5-bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione (10) :



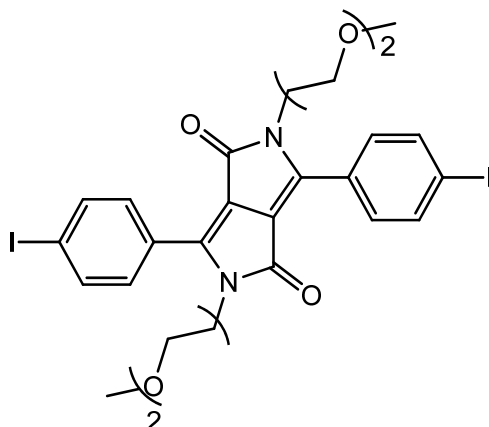
Dans un ballon tricol de 100 mL, on introduit 25 mL de NMP et 500 mg de **6** (1,12 mmol ; 1 éq.). Du *tert-butoxyde* de potassium (300 mg, 2,67 mmol ; 2,4 éq.), sont ajoutés puis le mélange réactionnel est chauffé à 60 °C puis 850 mg de 1-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy)éthane (4,65 mmol, 4,1 éq) sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été agité pendant 24h sous argon. Il est ensuite versé dans 50 mL de toluène puis lavé plusieurs fois à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit a été purifié par chromatographie sur colonne (silice, dichlorométhane/MeOH 98/2 en vol.) pour obtenir le produit **10** sous forme d'une poudre orange ($m = 250$ mg ; Rdt. = 35 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,89 (d, J = 8,5 Hz, 4H), 7,67 (d, J = 8,6Hz, 4H), 3,89 (t, J = 5,4Hz, 4H), 3,73(t, J = 5,5Hz, 4H), 3,52 (m, 4H), 3,43 (m, 4H), 3,31 (s, 6H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 162,45; 147,86; 131,77; 130,59; 126,43; 125,587; 109,43; 71,47; 70,18; 68,56; 58,72; 42,01.

SMHR: m/z 648,04696 (calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_6$ m/z 648,04706).

(11)



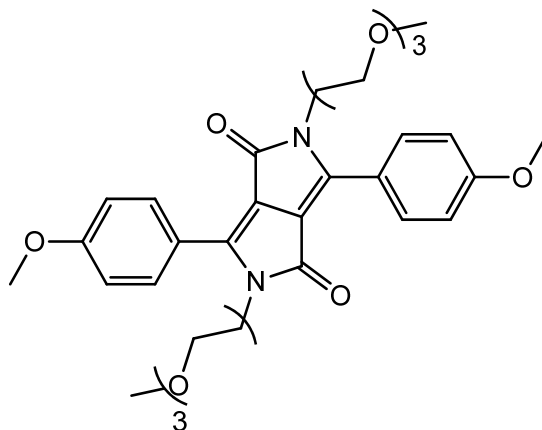
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **10** en utilisant **7** (600 mg, 1,1 mmol, 1 éq), du *tert*-butoxyde de potassium (300 mg, 2,7 mmol, 2,4 éq), NMP (25 mL) et du 1-bromo-2-(2-methoxyethoxy)ethane (850 mg, 4,6 mmol, 4,2 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre orange m = 160 mg (20 % de rendement).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,82 (d, J = 8,5Hz; 4H), 7,72 (d, J = 8,5 Hz, 4H), 3,86 (t, J = 5,4 Hz, 4H), 3,69 (t, J = 5,4Hz, 4H), 3,49 (m, 4H), 3,40 (m, 4H), 3,29 (s, 6H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 161,91; 147,47; 137,22 ; 129,97; 126,47; 108,95 ; 97,39 ; 70,95 ; 69,66 ; 68,04 ; 58,22; 41,47.

SMHR: m/z 744,02055 (calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{I}_2\text{N}_2\text{O}_6$ m/z 744,01932).

(12)



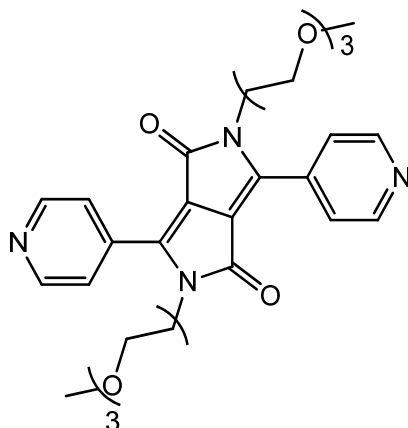
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **10** en utilisant **8** (1,4 g, 4 mmol, 1 éq), du *tert*-butoxyde de potassium (1,12 mg, 10 mmol, 2,5 éq), du NMP (50 mL) et du 1-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy-2-éthoxy)éthane (2,28 g, 10 mmol, 2,5 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre orange $m = 250$ mg (10 % de rendement).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 8,00 (d, $J = 9$ Hz, 4H); 7,01 (d, $J = 9$ Hz, 4H); 3,93 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H); 3,85 (s, 6 H); 3,75 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H); 3,57-3,55 (m, 12H); 3,48-3,46 (m, 4H); 3,32 (6H, s).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,18; 161,85; 148,28; 131,28; 120,54; 114,27; 108,69; 71,93; 70,64; 70,56; 70,53; 68,95; 58,99; 55,43; 42,21.

SMHR: m/z 663,28937(calculé pour $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_{10}$ m/z 663,28998)

(13)



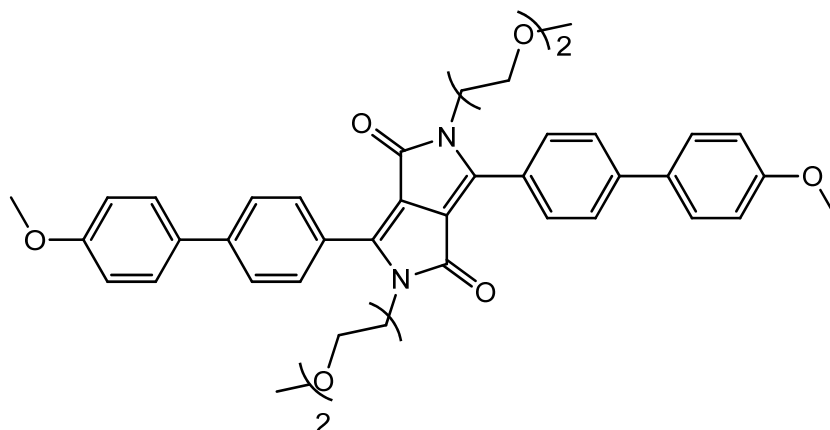
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **10** en utilisant **9** (1,4 g, 4 mmol, 1 éq), *tert*-butoxyde de potassium (240 mg, 2,15 mmol, 2,5 éq), du NMP (25 mL) et du 1-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy-2-éthoxy)éthane (490 mg, 2,15 mmol, 2,5 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre orange $m = 60$ mg (12 % de rendement).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 8,8 (4H, $J = 6,2$ Hz, d); 7,92 (4H, $J = 6,2$ Hz, d); 3,89 (4H, $J = 5,2$ Hz, t); 3,73 (4H, $J = 5,2$ Hz, t); 3,56-3,54 (m, 12H); 3,49-3,46 (m, 4H); 3,32 (6H, s).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 162,42; 150,67; 147,62; 135,32; 123,08; 111,18; 72,10; 70,18; 70,70; 68,98; 59,21; 42,77.

SMHR: m/z 583,27695 (calculé pour $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_8$ m/z 583,27678).

(16)



Sous argon, **10** (100 mg, 0,154 mmol, 1 éq.), de l'acide 4-méthoxyphénylboronique (70 mg, 0,462 mmol, 3 éq.), une solution de K_2CO_3 1M (3 mL, 2,8 mmol, 18 éq.) et 50 mL de toluène ont été introduit dans un ballon tricol de 100 mL. Le mélange réactionnel a été chauffé à

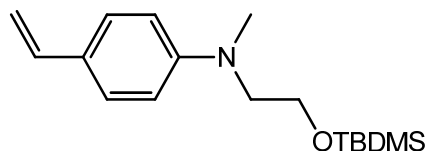
reflux, puis une solution de tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (10 mg, 0,008 mmol ; 0,05 éq.) dans 0,5 mL de toluène est introduite dans le milieu réactionnel. Le mélange a été porté à reflux pendant 24 h. La solution a ensuite été refroidie, puis le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été repris dans de l'éthanol, chauffé à 90°C puis filtré et lavé plusieurs fois à l'éthanol. Le produit **16** a été obtenu sous forme d'un solide orange foncé (m = 30 mg ; Rdt. = 28 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 8,06 (d, J = 8,4Hz, 4H); 7,69 (d, J = 8,4Hz, 4H); 7,58 (d, J = 8,5Hz, 4H); 6,99 (d, J = 8,5 Hz, 4H); 4,00 (t, J= 5,7 Hz, 4H); 3,85 (s, 6H); 3,78 (t, J= 5,7 Hz ; 4H); 3,55 (m, 4H); 3,45 (m, 4H); 3,31 (s, 6 H).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ ppm = 163,32 ; 159,99 ; 148,84 ; 143,68; 132,75; 130,05 ; 128,45; 127,06 ; 126,38 ; 114,64 ; 109,86 ; 72,05; 70,74 ; 69,17 ; 59,59 ; 55,59 ; 42,41.

SMHR: m/z 704,31222 (calculé pour C₄₂ H₄₄ N₂ O₈ m/z 704,30977).

N-(2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)-N-méthyl-4-vinylaniline (19):



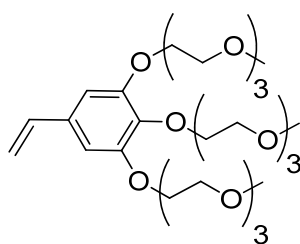
Dans un ballon de 250 mL sous argon, du BuLi (2,1 mL, 5,35 mmol, 1,6 éq), de bromure de méthyl(triphényl)phosphonium (2,2 g, 6,2 mmol, 1,8 éq) et 50 mL de tétrahydrofurane (THF) ont été introduit. La solution a viré au jaune. Une solution de 4-((2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)(méthyl)amino)benzaldéhyde (1,2 g, 3,4 mmol, 1 éq) dissout dans 10 mL de THF a été ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été agité pendant 24 heures. Ensuite, 250 mL d'hexane ont été ajoutés, et après 15 min un précipité jaune clair s'est formé. Ce précipité a été filtré et lavé à l'heptane. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. 20 mL de THF ont été ajouté sur le produit, puis la suspension a été filtrée sur Büchner et lavé à l'heptane. Les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le produit **19** a été obtenu sous forme d'une huile jaune clair (m = 900 mg, Rdt. = 91 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,28 (d, $J=8,9$ Hz, 2H) ; 6,65 (d, $J=8,9$ Hz, 2H) ; 6,62 (dd, $J=11,1$ Hz, 1H) ; 5,52 (d, $J=17,7$ Hz, 1H) ; 4,99 (d, $J=11,2$ Hz, 1H) ; 3,77 (t, $J=6,3$ Hz, 2H) ; 3,47 (t, $J=6,3$ Hz, 2H) ; 2,99 (s, 3H) ; 0,89 (s, 9H) ; 0,02 (s, 6H).

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 149,14 ; 136,85 ; 127,44 ; 111,91 ; 109,19 ; 60,72 ; 55,05 ; 39,39 ; 32,11 ; 26,12 ; 22,92 ; 14,32.

HRMS: m/z 291,20575 (calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NOSi}$ m/z 291,20184).

3,4,5-tris(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy)-éthoxy)-5-vinylbenzene (21):

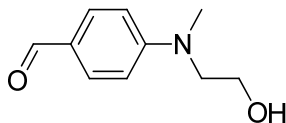


Dans un ballon de 250 mL sous argon, du *tert*-butoxide de potassium (246 mg; 2,19 mmol; 1,3 éq.), du bromure de méthyl(triphényl)phosphonium (781mg, 2,19 mmol, 1,3 éq.) et 50 mL de tétrahydrofurane (THF) ont été introduits. Le mélange a été agité pendant 30 min, puis une solution de 4-((2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)(méthyl)amino)benzaldéhyde (1 g, 1,68 mmol, 1 éq.) dissout dans 10 mL de THF a été introduite goutte à goutte. La solution a été laissée à t_a pendant 24 h. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut est ensuite repris dans du dichlorométhane, et lavé plusieurs fois à l'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO_4 puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane) pour donner le produit **21** sous forme d'un solide blanc ($m = 700$ mg ; Rdt. = 70 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): 6,64 (s, 2H); 6,55 (dd, 1H, $J=17,7$, 10,8) ; 5,59 (d, 1H, $J=17,7$) ; 5,15 (d, 1H, $J=10,7$) ; 4,16-4,1 (m, 6H) ; 3,82 (t, 2H, $J=4,9$ Hz) ; 3,76 (t, 2H, $J=5,2$ Hz); 3,72-3,68 (m, 6H); 3,65-3,60 (m, 12H); 3,52-3,50 (m, 6H) ; 3,45 (s, 9H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): 152,86 ; 136,78 ; 132,04 ; 132,01 ; 130,68 ; 128,93 ; 128,81 ; 113,41 ; 106,29 ; 72,54 ; 72,12 ; 71,00 ; 70,88 ; 70,75 ; 70,72 ; 69,96 ; 69,05 ; 59,22.

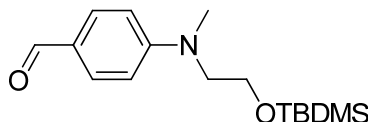
SMHR: m/z 592,33201 (calculé pour $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_{12}$ m/z 590,33023).

4-((2-(Hydroxy)éthyl)(méthyl)amino)benzaldéhyde (24):

Dans un ballon 250 mL, sous argon, du 4-fluorobenzaldéhyde (20 g, 0,16 mol, 1 éq.), de la N,N-méthyléthanolamine (41,4 g, 0,55 mol, 3,4 éq.), du carbonate de potassium (34 g, 0,25 mol, 1,6 éq.), 50 mL de DMSO et 3 gouttes d'aliquate 336 ont été introduits, puis le mélange réactionnel a été agité à 100 °C pendant 48 h puis ensuite versé dans de l'eau froide, extrait au dichlorométhane et lavé plusieurs fois à l'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO₄ puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle a été ensuite reprise dans 250 mL d'éther puis acidifiée par 800 mL d'une solution d'HCl 1M. La phase aqueuse a été isolé puis neutralisée par une solution saturée de K₂CO₃, et extraite avec du dichlorométhane (3× 200 mL). La phase organique a été séchée sur MgSO₄ puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit **24** a été obtenu sous forme d'un solide rouge (m = 24 g ; Rdt. = 83 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): 9,65 (s, 1H) ; 7,66 (d, J=8,6 Hz, 2H) ; 6,72(d, J= 8,6 Hz, 2H) ; 3,83 (t, J= 5,1 Hz, 2H) ; 3,59 (t, J=5,1 Hz, 2H) ; 3,08 (s, 3H) ; 2,2 (s, 1H).

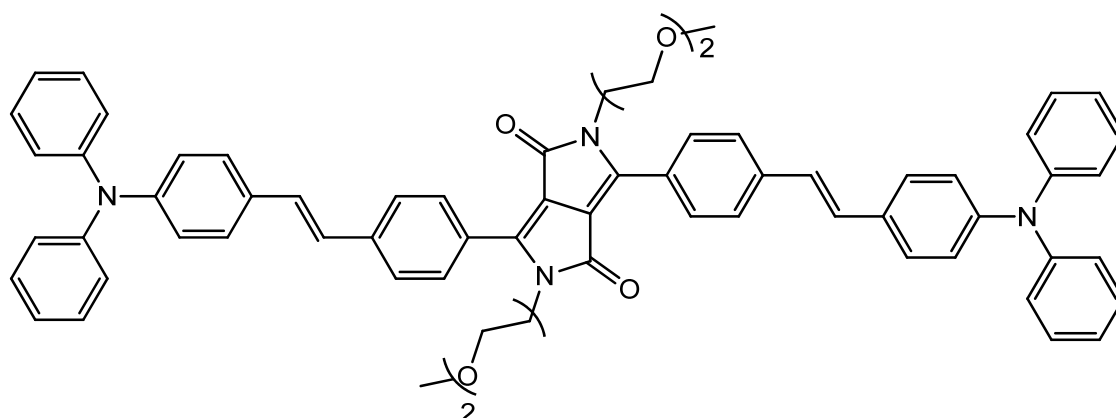
¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): 190,53 ; 154,12 ; 132,31 ; 125,56 ; 111,39 ; 60,23 ; 54,56 ; 39,35.

4-((2-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)(méthyl)amino)benzaldéhyde (25):

Dans un ballon tricol 500 mL sous argon à 0 °C, le produit **24** (10,8 g, 60,3 mmol, 1 éq.), l'Imidazole (13,14 g, 193 mmol, 3,2 éq.), du TBDMSCl (10 g, 66 mmol, 1,1 éq.) et 160 mL de THF anhydre ont été introduits. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 16 h. La solution a été ensuite filtrée sous vide et le solvant du filtrat obtenu a été évaporé sous pression réduite. Le produit **25** a été obtenu sous forme d'une huile orange (m = 14,4 g ; Rdt. = 81 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): 9,72 (s, 1H) ; 7,71 (d, J=8,8 Hz, 2H) ; 6,71 (d, J= 8,8 Hz, 2H) ; 3,80 (t, J= 5,4 Hz, 2H) ; 3,57 (t, J=5,4 Hz, 2H) ; 3,09 (s, 3H) ; 0,86 (s, 9H) ; 0,00 (s, 6H).

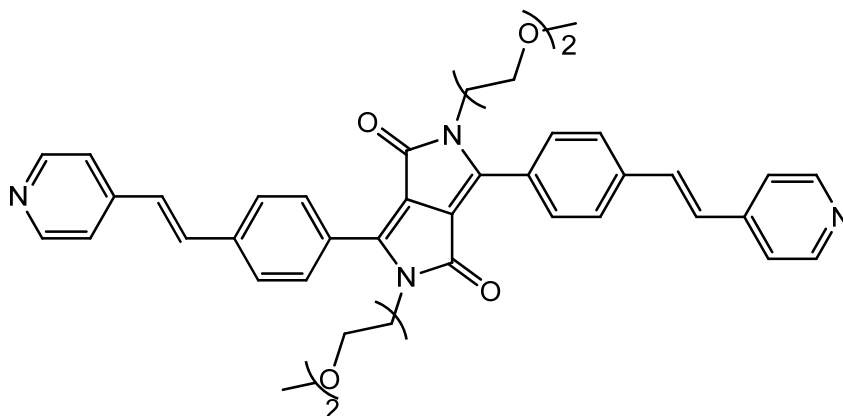
3,6-bis(4-((E)-4-(diphénylamino)styril)phényl)-2,5-bis(2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione (26) :



Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon, **10** (200 mg, 0,308 mmol ; éq.), de l'acétate de palladium Pd(OAc)₂ (34 mg, 0,153 mmol, 0,5 éq.), du tri-*o*-tolylphosphine (66 mg, 0,184 mmol, 0,6 éq.), du DMF anhydre (20 mL) et de la triéthylamine fraîchement distillée (30 mL), ont été introduits. Le mélange réactionnel a été chauffé pendant une heure à 50 °C pour activer l'halogénure. Une solution de N,N-diphénylvinylaniline (210 mg, 0,77 mmol, 2,5 éq) dans 10 mL de triéthylamine a été introduite dans le milieu réactionnel qui est ensuite porté à 130 °C pendant 48h. La solution a été refroidie, puis le mélange réactionnel filtré sur célite. Le solvant a été évaporé sous pression réduite puis le produit brut a été repris dans du dichlorométhane et lavé à l'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO₄ puis le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/ MeOH de 100/0 à 90/10 en volume). Le produit **26** a été obtenu sous forme d'un solide rouge (m = 62 mg ; Rdt. = 20 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 8,00 (d, J=8,4 Hz, 4H) ; 7,60 (d, J=8,4 Hz, 4H) ; 7,40 (d, J=8,8 Hz, 4H) ; 7,27-7,24 (m, 8H) ; 7,15 (d, J=16,3 Hz, 2H) ; 7,11 (d, J=8,5 Hz, 8H) ; 7,04 (d, J=8,5 Hz, 8H) ; 7,01 (d, J=16,3 Hz, 2H) ; 3,99 (t, J=5,7 Hz, 4H) ; 3,77 (t, J=5,8 Hz, 4H) ; 3,55 (t, J=4,6 Hz, 4H) ; 3,45 (t, J=4,6 Hz, 4H) ; 3,32 (s, 6H).

