HAL
open science

Nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour les neurosciences

Sébastien Piant

▶ **To cite this version:**

Sébastien Piant. Nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour les neurosciences. Chimie organique. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAF062 . tel-01303737

HAL Id: tel-01303737

https://theses.hal.science/tel-01303737v1

Submitted on 18 Apr 2016

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Sébastien PIANT

soutenue le : **23 novembre 2015**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour les neurosciences

THÈSE dirigée par :

Mr. BOLZE Frédéric	Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. ANDRAUD Chantal	Docteur, ENS Université de Lyon
Mr. MONCHAUD David	Docteur, Université de Bourgogne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. CHASSAING Stefan	Docteur, ITAV, centre Pierre Potier, Toulouse
Mr. WEIBEL Jean-Marc	Professeur, Université de Strasbourg
Mr. SPECHT Alexandre	Docteur, Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Sébastien PIANT

soutenue le : **23 novembre 2015**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour les neurosciences

THÈSE dirigée par :

Dr. BOLZE Frédéric	Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. ANDRAUD Chantal	Docteur, ENS Université de Lyon
Dr. MONCHAUD David	Docteur, Université de Bourgogne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. CHASSAING Stefan	Docteur, ITAV, centre Pierre Potier, Toulouse
Pr. WEIBEL Jean-Marc	Professeur, Université de Strasbourg
Dr. SPECHT Alexandre	Docteur, Université de Strasbourg

« Ce n’est qu’en essayant continuellement que l’on finit par réussir…

En d’autres termes…

Plus ça rate et plus on a de chance que ça marche »

Les Shadoks

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'université de Strasbourg, au sein du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives dans l'équipe Chimie et Neurobiologie moléculaire codirigé par Dr. Alexandre Specht et Dr. Thomas Grutter que je remercie une première fois pour leur accueil.

Je remercie vivement Dr. Chantal Andraud, Dr. David Monchaud, Dr. Stefan Chassaing et Pr. Jean-Marc Weibel, pour avoir accepté de juger ce travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je voudrais commencer par remercier mon directeur de thèse Frédéric sans qui tous cela n'aurait pas été possible. Merci pour ton inépuisable énergie aura su me rebooster dans les moments de doute, merci également pour les nombreux débats scientifiques que nous avons partagé. Merci de m'avoir fait découvrir de nouveaux horizons scientifiques mais aussi géographiques. Ta passion et tes expériences hors-normes me laisseront un souvenir inoubliable.

Je tiens à remercier chaleureusement Alexandre qui m'a accueilli au sein de son laboratoire dès le master et m'a fait confiance pour le doctorat. Merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances et ton savoir-faire, merci pour ta disponibilité et ton écoute. Nos débats sur les nouvelles technologies me manqueront et n'oublions pas que nous avons l'idée du siècle à développer. ;-)

Je voulais également remercier Thomas qui a été disponible pour toutes les questions de biologie que j'ai pu me poser. La pertinence de tes questions lors des séminaires a été une source de motivation pour toujours approfondir les sujets abordés.

Thierry, je te remercie pour ton humour décalé et les discussions mouvementées que l'on a pu avoir. Merci pour ta bienveillance lors des dernières semaines de rédaction.

Adeline, Damien et Chloé, merci pour ce quatuor d'enfer que nous avons formé pendant quelques années, les soirées, les commérages et les fous rires garderont une place privilégiée dans ma mémoire et je sais que ce ne seront pas les derniers.

Adeline merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, tu as su partager ton savoir-faire et ton amour du travail bien faits. Damien tu as été un modèle de persévérance, qui m'as beaucoup inspiré et merci d'avoir pris le temps de partager tes connaissances malgré une dernière année thèse très mouvementé. Chloé, je suis heureux d'avoir pu partager cette aventure avec toi, le fait de pouvoir échanger avec quelqu'un dans la même situation a été une aide précieuse pendant toute cette thèse. Merci de m'avoir transmis un peu de ta passion pour les jeux de société et vivement la prochaine partie.

Mahboubi merci pour ton enthousiasme et ton soutien permanent, ta volonté à toujours vouloir m'aider m'a beaucoup touché. Merci d'avoir partagé ma passion du cinéma et des séries, nos débats hebdomadaires sur l'épisode de la veille ont été un réel plaisir.

Merci à Bastien et Laurie qui m'ont laissé jouer les « petits » chefs dans le laboratoire, nos échanges au quotidien m'ont beaucoup apportés. Bastien merci de m'avoir aidé pour quelques

manipulations, cela m'a fait gagner un temps précieux et merci d'avoir été un partenaire et un rival d'exception sur les courts de squash, à quand notre prochaine échange interminable.

Je souhaiterais également remercier tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire et que j'ai formé de près ou de loin, Mike, Vuk, Giuseppe, Damien… désolé pour ceux que j'oublie.

Mes sincères remerciements au Dr. Antoine Taly qui a su mettre son professionnalisme et son savoir-faire à notre service pour le criblage virtuel. Je remercie également les personnes avec qui j'ai collaboré autour de ce projet, Cyril, Patrick, Barbara, Justine, Stéphanie.

Je tiens remercié particulièrement ma famille qui m'a donné les outils pour arriver jusqu'ici, mes grands-parents pour m'avoir transmis leurs valeurs, mes tantes pour leurs incroyables patiences, ma marraine Françoise pour son soutien constant et mes sœurs Laëtitia et Amandine pour leurs bonnes humeurs et leurs complicités. Je voudrais remercier mes parents qui m'ont donné l'opportunité d'avoir le choix de mon avenir, particulièrement ma maman qui est pour moi un modèle de ténacité et qui m'a toujours soutenu.

Je tenais également à remercier ma belle-famille Marie-Rose, Jean-Marie, Vincent, Céline, Elise, et Frédéric pour leur précieux conseil et leur gentillesse.

Mes plus sincères remerciements à mes amis Jordan, Nicolas, Amélie, Frédéric, Matthieu, Mathilde, Mikael, Amélie H., Jérémy, Amandine, Kevin, Julien G., Laura, Sylvain, Céline, Grégory, Samantha, Thierry et Valentin qui sont resté malgré les épreuves et le peu de temps que j'ai pu leur consacrer ces derniers mois. Les moments partagés ont été une bouffé d'oxygène pour tenir bon au cours de ce projet.

Enfin, je voudrais adresser à ma femme Hélène le sentiment de ma gratitude la plus intense. Son amour et son soutient ont véritablement été ma principale source d'énergie et de motivation pour travailler pendant ces trois ans. Ton parcours admirable n'a cessé de m'inspirer lors des longues soirées au laboratoire. Merci du dévouement dont tu as fait preuve pendant ces derniers mois et merci de rendre ma vie aussi belle.

Merci à toi qui lis cette partie ! En espérant que ton nom y figure sinon je te remercie aussi et pardon pour l'oubli.

Encore merci à tous !!!

ABBREVIATIONS

ACh	Acétlcholine
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Absorption à deux photons
AGRP	Aglouti related protein
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BEF-pyr	Bis-pyridiniuméthylnyl fluorène
Bhc	Bis-hydroxycoumarin
BIP	Biphényle
BNS	Bis-nitro-stilbène
BNSF	Bis-nitro-stilbène-fluorène
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyle
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CCS	Carte cognitive spatial
CDNI	α-Carboxy-2-nitroindoline
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CNB	Carboxy-nitrobenzyle
DCC	Dicyclohexylurée
DDAO	7-Hydroxy-9H-(1,3-Dichloro-9,9-Dimethylacridin-2-One
DEAC	Diéthylaminocoumarine
DEL	Diode électroluminescente
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIBAL	Hydrure de diisobutylaluminium
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	N,N'-Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMAQ	(2-Hydroxyméthylène-(N,N-diméthylamino)quinoline)
DMF	Diméthylformamide
DMNPB	4,5-Diméthoxynitrophénylbenzyle
DMSO	Diméthylsulfoxide
DOX	Doxorubicine
DPENB	di-PENB
EANBP	2-(4'-(bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol
FA	acide folique
GABA	acide γ-aminobutyrique

GFP	Protéine fluorescente verte
Glu	Acide L-glutamique
Gly	Glycine
GPP	Groupement protecteur photolabile
HMS	Hexagonal mesoporous silica
HoBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IP3	Inositol triphosphate
IPD	Ion pore domain
LBD	Ligand binding domain
LGIC	Ligand gated ion channel
MNI	Méthoxy-nitroindole
Mpa	Acide *para*-méthoxyphényle
NIR	Proche infrarouge
o-NB	*ortho*-Nitrobenzyle
o-NPE	*ortho*-Nitrophénhyl éthyle
o-NPP	*ortho*-Nitrophénéthyle
ONL	Optique non linéaire
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	Solution de tampon phosphate
PENB	3-(2-propyl)-4'-Trisethoxy(methoxy)-4-nitrobiphenyl
PeT	Transfert d'électron photoinduit
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAS	Acide sulfoacétique
SNC	Système nerveux central
TA	Température ambiante
TBAB	Bromure de *tétra*-butylammonium
TEG	Triéthylène glycol
TFA	Acide trifluoroacétique
TPENB	*tétra*-PENB
UA	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet

Table des matières

CHAPITRE I
INTRODUCTION

I.1. Les groupements protecteurs photolabiles 3
I.1.1. Dévelopements pour la synthèse organique 3
I.1.2. Régulation de processus biologiques 4
I.1.3. Paramètres photophysiques et photochimiques 6
I.2. Optique non linéaire 7
I.2.1. Théorie 7
I.2.2. Absorption multi-photonique 8
I.2.3. Paramètres photophysiques et photochimiques 12
I.2.4. Ingénierie moléculaire de chromophores sensibles à l'excitation à deux photons 13
I.3. Applications de l'absorption à deux photons 18
I.3.1. Imagerie 18
I.3.2. Microfabrication 19
I.3.3. Systèmes de délivrance : Micelles et polymères 21
I.3.4. Applications aux neurosciences 23
I.4. Projet 26

CHAPITRE II
ETUDES PRELIMINAIRES

II.1. Introduction 33
II.2. Synthèse 36
II.2.1. Dimère non conjugué 36
II.2.2. Tétramère non conjugué 37
II.3. Etude photophysique et photochimique des dimères et tétramères non conjugués 41
II.4. Conclusion préliminaire 44
II.5. Alternative 47

CHAPITRE III
DENDRIMERE DE TYPE PAMAM

III.1. Introduction 51
III.2. PAMAM G0/G1 53
III.2.1. Synthèse 53

III.2.2. Caractérisation 55
III.2.3. Etudes des paramètres photophysiques et photchimiques 65
III.3. Glutamate cagé 70
III.3.1. Synthèses et caractérisations 70
III.3.2. Etude des paramètres photophysiques et photochimiques 74
III.4. Conception de système hybride 80
III.4.1. Phénomène de coopération 80
III.4.2. Préparation de PAMAM hybride sulfatés et pegylés 85
III.4.3. Caractérisation 87

CHAPITRE IV
QUINUCLIDINE ET INHIBITION NEURONALE

IV.1. Introduction 93
IV.2. Synthèse 97
IV.3. Criblage Virtuel 99
IV.4. Expériences *in vitro* et *in vivo* 101

Conclusion 105

Partie expérimentale 109
1.Matériels et appareillages 111
2.Synthèses 113

Références 141

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I.1. Les groupements protecteurs photolabiles

I.1.1. Développements pour la synthèse organique

Les groupements protecteurs photolabiles (GPP), également appelés « cages », sont des molécules possédant un chromophore capable de conduire à la rupture d'une liaison suite à un *stimulus* lumineux. Ils sont liés de manière covalente à une fonction chimique qui est ainsi masquée ou protégée. Après une excitation lumineuse, la molécule dans un état excité va subir un réarrangement électronique qui conduit au clivage spécifique d'une liaison, régénérant la fonction chimique qui a été protégée[1]. Comme la déprotection ne nécessite pas l'emploi de réactif chimique, ces GPP présentent une bonne compatibilité vis à vis de fonctions chimiquement sensibles et sont orthogonaux par rapport aux groupements protecteurs utilisés en synthèse organique. En revanche, ils ne pourront pas être utilisés avec des molécules photosensibles sous peine de conduire à la dégradation du composé étudié. La longueur d'onde d'irradiation et les conditions de photolyse sont deux des paramètres qui permettent d'obtenir une sélectivité de déprotection si plusieurs groupements photosensibles différents sont utilisés (Figure 1) (orthogonalités chromatiques).[2]

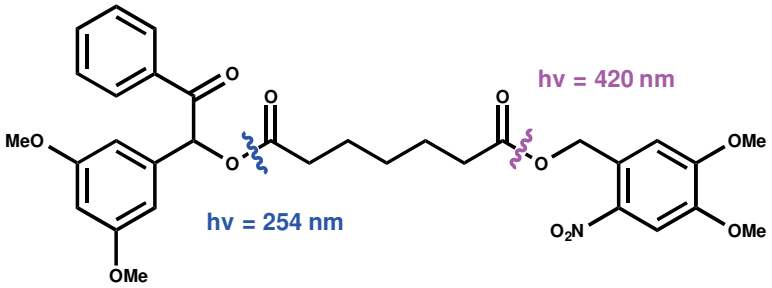


Figure 1. *Déprotection sélective de deux groupements protecteurs photolabiles différents en fonction de la longueur d'onde d'irradiation.*[2]

Plus récemment, une évolution dans les dérivés de type *ortho*-nitrobenzyle (*o*-NB) a permis de moduler la déprotection en fonction du pH ou en présence de métaux. Il s'est avéré que lorsqu'un groupement aminé est placé en *para* du groupement nitro, le composé peut adopter une forme préférentielle photostable qui ne conduit pas à la rupture d'une liaison. Il sera nécessaire d'ajouter un acide ou un métal pour régénérer la sensibilité à la lumière et conduire à la photolibération du composé attendu (Figure 2). En effet, l'acide de Lewis ou de Brönsted empêchera l'amine d'opérer le transfert de charge responsable de la forme photostable. On peut ainsi obtenir une déprotection sélective en fonction des conditions expérimentales autres que le choix de la longueur d'onde d'excitation.[3]

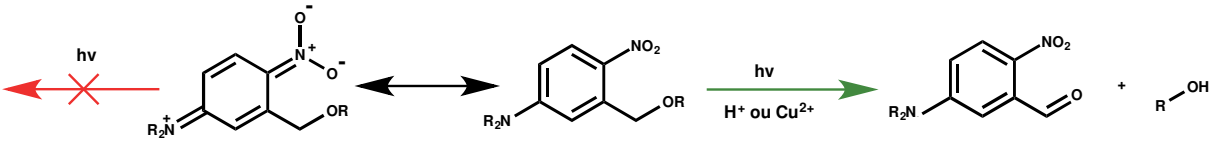


Figure 2. *Sélectivité des conditions de photolyse pour les dérivés ortho-nitrobenzyles aminés.*[3]

La diversité des groupements protecteurs photosensibles permet aujourd'hui de protéger un large choix de fonctions chimiques (acide carboxylique, amine, alcool, phosphate, sulfate,

thiol, …) mais également d'avoir accès à une large gamme de longueur d'onde d'irradiation (Figure 3). [4,5]

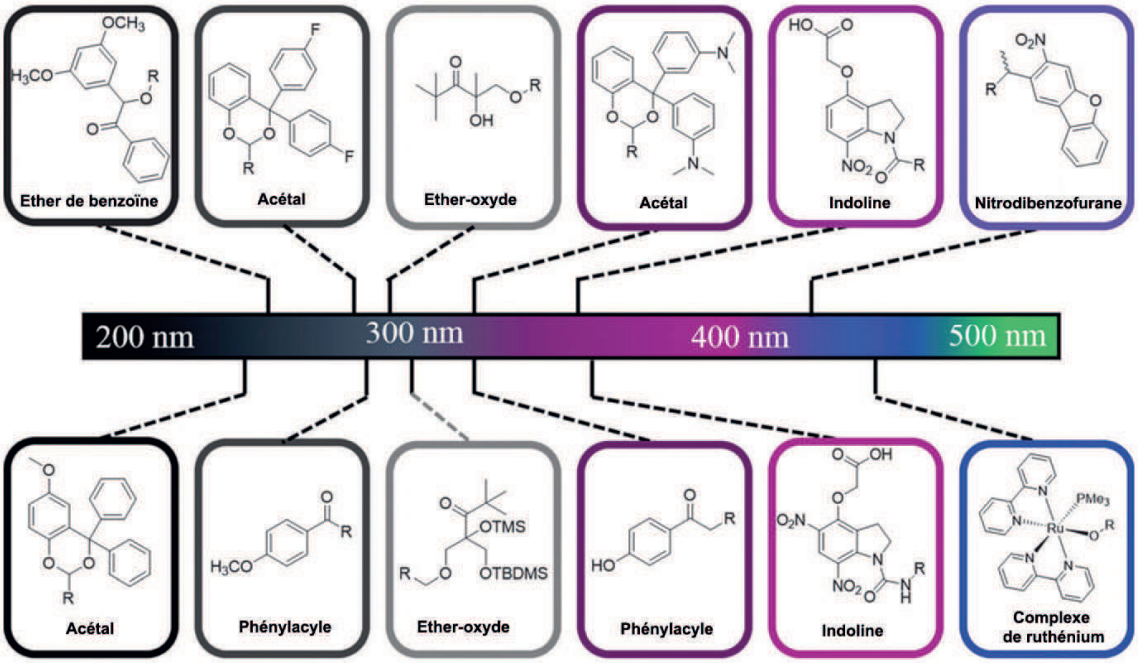


Figure 3. *Représentation de différents groupements protecteurs photosensibles avec un maximum d'absorbance entre 220 et 450 nm.*[4]

I.1.2. Régulation de processus biologiques

Les processus biologiques sont régis par des séries d'événements physiologiques qui se produisent avec une précision spatio-temporelle très élevée. Pour bien comprendre ces phénomènes, il faut être capable de reproduire ou perturber ces cascades physiologiques avec la même précision et de manière orthogonale au milieu biologique, c'est à dire avec un outil capable d'interagir uniquement avec la molécule photosensible. La précision nécessaire pour ces études peut être obtenue grâce à la lumière, et plus précisément grâce aux GPP. Cette fois le GPP sera lié de manière covalente à un effecteur biologique conduisant à un composé dit « cagé » (ou « caged compound » en anglais), qui idéalement ne doit plus présenter d'activité biologique. Une irradiation lumineuse va provoquer la libération de l'effecteur biologique et produire un saut de concentration localisé qui pourra engendrer une réponse biologique spécifique à l'effecteur étudié (Figure 4). Ce processus est métaphoriquement appelé « uncaging ». Idéalement, le GPP devra être soluble en milieu biologique, stable à l'hydrolyse et sa photo-déprotection devra s'effectuer de manière efficace. De plus, le produit secondaire formé ne devra pas interférer avec la photo-déprotection en cours et si possible être inerte biologiquement durant la durée de l'expérience. Enfin, la libération de la biomolécule devra être rapide et en accord avec l'échelle de temps du processus biologique étudié[6]. En effet, à cause du phénomène de diffusion en milieu biologique une cinétique de photolyse lente provoquerait une perte du contrôle spatial apporté par les GPP.