2,5-bis(2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl)-3,6-bis(4-((E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl)phényl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione (27) :

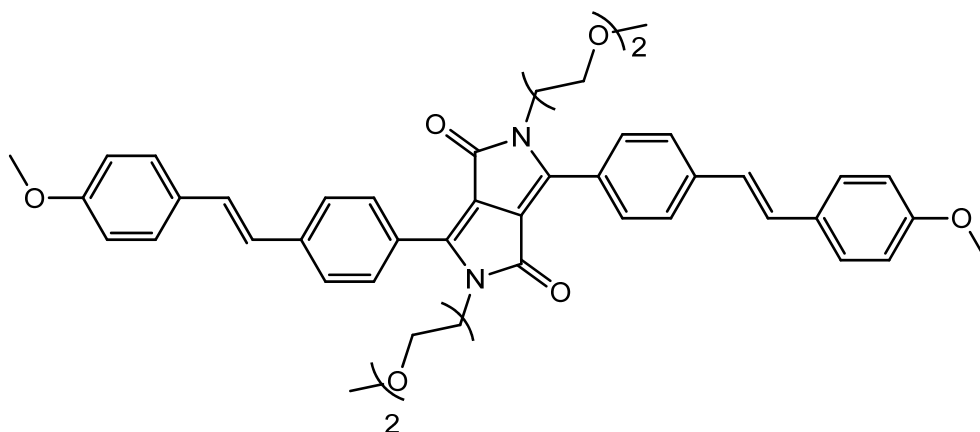


¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 8,60 (d, J = 5Hz, 4H); 8,04 (d, J = 8Hz, 4H); 7,64 (d, J = 8Hz, 4H); 7,40 (d, J = 5Hz, 4H); 7,30 (d, J = 16 Hz, 2H); 7,10 (d, J = 16 Hz, 2H); 3,9 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,70 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,50 (m, 4H); 3,72(m,14H); 3,40(m, 4H); 3,4 (m, 4H); 3,33 (m, 6 H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,11 ; 150,06 ; 148,54 ; 144,61 ; 138,95 ; 132,55 ; 130,05 ; 128,19 ; 128,07 ; 127,44 ; 121,22 ; 110,22 ; 71,97 ; 70,65 ; 69,07 ; 59,18 ; 42,48.

SMHR: m/z 698.30977 (calculé pour $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$ m/z 698,31044).

(28)



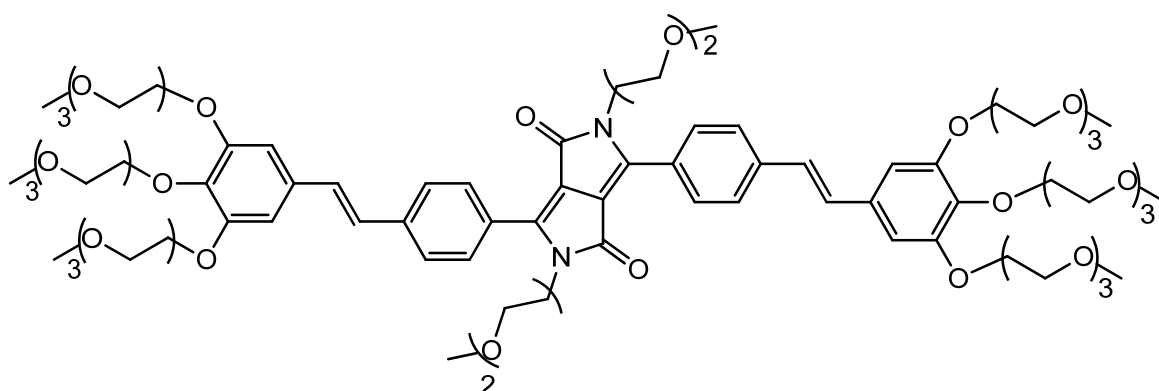
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **26** en utilisant **10** (100 mg, 0,154 mmol ; 1 éq.), de l'acétate de palladium II (3,5 mg, 0,0154 mmol, 0,10 éq.), tri-*o*-tolylphosphine (14,1 mg, 0,0452 mmol, 0,30 éq.), du DMF anhydre (8 mL), de la triéthylamine fraîchement distillée (15 mL) et du 4-vinyanisole (62 mg, 0,462 mmol, 3 éq.). Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/ MeOH 99/1). Le produit **28** a été obtenu sous forme d'une solide rouge ($m = 82$ mg ; Rdt. = 70 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 8,00 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 4H); 7,60 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 4H); 7,48 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 4H); 7,17(d, $J = 16\text{ Hz}$, 2H); 7,13 (d, $J = 16\text{ Hz}$, 2H); 6,91 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 4H); 4,00 (t, $J = 5,7\text{ Hz}$, 4H); 3,82 (s, 6H); 3,76 (t, $J = 5,7\text{ Hz}$; 4H); 3,55 (m, 4H); 3,45 (m, 4H); 3,32 (s, 6 H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,11; 159,78 ; 148,451 ; 140,62 ; 132,55 ; 130,45 ; 129,75; 128,12 ; 126,51 ; 126,45 ; 125,66 ; 114,26 ; 109,73 ; 71,85 ; 70,517 ; 68,98 ; 59,07 ; 55,37; 44,23.

SMHR: m/z 756,34155 (calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8$ m/z 756,34107).

(29)



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **26** en utilisant **10** (85 mg, 0,131 mmol ; 1 éq.), de l'acétate de palladium II (3 mg, 0,013 mmol ; 0,10 éq.), de la tri-*o*-tolylphosphine (12mg, 0,039mmol ; 0,30 éq.), du DMF anhydre (8 mL), de la triéthylamine fraîchement distillée (12 mL) et du 3,4,5-tris(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)-5-vinylbenzène (0,195 g, 0,327 mmol, 2,5 éq.). Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/ MeOH 95/5 jusqu'à 85/15 en volumes. Le produit **29** a été obtenu sous forme d'une solide rouge (m = 90 mg ; Rdt. = 41 %).

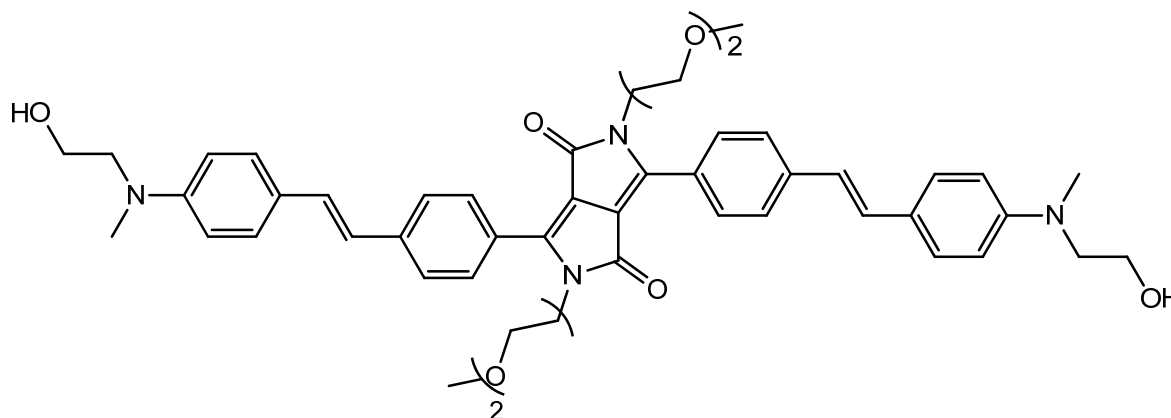
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 8,01 (d, J = 8,5Hz, 4H); 7,6 (d, J = 8,5Hz, 4H); 7,07 (d, J = 16,2Hz, 2H); 6,98 (d, J = 16,2Hz, 2H); 6,77(s, 4H); 4,21 (t, J = 5Hz, 8H); 4,16 (t, J = 5,1Hz, 4H); 3,98 (t, J = 5,1Hz, 4H); 3,87 (t, J = 5Hz, 8H); 3,8-3,76 (m, 8H); 3,75-3,70

(m,14H); 3,67-3,61 (m, 24H); 3,56-3,51 (m, 16H); 3,46-3,44 (m, 4H); 3,35 (s, 18 H) ; 3,2 (s, 6H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm =162,97; 152,72; 148,32; 140,01; 138,86; 132,30; 130,51; 129,66; 127,03; 126,70; 126,51; 109,68; 106,58; 72,32; 71,83; 71,71; 70,72; 70,59; 70,45; 69,66; 68,85; 58,96; 58,91; 42,69.

SMHR: m/z 1668,85518 (calculé pour $\text{C}_{86}\text{H}_{128}\text{N}_2\text{O}_{30}$ m/z 1668,85519).

3,6-bis(4-((E)-4-((2-hydroxyéthyl)(méthyl)amino)styril)phényl)-2,5-bis(2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione (31) :



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **26** en utilisant **10** (800 mg, 1,24 mmol ; 1 éq.), de l'acétate de palladium II (28 mg, 0,124 mmol, 0,1 éq.), de la tri-*o*-tolylphosphine (113 mg, 0,372 mmol, 0,3 éq.), du DMF anhydre (30 mL), de la triéthylamine fraîchement distillée (45 mL) et **19** (900 mg, 3,1 mmol, 2,5 éq.). La déprotection de la fonction phénol a été effectuée dans un ballon tricol de 250 mL sous argon. Le produit brut et 40 mL de THF ont été ajouté, ensuite une solution de TBAF (1 g, 3,8 mmol, 3 éq.) a été ajouté goutte à goutte et le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h. Ensuite 150 mL d'eau ont été ajoutés, le produit a été extrait par d'acétate d'éthyle puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice

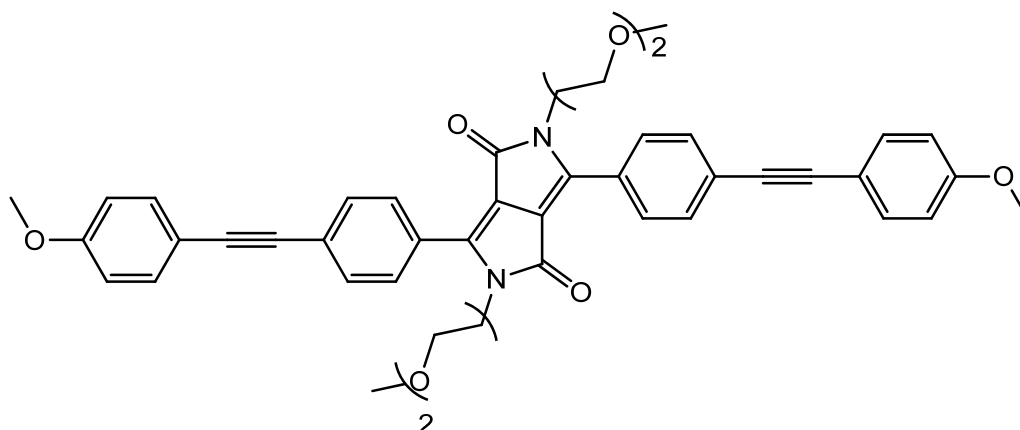
(dichlorométhane/ MeOH de 100/0 à 80/20 en volume) pour conduire au produit **31** sous forme d'un solide violet ($m = 800$ mg ; Rdt. = 77 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,98 (d, $J=8,2$ Hz, 4H) ; 7,57 (d, $J=8,2$ Hz, 4H) ; 7,43 (d, $J=8,3$ Hz) ; 7,13 (d, $J=16,4$ Hz, 2H) ; 6,94 (d, $J=16,2$ Hz, 2H) ; 6,83 (d, $J=7,1$ Hz, 4H) ; 3,98 (t, $J=5,2$ Hz, 4H) ; 3,83 (t, $J=5,1$ Hz) ; 3,76 (t, $J=5,7$ Hz, 4H) ; 3,53 (m, 8H) ; 3,45 (t, $J=4,5$ Hz, 4H) ; 3,32 (s, 6H) ; 3,03 (s, 6H).

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 130,77; 129,71; 126,13; 126,22; 126,09; 71,86; 70,52, 70,31; 68,99; 63,37; 60,13; 59,06; 53,41; 42,23; 31,93; 29,69, 29,60; 29,46; 29,36; 29,25; 29,14; 24,94.

HRMS: m/z 842,42391 (calculé pour $\text{C}_{50}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8$ m/z 842,42546).

(33)



Dans un ballon tricol de 100 mL et sous argon, **10** (140 mg, 0,22 mmol, 1 éq.), du chlorure de palladium II (2,4 mg, 0,013 mmol ; 0,06 éq.), de l'iodure de cuivre (2,5 mg, 0,013 mmol ; 0,06 éq.), de la triphénylphosphine (7 mg, 0,026 mmol ; 0,12 éq.), du THF anhydre (20 mL) et de la triéthylamine fraîchement distillée (10 mL) ont été introduit. Le mélange réactionnel a été chauffé pendant une heure à 50 °C. Une solution de 4-éthynylanisole (71 mg, 0,54 mmol ; 2,5 éq.) dans 10 mL de THF a été introduite dans le milieu réactionnel puis le mélange a été agité à 50°C pendant 30 min puis à 75 °C pendant 48h. La solution a été refroidie, puis filtrée sur célite avant évaporation des solvants sous pression réduite. Le produit brut a été repris dans du dichlorométhane et lavé à l'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO_4 puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie

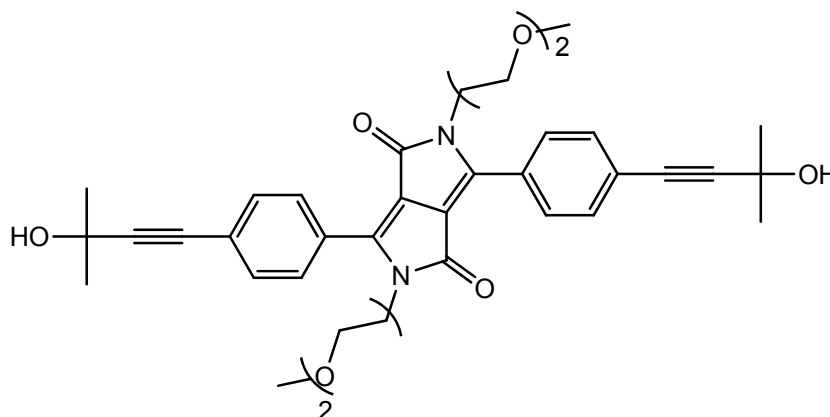
sur plaque préparative de silice (dichlorométhane/ MeOH 98/2 en volumes). Le produit **33** a été obtenu sous forme d'une solide rouge (m = 50 mg ; Rdt. = 30 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 7,98 (d, J = 8,3Hz, 4H); 7,59 (d, J = 8,3Hz, 4H); 7,46 (d, J = 8,3Hz, 4H); 6,86 (d, J = 8,3 Hz, 4H); 3,94 (t, J = 5,6 Hz, 4H); 3,79 (s, 6H); 3,73 (t, J = 5,5 Hz ; 4H); 3,51 (m, 4H); 3,42 (m, 4H); 3,31 (s, 6 H).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ ppm = 163,03 ; 160,12 ; 148,51 ; 133,41 ; 131,75 ; 129,45 ; 127,24 ; 126,77; 115,08 ; 114,23 ; 110,14 ; 92,58 ; 88,10 ; 71,96 ; 70,62 ; 76,91 ; 59,18 ; 55,46 ; 42,39.

SMHR: m/z 752,30975 (calculé pour C₄₆ H₄₄ N₂ O₈ m/z 752,30977).

(35')



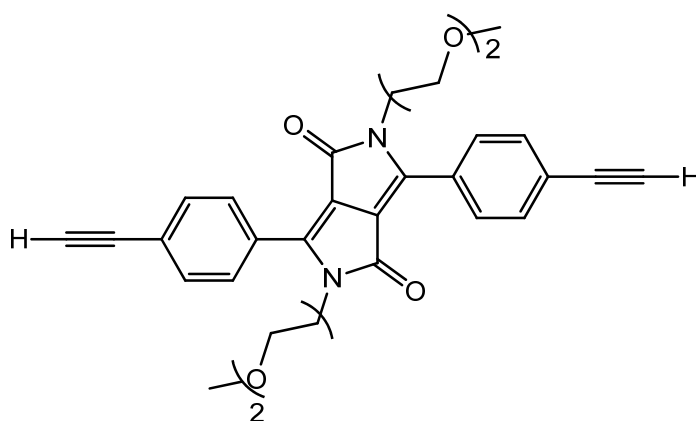
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **33** en utilisant **10** (600 mg, 0,923 mmol, 1 éq), du chlorure de palladium II (9,8 mg, 0,055 mmol ; 0,06 éq.), de l'iodure de cuivre 10,5 mg, 0,055 mmol ; 0,06 éq.), de la triphénylphosphine (29 mg, 0,11 mmol ; 0,12 éq.), du THF anhydre (25 mL), de la triéthylamine fraîchement distillée (12 mL) et du 2-méthyl-3-butyn-2-ol (186 mg, 2,215 mmol ; 2,4 éq.). Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/ MeOH 99/1 en volumes) pour donner le produit **35'** sous forme d'un solide orange (m = 460 mg ; Rdt. = 78 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,93 (d, J = 8,5Hz, 4H); 7,5 (d, J = 8,5Hz, 4H); 3,9 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,71 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,50 (m, 4H); 3,42 (m, 4 H) ; 3,30 (s, 6H) ; 1,69 (s, 12h).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,07; 148,62; 132,11; 129,46; 127,76; 125,95; 110,26; 96,74; 81,99; 72,04; 70,70; 69,13; 59,25; 42,46; 31,64; 29,88.

SMHR: m/z 656,30972 (calculé pour $\text{C}_{38} \text{H}_{44} \text{N}_2 \text{O}_8$ m/z 656.30977).

(35)



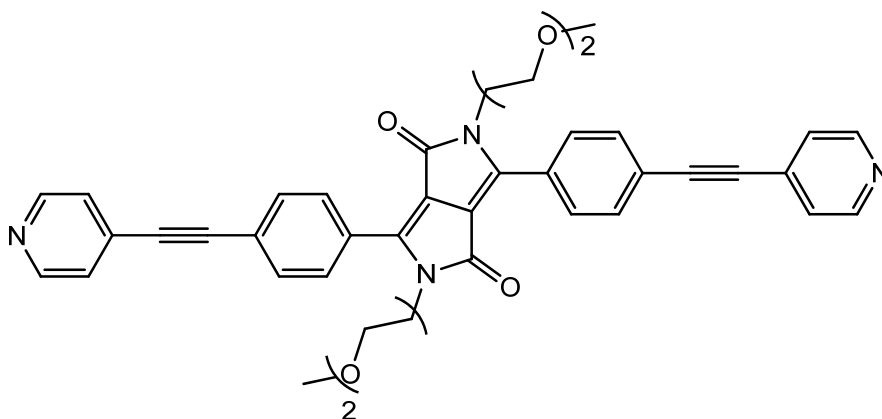
Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon, **35'** (100 mg, 0,152 mmol, 1éq), NaOH (20 mg, 0,5 mmol, 3,3 éq) et 10 mL de toluène ont été introduits. Après 2 h de reflux, la solution a été refroidie, puis le mélange réactionnel filtré sur silice. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit **35** a été obtenu sous forme d'un solide orange (m = 80 mg ; Rdt. = 95 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,97 (d, J = 8,5Hz, 4H); 7,6(d, J = 8,5Hz, 4H); 3,91 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,72 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,51 (m, 4H); 3,425 (m, 4 H); 3,309 (s, 6H) ; 3,206 (s, 2h).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,03 ; 132,62 ; 129,51 ; 128,30 ; 125,21 ; 83,30; 79,96 ; 72,02 ; 70,71 ; 69,11 ; 59,24 ; 42,51 ; 29,86 ; 14,40.

SMHR: m/z 540,22673 (calculé pour $\text{C}_{32} \text{H}_{32} \text{N}_2 \text{O}_6$ m/z 540,22604).

(36)



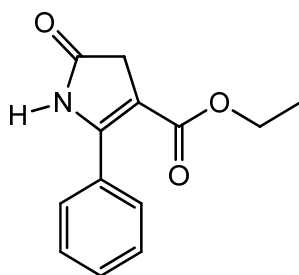
Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon, de l'iodopyridine (76 mg, 0,37 mmol, 2,5 éq), du chlorure de palladium II (1,6 mg, 0,009 mmol ; 0,06 éq.), de l'iodure de cuivre (1,7 mg, 0,009mmol ; 0,06 éq.), de la triphénylphosphine (6 mg, 0,018 mmol ; 0,12éq.), du THF anhydre (15 mL) et de la triéthylamine fraîchement distillée (8 mL) ont été introduit. Le mélange réactionnel a été chauffé pendant une heure à 50 °C. Une solution de **35** (80 mg, 0,148 mmol ; 1 éq.) dans 10 mL de THF a été introduite puis le mélange a été agité à 50°C pendant 30 min puis à 75 °C pendant 4 8h. La solution a été refroidie, puis le mélange réactionnel filtré sur célite. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été repris dans du dichlorométhane et lavé à l'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO₄ puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur plaque préparative de silice (dichlorométhane/ MeOH 95/5 en volumes) pour conduire au produit **36** sous forme d'un solide rouge (m = 40 mg ; Rdt. = 40 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 8,60 (s large, 4H); 8,07 (d, J = 8,5Hz, 4H); 7,67 (d, J = 8,5Hz, 4H); 7,45 (s large, 4H); 3,95 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,76 (t, J = 5,5Hz, 4H); 3,54 (m, 4H); 3,44 (m, 4 H) ; 3,27 (s, 6H).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ ppm = 162,84 ; 150,06 ; 149,01 ; 148,371 ; 132,21 ; 131,87 ; 129,53 ; 128,55; 125,95 ; 124,74 ; 110,35 ; 94,12 ; 88,91 ; 71,83 ; 70,59 ; 70,53 ; 68,93 ; 59,06 ; 42,45.

SMHR: m/z 694,27995 (calculé pour C₄₂ H₃₈ N₄ O₆ m/z 694.27913).

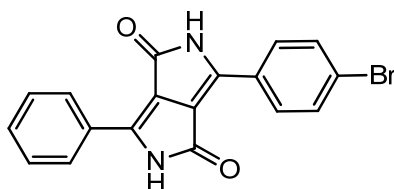
(37)



Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon, du benzoylacétate d'éthyle (8,8 g, 46 mmol ; 1 éq.), du méthylchloroacétate (4,97 g, 46 mmol, 1éq.), du carbonate de sodium (6,6 g, 62 mmol, 1,35 éq.), 10 mL d'acétone et 11 mL de diméthoxyétane, ont été introduit. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux pendant 24 h. Après 12h 0,75 g de méthylchloroacétate ont été ajoutés. La solution a été refroidie, puis filtrée pour éliminer le précipité. Le filtrat a été distillé sous argon à 150 °C pour donner un liquide marron clair auquel 37 mL d'acide acétique et 22 g d'acétate d'ammonium ont été ajouté. Ce mélange a été chauffé à 120 °C pendant 4h puis filtré à chaud pour éliminer les sels ayant précipité. La solution a été refroidie et un précipité blanc s'est formé. Après filtration le produit **37** a été isolé sous forme d'une poudre beige (m = 3,5 g ; Rdt. = 33 %).

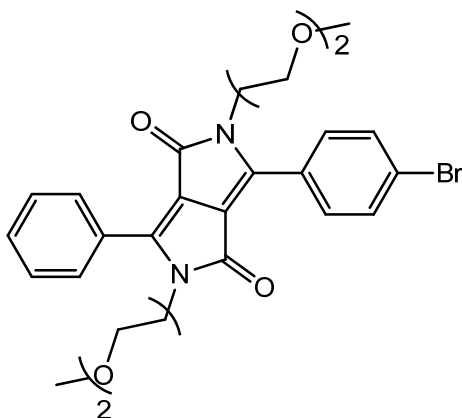
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 7,58-7,56 (m, 2H); 7,44-7,42 (m, 3H); 4,11 (q, J = 7,1 Hz, 2H); 3,49 (s, 2H) ; 1,17 (t, J = 7,1 Hz ; 3H).

(38)



Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon du sodium métallique (0,64 g), de l'alcool *tert*-amylique (40 mL), une quantité catalytique de FeCl₃, ont été introduits. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux pendant 2 h puis du bromobenzonitrile (2,36 g, 13 mmol, 1 éq) et de l'ester de pyrrolinone (3 g, 13 mmol ; 1 éq.) dissout dans 30 mL de l'alcool *tert*-amylique, ont été ajoutés goutte à goutte. Le mélange a été laissé à reflux pendant 2 h, puis refroidit à 60 °C. 10 mL d'acide acétique ont alors été ajoutés puis la solution a été chauffée à 100°C pendant 20 min. Le mélange réactionnel a été refroidi puis filtré et lavé plusieurs fois à l'eau chaude et à l'éthanol. Après séchage sous vide le produit **38** a été obtenu sous forme d'une poudre rouge (m = 3,3 g ; Rdt. = 70 %).

(39)



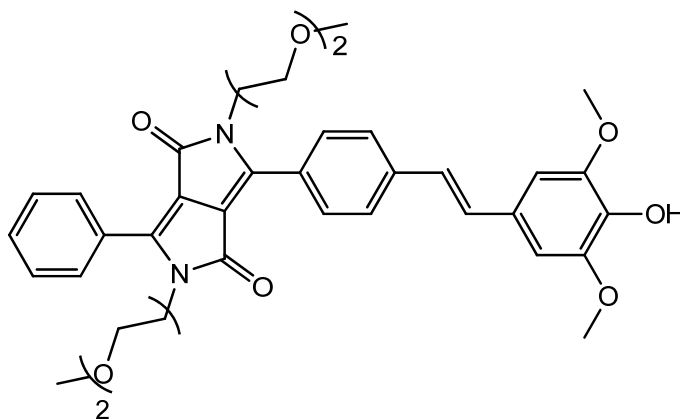
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **10** en utilisant **38** (10 g, 27 mmol, 1 éq), du *tert*-butoxyde de potassium (10 g, 89 mmol, 3,3 éq), de la NMP (150 mL) et du 1-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy)éthane (15 g, 81 mmol, 3 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre orange $m = 5,5$ g (36 % de rendement).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,95-7,93 (m, 2H); 7,9 (d, $J = 8,5\text{Hz}$; 2H) ; 7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) ; 7,50-7,48 (m, 3H) ; 3,74-3,96 (m, 4H) ; 3,53-3,49 (m, 4H) ; 3,44-3,41(m, 4H) ; 3,31 (s, 6H) ; 3,30 (s, 6H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,143 ; 148,00 ; 132,30 ; 131,50 ; 131,15 ; 129,51 ; 129,04 ; 128,14 ; 127,10 ; 125,97 ; 110,07 ; 72,03 ; 70,73 ; 70,67 ; 69,15 ; 69,05 ; 59,25 ; 53,63 ; 42,51 ; 42,217

SMHR: m/z 570,13724 (calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{BrN}_2\text{O}_6$ m/z 570,13655).

(40)



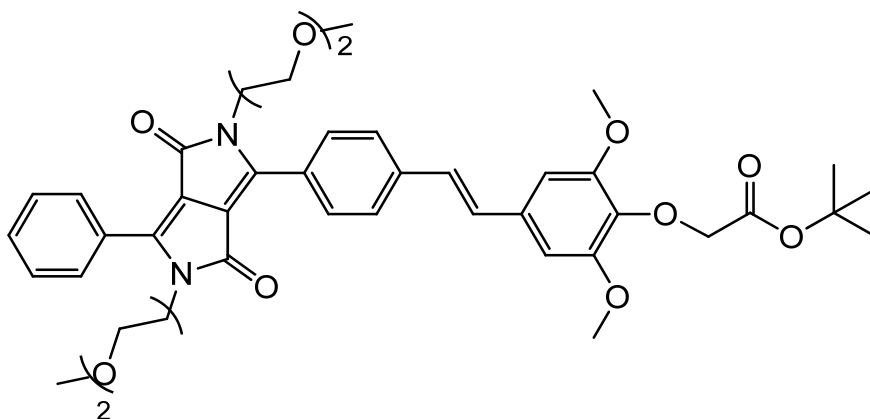
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **26** en utilisant **39** (500 mg, 0,877 mmol ; 1 éq.), de l'acétate de palladium II (100 mg, 0,446 mmol ; 0,50 éq.), de la tri-*o*-tolylphosphine (160 mg, 0,526 mmol ; 0,60 éq.), du DMF anhydre (40 mL), de la diéthylamine fraîchement distillée (50 mL) et du 4-(tert-butyldiméthylsilanyloxy)-3,5-diméthoxystyrène (335 mg, 1,136 mmol, 1,3 éq.). Le produit brut a été filtré sur célite puis dissout dans 50 mL de THF. Une solution de TBAF (460 mg, 1,7 mmol, 2 éq) dissout dans 5 mL de THF a été introduit lentement dans cette solution, puis le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 1h. Ensuite il a été versé dans une solution froide d'acide phosphorique puis extrait à l'acétate d'éthyle et lavé plusieurs fois à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/ MeOH 99/1 en volumes) pour conduire au produit **40** sous forme d'une solide orange (m = 450 mg ; Rdt. = 76 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 7,99 (d, J = 8,3Hz, 2H); 7,94-7,92 (m, 2H); 7,58 (d, J = 8,3Hz, 2H); 7,49-7,47 (m, 3H); 7,1 (d, J = 16 Hz, 1H); 6,96 (d, J = 16 Hz, 1H); 6,75 (s, 2H); 3,96-3,92 (m, 10H); 3,75-3,69 (m, 4H); 3,54-3,49 (m, 4H); 3,45-3,40 (m, 4H); 3,31 (s, 3H); 3,29 (s, 3 H).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ ppm = 163,28 ; 163,12 ; 162,70 ; 149,01 ; 148,84 ; 147,47 ; 140,60 ; 135,60 ; 131,27 ; 129,95 ; 129,47 ; 128,96 ; 128,66 ; 128,24 ; 128,223 ; 126,73 ; 126,64 ; 125,99 ; 109,94 ; 109,78 ; 103,92 ; 72,01 ; 70,67 ; 70,63 ; 69,12 ; 69,07 ; 59,23 ; 56,57 ; 42,38 ; 42,17.

SMHR: m/z 670,28918 (calculé pour C₃₈ H₄₂ N₂ O₉ m/z 670,28903).

(41)



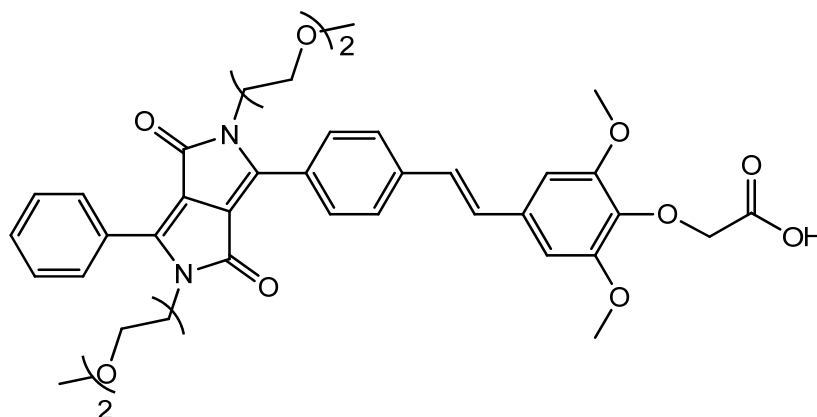
Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon, **40** (300 mg, 0,45 mmol ; 1 éq.), du *tert*-butylbromoacétate (180 mg, 0,9 mmol, 2éq.), du carbonate de potassium (310 mg, 2,25 mmol, 5 éq.), 30 mL de DMF, ont été introduits. Le mélange réactionnel a été chauffé à 90 °C pendant quelques minutes puis le *tert*-butyle bromoacétate (180 mg ; 0,9 mmol ; 2 éq.) a été ajouté. Puis la solution a été laissée à 90 °C pendant 48 h. Ensuite le mélange réactionnel a été refroidi, puis le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/ MeOH 98/2 en volumes) pour conduire au produit **41** sous forme d'un solide orange (m = 100 mg ; Rdt. = 28 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ ppm = 7,98 (d, J = 8,4Hz, 2H); 7,93-7,90 (m, 2H); 7,58 (d, J = 8,4Hz, 2H); 7,47-7,45 (m, 3H); 7,1 (d, J= 16 Hz, 1H); 6,99 (d, J = 16 Hz, 1H); 6,718 (s, 2H); 4,53 (s, 2H) ; 3,95-3,91 (m, 4H); 3,87 (s, 6H) ; 3,73-3,68 (m, 4H); 3,52-3,47 (m, 4H); 3,43-3,39 (m, 4H); 3,29 (s, 3H); 3,28 (s, 3 H), 1,44 (s, 9H).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ ppm =168,49 ; 163,09 ; 162,95 ; 162,56 ; 152,79 ; 148,78 ; 140,17 ; 137,00 132,45 ; 131,151 ; 130,81 ; 129,80 ; 129,31 ; 128,81 ; 128,48; 128,05 ; 127,14 ; 127,04 ; 126,85 ; 126,65 ; 109,77 ; 109,68 ; 104,21 ; 81,52 ; 71,85 ; 70,49 ; 70,46 ; 70,11 ; 68,95 ; 68,90 ; 59,04 ; 56,33 ; 42,21 ; 41,99 ; 28,16.

SMHR: m/z 784,35781 (calculé pour C₄₄H₅₂N₂O₁₁ m/z 784,35711).

(42)



Dans un ballon tricol de 100 mL sous argon, **41** (95 mg, 0,12 mmol ; 1 éq.) et 10 mL de dichlorométhane ont été introduits. Le mélange réactionnel a été refroidi à 0 °C. 3 mL d'acide trifluoroacétique ont été ajoutés puis après 30 min la solution a été laissée à température ambiante pendant 16 h. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été

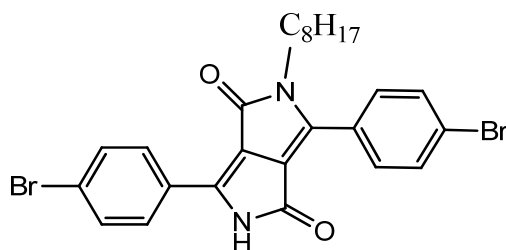
purifié par chromatographie sur plaque de silice (dichlorométhane/ MeOH 90/10 en volumes) pour conduire au produit **42** sous forme d'un solide orange ($m = 85$ mg ; Rdt. = 97 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,97-7,89 (m, 4H); 7,58-7,566 (m, 2H); 7,48-7,46 (m, 3H); 7,09 (d, $J = 16$ Hz, 1H); 7,00 (d, $J = 16$ Hz, 1H); 6,73 (s, 2H); 4,60 (s, 2H); 3,95-3,89 (m, 10H); 3,71-3,66 (m, 4H); 3,53-3,48 (m, 4H); 3,44-3,41 (m, 4H); 3,3 (s, 6H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 171,22 ; 163,16 ; 163,10 ; 152,34 ; 149,11 ; 149,11 ; 139,82 ; 136,43 ; 134,15 ; 131,31 ; 130,26 ; 129,98 ; 129,75 ; 129,45 ; 128,95 ; 128,35 ; 128,15 ; 127,33 ; 126,90 ; 109,77 ; 109,88 ; 103,83 ; 72,01 ; 71,60 ; 70,74 ; 70,60 ; 69,05 ; 59,21 ; 56,46 ; 42,22 ; 42,06.

SMHR: m/z 728,29642 (calculé pour $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{11}$ m/z 728,29451).

(43)

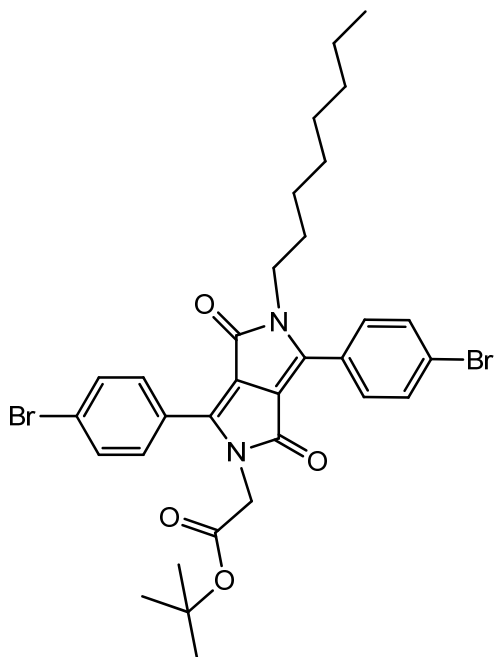


Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **10** en utilisant **6** (1,6 g, 3,6 mmol, 1 éq), du *tert*-butoxyde de potassium (0,4 g, 3,6 mmol, 1 éq), de la NMP (80 mL) et du 1-bromooctane (0,7 g, 3,6 mmol, 1 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre orange $m = 300$ mg (15 % de rendement).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 9,97 (s, 1H) ; 8,14 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) ; 7,66 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) ; 7,63 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) ; 7,55 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) ; 3,76 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H) ; 1,26-1,201 (m, 12H) ; 0,84 (t, $J = 7,00$ Hz, 3H).

SMHR: m/z 556,03644 (calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$ m/z 556,03610).