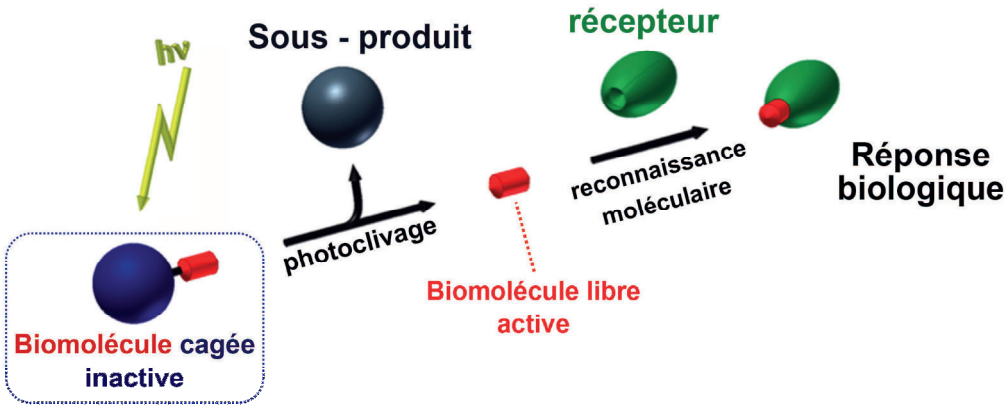


Figure 4. *Principe de photodéprotection ou « uncaging » d'une biomolécule.*

Les groupes d'Hoffmann et Schlaeger ont mis au point les premiers composés « cagés » en associant respectivement l'adénosine triphosphate (ATP)[7] et l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP)[8] à un *o*-NB (Figure 5). De cette façon, l'équipe d'Hoffmann a réussi à activer la pompe Na : K ATPase tandis que l'équipe de Schlaegger a étudié l'activation d'une protéine kinase cAMP dépendante.

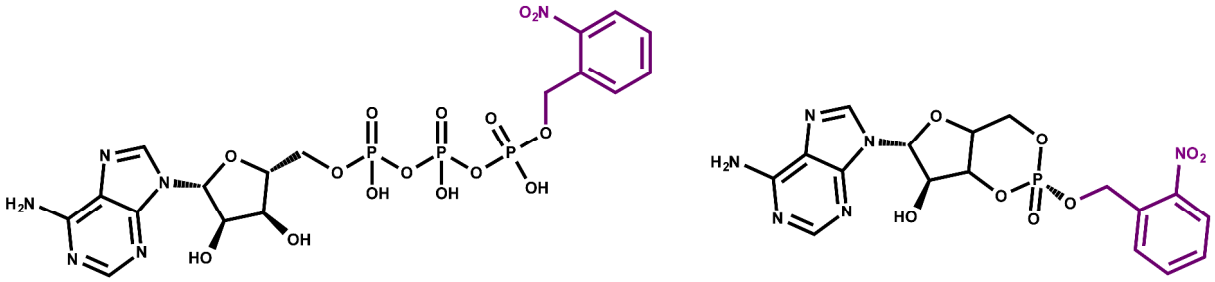


Figure 5. *ATP (gauche) et cAMP (droite) cagées avec l'ortho-nitrobenzyle (violet)*

Ces deux études ont réellement démontré l'utilité des composés cagés en biologie. Par la suite, de nombreux physiologistes ont utilisé ces chromophores pour une grande variété d'effecteurs biologiques tels que les inositols triphosphates (IP_3), la guanosine monophosphate cyclique (cGMP), l'ion calcium II, les neurotransmetteurs, les peptides, les lipides, les protéines, l'ARN ou encore l'ADN[9]. De nouvelles familles de groupements photolabiles sont également apparues comme alternatives aux *o*-NB.[10,11] Les coumarines, indolines ou quinoléines possèdent les propriétés photochimiques nécessaires pour l'« uncaging » (Figure 6). Ainsi de nombreux dérivés ont été synthétisés afin d'optimiser les propriétés photophysiques et photochimiques de ses systèmes. Cependant, la série des groupements nitro-aromatiques reste la plus répandue, renforcée par la description de dérivés toujours plus efficaces. Par exemple, le groupement *ortho*-nitrophényl-éthyle (*o*-NPE) est libéré plus rapidement et possède un sous-produit dont la toxicité envers les milieux biologiques est plus faible que son homologues *ortho*-nitrobenzyle[10].

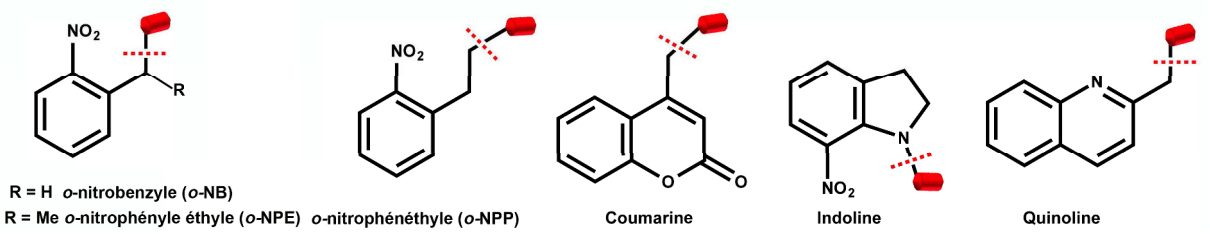


Figure 6. *Différentes familles de groupements protecteurs photolabiles utilisés pour photoréguler des processus biologique.*

I.1.3. Paramètres photophysiques et photochimiques

Plusieurs paramètres photophysiques et photochimiques doivent être déterminés pour évaluer la qualité d'un GPP. Le coefficient d'extinction molaire ε et le rendement de libération $\boldsymbol{R_{lib}}$ sont déterminés en premier car ils donnent une bonne indication à la fois de la capacité du chromophore (ε) à absorber les photons et à libérer la substance d'intérêt ($\boldsymbol{R_{lib}}$) du composé. Autre paramètre important, le rendement quantique de photolibération $\boldsymbol{\Phi_u}$ correspond au nombre de molécules effectuant la déprotection (parmi les autres possibilités de désexcitation), par rapport aux nombres de photons absorbés par molécule. Enfin, l'efficacité (ou section efficace) d'un GPP en excitation à un photon s'exprime par le produit $\boldsymbol{\varepsilon.\Phi_u}$ exprimé en $M^{-1}.cm^{-1}$, c'est l'analogie de la brillance pour un fluorophore ($\boldsymbol{\varepsilon.\Phi_{fluo}}$).

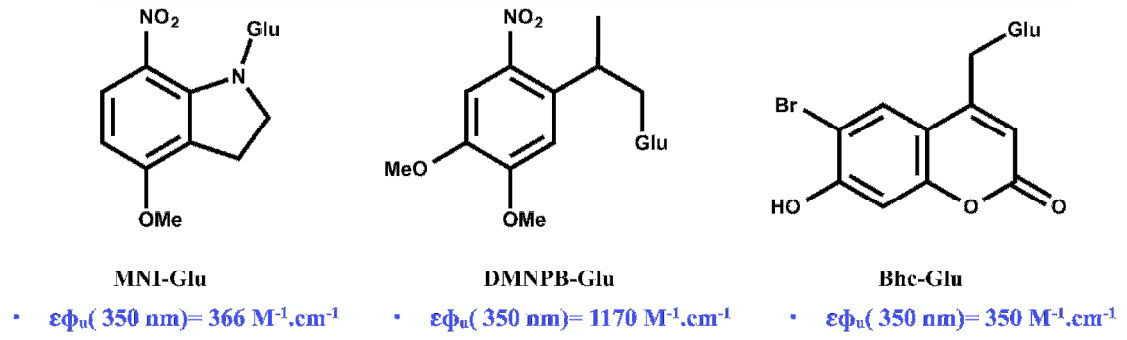


Figure 7. *Efficacité à un photon de différents GPP libérant du glutamate.*[12]

Pour initier la réaction de photolibération, une excitation par des rayonnements UV, produite grâce à un laser ou une DEL est souvent utilisée. Habituellement, une irradiation de quelques secondes à une longueur d'onde au plus proche du maximum d'absorbance de la molécule permet d'obtenir une libération efficace pouvant induire une réponse biologique. Des découvertes significatives dans différents domaines comme les neurosciences[6,11] ou l'embryologie[13] ont été obtenues grâce à l'utilisation de GPP. Cependant, les rayonnements UV utilisés comme déclencheur sont fortement nocifs pour les milieux biologiques et possèdent une résolution limitée. De plus, la diffusion des rayons UV dans les tissus vivants ne permet pas d'irradier en profondeur, quelques dizaines de μm en conditions optimales. Une partie de ces problèmes peut être résolu en utilisant une méthode d'excitation particulière, relevant de l'optique non-linéaire, appelée absorption à deux photons.

I.2. Optique non linéaire

I.2.1. Théorie

L'interaction entre un champ électrique associé à une onde lumineuse et la matière est responsable d'une polarisation qui varie en fonction de l'amplitude du champ. A l'échelle macroscopique la polarisation P_i d'un matériau peut s'exprimer en fonction d'un développement limité du champ électrique E porté par la lumière excitatrice, P_0 étant la polarisation permanente et $\chi^{(i)}$ représentant les susceptibilités électriques d'ordre (i) (Equation 1).

$$P_i = P_0 + \chi^{(1)}.E + \chi^{(2)}.E^2 + \chi^{(3)}.E^3 \ldots \quad (1)$$

A l'échelle microscopique, plus précisément au niveau moléculaire, une expression analogue exprimant le moment dipolaire d'une molécule μ_i en fonction de E peut être écrite (Equation 2) :

$$\mu_i = \mu_0 + \alpha.E + \beta.E^2 + \gamma.E^3 \ldots \quad (2)$$

où μ_0 est le moment dipolaire permanent, α est la polarisabilité, β l'hyperpolarisabilité quadratique et γ l'hyperpolarisabilité cubique.
Si le champ électrique appliqué E est faible, comme c'est le cas pour les sources lumineuses communes, seuls les termes d'ordre 0 et 1 sont considérés, les termes d'ordres supérieurs étant négligeables. On obtient ainsi les équations linéaires 3 et 4:

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

$$\mu_i = \mu_0 + \alpha.E \quad (4)$$

Dans ce cas, il y a proportionnalité entre la polarisabilité du matériau et le champ électrique appliqué, c'est le domaine de l'optique linéaire. Ces équations sont à la base de phénomène bien connus comme la réfraction, la biréfringence ou encore l'absorption d'un photon.
Les termes d'ordres 2 et supérieurs vont être considérés dans le cas d'un champ électrique intense, comme une irradiation par un laser pulsé notamment. Il n'y a plus proportionnalité entre la réponse du matériau et le champ électrique ainsi la réponse du matériau devient non-linéaire, c'est le domaine de l'optique non linéaire (ONL) (Figure 8).

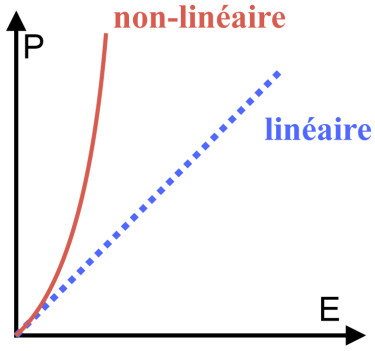


Figure 8. *Polarisation d'un matériau en fonction du champ électrique appliqué*

Les termes de second ordre β et $\chi^{(2)}$ caractérisent les phénomènes ONL quadratiques, dont le plus connu est la génération de second harmonique.[14] En ce qui concerne l'absorption à deux photons (ADP) qui nous intéresse plus particulièrement ici, ce sont les termes du troisième ordre qui sont concernés γ et $\chi^{(3)}$ et l'on parle d'optique non-linaire cubique. Des restrictions de symétrie importantes en ONL sont à considérer. En effet les matériaux ou molécules centrosymétriques verront les termes d'ordre pair disparaître dans les équations **1** et **2** alors que les termes d'ordre impair ne seront pas influencés par ce paramètre.

non centrosymétrique

$$\mu_i = \underbrace{\mu_0 + \alpha.E}_{\text{optique linéaire}} + \underbrace{\overbrace{\beta.E^2}^{\text{second harmonique}} + \overbrace{\gamma.E^3}^{\text{ADP}} \ldots}_{\text{optique non linéaire}} \quad (2)$$

centrosymétrique

$$\mu_i = \alpha.E + \gamma.E^3 \ldots \quad (5)$$

Ainsi pour obtenir des molécules ayant une réponse en ONL cubique, en particulier pour l'ADP, il n'est pas nécessaire de prendre en compte la symétrie du système mais en revanche pour obtenir une réponse en ONL quadratique, il sera nécessaire d'envisager des molécules et des matériaux non centrosymétriques.

I.2.2. Absorption multi-photonique

Afin de passer de l'état fondamental à un état excité, une molécule doit absorber de l'énergie. Cette énergie peut être thermique, électrique, mécanique ou encore lumineuse. Dans le cas d'une excitation lumineuse, la molécule doit absorber une énergie $\Delta E = h\upsilon$ qui correspond à la différence d'énergie entre les deux états considérés. Généralement, cette énergie est fournie par un photon, c'est le cas de l'absorption classique qui relève de l'optique linéaire, et vérifie la loi de Beer-Lambert. Néanmoins, il est également possible d'absorber deux photons, d'énergie identique ou différente avec un processus qui relève de l'optique non-linéaire. L'absorption à deux photons correspond à l'absorption par une molécule de deux photons quasi-simultanément[15] (<fs) dont la somme des énergies lui permet de passer de l'état fondamental à l'état excité. C'est ce phénomène qui va nous intéresser pour cette étude. L'absorption de plus de deux photons est aussi possible, on parle ainsi d'absorption à trois photons ou d'absorption multi-photonique (Figure 9). Maria Goeppert-Mayer avait prédit théoriquement ce phénomène dès 1931[16] et la mise au point des lasers pulsés au début des années 1960 permit à Kaiser et Garrett[17] d'observer expérimentalement une fluorescence sur un cristal de CaF_2 dopé aux ions Eu^{2+} sous excitation à deux photons avec un laser à rubis.