(44)

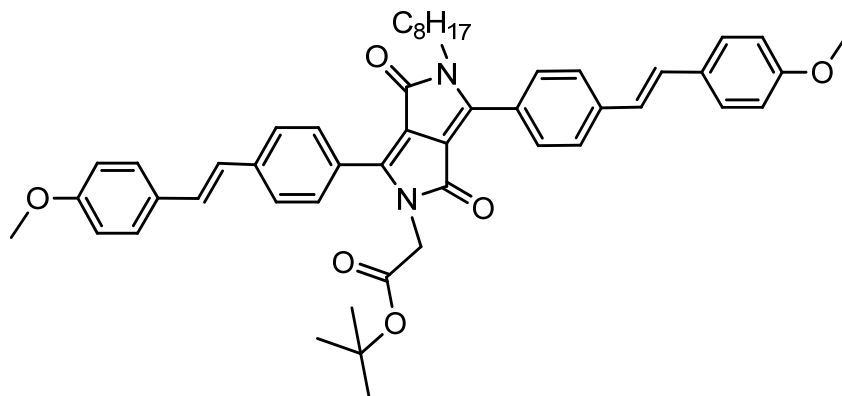


Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **10** en utilisant **43** (300 mg, 0,54 mmol, 1 éq), du *tert*-butoxyde de potassium (110 mg, 0,98 mmol, 1 éq), de la NMP (30 mL) et du *tert*-butylbromoacétate (160 mg, 0,82 mmol, 1 éq). Le produit désiré a été obtenu sous forme d'une poudre orange $m = 170$ mg (47 % de rendement).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,57-7,52 (m, 8H) ; 4,33 (s, 2H) ; 3,67 (t, $J=7,6$ Hz, 2H) ; 1,47-1,43 (m, 2H) ; 1,3 (s, 9H) ; 1,23-1,14 (m, 10H) ; 0,81 (t, $J=7,00$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 167,48 ; 162,54 ; 161,92 ; 148,22 ; 146,83 ; 132,26 ; 130,29 ; 130,17 ; 126,89 ; 126,78 ; 126,09 ; 126,02 ; 110,58 ; 109,20 ; 82,90 ; 43,89 ; 41,87 ; 31,84 ; 29,39 ; 29,20 ; 29,09 ; 28,15 ; 27,96 ; 26,78 ; 22,74 ; 14,22.

(45)



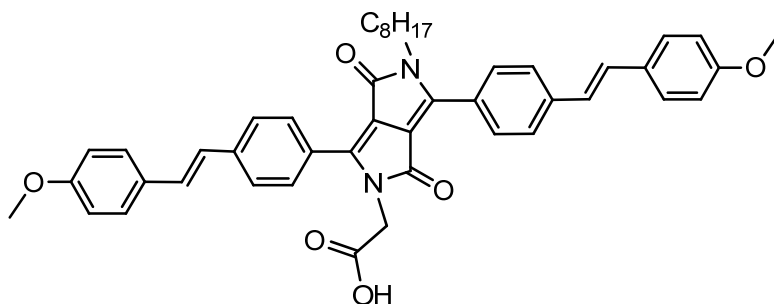
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **26** en utilisant **44** (170 mg, 0,253 mmol ; 1 éq.), de l'acétate de palladium II (5,7 mg, 0,0254 mmol ; 0,10 éq.), de la tri-*o*-tolylphosphine (23,1 mg, 0,076 mmol ; 0,30 éq.), du DMF anhydre (8 mL), de la triéthylamine fraîchement distillée (15 mL) et du 4-vinylnisole (85 mg, 0,634 mmol, 2,5 éq.). Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane). Le produit **45** a été obtenu sous forme d'un solide rouge ($m = 170$ mg ; Rdt. = 86 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,79 (d, $J=8,2\text{Hz}$, 2H) ; 7,76 (d, $J=8,2\text{Hz}$, 2H) ; 7,57-7,53 (m, 4H) ; 7,45-7,42 (m, 4H) ; 7,15 (d, $J=16\text{ Hz}$, 1H) ; 7,14 (d, $J=16\text{ Hz}$, 1H) ; 6,97 (d, $J=16\text{ Hz}$, 1H) ; 6,96 (d, $J=16\text{ Hz}$, 1H) ; 6,88 (d, $J=8\text{ Hz}$, 4H) ; 4,45 (s, 2H) ; 3,81 (s, 6H) ; 3,78 (t, $J=8\text{ Hz}$, 2H) ; 1,64-1,56 (m, 2H) ; 1,35 (s, 9H) ; 1,26-1,19 (m, 10H) ; 0,83 (t, $J=7,00\text{ Hz}$, 3H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 167,87 ; 163,06 ; 162,42 ; 159,96 ; 148,67 ; 147,19 ; 140,77 ; 130,69 ; 130,66 ; 129,84 ; 129,81 ; 129,39 ; 129,25 ; 128,93 ; 128,29 ; 126,81 ; 126,72 ; 126,65 ; 125,73 ; 125,69 ; 125,64 ; 114,43 ; 113,89 ; 110,64 ; 109,20 ; 82,69 ; 55,52 ; 53,61 ; 44,48 ; 42,31 ; 31,93 ; 29,59 ; 29,31 ; 29,22 ; 29,13 ; 28,08 ; 26,95 ; 22,80 ; 14,26.

SMHR: m/z 778,3975 (calculé pour $\text{C}_{50}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_6$ m/z 778,3982).

(46)



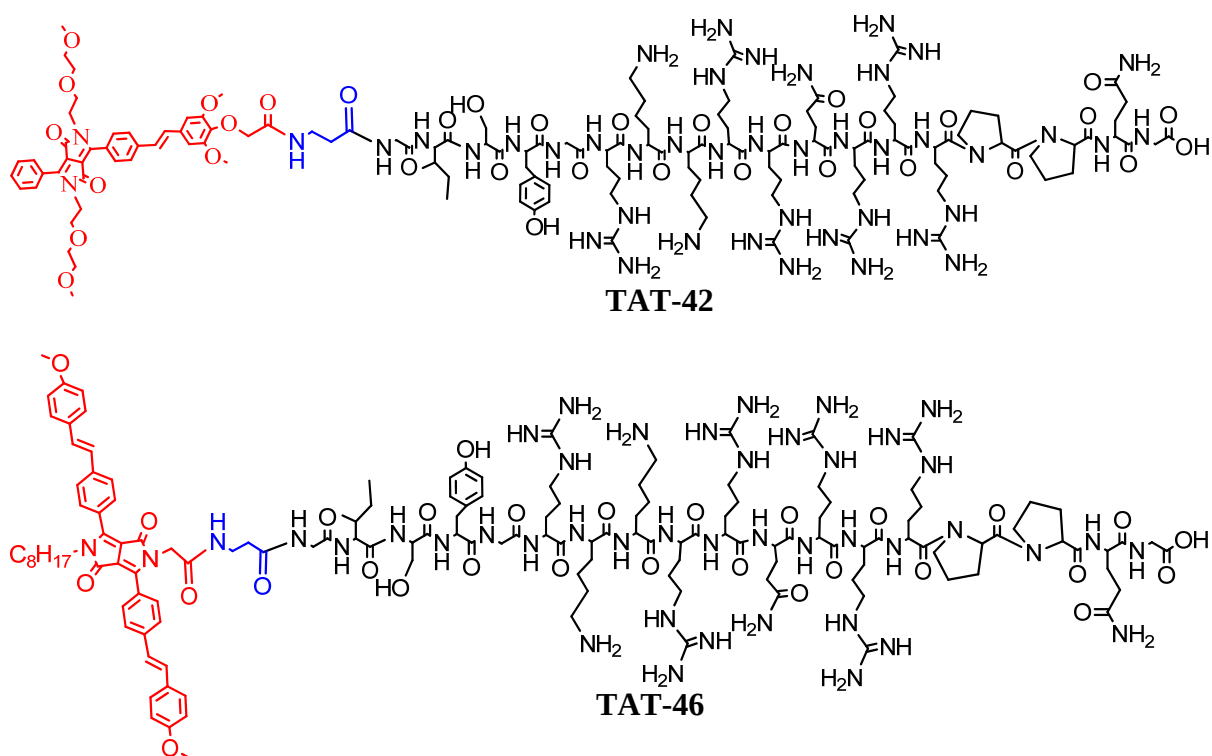
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **42** en utilisant **45** (170 mg, 0,218 mmol, 1 éq), du *dichlorométhane* (12 mL) et de l'acide trifluoroacétique (6 mL, 78 mmol). Le solvant a été évaporé sous pression réduite puis le produit brut a été lavé à l'heptane. Le produit **46** a été obtenu sous forme d'une solide rouge ($m = 130$ mg ; Rdt. = 85 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,82-7,76 (m, 4H) ; 7,2-7,59 (m, 4H) ; 7,47-7,44 (m, 4H) ; 7,20-7,13 (m, 2H) ; 7,01-7,95 (m, 2H) ; 6,91-6,87 (m, 4H) ; 4,54 (s, 2H) ; 3,82-3,72 (m, 8H) ; 1,66-1,57 (m, 2H); 1,24-1,19 (m, 10H) ; 0,83 (t, $J=6,5$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 207,26 ; 170,92 ; 163,1 ; 163,10 ; 163,07 ; 163,04 ; 160,05 ; 150,16 ; 146,50 ; 141,31 ; 141,24 ; 131,13 ; 131,08 ; 129,79 ; 129,82 ; 129,41 ; 128,99 ; 128,39 ; 127,03 ; 126,82 ; 126,48 ; 125,90 ; 125,59 ; 114,47 ; 110,99 ; 108,64 ; 55,58 ; 44,62 ; 44,54 ; 32,53 ; 31,95 ; 31,14 ; 29,65 ; 29,33 ; 29,23 ; 26,96 ; 22,82 ; 14,29.

SMHR: m/z 722,3412 (calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$ m/z 722,3356).

Synthèse peptidique et bioconjugaison



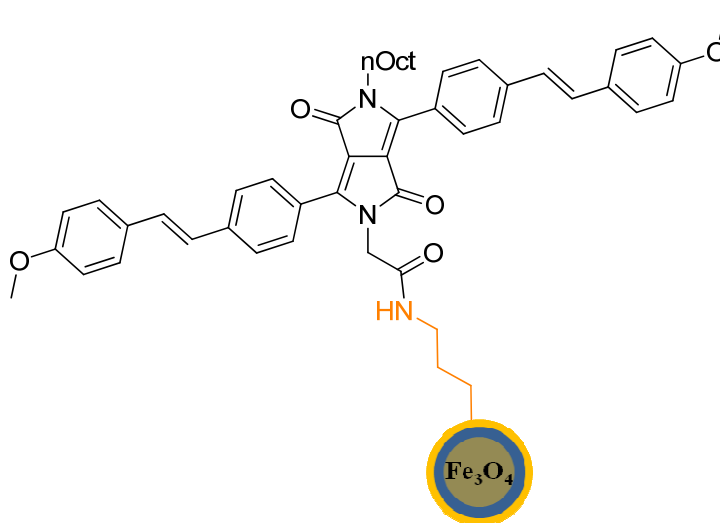
TAT (44-61) a été préparé par synthèse en phase solide utilisant la méthode de protection Fmoc avec un synthétiseur peptidique automatique (ABI 433A, Appalar, France).

Brièvement, 207 mg de Fmoc-Leu-Wang resin LL ont été utilisés (substitution 0,3 mmol/g) à une échelle de 0.1 mmol et tous les acides aminés ont été couplés en utilisant le système HBTU/HOBt comme agent de couplage. La déprotection des groupements protecteurs N α Fmoc a été obtenue après 6 min de traitement avec de la pipéridine suivi par UV à 301 nm. Le peptide a été terminé par un dérivé β -alanine utilisé comme espaceur entre le peptide et la sonde fluorescente. 2 Lots de 0,006 mmol de résine ont été isolés et incubé dans 400 μ l de NMP contenant 0,028 mmole du chromophore **42** ou **46** (20 mg, 4 éq), 100 μ l de HBTU 0,45 M et 100 μ l de DIEA 2 M pendant 24h à température ambiante. Après filtration puis lavage par du méthanol, la peptidyl-résine a été clivée pendant 2h dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) contenant du phénol (2 %, m/v), du tri-*iso*-propylsilane (5 %, v/v) et de l'eau (2,5 %, v/v). Après une précipitation dans l'éther, les peptides ont été purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse sur une colonne C8 (uptisphere 300 Å, 5 μ m; 250 x 10, Interchim, France) puis lyophilisés. La pureté de ces peptides marqués ainsi que leur masses moléculaires ont été obtenues par spectrométrie de masse :

- **TAT-42** : m/z 2977,59 (calculé 2976,59)
- **TAT-46** : m/z 2974,65 (calculé 2974,64).

Avant utilisation, les peptides ont été dissous dans de l'eau distillée, aliquotés et conservés à -20 ° C.

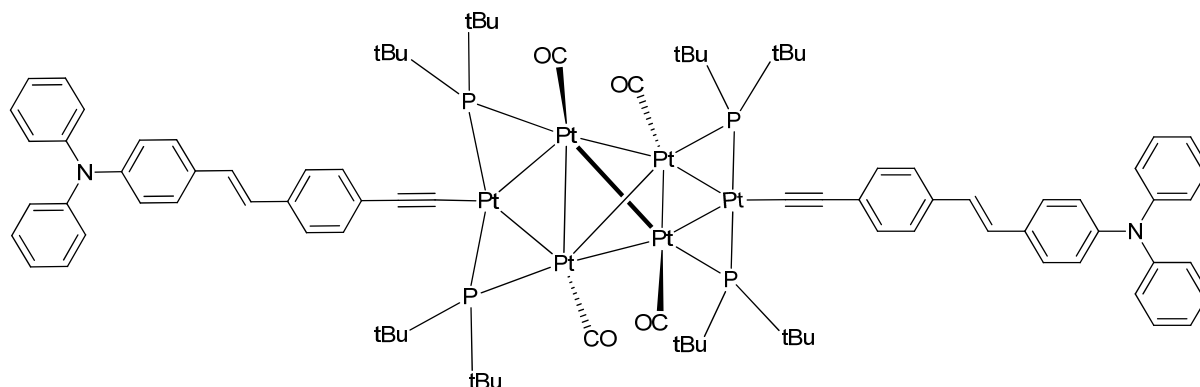
(46-NP)



Dans un ballon 10 mL, 5 mg de produit **46** et 1 mL de chlorure de thionyle ont été ajoutés puis chauffés au un sèche-cheveux pendant 10 min. Le solvant a été évaporé sous pression

réduite puis le produit brut a été repris dans 2 mL de DMF. Cette solution a ensuite été ajoutée à une solution contenant 10 mg de NP dans 10 mL de chloroforme. 2 mL de triéthyleamine ont été ajoutés puis le mélange réactionnel a été agité pendant 1h à température ambiante. Le produit a été isolé par centrifugation puis lavé plusieurs fois au dichlorométhane.

(51)



Dans un ballon tricol de 25 mL sous argon, le cluster de platine **49** (24 mg, 0,012 mmol, 1 éq), de l'iodure de cuivre (0,3 mg, 0,0015 mmol ; 0,13 éq.) et 10 mL de diéthylamine fraîchement distillée ont été introduits. Après quelques minutes d'agitation 12 mg de l'alcyne **50** (0,03 mmol, 2,5 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant 24 à température ambiante puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur plaque préparative de silice (dichlorométhane/heptane 30:70 en volumes) pour conduire au produit **51** sous forme d'une solide rouge brique ($m = 14$ mg ; Rdt. = 45 %).

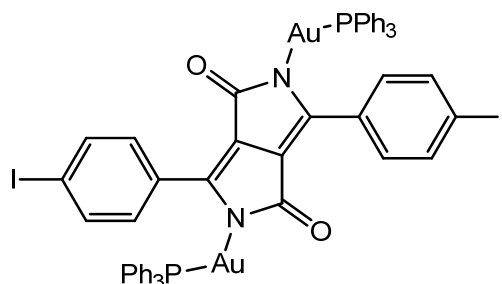
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,36-7,33 (m, 8H), 7,28 (d, $J = 8,4\text{Hz}$, 4H), 7,25-7,22 (m, 8 H), 7,09 (d, $J=7,6$ Hz, 8H), 7,03-6,99 (m, 10H), 6,96 (d, $J=7,6$ Hz, 2H), 1,49 (tv, $J=6,8$ Hz, 72H).

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 163,08 ; 160,06 ; 150,17 ; 146,52 ; 141,32 ; 131,13 ; 131,09 ; 129,80 ; 129,52 ; 129,41 ; 128,40 ; 127,05 ; 126,83 ; 125,60 ; 114,48 ; 77,802 ; 55,59 ; 31,15.

^{31}P RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): 341,54-339,60 (m) ; 336,43-334,33 (m) ; 335,36 (s) ; 331,27-329,39 (m).

SMHR: m/z 2572,5125 (calculé pour $C_{92}H_{112}N_2O_4P_4Pt_6$ m/z 2572,5168).

(52)



Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL de NMP et du Ph_3PAuCl (150 mg, 0,3 mmol, 2,3 éq.) ont été introduits. Ensuite 10 mL de DMF contenant du produit **7** (70 mg, 0,13 mmol, 1 éq.) et 0,3 mL d'une solution 0,1 M de $NaN(SiMe_3)_2$ dans le THF ont été ajoutés goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h sous argon, puis versé dans 50 mL de l'eau pour faire précipiter le produit formé. Après filtration le produit **52** est obtenu sous forme d'une poudre violette (m = 170 mg ; Rdt. = 90 %).

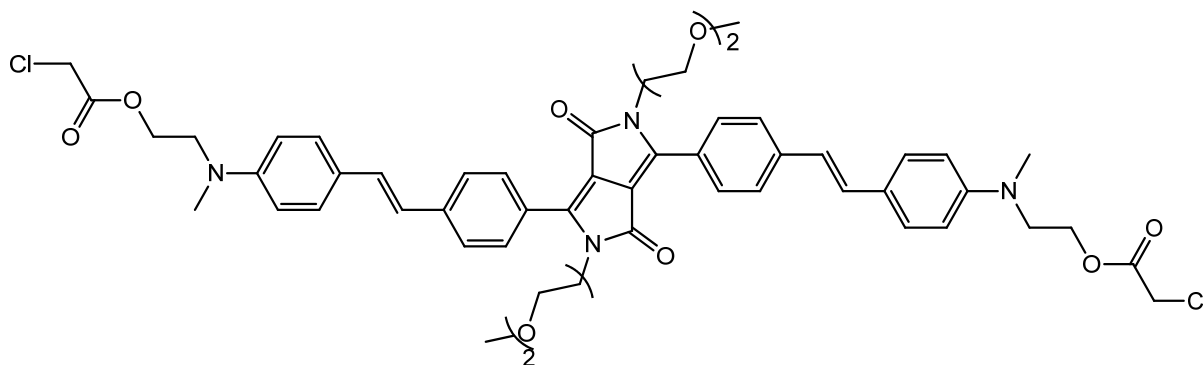
1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ ppm = 8,46 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 7,6 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 7,55-7,43 (m, 30 H).

^{13}C RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ ppm = 170,76 ; 137,39 ; 134,51 ; 134,37 ; 132,09 ; 130,19 ; 129,52 ; 129,40 ; 29,90 ; 29,86 ; 29,80.

^{31}P RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): 32,37 (s)

SM-MALDI: m/z 1456,216 (calculé pour $C_{54}H_{38}Au_2I_2N_2O_2P_2$ m/z 1455,982).