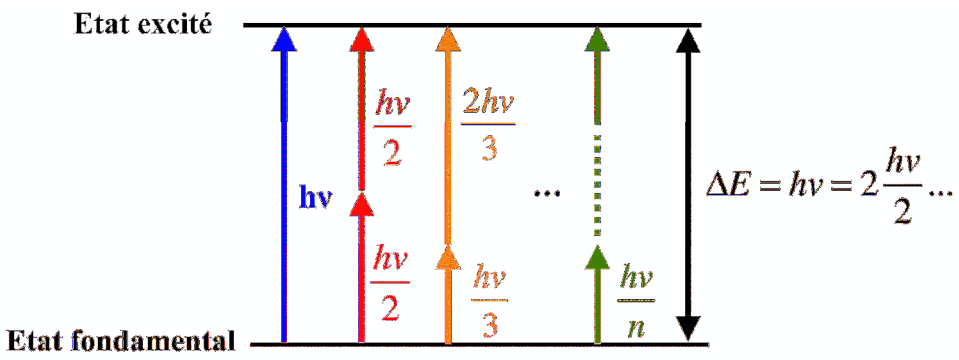


Figure 9. *Excitation par absorption mono- et multi-photonique*

Pour la suite de l'étude, nous ne considérerons que l'absorption de photons de même énergie. Pour une excitation comprenant une seule source lumineuse, on peut exprimer la probabilité d'absorption multiphotonique P selon l'équation :

$$P = \frac{1}{n}\sigma_n I^n \quad (6)$$

où n correspond au nombre de photon absorbés et σ_n à la section efficace d'absorption à n photons. Dans le cas qui nous intéresse ici, l'ADP ($n=2$), P aura une dépendance quadratique par rapport à l'intensité :

$$P = \frac{1}{2}\sigma_2 I^2 \quad (7)$$

avec σ_2 la section efficace d'ADP exprimée en GM (1 GM = 10^{-50}cm^4.s.photon^{-1}). Il est important de noter que la section efficace d'ADP est relié aux différents moments dipolaires de transitions (équation 8, Figure 10)[18] :

$$\sigma_2 \propto \frac{\boldsymbol{\mu_{gi}^2 \mu_{if}^2}}{\boldsymbol{\Delta^2}} \quad (\mathbf{8})$$

où g correspond à l'état fondamental, i à l'état intermédiaire et f l'état excité, μ à l'amplitude d'oscillation du moment dipolaire et Δ, qui dans le cas d'un chromophore centrosymétrique correspondra à l'écart énergétique entre l'énergie du premier photon absorbé et l'état intermédiaire, alors que pour une molécule non-centrosymétrique l'état intermédiaire n'existe pas, donc Δ sera directement relié à la constante Γ qui correspond à la largeur à mi-hauteur du spectre d'absorption à deux photons, exprimé en énergie.

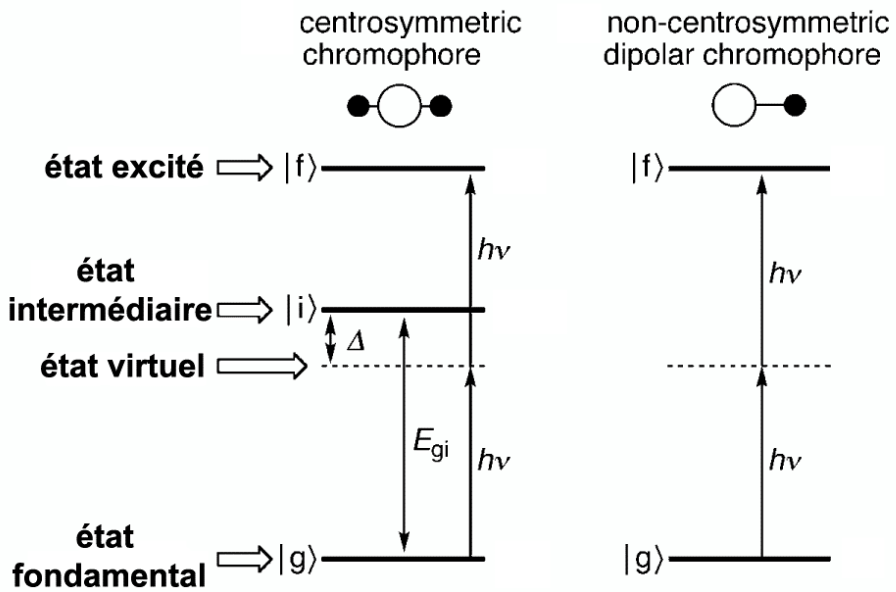


Figure 10. *Diagramme des principaux états énergétiques pour un chromophore centrosymétrique et non-centrosymétrique.* [18]

La dépendance quadratique de la probabilité de transition P vis à vis de l'intensité lumineuse I est directement responsable de la résolution spatiale très élevée induite par une absorption à

deux photons. En effet, ce phénomène ne sera détectable que si le nombre de photons arrivant simultanément sur la molécule est très important. Dans les dispositifs classiques, l'utilisation de lasers pulsés permet une compression temporelle des photons, les plus répandu sont les lasers titane : saphir. Habituellement, des pulses durant environ 100 fs avec une fréquence de 80 MHz et une puissance variant de 10 à 25 mW sont utilisés. Cette compression temporelle est associée à une compression spatiale par une lentille ou un objectif de microscope, ainsi l'excitation à deux photons n'aura lieu qu'au point focal. Le point focal est un volume de quelques femtolitres[12], voire moins, où la densité de photon est assez élevée pour que la probabilité qu'une molécule absorbe simultanément deux photons soit significative. Ainsi, l'excitation à deux photons permet d'obtenir des résolutions 3D très élevées où la profondeur d'irradiation (axe z) est contrôlée, contrairement à l'excitation à un photon où l'ensemble du trajet optique est excité (Figure 11, Figure 12).

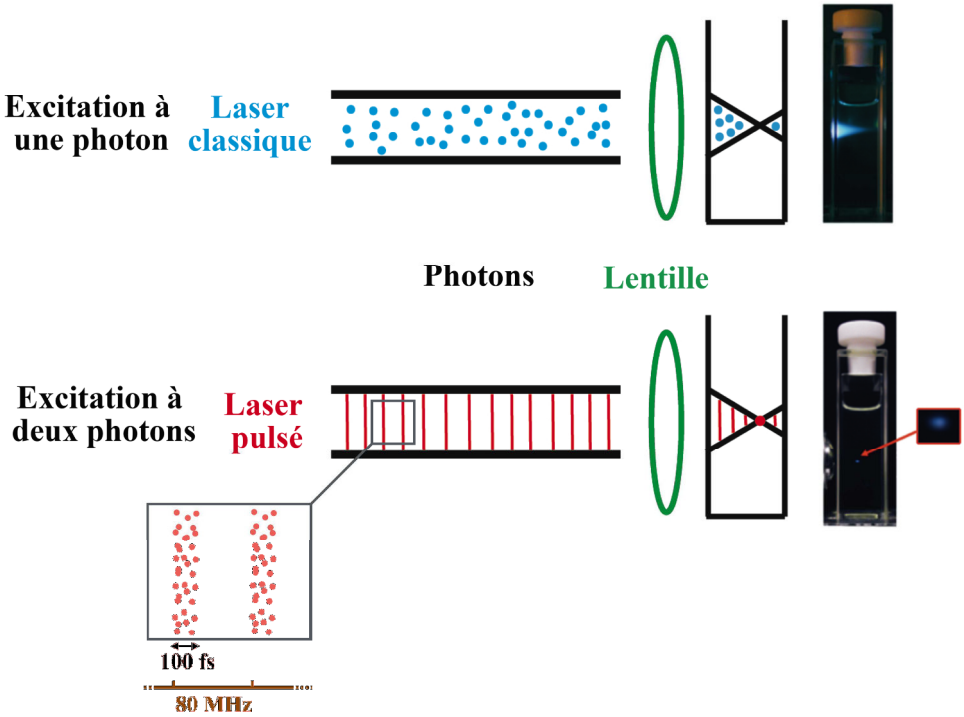


Figure 11. *Excitation à un et deux photons d'un fluorophore*

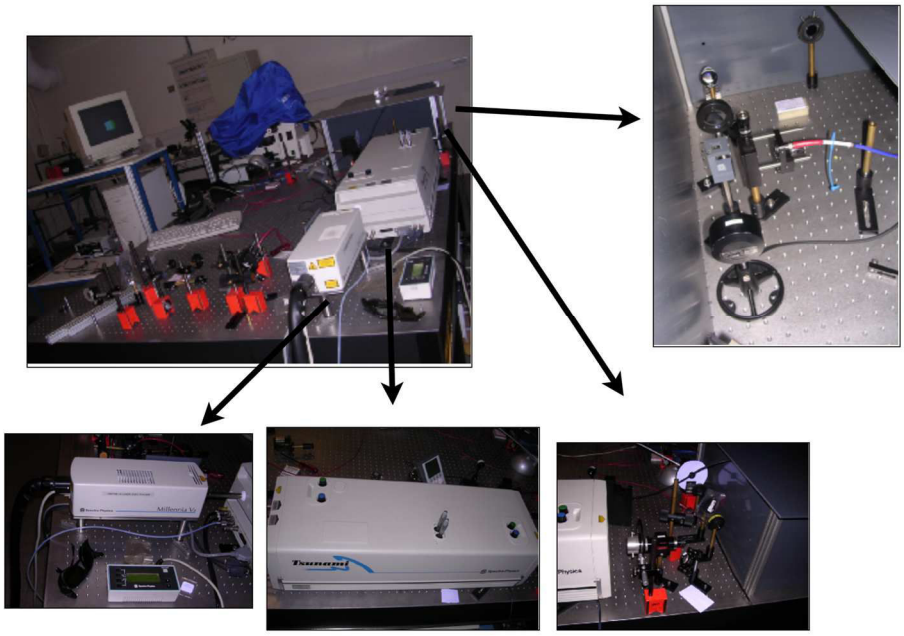


Figure 12. *Photo d'une installation pour la détermination des σ_2.*

L'excitation d'un composé par un laser va s'effectuer, dans la mesure du possible, à son maximum d'absorbance (λ_{max}) avec une énergie $E = \frac{hv}{2}$, définie précédemment, pour une excitation à deux photons de même énergie. Lorsqu'il s'agit d'une onde, la fréquence peut être définie par :

$$v = \frac{\lambda}{c} \quad (9)$$

où λ est la longueur d'onde et c la célérité de l'onde, pour une onde lumineuse cela correspond à la vitesse de la lumière. Ainsi, si l'énergie est exprimée en fonction de la longueur d'onde on obtient :

$$2\lambda = \frac{hc}{E} \quad (10)$$

On constate que pour les mêmes niveaux énergétiques le fait de passer d'une excitation monophotonique à une excitation biphotonique va multiplier la longueur d'onde d'excitation par deux. De plus, les excitations à un photon s'effectuent généralement entre 350 et 500 nm dans la gamme des rayonnements UV et une partie du spectre visible, l'excitation à deux photons nécessitera des longueurs d'ondes allant de 700 à 1000 nm, soit des rayonnements infrarouges (IR). L'utilisation de rayonnement IR présente plusieurs avantages, en particulier le fait de se situer dans la fenêtre de transparence des tissus vivants (Figure 13). C'est une gamme spectrale allant de 600 à 1200 nm où les principaux chromophores biologiques ont une absorbance faible. Cela va permettre des irradiations plus profondes dans les tissus vivants,[19] jusqu'à plusieurs mm en conditions optimales, et également une diminution de la phototoxicité[20,21] qui est principalement due à l'utilisation de lumière UV très énergétique dans le cas de l'excitation classique. De plus, le laser pulsé va engendrer un flux discontinu de photons, la chaleur va ainsi pouvoir se dissiper entre chaque pulse et par conséquent sur des irradiations prolongées la thermo-toxicité de l'excitation à deux photons sera très faible comparée à celle de l'excitation à un photon continue.

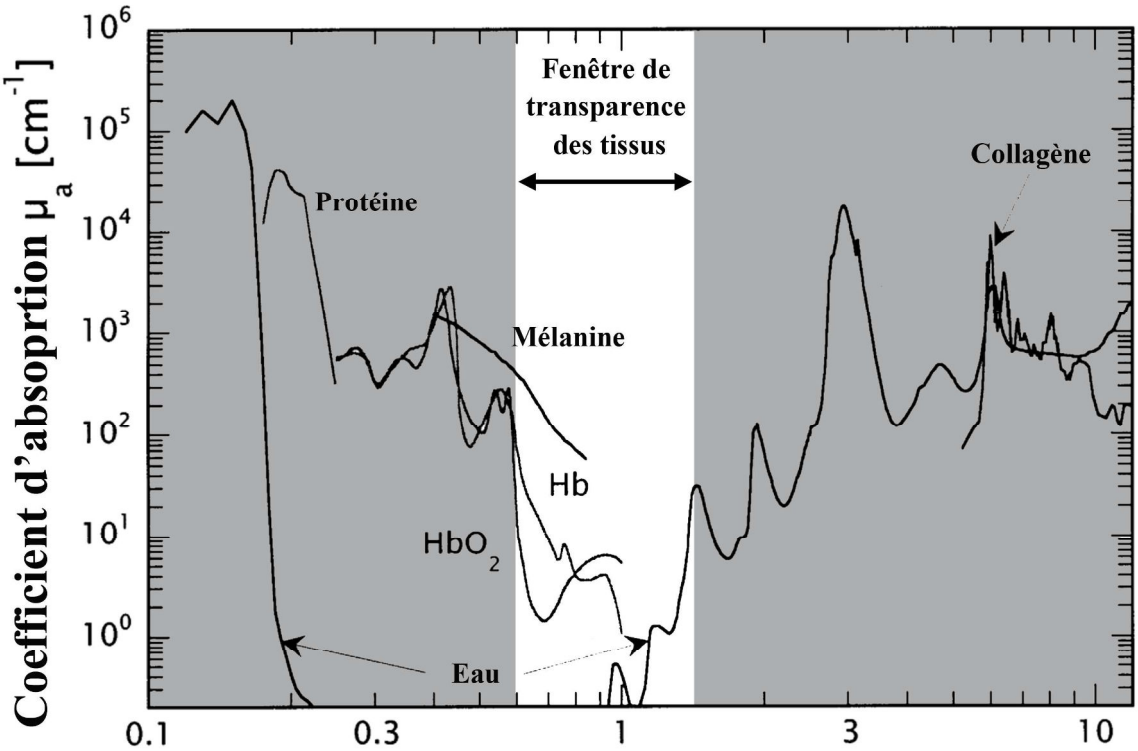


Figure 13. *Coefficient d'absorption optique des principaux chromophores des tissus vivants de 0.1 à 12 µm.*[20]

Pour conclure cette section, l'excitation à deux photons présente de nombreux avantages : résolution 3D élevée, faible photo-toxicité/thermo-toxicité et irradiation en profondeur. C'est une méthode de choix pour les études *in vitro* et *in vivo.* Voyons maintenant quelques paramètres qui permettent de déterminer l'efficacité d'un GPP vis à vis d'une excitation à deux photons.

I.2.3. Paramètres photophysiques et photochimiques

En excitation à deux photons l'efficacité d'un composé sera déterminée par la section efficace de photolibération (δ_u) défini par :

$$\delta_u = \delta_a \Phi_u \quad (11)$$

où δ_a est la section efficace d'absorption à deux photons exprimée en GM (également nommée σ_2 ou δ selon les sources) et Φ_u le rendement quantique (Figure 14).

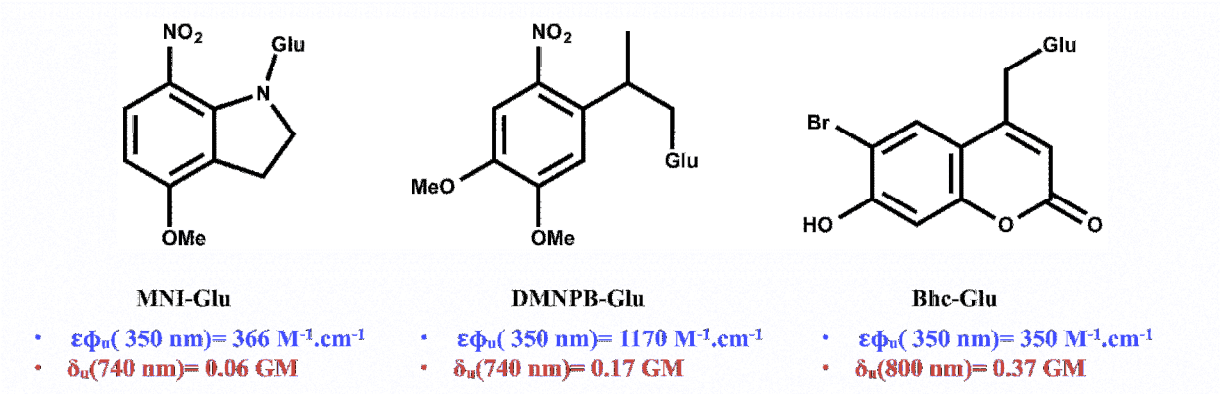


Figure 14. *Efficacité à un et deux photons de différents GPP libérant du glutamate.*[12]

I.2.4. Ingénierie moléculaire de chromophores sensibles à l'excitation à deux photons

Les groupements photosensibles synthétisés pour l'utilisation sous excitation à un photon, présentés dans la première partie, se montrent peu efficaces sous excitation à deux photons.[12] C'est en 1999 dans l'équipe de Tsien[22] que le premier GPP efficace en excitation à deux photons est mis en applications. Un dérivé de coumarine, le Bhc, est combiné avec un neurotransmetteur, le glutamate, pour donner un composé capable de provoquer l'activation des neurones. Par la suite, Kasai et son équipe vont affiner la technique et mimer la libération d'un neurotransmetteur sur une synapse unique grâce au MNI-Glu et à un laser pulsé à 720 nm.[23] Suite à cela, une nouvelle génération de composés a été synthétisée, ce qui a permis de mettre en évidence certains paramètres permettant une augmentation de la sensibilité à l'excitation à deux photons. Portés par les applications en sciences des matériaux, de nombreux principes généraux d'ingénierie moléculaire ont été déterminés afin d'optimiser les propriétés d'absorption à deux photons de molécules organiques[24]. Ce sont les mêmes principes qui ont été utilisés pour l'optimisation des cages sensibles à une excitation biphotonique. La majorité des composés utilisés pour l'uncaging sont des dipôles non-centrosymétriques de type électrodonneur – système conjugué π – électroattracteur (D-π-A). Ces systèmes sont aussi appelés « push-pull » (Figure 15).