(53)



Dans un ballon tricol de 250 mL, sous argon, **31** (800 mg ; 0,95 mmol ; 1 éq.) et 40 mL de dichlorométhane anhydre ont été introduits. Le ballon a été refroidi à 0°C, puis 0,6 mL de

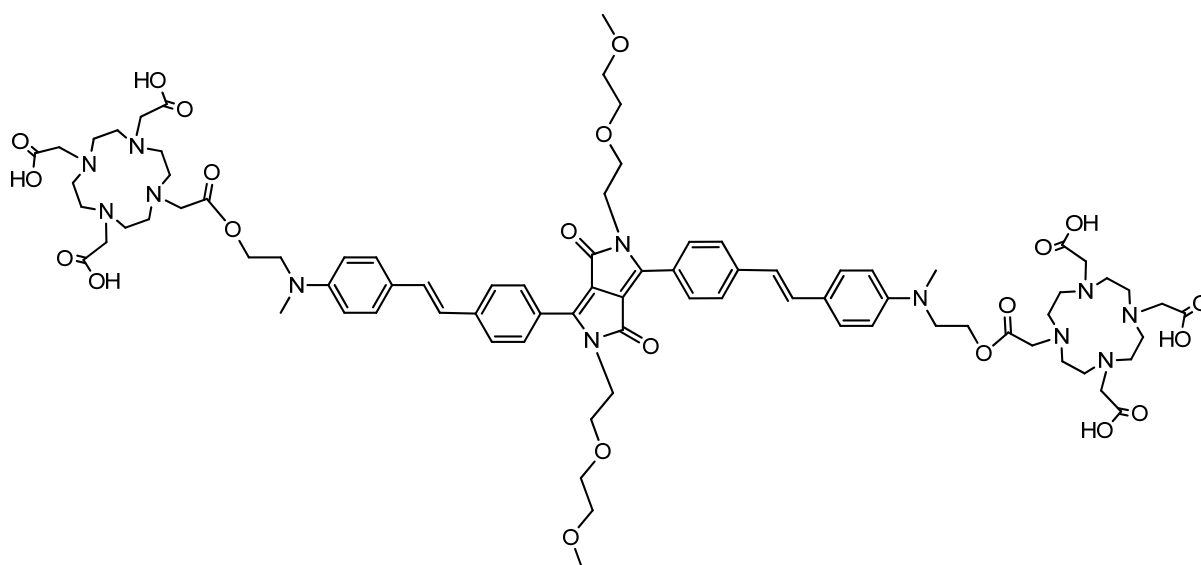
triéthylamine (431 mg, 4,27 mmol ; 6 éq.) et 0,23 mL de chlorure de chloroacétyle (320 mg, 2,85 mmol ; 2 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant deux heures à température ambiante. La phase organique a été lavée avec l'eau, ensuite séchée sur MgSO_4 . Le solvant a été évaporé sous pression réduite donnant le produit **53** obtenu sous forme d'un solide violet ($m = 800 \text{ mg}$; Rdt. = 85%).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ ppm = 7,98 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 4H) ; 7,59 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 4H) ; 7,46 (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 4H) ; 7,14 (d, $J = 16,1 \text{ Hz}$, 2H) ; 6,96 (d, $J = 16,1 \text{ Hz}$, 2H) ; 6,85 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 4H) ; 4,39 (t, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 4H) ; 4,02-3,97 (m, 8H) ; 3,76 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 4H) ; 3,68 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$; 4H) ; 3,56-3,54 (m, 4H) ; 3,47-3,45 (m, 4H) ; 3,33 (s, 6H) ; 3,05 (s, 6H).

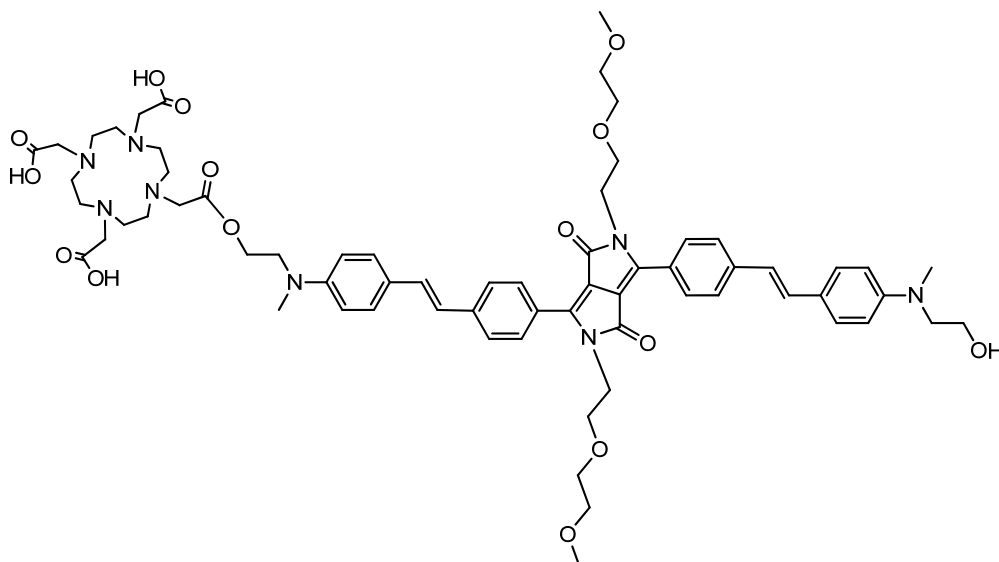
^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ ppm = 167,47 ; 163,37 ; 148,71 ; 140,92 ; 130,53 ; 129,98 ; 128,49 ; 126,62 ; 114,56 ; 109,943 ; 72,06 ; 70,71 ; 69,18 ; 68,40 ; 62,62 ; 59,26 ; 52,32 ; 42,46 ; 40,89 ; 40,73 ; 30,59 ; 29,90 ; 23,99 ; 1,22.

SMHR: m/z 994,36972 (calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$ m/z 994,36865).

(55)



(56)

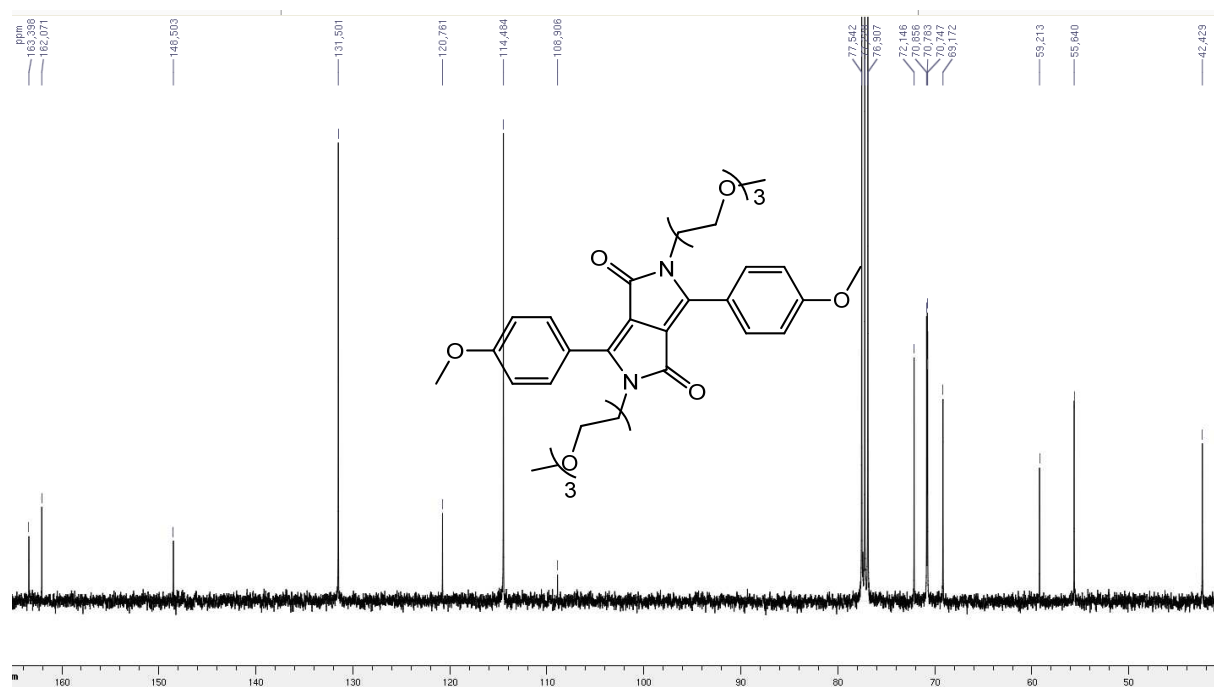
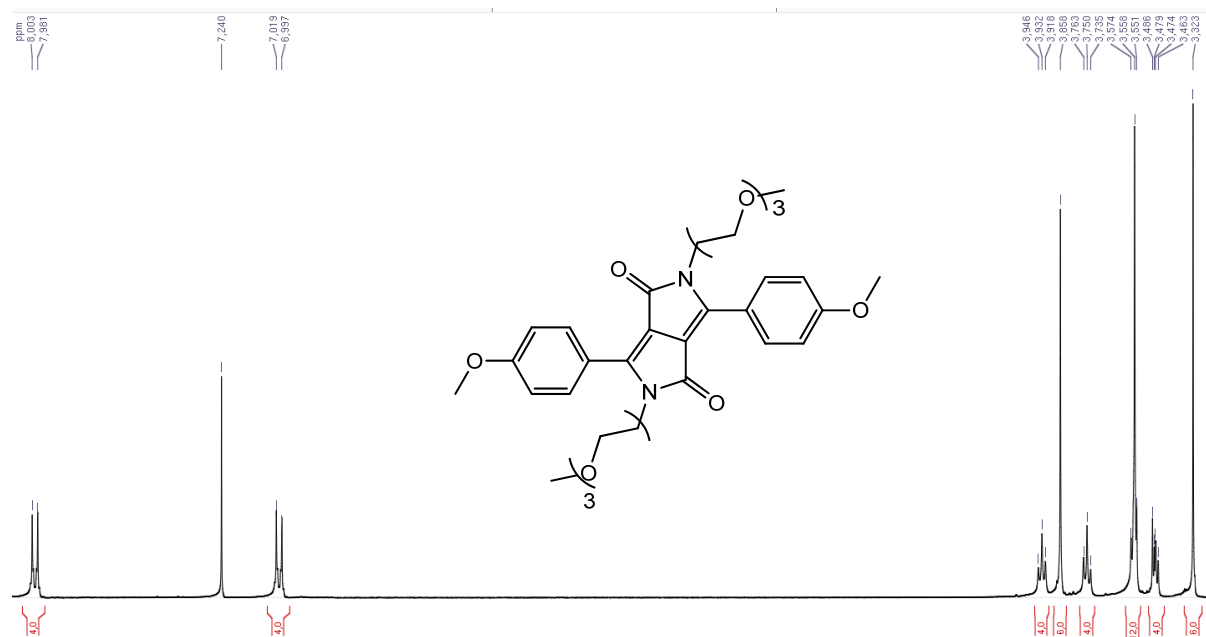


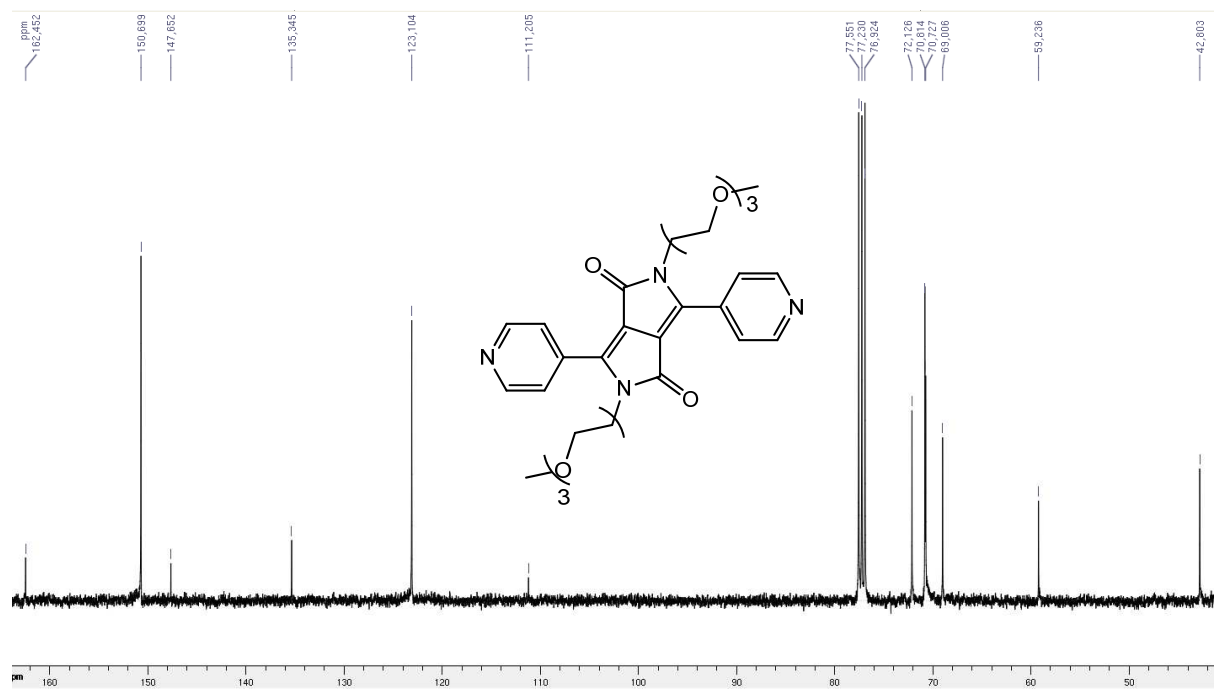
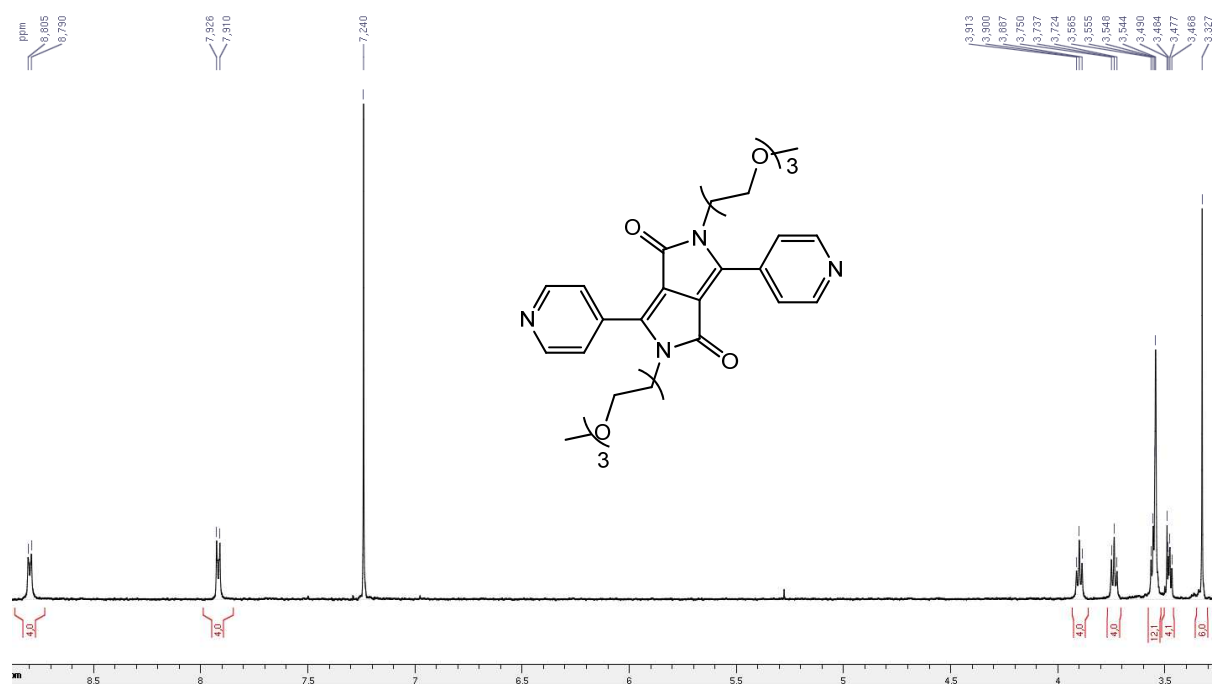
Dans un ballon tricol de 250 mL, sous argon, le dérivé de cyclène DO₃tBu(300 mg, 1,71 mmol ; 2,2 éq.), du carbonate de potassium (360 mg ; 5,32 mmol ; 10 éq) et 50 mL d'acétonitrile anhydre ont été introduits. Le mélange réactionnel a été chauffé jusqu'à 65 °C, puis une solution de **53** (260 mg ; 0,532 mmol ; 1 éq.) dans 10 mL d'acétonitrile anhydre a été ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à 65 °C puis filtré sous vide. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été repris dans 15 mL de dichlorométhane ensuite le ballon a été mis dans un bain de glace et 5 mL de TFA ont été ajoutés goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à température ambiante. Le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (C18 ; eau/ CH₃CN, 1:1 en volumes). Deux produits ont été obtenus, 100 mg de **55** et 260 mg de **56**.

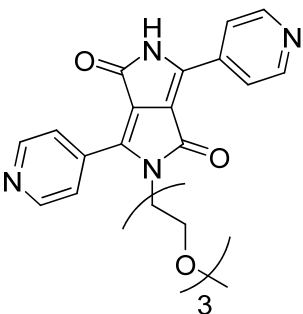
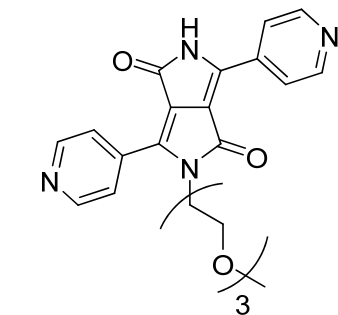
SMHR pour **55**: m/z 1614,78484 (calculé pour C₈₂ H₁₁₃ N₁₂ O₂₂ m/z 1614,78576).