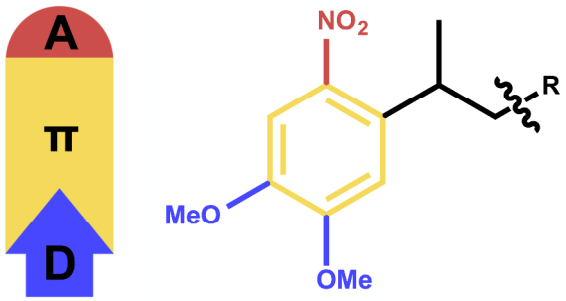


Figure 15. *Représentation schématique et exemple d'un système de type « push-pull »*

Les substituants des systèmes conjugués vont avoir un rôle majeur dans la polarité de la molécule. Comme citée dans la section ONL, la section efficace d'absorption δ_a à deux photons est liée aux moments dipolaires de transitions. Ainsi, la capacité plus ou moins importante d'un groupement à donner ou attirer des électrons va influencer directement la section efficace d'absorption à deux photons[18,25] du composé envisagé. Hammet a étudié et quantifié la force des groupements électrodonneurs et électroattracteurs en prenant en compte

les effets mésomères et inductifs de différents substituants (Tableau 1). Un coefficient de Hammet a été proposé pour représenter la force d'un groupement donné à attirer ou repousser des électrons.

Groupement électrodonneur	*Coefficient de Hammet σ*	*Groupements électroattracteur*	*Coefficient de Hammet σ*
$N(CH_3)_2$	-1.70	**NO_2**	0.79
OH	-0.92	**SO_2CH_3**	0.73
OMe	-0.78	**CN**	0.66
Me	-0.31	**Br**	0.15

Tableau 1. *Coefficient de Hammet pour différents groupements.*

Pour les groupements électrodonneurs les dérivés aminés tels que $-NMe_2$ seront préférés à ceux oxygénés comme -OMe. Par exemple, l'EANBP voit sa section efficace d'uncaging à deux photons augmenter vis-à-vis du PENB[26] (Figure 16).

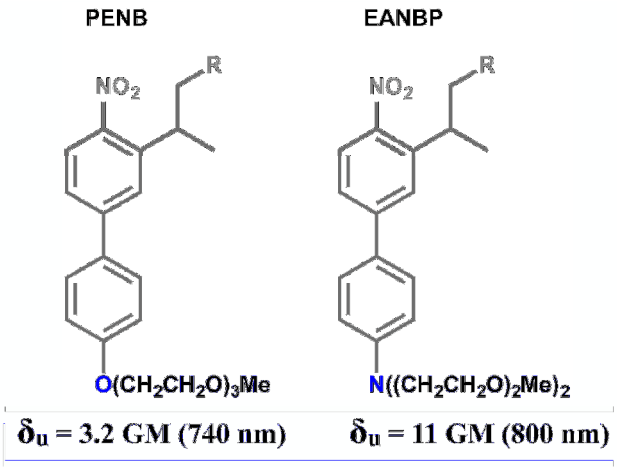


Figure 16. *Exemple de modification d'un groupement électrodonneur pour augmenter la sensibilité d'un GPP à l'excitation biphotonique*

Les groupements attracteurs quant à eux sont de bien meilleurs inducteurs d'hyperpolarisabilité, de plus la géométrie plane de ces groupements permet une extension des systèmes conjugués π efficaces. Dans le cas des séries *o*-NB ou *ortho*-nitrophénéthyle (*o*-NPP), les groupements nitro sont impliqués dans le mécanisme de photolibération et une modification n'est pas souhaitée puisque le groupement nitro a déjà un coefficient d'Hammet très élevé.

Le système conjugué central est également un facteur important. Les structures de types biphényle et stilbène font partie des systèmes les plus utilisés afin d'augmenter la section efficace d'absorption à deux photons. Au sein du laboratoire des groupements stilbènes ont été associés à l'*o*-NPP[27], malgré une augmentation de la section efficace d'ADP le rendement de libération diminue. Ceci est notamment dû au caractère photoisomérisable de la double liaison une partie des photons va être utilisée pour former l'isomère et non pour effectuer la réaction de photolyse ce qui entraine une baisse du rendement quantique. De plus, le nouvel isomère formé possède ses propres caractéristiques photochimiques qui peuvent également ne pas conduire à la photolyse. Les groupements biphényles se montrent plus efficaces comme

on peut le voir dans la série des *o*-NPP en comparant le DMNPB[28] et le PMNB[27] mais aussi plus récemment, dans la série des quinoléines avec les dérives du 8-DMAQ[29,30] (Figure 17). Pour que les composées restent suffisamment solubles dans les milieux biologiques il faut rester sur des tailles de système conjugué raisonnable.

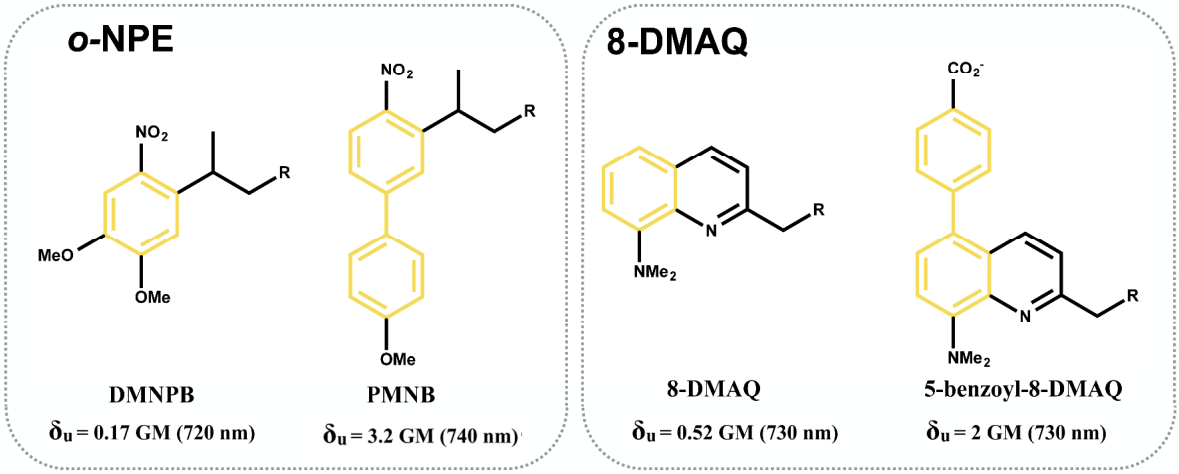


Figure 17. *Exemple d'amélioration de la section efficace d'uncaging à deux photons par élongation du système conjugué et/ou introduction d'un groupement donneur d'électron.*[26,28–30]

Il existe d'autre agencements moléculaires conduisant à des multi-pôles, par exemple des systèmes de type A–π–D–π–A ou A–π–A sont moins répandus au sein des composés cagés mais se sont avérés très efficaces pour les composés fluorescents par excitation à deux photons[31,32], BNS et BNSF[33] en sont deux exemples majeurs. Il faut tout de même noter que ces deux molécules sont peu solubles en milieu aqueux, notamment à cause de leur système conjugué étendu très hydrophobe. Récemment, une structure plus complexe a été développé par l'équipe de Blanchard-Desce, un octupôle de type D-(π -A)$_3$ (Figure 18). [34]

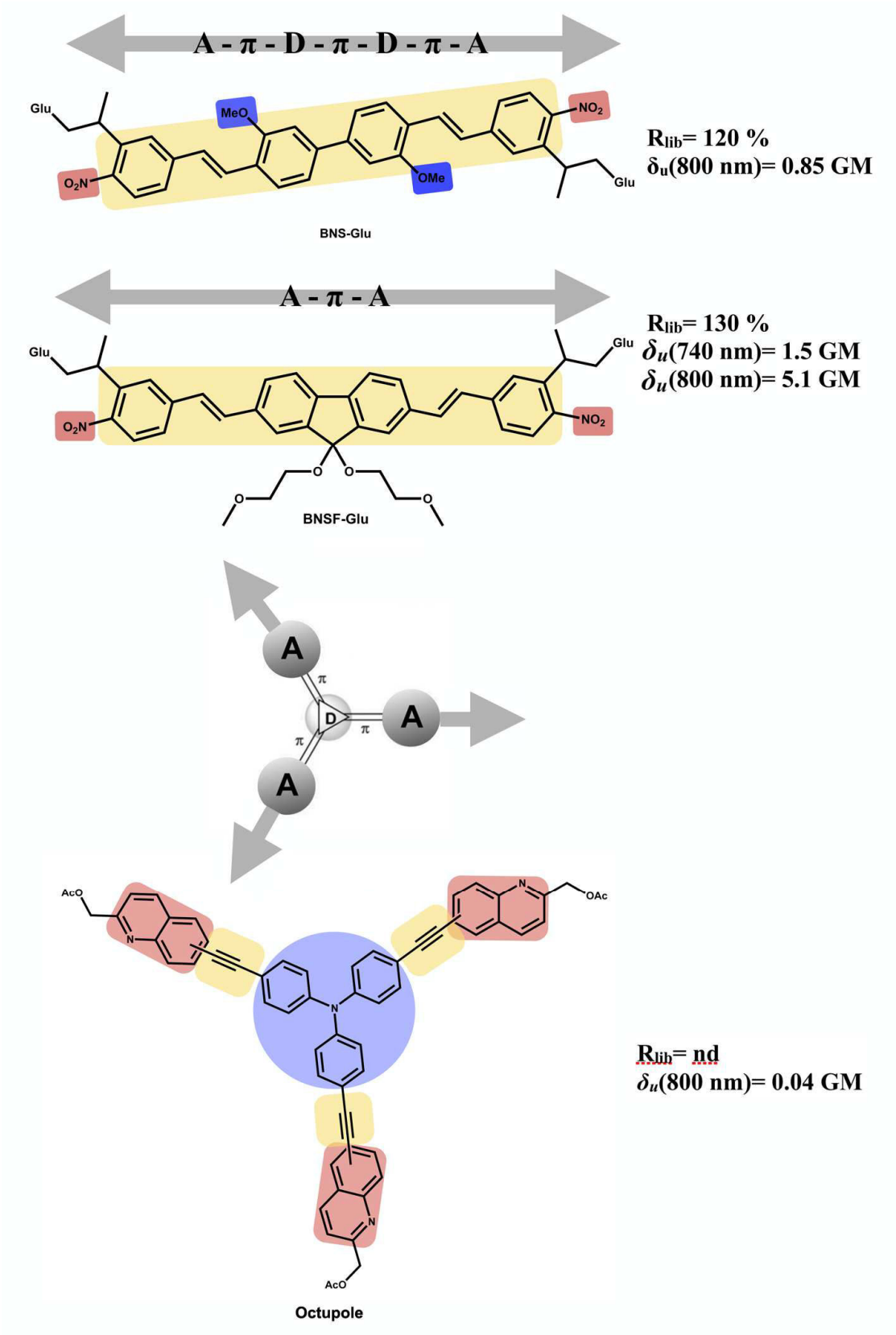


Figure 18. *Multipôles utilisés en photochimie.* [33,34]

Ces systèmes peuvent également être considérés comme des dimères ou des trimères conjugués. Un seul composé à la capacité de libérer deux ou trois substrats, glutamate pour BNS et BNSF et acétate pour l'octupôle triphénylamine. C'est pour cela que les rendements

de libération sont supérieurs à 100%, puisque comme établi précédemment le R_{lib} est défini par la quantité de substrat libérée par molécule après irradiation. Par exemple, dans le cas du BNSF, si la libération était totale, le R_{lib} serait égal à 200%, car on peut avoir deux substrats libérés pour un GPP. L'augmentation du nombre de biomolécules libérées par un GPP va permettre, soit d'obtenir la même quantité de substrat libéré mais à partir d'une concentration de composé cagé plus faible, soit de garder la même concentration et d'obtenir une libération plus grande.
C'est dans cette optique que l'équipe de Blanchard-Desce a développé un octupôle basé sur un cœur central triphénylamine avec un GPP de la famille des quinoléines[34]. L'équipe de Dalko a également synthétisé un quadrupôle avec deux quinoléines directement liées entre elles en différentes positions[35] (Figure 19). Malgré l'augmentation du nombre d'effecteurs biologiques pouvant être libérés sur ce type d'espèce, les propriétés photochimiques d'« uncaging » obtenues sont faibles.

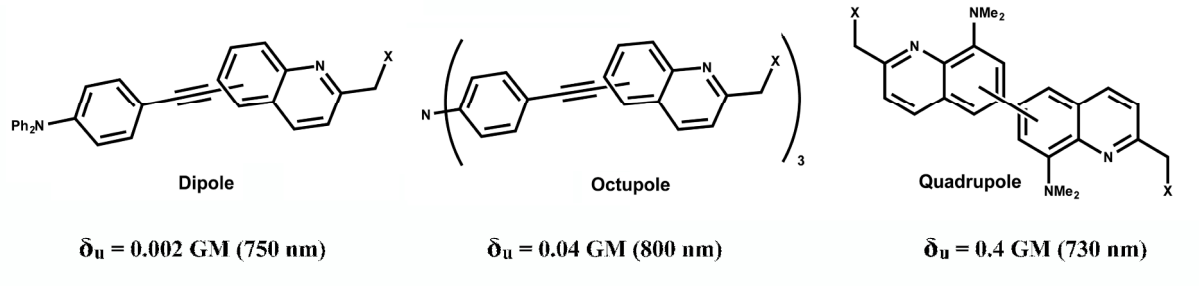


Figure 19. *Dipôle, quadripôle et octupôle de GPP.*[34,35]

Une autre approche, qui utilise le transfert d'électron photoinduit (PeT), consiste à employer des groupements sensibles à l'excitation à deux photons comme antenne pour transférer de l'énergie lumineuse au groupement protecteur. Ainsi, un composé de la série des *o*-NB qui est classiquement utilisé pour des irradiations à un photon, a vu sa sensibilité à l'excitation à deux photons augmentée d'un facteur 5 grâce à un dérivé fluorènyle fixé de manière covalente au groupement photoclivable[36,37]. L'équipe d'Anderson a ainsi synthétisé un composé possédant des caractéristiques photochimiques satisfaisantes (BEF-Pyr), ceci notamment grâce à une section efficace d'absorption à deux photons très élevée [38] (Figure 20).

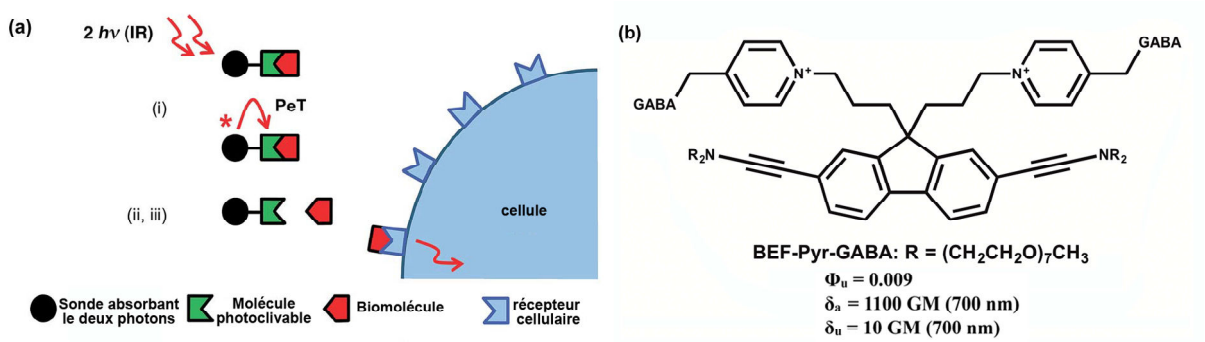


Figure 20. *(a) Principe de photoclivage d'un groupement protecteur photolabile via un transfert d'électron photoinduit. Après excitation à deux photons (i) la sonde va transférer ces électrons au groupement photoclivable, (ii) ce qui va provoquer la réaction photochimique et (iii) permettre la libération de la biomolécule.*[38] *(b) Exemple de composé utilisant le PeT pour la libération de GABA.*

Le laboratoire d'Adah Almutairi a adapté les systèmes auto-immolable à la photochimie en créant un composé permettant de libérer jusqu'à 2.8 glutamates par molécule. Pour cela, ils utilisent un système d'auto-immolation basé sur un dérivé quinone-méthide[39] décliné en plusieurs générations avec comme déclencheur photosensible un dérivé de coumarine, le Bhc[40] (Figure 21). Cette méthode permet de libérer plusieurs substrats mais souffre d'une cinétique de libération très lente (plusieurs jours), qui engendrent une perte du contrôle spatial de la libération.

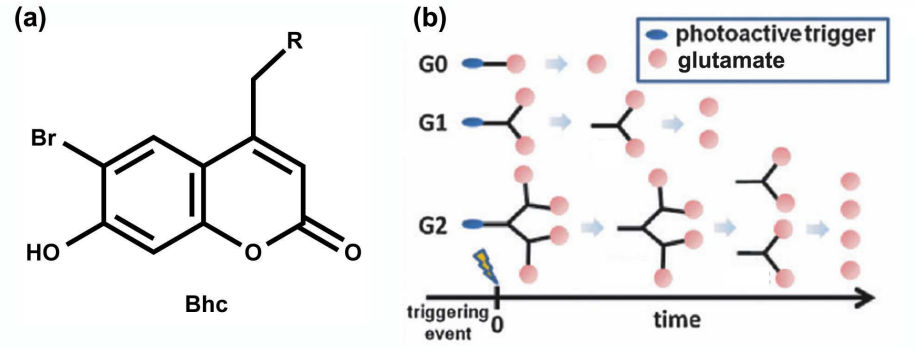


Figure 21. *(a) Structure du 6-bromo-7-hydroxycoumarine (b) Principe de l'auto-immolation pour les générations 0,1 et 2.*[40]

C'est dans cette dynamique que s'inscrit cette thèse, nous nous attacherons à la mise au point d'un GPP efficace sous excitation à deux photons ayant la capacité de libérer plus d'un effecteur biologique, dans le but d'obtenir un composé capable d'engendrer un saut de concentration plus élevé que ceux obtenus à l'heure actuelle.

I.3. Applications de l'absorption à deux photons

I.3.1. Imagerie

La microscopie de fluorescence a été la première à profiter à des avantages liés à l'utilisation de l'excitation à deux photons[41]. Outre les avantages décris dans les sections précédentes comme la résolution très élevée et la faible phototoxicité, cette technique permet la collecte d'un plus grand nombre de photons ce qui va grandement améliorer le rapport signal sur bruit. Le contraste des images obtenu avec cette technique est nettement amélioré comparé à la microscopie confocale[42]. Les sondes fluorescentes vont également être optimisées afin de correspondre aux exigences de l'optique non linéaire[43]. L'ingénierie moléculaire des sondes fluorescentes va établir les bases de l'optimisation de composés pour l'excitation à deux photons, dont les GPP s'inspireront par la suite (Figure 22).

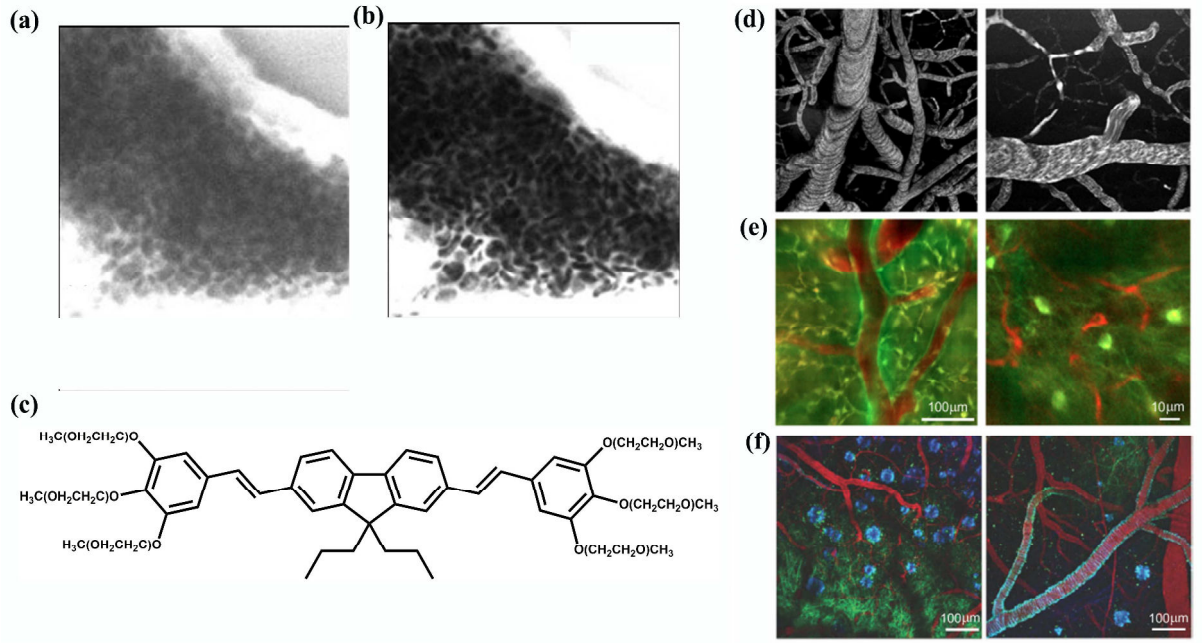


Figure 22. *Comparaison entre microscopie confocale (a) et microscopie à deux photons (b) d'un plexus choroïde teinté de fluorescéine. (c) Exemple de sonde fluorescente optimisée pour la microscopie à deux photons. Microscopie deux photons in vivo des fonctions cérébrales (d) Exemple de cartographie à deux photons de la vascularisation après une injection de dextrane conjugué à une fluorescéine. (e) Image à deux canaux de signaux neuronaux (vert) et vasculaires (rouge) : (gauche) coloration des neurones par une sonde vert Oregon sensible au calcium et (droite) souris transgénique exprimant la GFP (« green fluorescent protein ») dans une sous-population de neurone. Le dextrane rouge Texas est le traceur intravasculaire dans les deux cas. (f) Image à trois canaux d'une souris atteinte de la maladie d'Alzheimer avec une sonde ciblant les amyloïdes (bleu), la GFP exprimée dans les neurones et dendrites (vert) and la vascularisation (rouge).* [42,44]

I.3.2. Microfabrication

La photopolymérisation est particulièrement efficace pour la création de structures contrôlées à l'échelle micrométrique[45,46]. Un mélange de photoinitiateurs et de monomères est irradié par un laser selon un motif défini. Grâce à l'excitation biphotonique, seuls les photoinitiateurs situés au point focal vont générer des radicaux qui entraineront la polymérisation des monomères. Cette technique va permettre d'obtenir des structures fonctionnelles souvent visualisées par la création de structures artistiques à l'échelle du micron (Figure 23).[47,48]

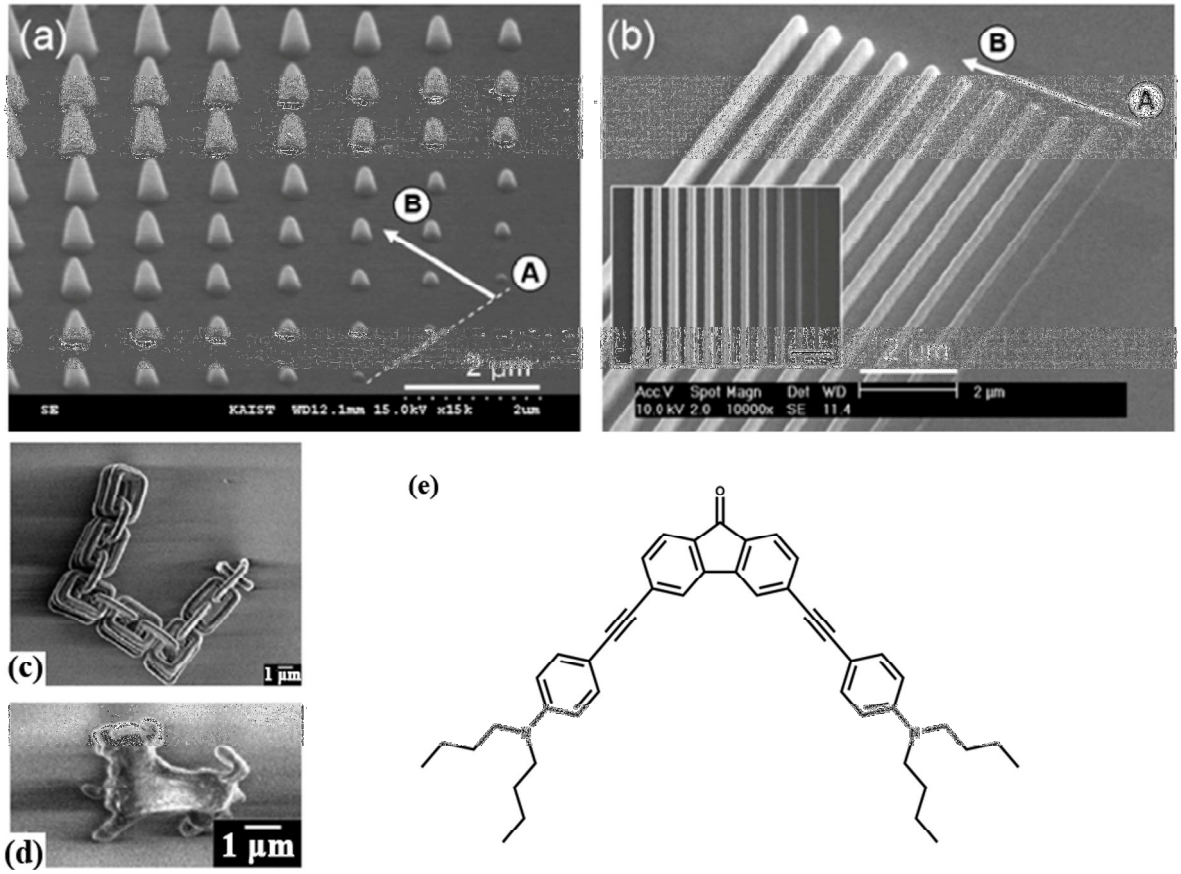


Figure 23. *Image de microscopie électronique à balayage de cône (a) et ligne (b) et microstructure 3D : (c) micro-chaîne, (d) micro-taureau de 4 µm* [46]*. (e) Exemple de photoinitiateur utilisé dans le processus de photopolymérisation.* [46–48]

Récemment, deux équipes ont effectué une avancée majeure dans la bio-impression. Contrairement à précédemment, l'excitation lumineuse ne va pas initier la création de liaison mais bien la photolyse d'un GPP. Le GPP va en réalité masquer la réactivité d'un des deux composants d'une matrice. Il s'agira ici d'obtenir après irradiation une matrice 3D cytocompatible, c'est à dire capable d'accueillir une culture cellulaire. Une copolymérisation par addition de Michael sur des fonctions thiol portées par des dérivés coumarines permet l'obtention d'un gel cytocompatible avec un contrôle de sa taille, sa forme et sa rigidité[49]. La seconde méthode va, elle, permettre de déclencher la formation d'un assemblage protéique avec une un contrôle spatial élevé[50]. La formation du complexe est basée sur l'affinité entre le glutathion et la glutathion S-transférase. Ces deux techniques ont un énorme potentiel en médecine régénérative et bio-impression.

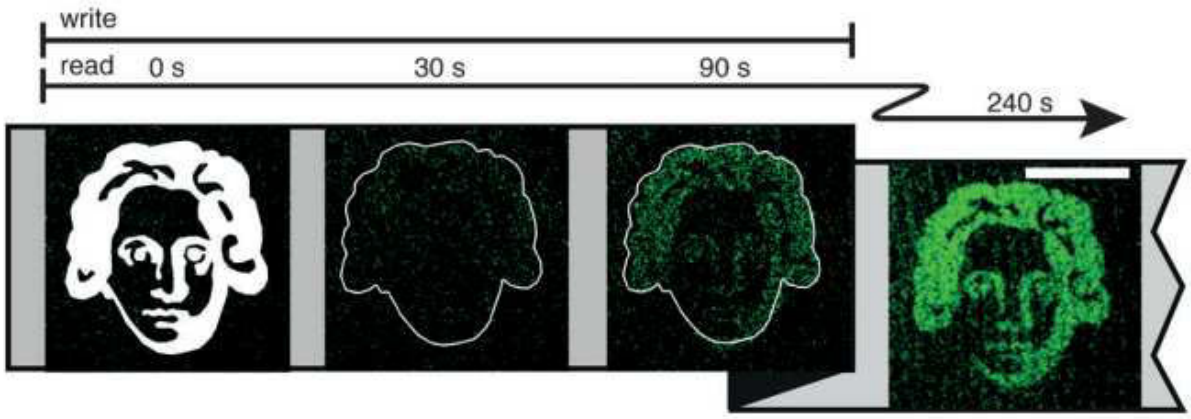


Figure 24. *Construction 3D d'un réseau protéique par activation à deux photons.*[50]

I.3.3. Systèmes de délivrance : Micelles et polymères

Les micelles sont devenues un outil puissant pour l'acheminement de sondes fluorescentes ou de drogues vers des cibles spécifiques. Pour en libérer le contenu, un stimulus tel qu'une réaction redox ou un changement de pH peuvent être utilisés. En 1999, la lumière, par l'intermédiaire de dérivé azobenzène, va permettre de modifier les propriétés macroscopiques de micelles. Par la suite les composés photosensibles vont devenir des molécules de choix pour obtenir des transporteurs avec une libération hautement spécifique. Ainsi, des composés très hydrophobes, comme le rouge de Nil, vont pouvoir être libérés sous excitation à un ou deux photons à partir de micelles comportant des groupements photosensibles[51]. Des nanoparticules avec des capacités de conversions ascendante (« upconverting nanoparticules ») sont co-encapsulées avec du rouge du Nil (« Nil-Red ») dans des micelles photosensibles basées sur un groupement *o*-NB, afin de le rendre sensible à des excitations à 980 nm[52]. En effet, la nanoparticule va absorber le rayonnement infrarouge et réémettre de la lumière UV qui sera à son tour absorbée par les dérivés *o*-NB qui effectueront le photoclivage. Ces nouveaux outils de délivrance possèdent une libération spécifique et rapide ainsi que de très bonne compatibilité biologique[53]. L'association des techniques précédentes et de nanoparticules de silice va permettre l'obtention de composés capables de libérer un anticancéreux mais aussi de cibler les cellules tumorales grâce à l'ajout d'acide folique dont le récepteur est surexprimé par les cellules cancéreuse[54].
Au même titre, les polymères sensibles à la lumière peuvent être utilisés comme système de délivrance de médicament. Un implant cutané a récemment démontré de formidables propriétés pour la libération localisée d'un anti-inflammatoire sous irradiation UV.[55]