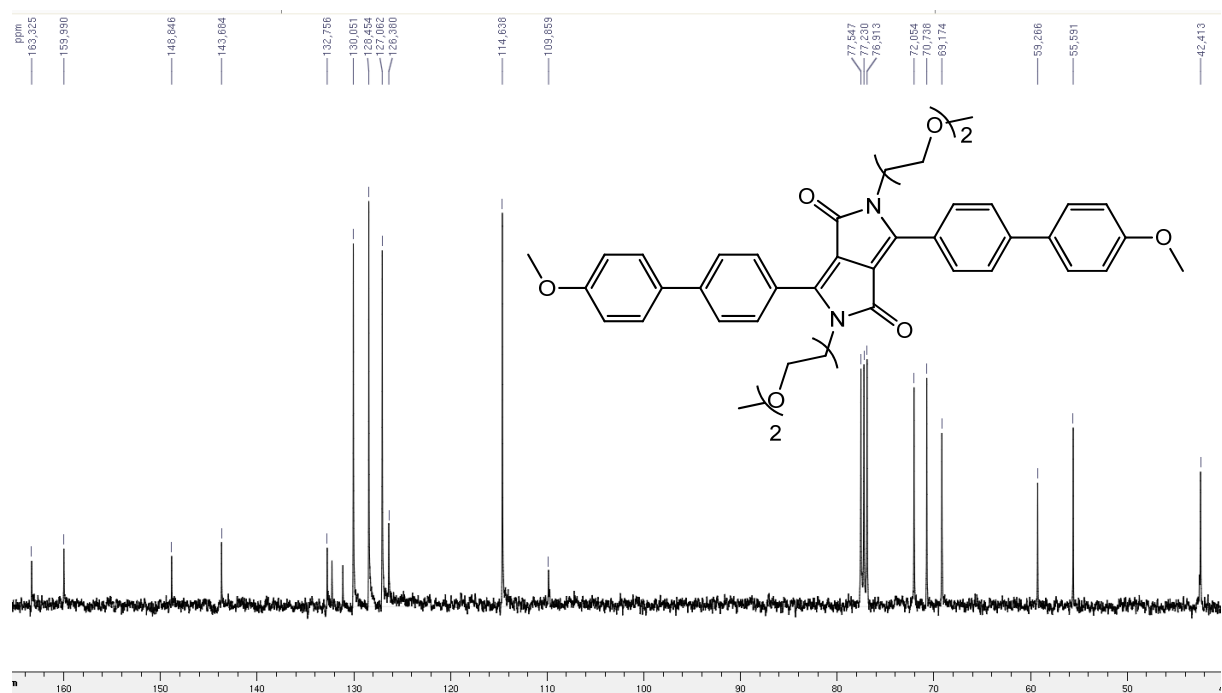
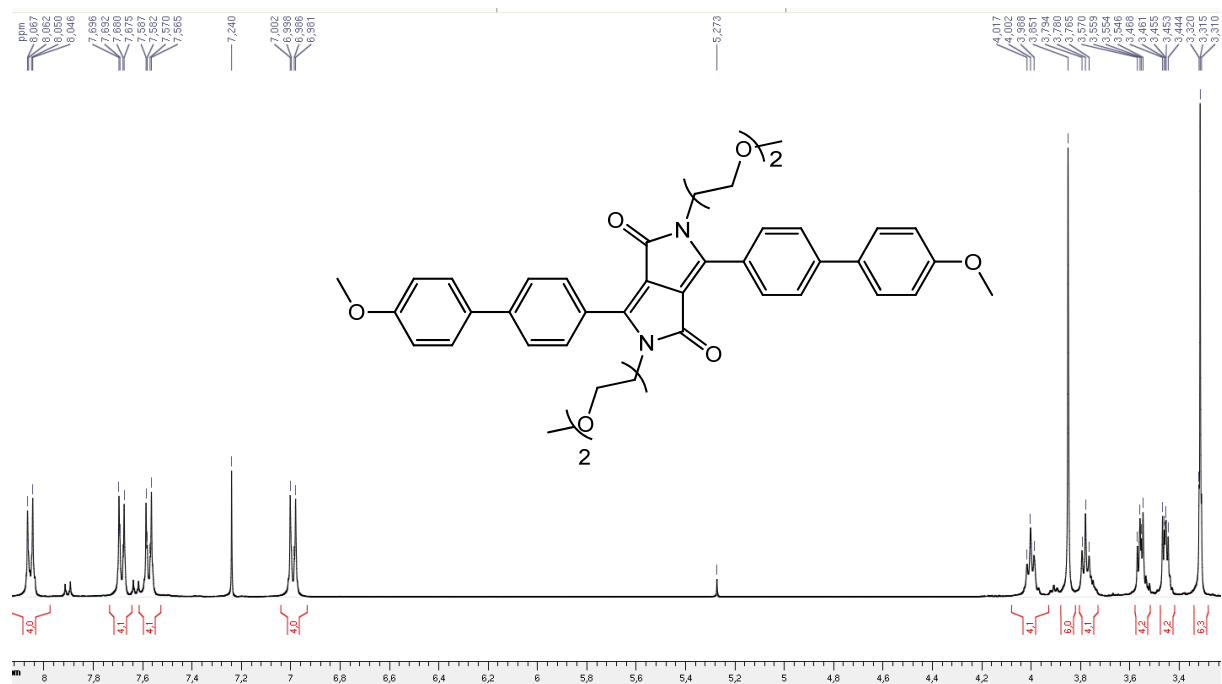
SMHR pour **56**: m/z 1228,60705 (calculé pour C₆₆ H₈₇ N₈ O₁₅ m/z 1228,60561).

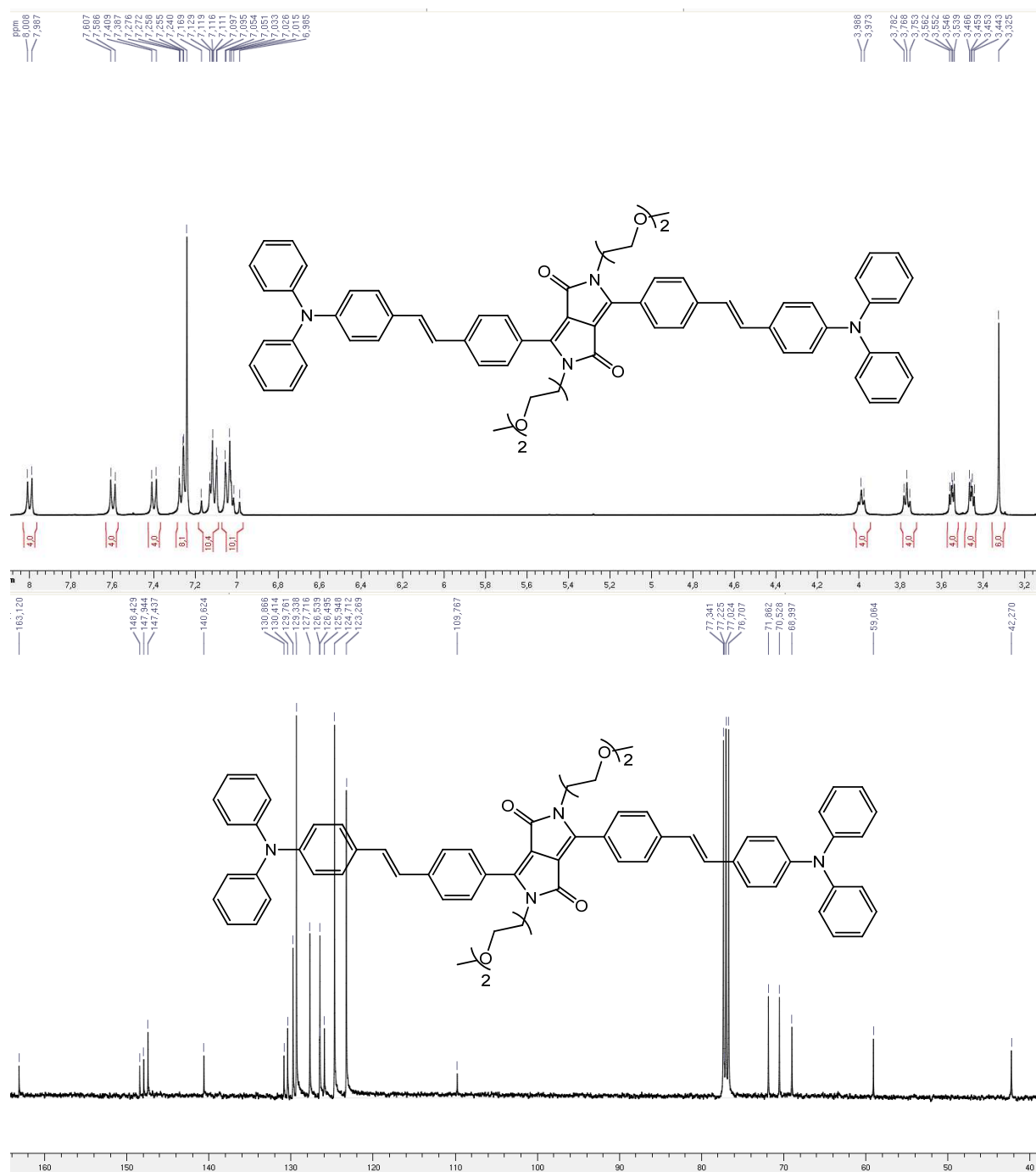
ANNEXE

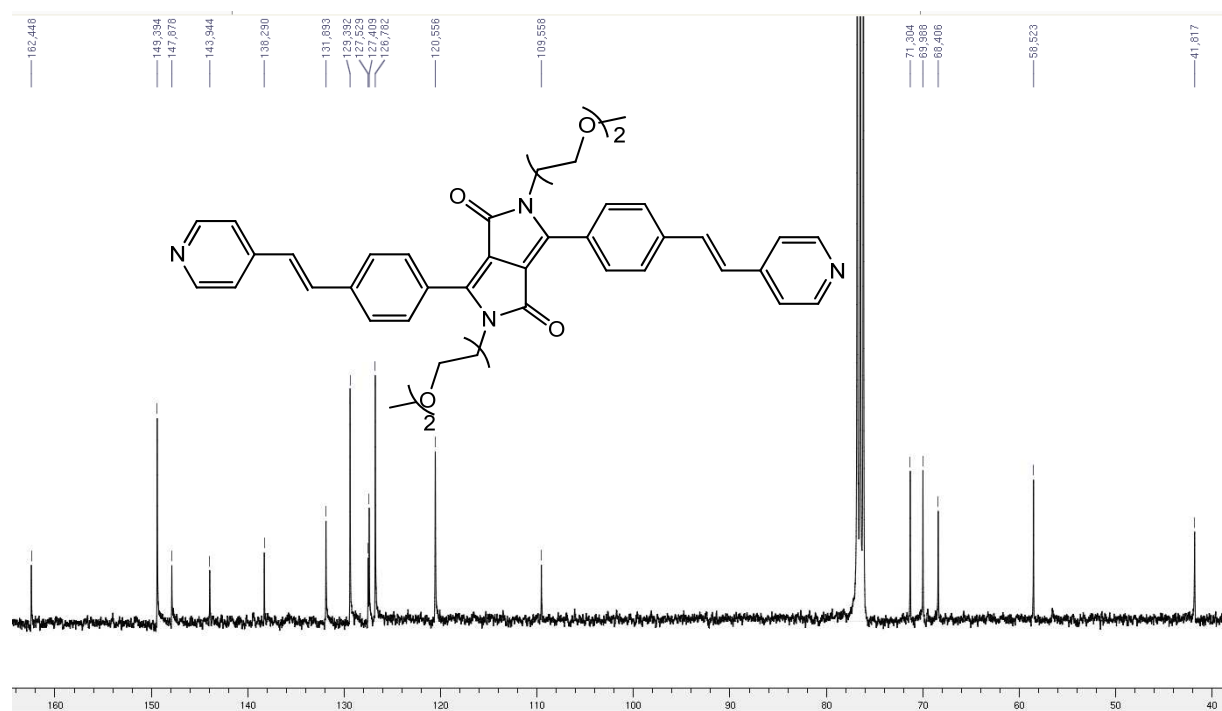
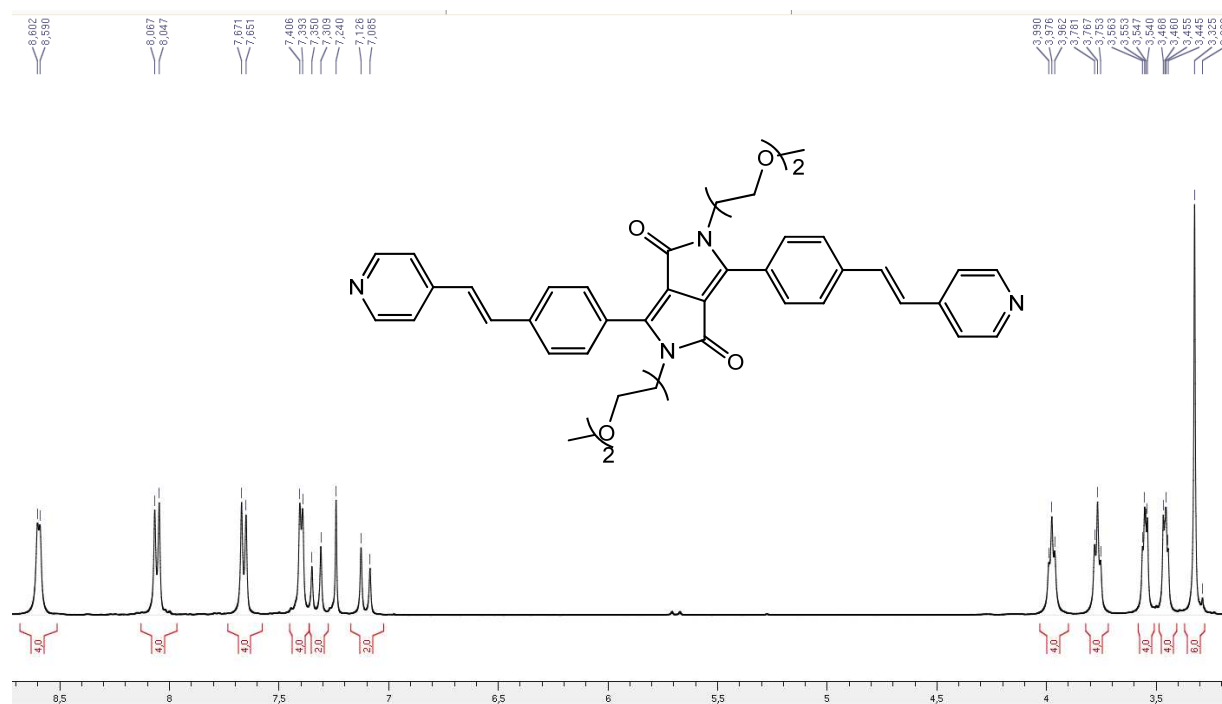


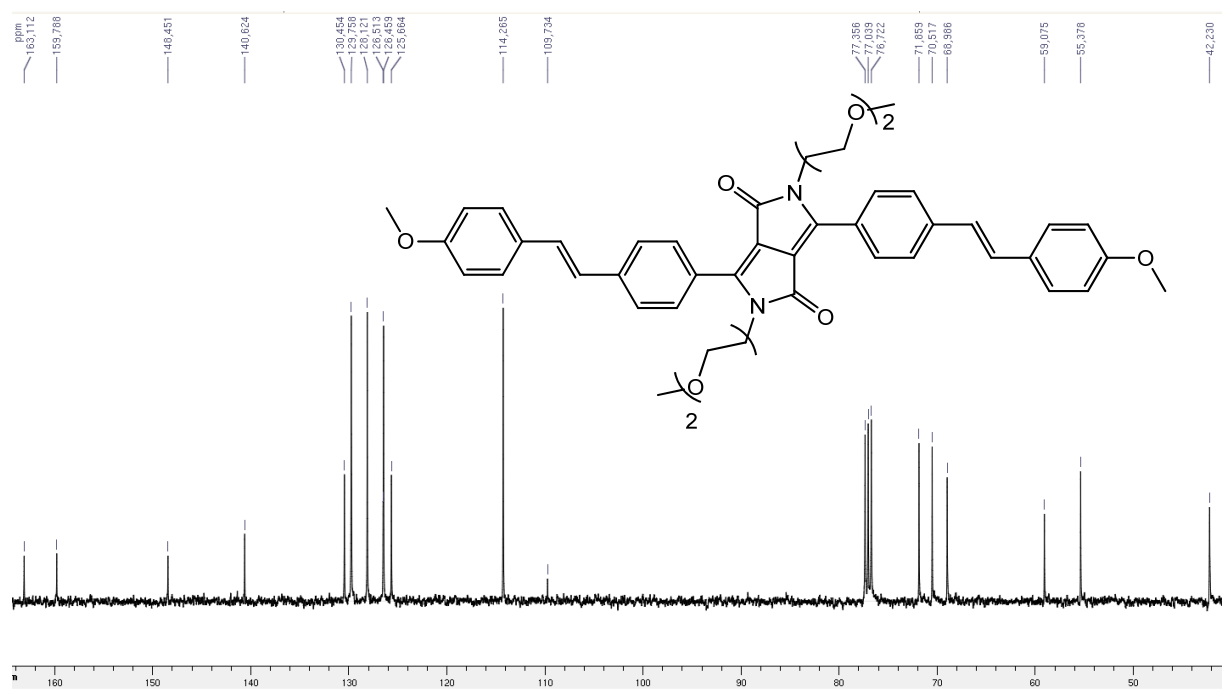
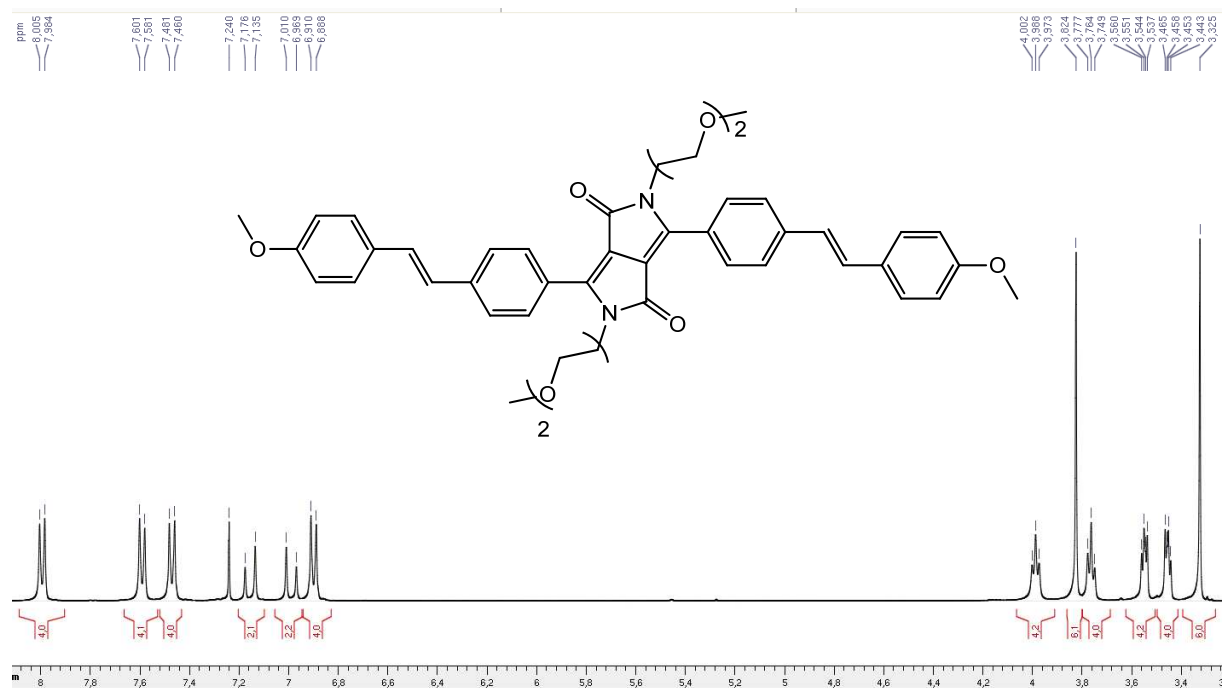