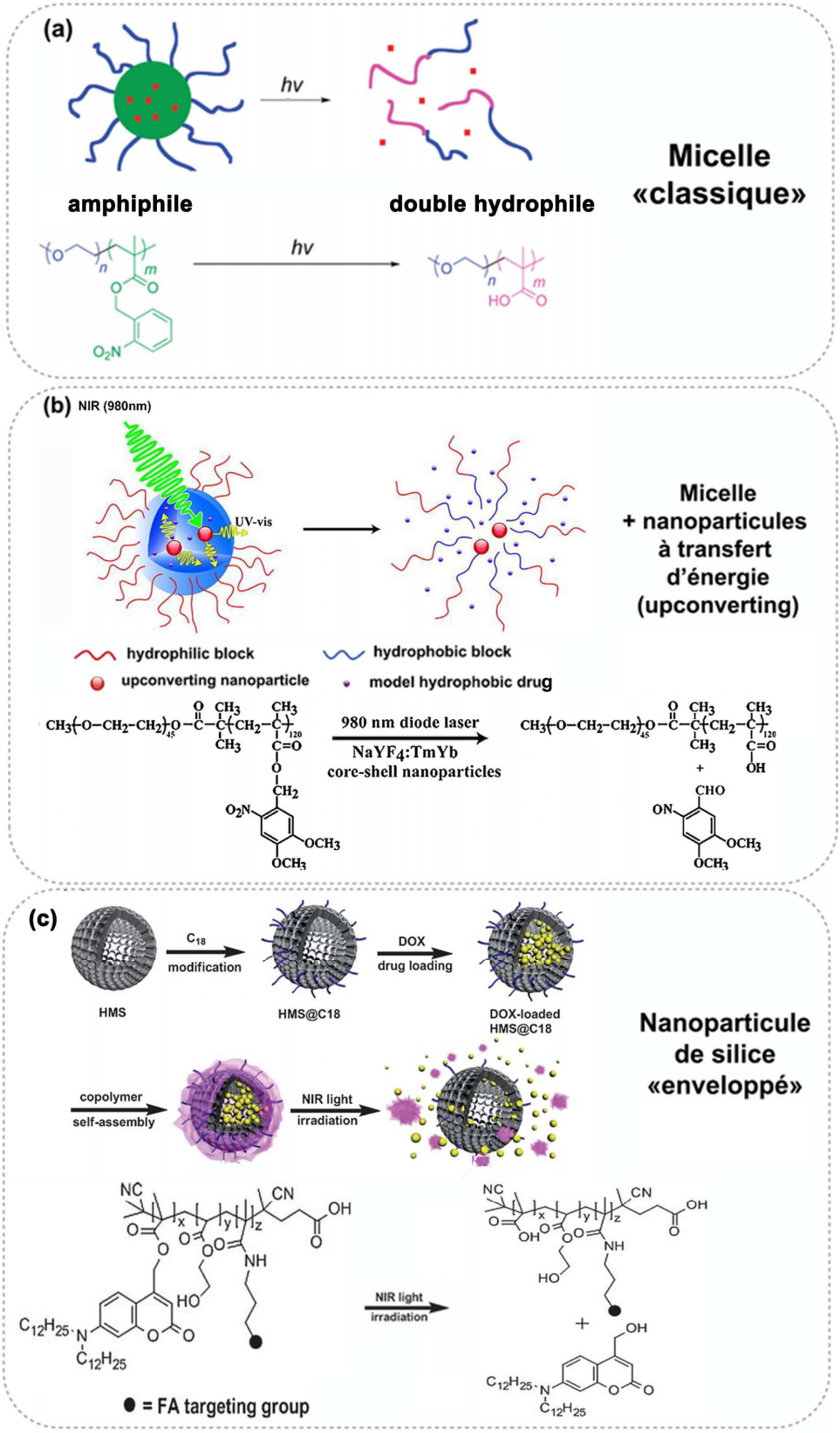


Figure 25. *Plusieurs exemples de micelles photosensibles (a) Micelle photosensible « classique » : après irradiation la poche hydrophobe disparaît et libère la molécule d'intérêt (rouge). (b) Co-encapsulation de drogue hydrophobe et « upconverting » nanoparticules. (c) Enrobage par un copolymère photosensible d'une nanoparticule de silice.* [51,52,54]

I.3.4. Applications aux neurosciences

Le système nerveux est un réseau extrêmement complexe composé de cellules hautement spécialisées, les neurones, capable de véhiculer un signal électrochimique. Chaque neurone est connecté à plusieurs milliers d'autres par le biais de synapses, ce qui fait de leur cartographie fonctionnelle un vrai chalenge. Historiquement, la connectivité des neurones a été étudiée en appliquant un stimuli électrique sur le neurone présynaptique et en enregistrant la réponse du neurone post-synaptique[9,56] (Figure 26) par des techniques d'électrophysiologie.

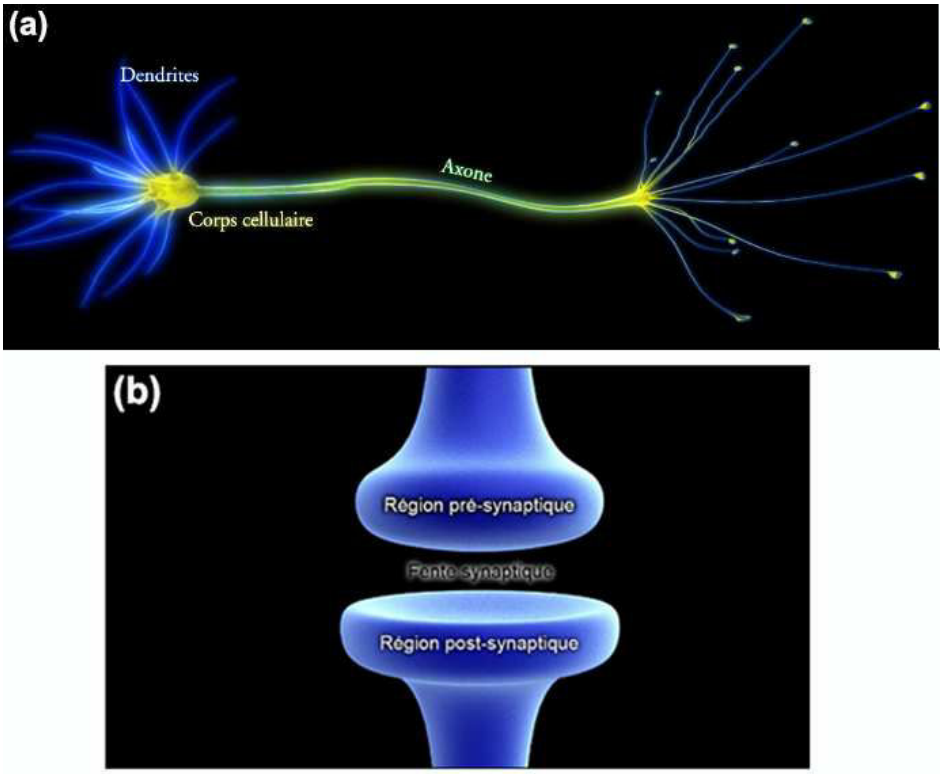


Figure 26. *(a) Représentation schématique d'un neurone (b) Schéma d'une synapse.*[57]

En 1989, Denk et son équipe décrivent une nouvelle méthode d'étude basée sur les GPP. Ils vont protéger un carbamoylcholine avec un dérivé *o*-NB, le CNB, qui après photoclivage va être libéré et activé les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (Figure 27).[58] Les GPP permettent d'obtenir des stimulations présynaptiques plus précises avec une localisation bien définie comparées au stimuli électriques[11], ainsi l'utilisation de ces composés va rapidement s'étendre aux autres neurotransmetteurs (notamment le glutamate). La résolution spatiale de cette méthode reste cependant limitée par la diffusion de la lumière dans les tissus vivants. En effet, Les longueurs d'onde utilisées avec l'excitation à un photon (de 300 à 500 nm) sont largement absorbées et diffusées par les chromophores endogènes de la cellule exposée. De plus, l'exposition de composés secondaires au rayonnement UV est un facteur de variation non négligeable pour l'observation de comportement physiologique. La photolibération chimique à deux photons (ou « chemical two-photon uncaging »)[59] va apporter une première réponse. Attention il est important de préciser ici qu'il ne s'agit pas d'excitation à deux photons mais d'un double photoclivage qui va nécessiter deux photons fournis par une excitation à un photon. Dans ce cas, le glutamate est lié par deux groupements protecteurs α-carboxy-2-nitrobenzyle. Ainsi, le photoclivage va demander l'absorption de deux photons, la probabilité d'obtenir ce résultat est plus élevée au point focal, on obtient alors un composé avec une meilleure résolution spatiale.

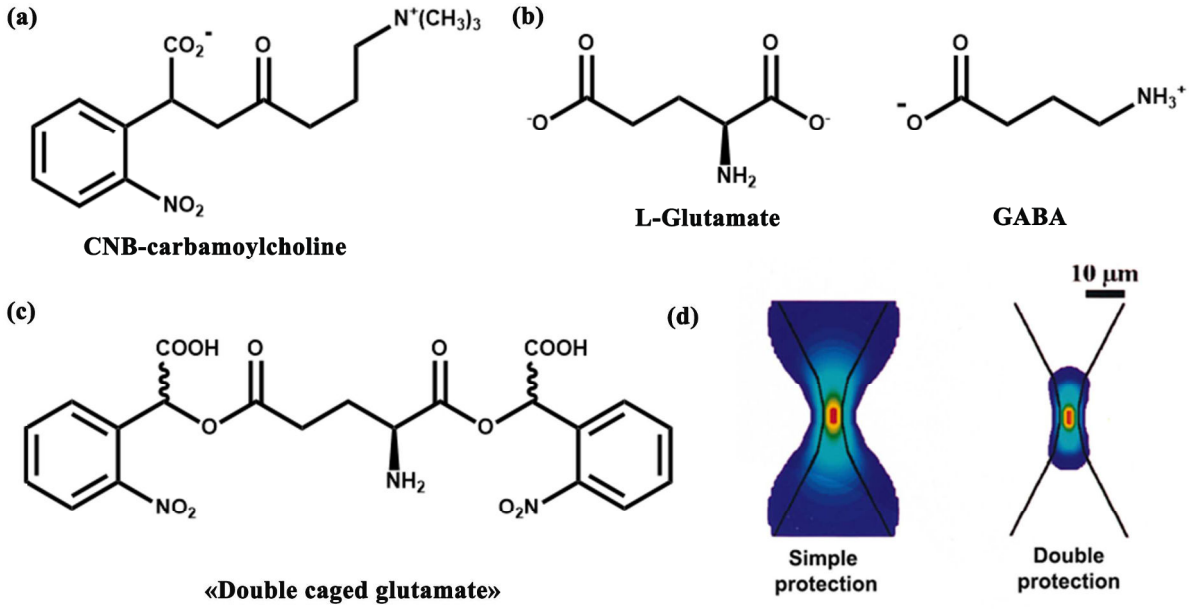


Figure 27. *(a) Premiers composés cagés pour les neurosciences. (b) Les deux neurotransmetteurs principaux du SNC. (c) Glutamate doublement protégé. (d) Représentation théorique de la zone de libération du glutamate après photoclivage pour une protection simple et double. Le rouge représente les concentrations les plus élevées et le bleu les plus faibles.*[59]

Par la suite, la première génération de composés sensibles à l'excitation à deux photons, tel que le Bhc-Glu[22] et le MNI-Glu[60], vont conduire à des résolutions spatiales encore plus élevées et une pénétration bien plus profonde dans les tissus. Désormais, la libération de glutamate atteint une résolution suffisante pour effectuer des études *ex vivo* où seule une épine dendritique, c'est-à-dire la synapse d'une dendrite, est excitée[23,61]. Ces nouveaux outils ont apporté une contribution importante dans la compréhension détaillée des mécanismes de connexion entre les neurones.[62] (Figure 28).

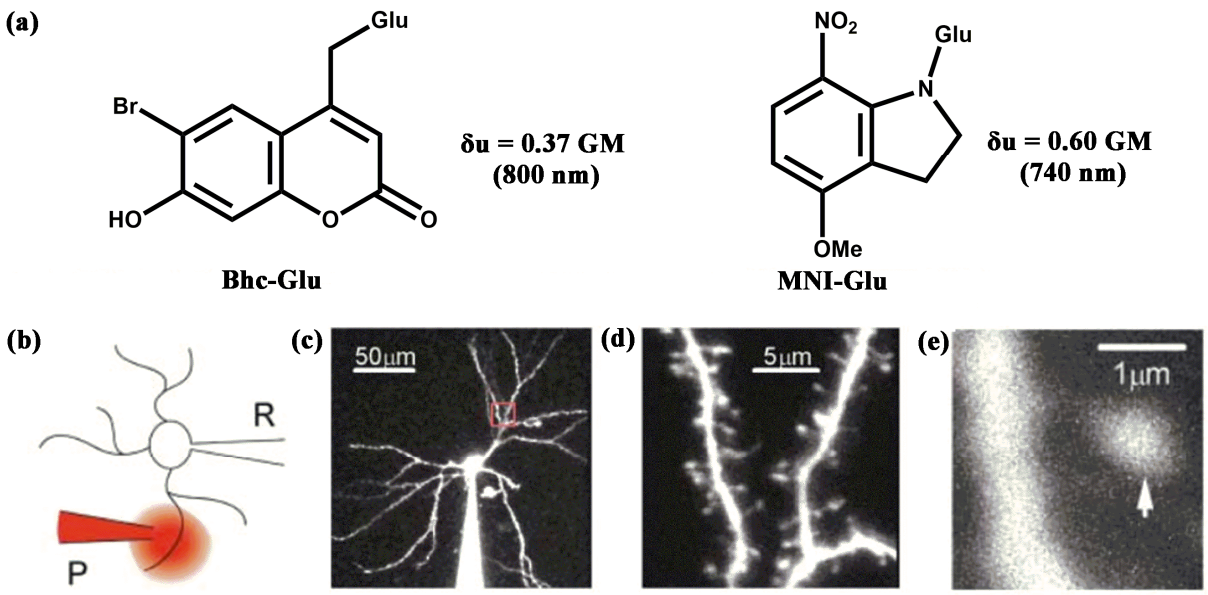


Figure 28. *(a) Première génération de glutamate protégé sensible à l'excitation à deux photons (b) Schéma illustrant l'application locale de drogue via une micropipette (P) dans la région dendritique contenant la synapse d'intérêt et à proximité d'une pipette d'enregistrement (R). Image de microscopie à deux photons représentant (c) un neurone complet, (d) un segment d'épines dendritiques et (d) une épine dendritique.*[61]

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC, il est contrebalancé par le GABA qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur. Les processus physiologiques des neurones sont ainsi constamment excités ou inhibés principalement en fonction du ratio de ces deux neurotransmetteurs. Malgré leur importance, les dérivés cagés de GABA sont moins développés. Ceci est en partie dû au fait que la majorité des molécules synthétisées conservent une affinité pour les récepteurs GABA après fixation du GPP. Ces molécules sont antagonistes des récepteurs GABA[60,63,64]. Ceci pose deux problèmes majeurs : tout d'abord le composé protégé antagoniste qui n'a pas réalisé la déprotection va masquer l'effet du GABA libéré, de plus l'incubation avec un antagoniste peut perturber la physiologie initiale de tissu[56]. Certains composés, comme le RuBi-GABA, ne montrent aucun antagonisme mais sont faiblement efficaces en excitation à deux photons et présentent une toxicité sur les cellules neuronales[65]. Néanmoins, l'utilisation de GPP très efficace permet de contrer en partie ces problèmes mais la mise au point d'un composé non antagoniste reste une nécessité. L'essor des GPP sensibles à l'excitation à deux photons a permis le développement de composés nettement plus efficaces que les premières générations tel que CDNI[66] ou EANBP[26] mais également avec des sensibilités à des gammes de longueurs d'onde très différentes. L'équipe d'Ellis-Davis a profité de cette diversité pour combiner plusieurs composés photosensibles, le DEAC450-Glu et le CDNI-GABA[67]. Ils vont ensuite pouvoir choisir quel composé sera libéré en fonction de la longueur d'onde d'excitation utilisée, ainsi le glutamate pourra être libéré par excitation à 900 nm alors que le GABA le sera par excitation à 720nm.

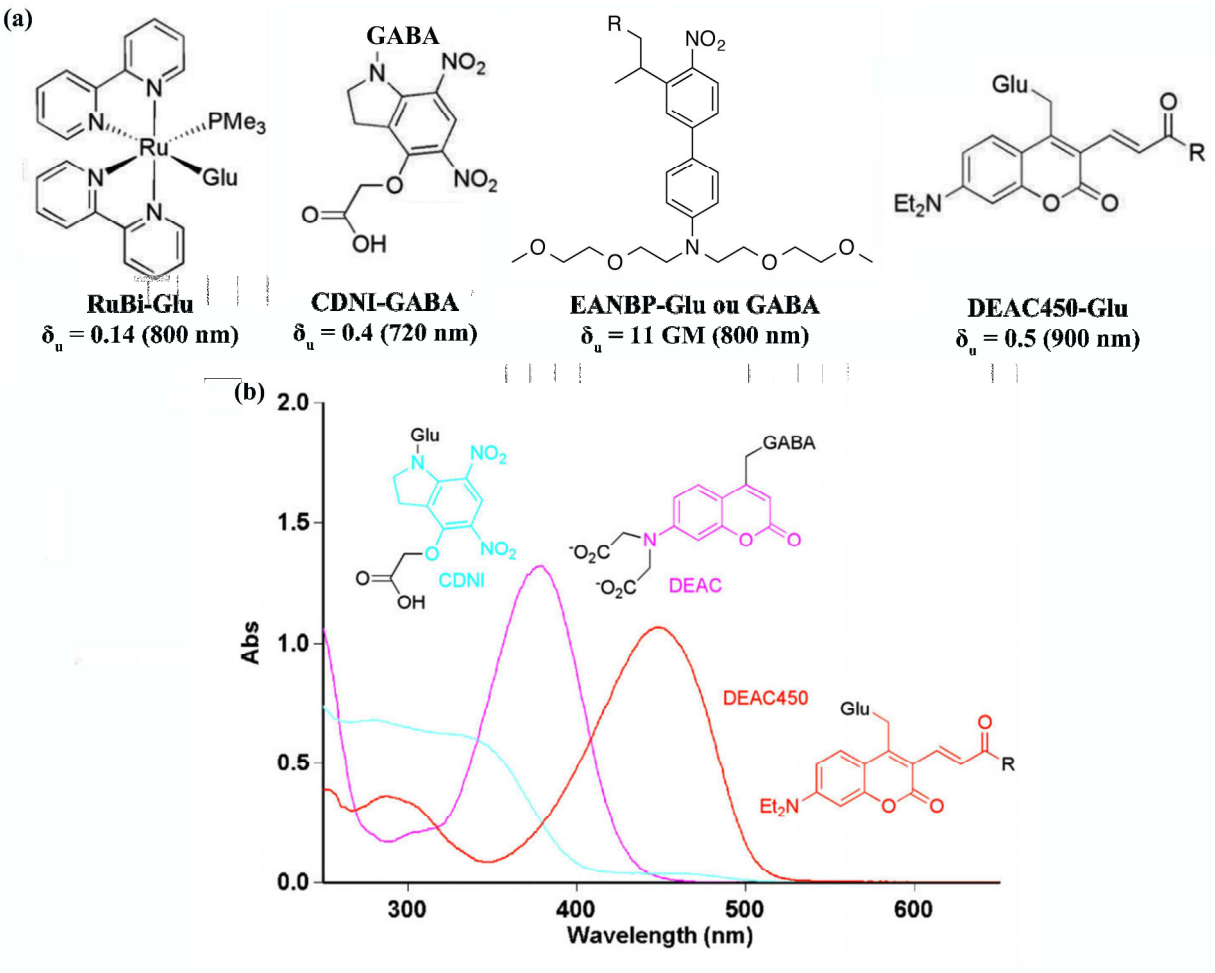


Figure 29. *(a) Nouvelles générations de neurotransmetteurs protégés par des GPP. (b) Spectre d'absorption du CDNI (bleu), DEAC (violet) et DEAC450 (rouge).*[67]

Les nombreux outils photochimiques à notre disposition nous rapprochent de plus en plus d'un contrôle poussé des voies de signalisations neuronales. C'est dans cette continuité d'amélioration des outils neurophysiologiques que va s'inscrire cette thèse et le projet auquel nous avons collaboré.

I.4. Projet

Cette thèse est issue d'un projet collaboratif international entre des laboratoires de différents pays financé par l'organisation « Human Frontier Science Program ». Il a pour but l'étude du réseau cognitif de l'hippocampe par imagerie fonctionnelle et manipulation à haute résolution *in vivo* (titre original : « *In vivo* functional imaging and high-resolution manipulations of hippocampal memory circuits »). Les expériences de neurophysiologie seront effectuées par l'équipe du Dr. Attila Losonczy de l'université de Columbia, la biochimie sera gérée par l'équipe du Dr. Boris Zemelman de l'université du Texas à Austin, les expériences optiques seront menées à Vienne par l'équipe du Dr. Vaziri, enfin la synthèse de nouveaux outils photochimiques sera assurée par moi-même sous la direction du Dr. Frédéric Bolze à Strasbourg.

Comme nous l'indique le titre du projet, le but est de travailler sur l'hippocampe. L'hippocampe est une partie du cerveau qui joue un rôle important dans la navigation spatiale et la mémoire à long terme. Il est souvent utilisé en neurophysiologie comme modèle du

système nerveux car son organisation en strates distinctes facilite l'expérimentation. De plus, c'est une des seules structures à présenter une activité de neurogénèse, création de nouveau neurone, chez l'adulte. L'hippocampe est séparé en différentes aires, l'aire CA1 est privilégiée pour les expériences car il correspond à un modèle simplifié de l'organisation anatomique de l'hippocampe entier[68], de plus il contient les cellules de lieu ou « place cell » (Figure 30).[69,70]

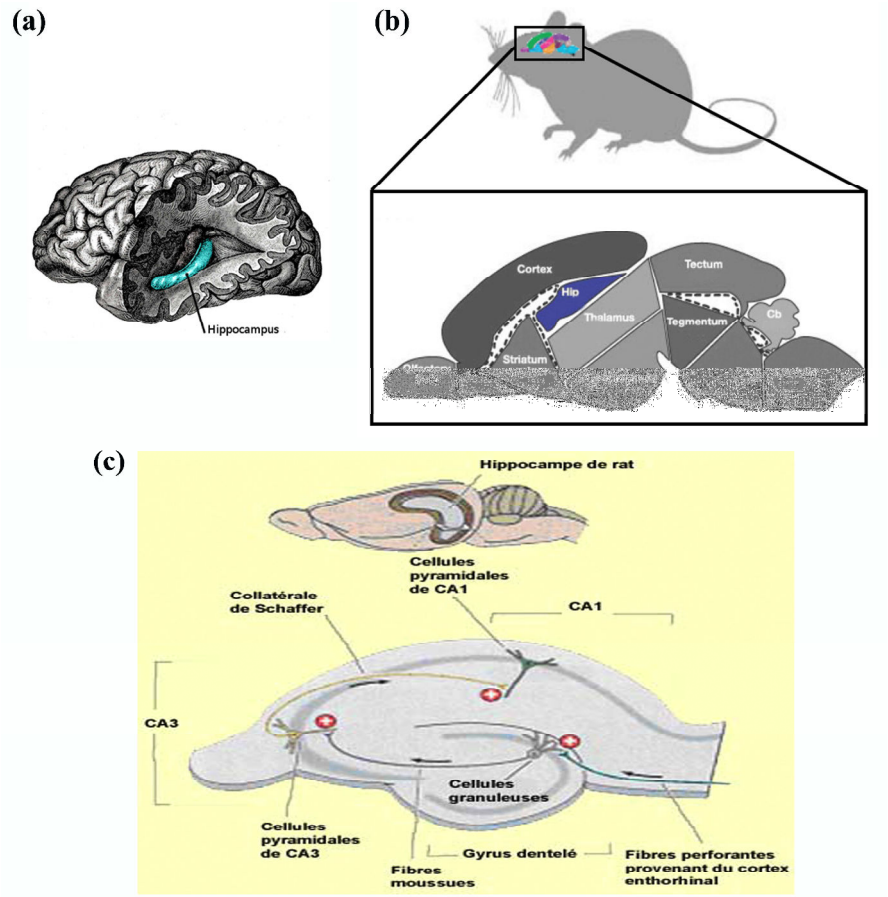


Figure 30. *(a) Hippocampe (bleu) chez l'homme. (b) Hippocampe (bleu) chez le rat. (c) Représentation des différente partie d'un hippocampe de rat.*[71,72]

Les cellules de lieu sont des neurones dont l'activité est modulée par des éléments spatiaux (par exemple : un lieu visité). L'activation des neurones est ensuite centralisée au sein d'une carte cognitive spatiale (CCS) que notre cerveau va interpréter. Les informations actuelles sur le codage de la navigation spatiale ont permis d'élaborer la théorie de la CCS. La CCS peut être représentée par une grille composée d'une série de neurones, les cellules de lieu. Chaque lieu enregistré dans notre mémoire va correspondre à un motif où certains neurones sont actifs et certains silencieux. Ces neurones sont activés de manière plus ou moins intense selon l'information visualisée. Par exemple, pour un lieu A (un lac), un motif précis va être activé. Lorsque nous faisons appel à des informations sur un lieu bien distinct B (un désert), si l'on observe la même série de neurone un motif d'activation totalement différent va apparaître, ce phénomène est appelé « global remapping » (Figure 31).

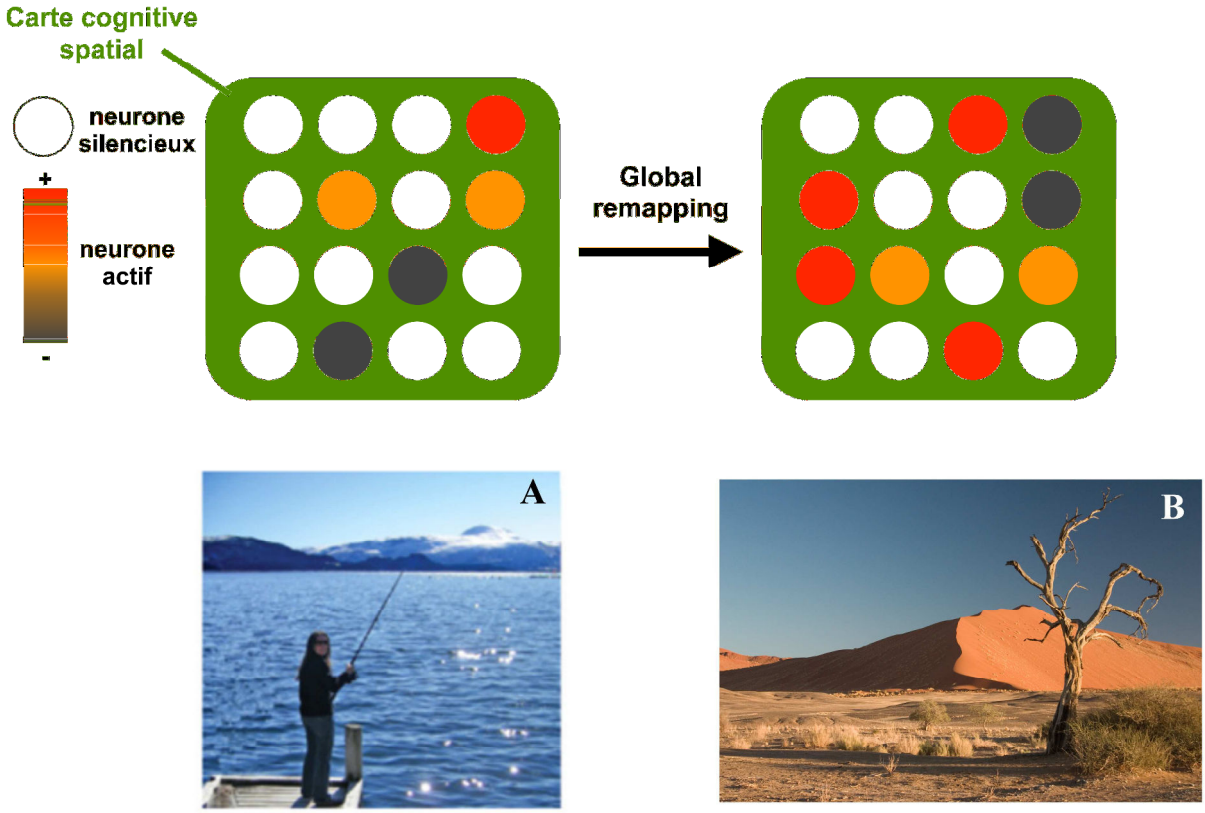


Figure 31. *Représentation schématique d'un « global remapping ». Le changement de lieu va provoquer l'activation d'un motif différent de neurone.* [70]

En revanche, si la différence entre deux lieux est subtile, par exemple le même lieu mais avec un angle différent A', on assistera à un phénomène de « rate remapping » et dans ce cas un motif similaire sera utilisé mais l'intensité d'activation des neurones sera différente (Figure 32).[73]

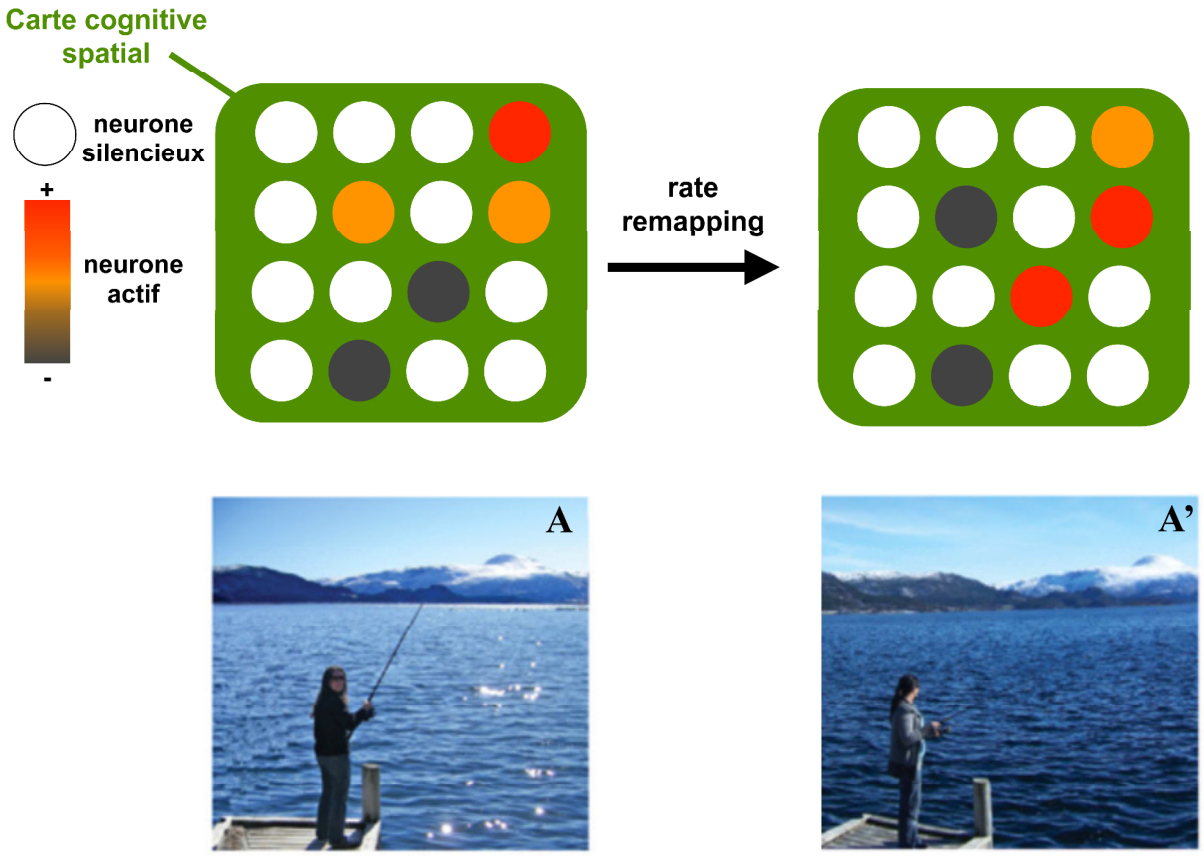


Figure 32. *Représentation schématique d'un « rate remapping ». Pour un changement subtil d'environnement spatial, un motif similaire de neurone est utilisé mais a des intensités différentes.* [70]

La théorie de la CCS se base sur des observations expérimentales, cependant la formation et la dynamique des différents phénomènes de codage est encore inconnue et leur compréhension constitue le chalenge de ce projet.[74,75] Si l'on regarde à l'échelle cellulaire, la structure d'un neurone de l'aire CA1, on constate des entrées glutamatergiques excitatrices provenant de deux autres parties de l'hippocampe, l'aire CA3 et le cortex entorhinale. Des interneurones GABAergic sont également présents et vont produire une inhibition locale.[76,77] L'activité de ce type de neurones va donc être une balance entre des excitations extrinsèques et des inhibitions locales (Figure 33).

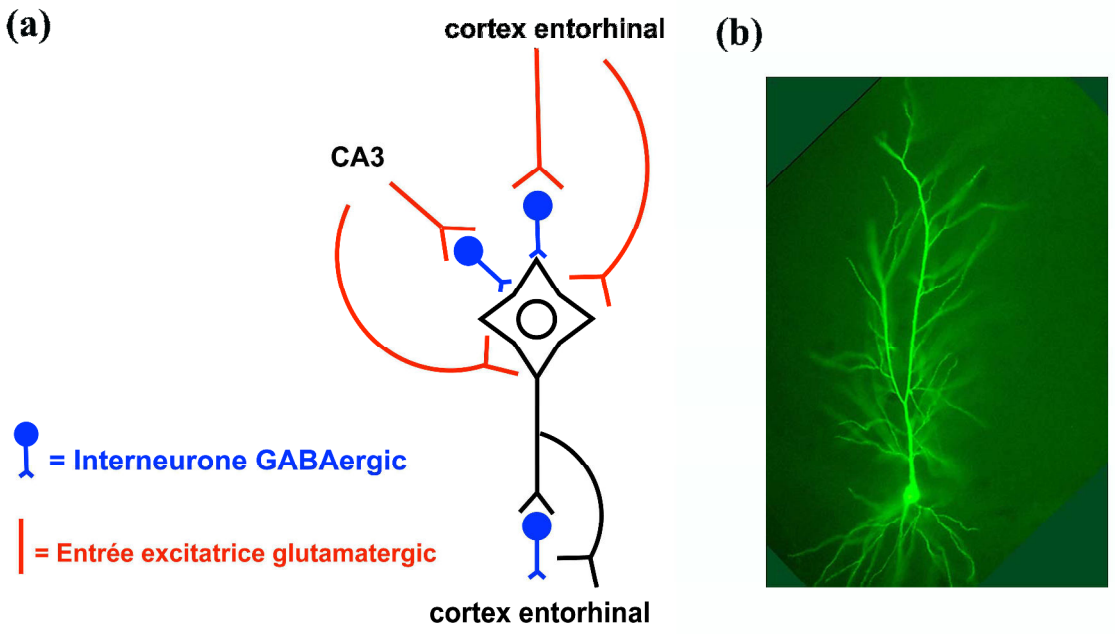


Figure 33. *(a) Schéma simplifié d'un neurone de l'aire CA1. (b) Image d'un neurone CA1 en microscopie à fluorescence.* [78]

Notre rôle dans cette étude va être de fournir des outils capables de perturber ces systèmes à l'échelle cellulaire et ceci afin de déterminer le rôle d'une ou d'un sous-groupe de cellules. Pour ce faire, nous allons utiliser les GPP présentés dans la première partie combinés à différents substrats d'intérêt : le duo glutamate / GABA et des dérivés de quinuclidine. Le glutamate et le GABA cagés vont permettre de provoquer des cascades physiologiques tandis que les dérivés de quinuclidine cagés doivent apporter la possibilité de rendre inactive la zone ciblée.