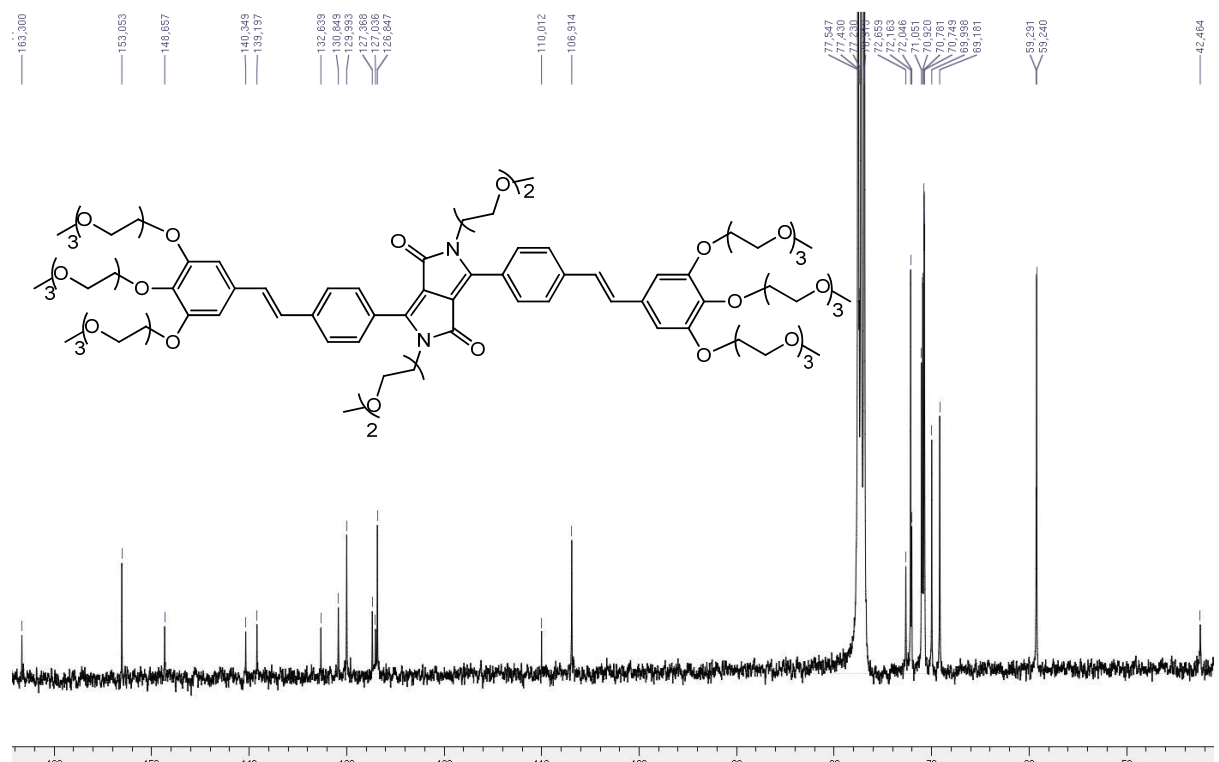


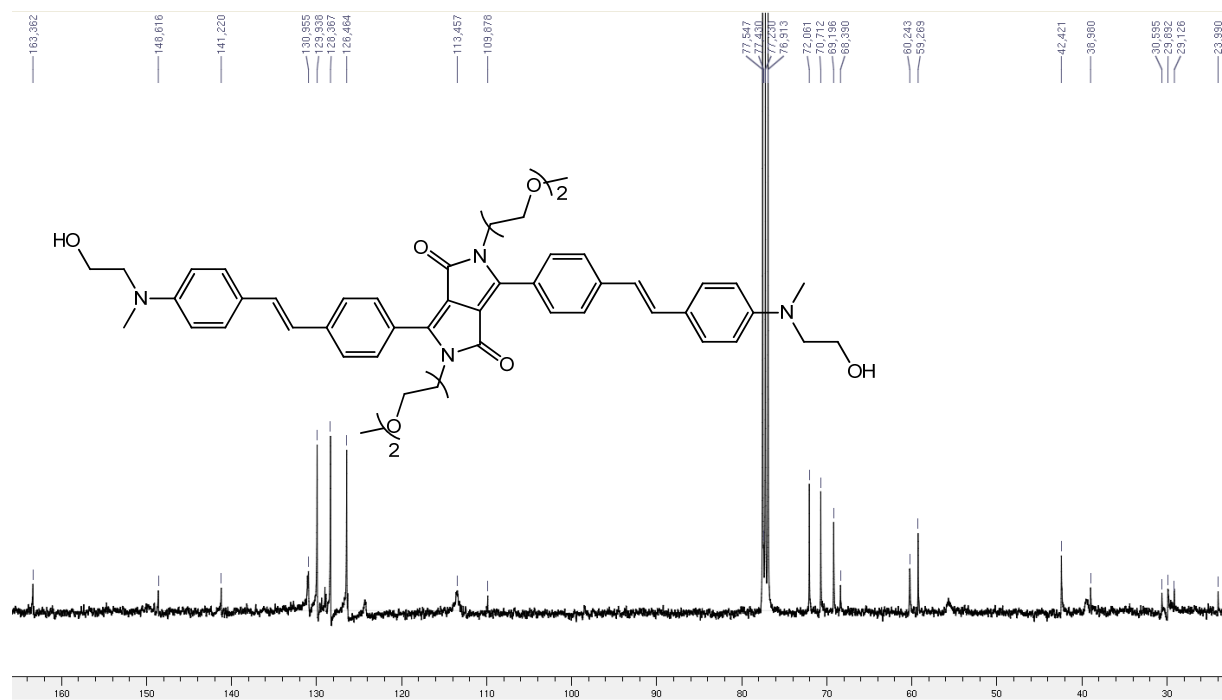
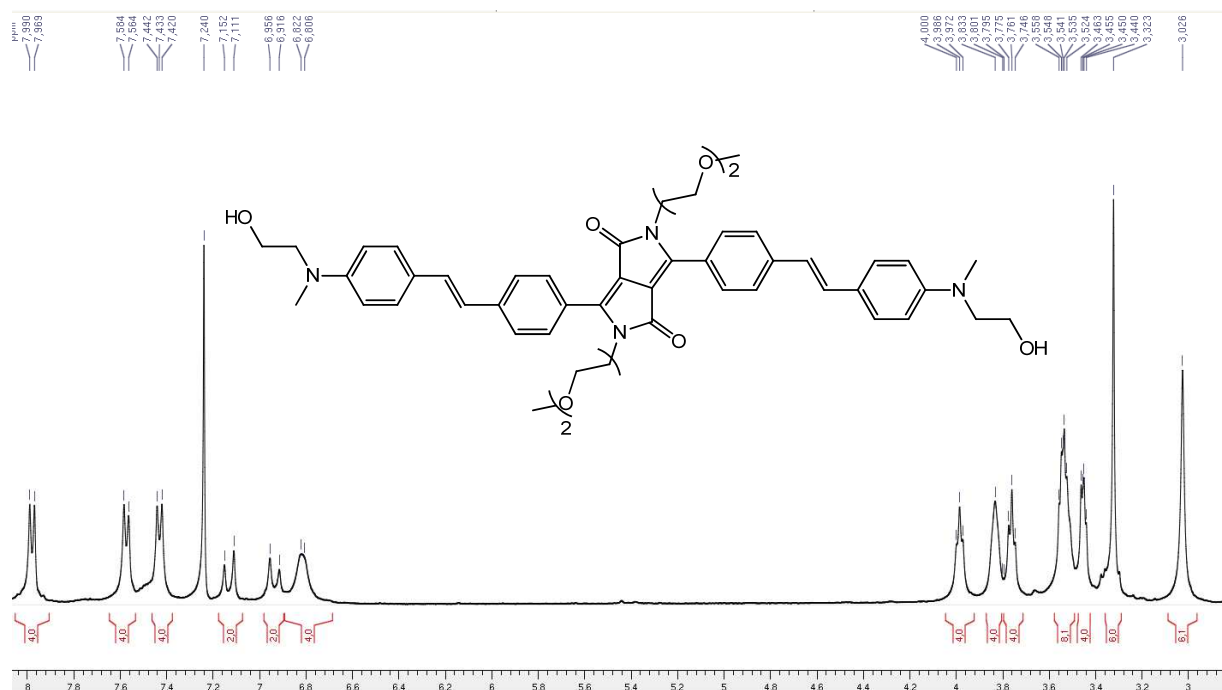


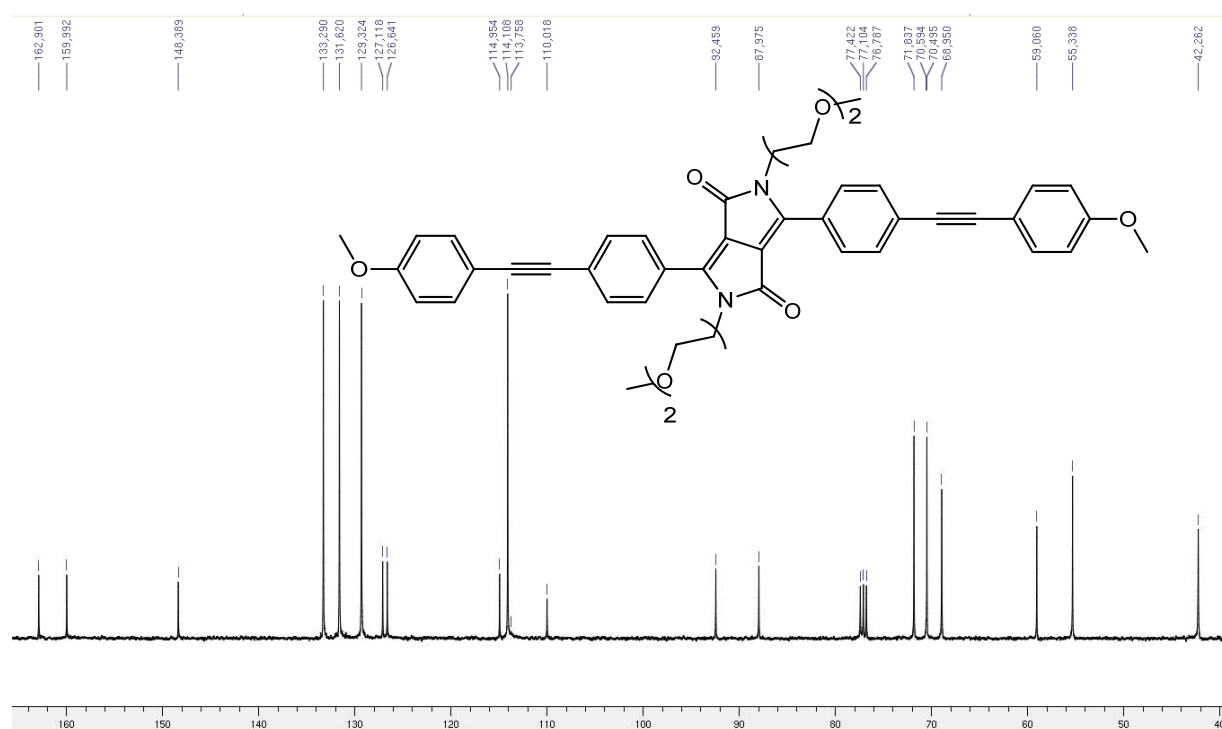


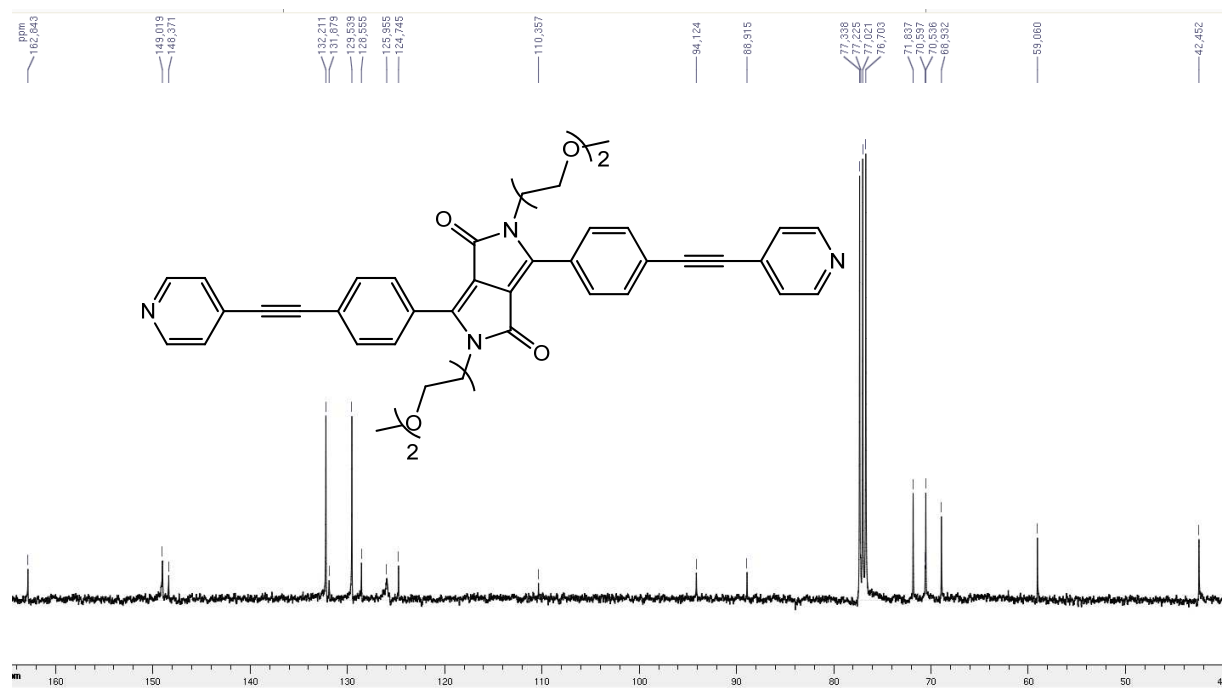
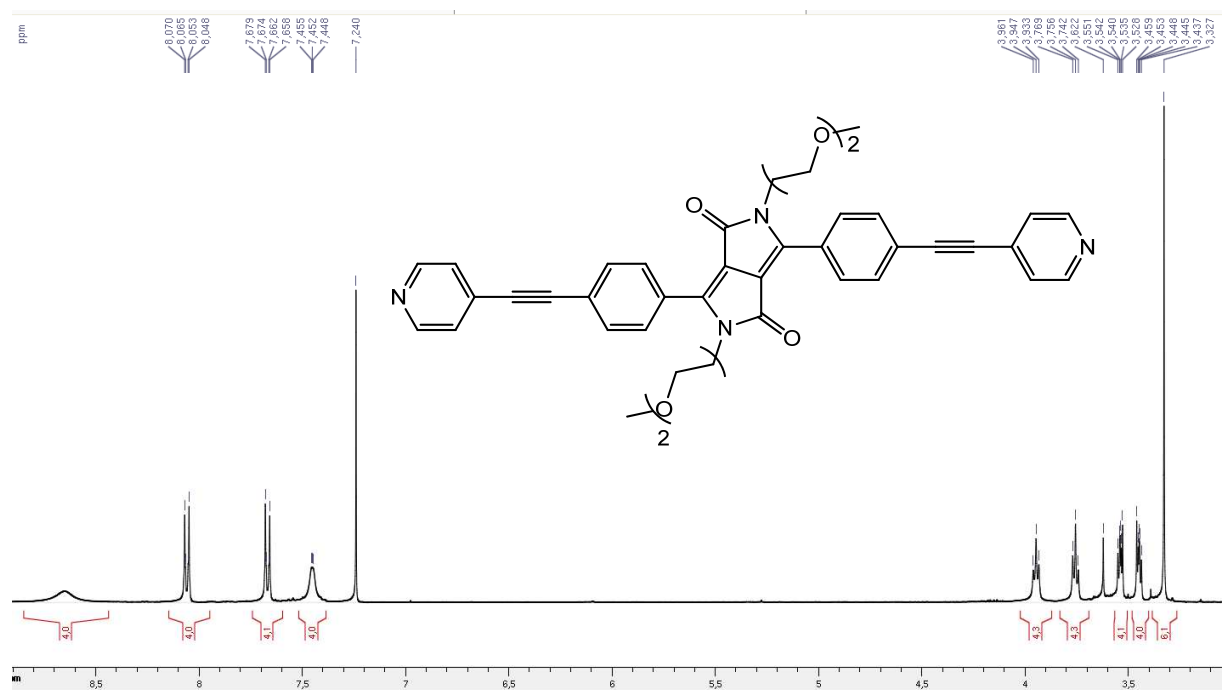


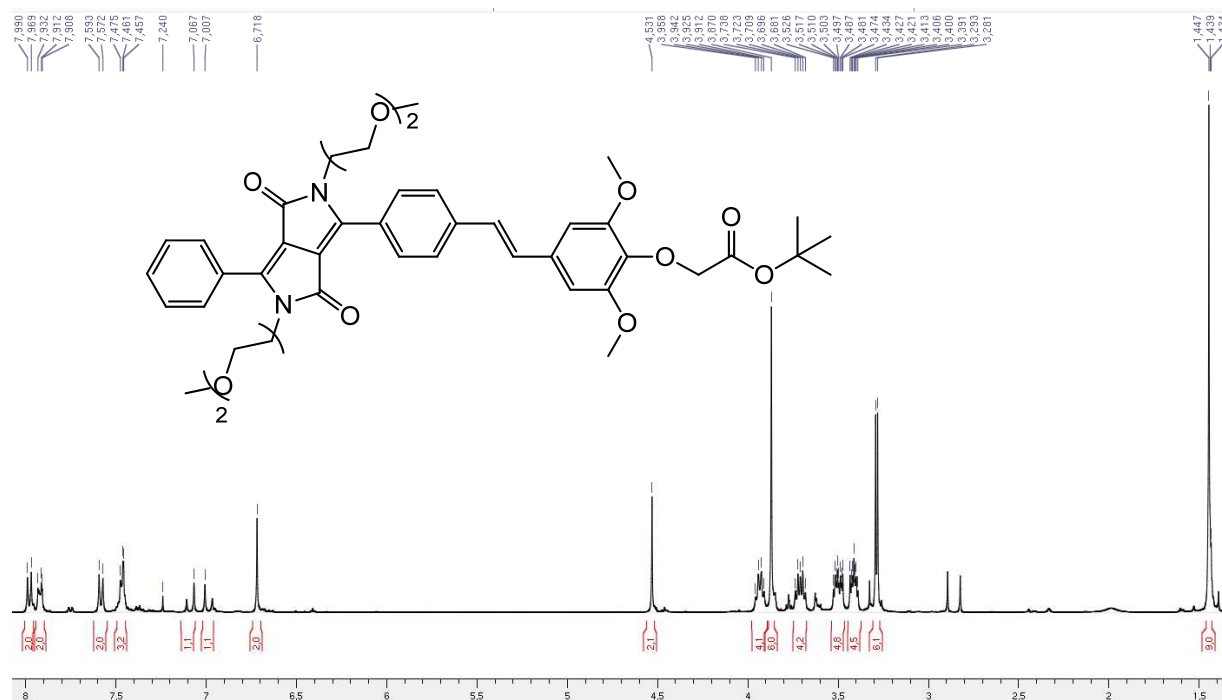


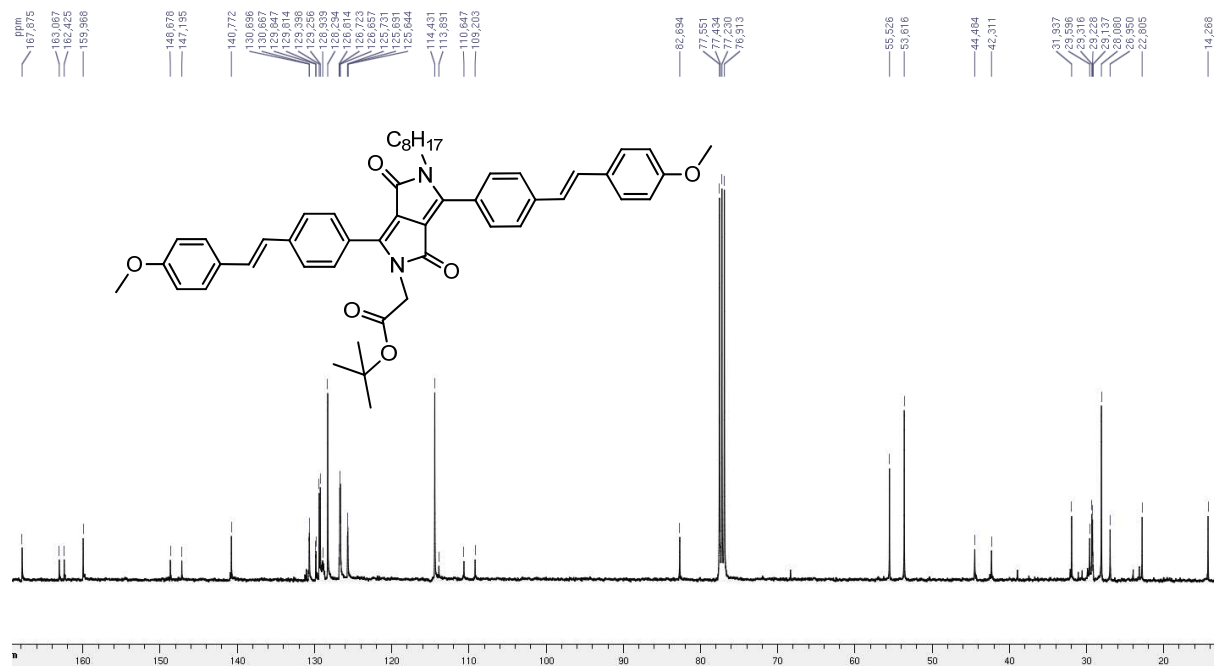
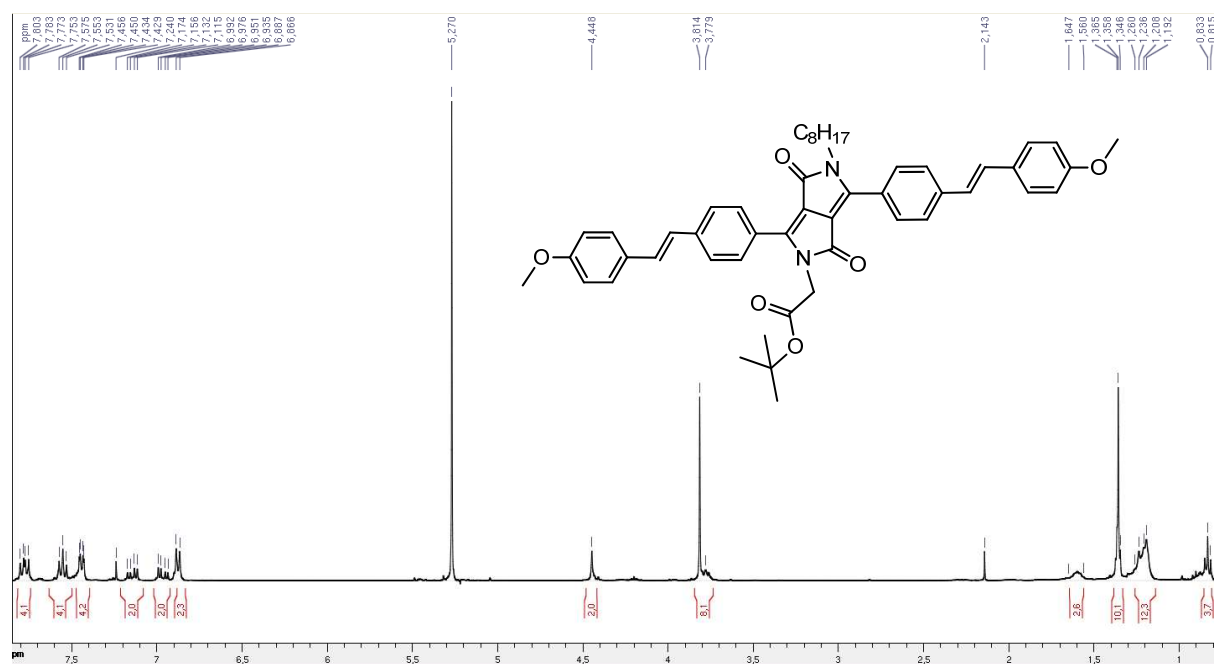


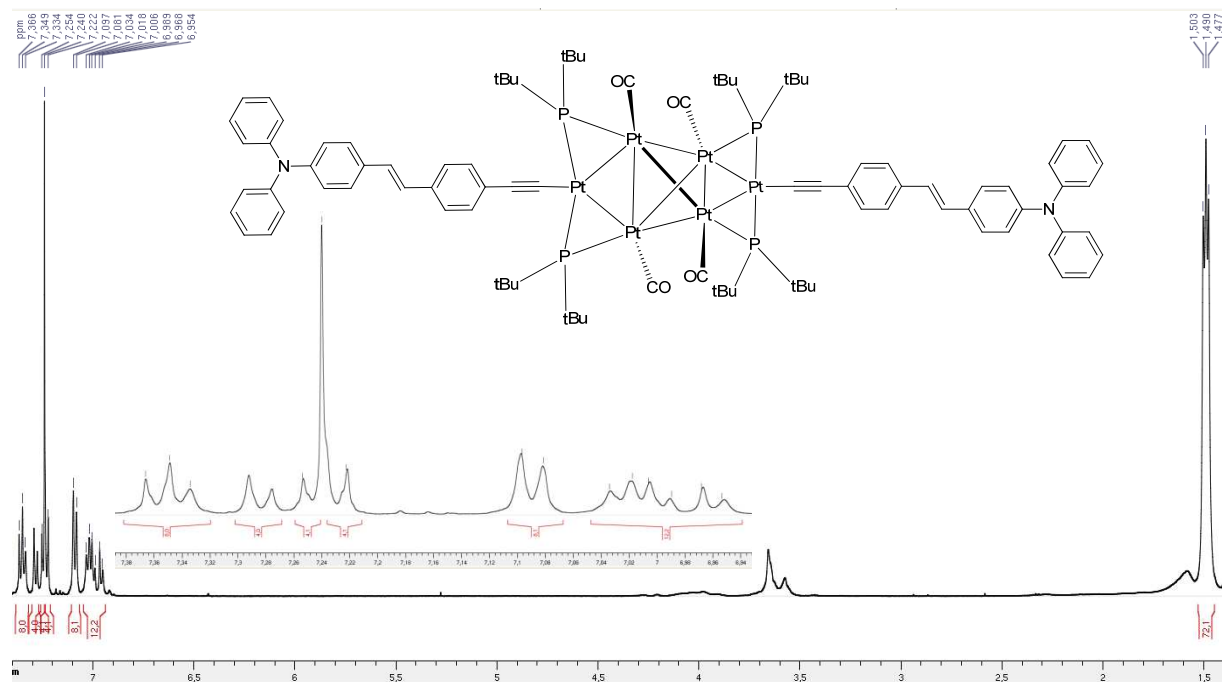


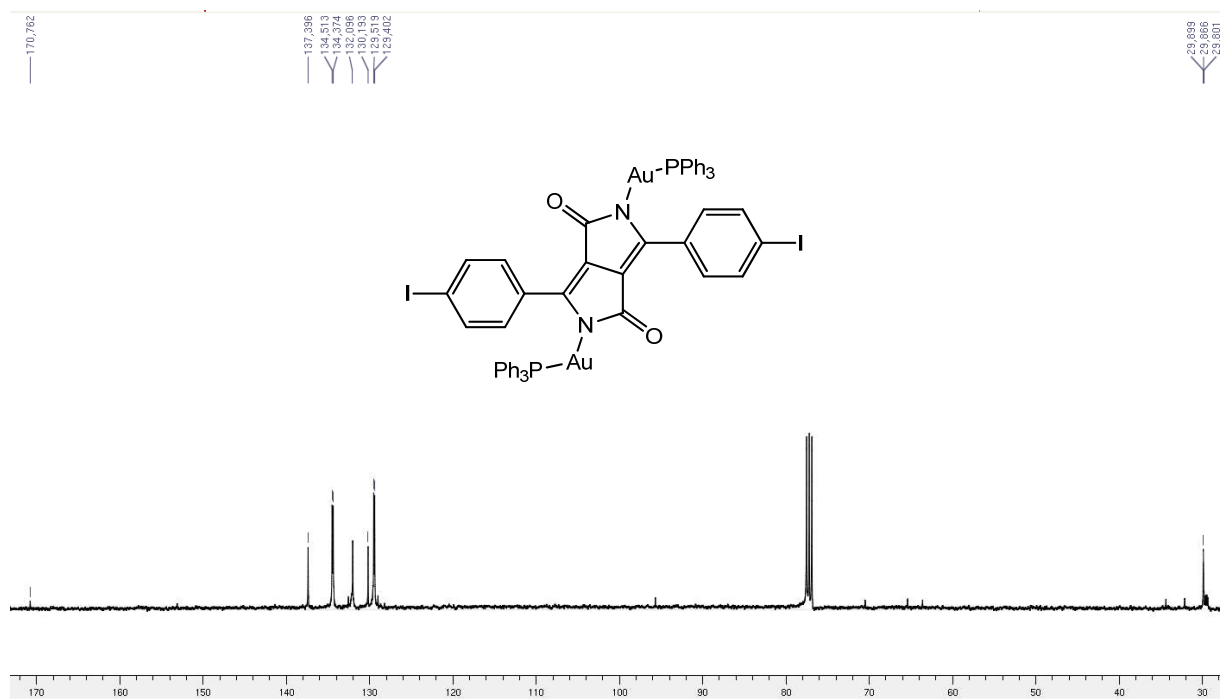
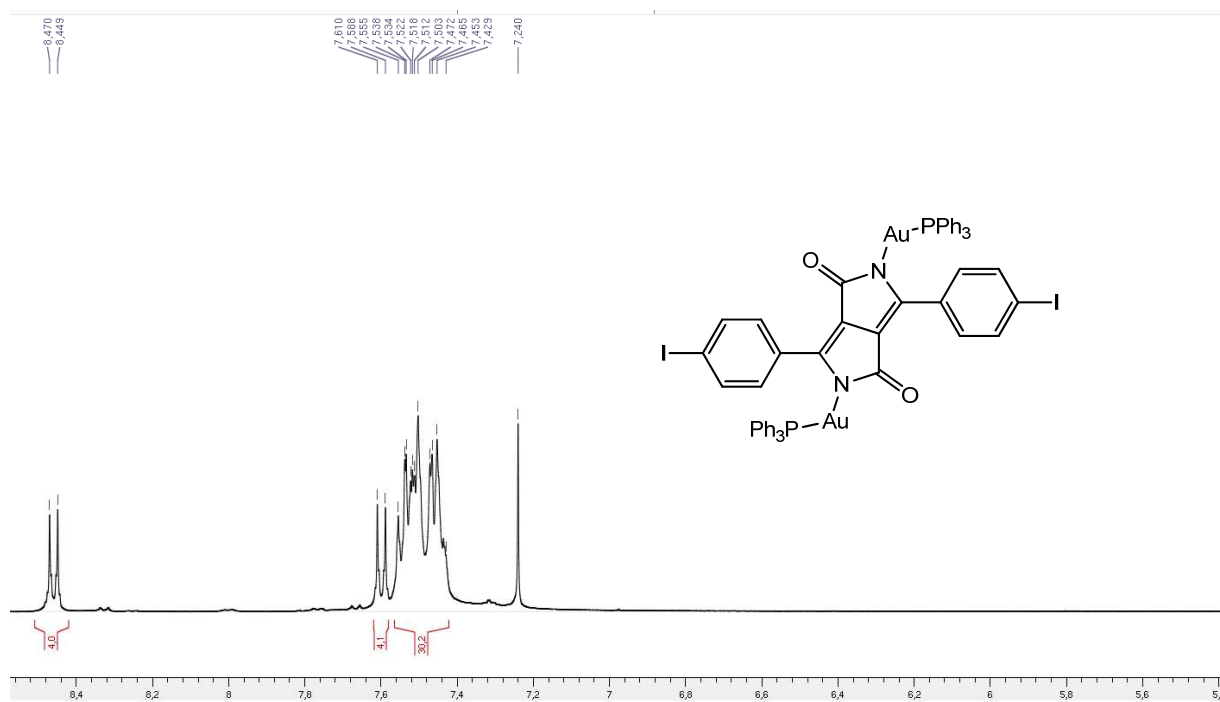












CURRICULUM VITAE

Hussein FTOUNI

Né le 1 Janvier 1987
79 Route du Rhin
67400 Illkirch-Graffenstaden
Tel: 06 58 63 06 56
Email: hftouni@hotmail.fr
Permis B



FORMATION

2009-2012**Université de Strasbourg, France**

Doctorat en Chimie Organique (en cours, soutenance prévue en novembre 2012), Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie (UMR 7213).
Directeurs : Pr. Jean-François NICOUD et Dr. Frédéric Bolze.
«Ingénierie moléculaire de fluorophores absorbants bi-photoniques pour des applications biologiques».

2008-2009**Université de Reims Champagne Ardenne, France**

Master 2 Chimie, Substances Naturelles et Médicaments, parcours recherche
(**Major de promotion**; Moyenne 14.66)

2007-2008**Université Libanaise - Faculté des sciences de Beyrouth, Liban**

Master 1 Biochimie (Mention Bien)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2009-2012**Thèse en Chimie organique :**

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie (UMR 7213). Directeurs : Pr. Jean-François NICOUD et Dr. Frédéric Bolze.

- Synthèse de fluorophores dérivés de Dicéto Pyrrolo-Pyrrole (DPP) pour la microscopie bi-photonique.
- Synthèse des nouveaux fluorophores amino-réactifs.
- Synthèse des nouveaux fluorophores pour la microscopie multimodale.
- Caractérisation photophysique à un et à deux photons.
- Applications biologiques (microscopie bi-photonique, confocale, électronique, bioconjugaison de fluorophores...).

2010-2012**Enseignement :**

Moniteur à Faculté de Chimie, Université de Strasbourg.

- Travaux dirigés de Réactivité Chimique L1 (48 h).
- Travaux pratiques de Chimie expérimentale L1 (84 h).

2008-2009**Stage de M2 Recherche :**

UMR 6229 (ICMR, Dir. Pr. X. Coqueret), groupe "Chimie de Coordination" (Resp. Pr. E. Guillon), Faculté des Sciences, Université de Reims Champagne Ardenne.

Sujet : Devenir des antibiotiques dans l'environnement : Spéciation, sorption et détermination de ses propriétés complexantes vis-à-vis du cuivre (II).

COMPETENCES

Scientifiques :

- **Synthèse organique** : synthèse multi-étapes, synthèse totale, réactions pallado-catalysées, fonctionnalisation de nanoparticules et biomolécules...
- **Synthèse inorganique** : synthèse de fluorophores basés sur des clusters de platine, d'or...
- **Etudes photophysiques** : Mono-photonique (spectres d'absorption, d'émissions, d'excitation, détermination des rendements quantique, des coefficients extinction molaire, des durées de vie...) et bi-photonique (spectres fluorescence induite par excitation bi-photonique, détermination des sections efficaces d'absorption bi-photonique...)
- **Techniques de Chromatographie** : HPLC, chromatographie flash, chromatographie sur colonne...
- **Techniques d'analyse** : RMN, spectroscopie de masse, de fluorescence, UV-visible ...
- **Imagerie cellulaire** : Marquages des cellules, microscopie confocale et biphotonique...

Langues : Français (bilingue), Anglais (bon niveau), Arabe (langue maternelle).

Informatiques: Microsoft office (Word, Excel, et PowerPoint), Bases de données (ChemDraw, SciFinder, NMR notebook...), Image J, Leica Application Suite....

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Orales :

- Hussein FTOUNI, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. « *Synthesis and characterization of new fluorophores for two-photon microscopy* », Mai 2011, **PhoBiA Annual Nanophotonics International Conference « PANIC »**, Wroclaw-Pologne
- Hussein FTOUNI, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. « *Synthèse et caractérisation de fluorophores dérivés du dicéto-pyrrolo-pyrrolle (DPP) pour la microscopie biphotonique* », Octobre 2011, **Le colloque Matériaux et Nanostructures π -Conjugués (MNPC)**, Obernai-France.
- Hussein FTOUNI, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. « *Synthèse et caractérisation de fluorophores dérivés du dicéto-pyrrolo-pyrrolle (DPP) pour la microscopie bi-photonique intravitale* », novembre 2011, **Rencontre ChiMi 2011 : « Chimie et microscopie : vers l'in vivo »**, Marseille-France.

Par affiches :

- Hussein FTOUNI, Doria ABED, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. « *Synthèse et caractérisation de fluorophores dérivés du dicéto-pyrrolo-pyrrolle (DPP) pour la microscopie bi-photonique* », Septembre 2010, **Ecole thématique : Microscopie Fonctionnelle en Biologie (MIFOBIO)**, Seignosse-France.

- Hussein FTOUNI, Doria ABED, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. « *Synthèse et caractérisation de fluorophores dérivés du dicéto-pyrrolo-pyrrole (DPP) pour la microscopie bi-photonique* », Mai 2011, **Les Journées du Campus d'Illkirch (JCI)**, Illkirch-France.

Publications :

- Hussein FTOUNI, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. « *Water soluble diketo pyrrolopyrroles for two-photon excited microscopy* ». Dyes and pigments, soumise.
- Hussein FTOUNI, Hugues de ROCQUIGNY, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD « *Functionalized two-photon absorbing diketopyrrolopyrrole fluorophores for in-vivo fluorescent microscopy* ». À soumettre à Bioconj. Chem.
- Hussein FTOUNI, Yannick SCHWAB, Frederic BOLZE, Jean-Francois NICOUD. “*diketo pyrrolopyrroles probes for correlative light-electron microscopy*”, manuscript en preparation.

LOISIRS

chasse, fitness, natation.

REFERENCES

Pr. **NICOUD Jean-François** (directeur de thèse)

☎ 03.90.24.42.76

E-mail : jfnicoud@unistra.fr

Dr. **BOLZE Frédéric** (co-directeur de thèse)

☎ 03.68.85.41.15

E-mail : frederic.bolze@unistra.fr

Dr. **RENAULT Jean-Hugues** (responsable M2)

☎ 03.26.91.34.03

E-mail : jean-hugues.renault@univ-reims.fr

Résumé: La fluorescence excitée à deux photons est actuellement largement utilisée pour l'imagerie de tissus biologiques, mais la faible sensibilité des fluorophores utilisés en microscopie confocale (excitation à un photon) à une excitation à deux photons (ADP) rend nécessaire la conception et la synthèse de nouveaux fluorophores spécifiques pour la microscopie de fluorescence par excitation bi-photonique (MFEB). Mon travail de thèse a ainsi porté sur l'ingénierie moléculaire (conception, synthèse et caractérisations) de nouveaux fluorophores pour la MFEB. Nous nous sommes particulièrement intéressés à des systèmes unidimensionnels (1D) de petite taille comportant des systèmes π étendus autour d'un cœur rigide (dicétopyrrolopyrrole ou DPP) et entourés de différents systèmes électro-actifs. Nous avons modifié par la suite les fluorophores précédents de manière à pouvoir les conjuguer à des molécules d'intérêt biologique, comme des protéines. Ces fluorophores bio-conjugables ont été greffés sur un peptide du virus HIV étudié au laboratoire : TAT (Trans-Activator of Transcription). L'imagerie par microscopie biphotonique a été effectuée avec succès sur des cellules HeLa. Nous nous sommes ensuite tourné vers la mise au point de nouvelles sondes multimodales pour associer la MEBP à une autre modalité d'imagerie : la résonance magnétique nucléaire et la microscopie électronique (imagerie corrélative). Pour ce faire nous avons développé des colorants fluorescents par excitation bi-photonique comportant une entité paramagnétique ou dense aux électrons (nanoparticules de magnétite, ion gadolinium III ou atomes lourds comme le platine et l'or,).

Abstract: Two-photon induced fluorescence is nowadays widely used for the imaging of biological tissues. The classical fluorophores used in confocal microscopy exhibit low sensitivity to two-photon excitation for the two-photon excitation microscopy (TPEM), led the researchers towards the development of new fluorophores, specifically engineered for TPEM. This manuscript describes our work on conception, synthesis and characterizations of new one-dimensional fluorophores based on dicétopyrrolopyrrole (DPP) central core, surrounded by various electro-active systems through π conjugated systems. We also modified such fluorophores to be able to conjugate them to molecules of biological interest, such as proteins. These bio-conjugable fluorophores were grafted on a peptide of HIV virus studied in our laboratory: TAT (Trans-Activator of transcription). The imaging by TPEM was successfully performed on HeLa cells. In addition we developed new multimodal probes for the correlative light electronic microscopy and for the correlative imaging fluorescence microscopy/ *Magnetic resonance imaging (MRI)*. Theses multimodal probes associate a fluorescent moiety based on the DPP core associated to a paramagnetic or electron dense entity (magnetite nanoparticles, gadolinium III or heavy atoms such as platinum or gold).