Au sein du laboratoire la série des *o*-NPP a été très développée, et des composés tels que l'EANBP ou le PENB présentent des caractéristiques photochimiques, photophysiques très satisfaisantes et une faible cytotoxicité. L'association de ces dérivés au glutamate fonctionne efficacement, cependant ils sont peu adaptés pour le GABA puisque les composés deviennent antagonistes. Cette thèse a été motivée par l'idée d'apporter une nouvelle plateforme aux GPP et une nouvelle manière d'utiliser ces groupements, en s'inspirant de la tendance qu'a connue le domaine des sondes pour l'imagerie à dendrimériser et nanostructurer ces composés. L'idée est de mettre au point un système qui permettrait de combiner plusieurs GPP afin de multiplier le nombre de substrats libérés. L'obtention d'un saut de concentration plus élevé permettrait d'aborder ces composés de deux manières, soit en conservant les mêmes concentrations pour obtenir un effet plus important, soit en diminuant la concentration en conservant l'effet initial mais en en diminuant l'impact sur la cellule. De plus, dans le cas spécifique du GABA, la diminution des concentrations permettait une diminution de l'effet antagoniste. On peut également envisager que des structures de grande taille annulent totalement l'antagonisme du GABA cagé.

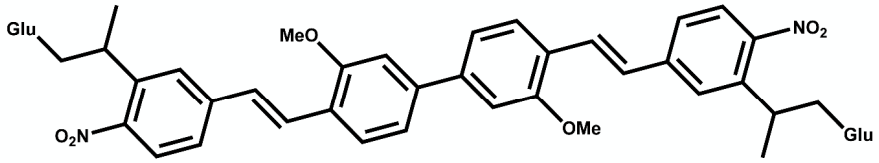
Enfin pour obtenir une palette complète d'outils pour l'étude des neurones nous avons étudié les dérivés de quinuclidine qui sont utilisés en combinaison avec l'ingénierie protéique du récepteur à l'acétylcholine α7 nicotinique permettent d'obtenir un puissant outil d'inhibition des neurones. A l'heure actuelle, ces dérivés n'ont jamais été cagés et il serait très intéressant de pouvoir ajouter un contrôle spatio-temporel à ce type d'outils. Ainsi nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux dérivés de quinuclidine capable de fixer un GPP tous en conservant leur affinité pour leur récepteur.

CHAPITRE II

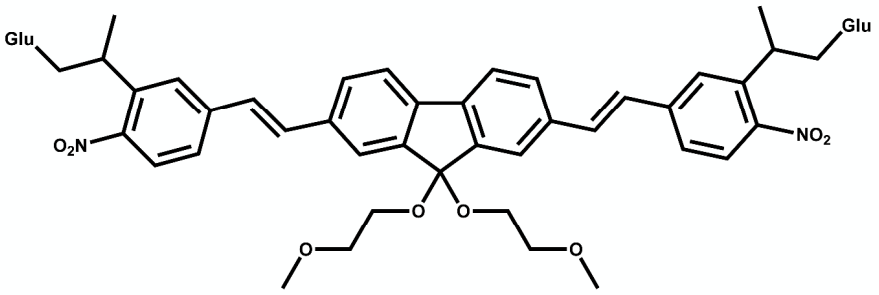
ETUDES PRELIMINAIRES

II.1. Introduction

Pour débuter cette étude, nous nous sommes inspirés du BNS et du BNSF. Ces molécules possèdent de très bonnes sections efficaces de libération à deux photons (δ_u) mais souffrent d'un manque de solubilité notamment à cause de leur système conjugué étendu très hydrophobe conduisant à des molécules peu solubles dans l'eau (Figure 34).



BNS-Glu R_{lib}= 120 %
δ_u(800 nm)= 0.85 GM



BNSF-Glu

R_{lib}= 130 %
δ_u(740 nm)= 1.5 GM
δ_u(800 nm)= 5.1 GM

Figure 34. *BNS-Glu et BNSF-Glu*

Notre première approche a été de synthétiser des composés comportant deux à quatre GPP et de manière non conjuguée, contrairement au BNS et au BNSF. Nous avons décidé de débuter le projet avec de petites structures modèles afin d'appréhender plus facilement le comportement de ce nouveau type de composé, puisqu'à notre connaissance aucune donnée n'existe sur ce type de système. Notre choix s'est porté sur la série des o-NPP développée au sein du laboratoire. Nous avons choisi d'utiliser comme unité de base un dérivé possédant un groupement donneur oxygéné comme le PENB ou le PMNB. En effet, la synthèse, la fonctionnalisation et la purification des dérivés oxygénés est plus accessible que celles des dérivés aminés comme EANBP malgré des sections efficaces d'uncaging à deux photons plus élevées (Figure 35).

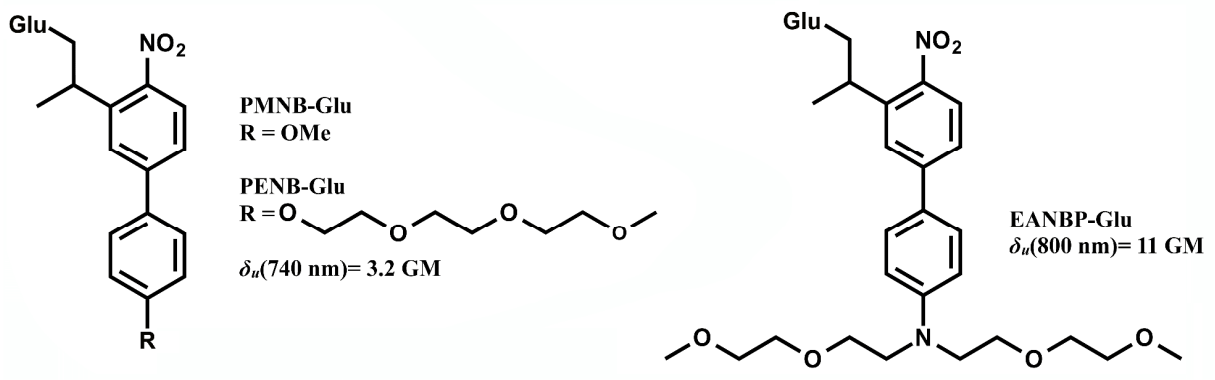


Figure 35. *PMNB-Glu, PENB-Glu et EANBP-Glu*

Il est important de préciser que le PMNB et le PENB ont des paramètres photochimiques similaires, mais la solubilité accrue du PENB en milieu biologique (aqueux) due à la chaîne éthylène glycol est un avantage pour une application biologique de ces groupements photolabiles. Ces deux composés ont été très largement étudiés,[26,27,79] ce qui nous donne accès à l'ensemble de leurs paramètres photochimiques et photophysiques (Tableau 2). L'évolution du spectre d'absorption durant l'irradiation permet de suivre la réaction de photolyse, les points isobestiques définis par ces spectres nous indique que la réaction forme majoritairement un type de sous-produit. Enfin le dosage du glutamate libéré, nous indiquera que la voie de photolyse est privilégié (Figure 36).

	λ_{max} (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	R_{lib}	ϕ_u	$\delta_u\phi_u$ (GM)(λ)	Solubilité (PBS pH7.4)	Hydrolyse (24h dans PBS pH 7.4)
PMNB-Glu	317	9900	90 %	0.09	3.2 (740 nm)	nd	3 %
PENB-Glu	317	9900	90 %	0.09	3.2 (740 nm)	> 5 mM pour PENB-Glu	3 %

Tableau 2. *Données photophysiques et photochimique de PMNB-glu et PENB-Glu.*[26]

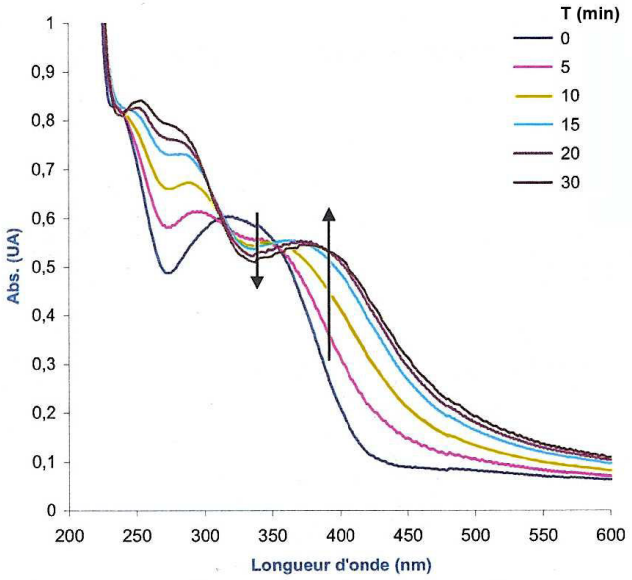


Figure 36. *Spectre d'absorption et évolution au cours de l'irradiation (en minutes) de PENB-Glu.*[80]

On peut voir au cours du temps une diminution de l'absorbance à 317 nm qui correspond à la disparition du glutamate cagé et une augmentation à 300 et 390 nm qui traduit la formation du sous-produit de photolyse. La longueur d'onde plus élevée suggère la formation d'un sous-produit avec un système conjugué plus étendu comme l'évoque le mécanisme proposé dans la littérature. Cependant ces sous-produits n'ont pas été caractérisés car l'irradiation continue provoque une dégradation de ceux-ci.[80] Une fois excité le produit peut emprunter plusieurs voies réactionnelles, l'optimisation des composés *o*-NPP a permis de favoriser la réaction majoritaire conduisant au photoclivage mais des réactions secondaires peuvent apparaître (Figure 37).[81]

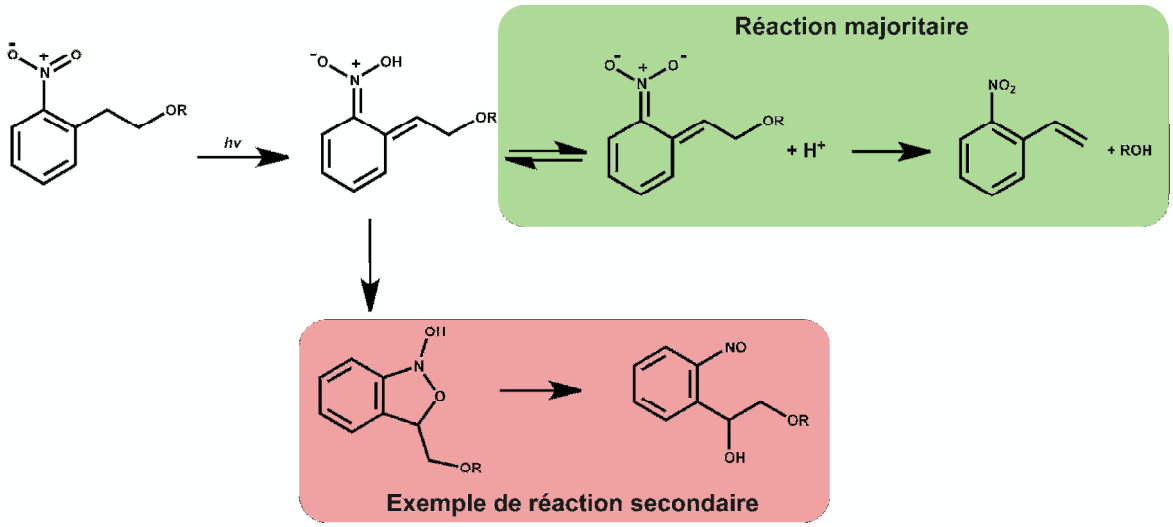


Figure 37. *Mécanismes photochimiques proposés pour la série o-NPP.*[5]

Voyons maintenant comment il est possible de combiner plusieurs GPP au sein d'une même molécule. La synthèse d'un dimère et d'un tétramère non conjugué vont permettre d'observer les propriétés de ce type de composés afin d'orienter nos choix pour des composés de plus grande taille.

II.2. Synthèse

II.2.1. Dimère non conjugué

Le projet a débuté avec la synthèse d'un dimère non-conjugué. Pour relier les deux GPP entre eux, une chaîne diéthylène glycol a été choisie afin de correspondre au plus près au modèle du PENB et d'augmenter la solubilité du système. La voie de synthèse choisie pour le DPENB est convergente (Schéma 1).

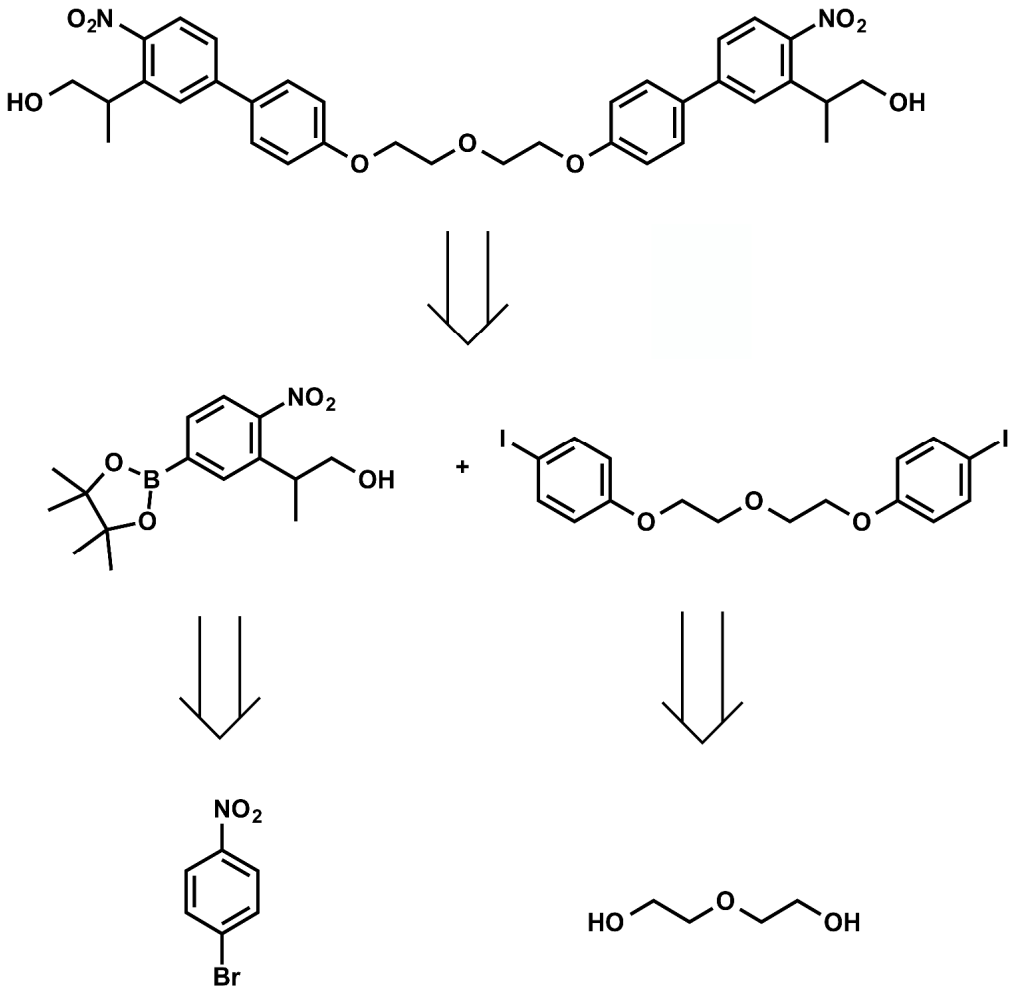


Schéma 1. *Rétrosynthèse du DPENB.*

Le premier synthon **3** (Schéma 2) est préparé comme décrit dans la littérature.[82] La synthèse commence par une substitution nucléophile aromatique indirecte [83,84] en *ortho* du *para*-bromonitrobenzene pour former l'ester **1**, suivie d'une méthylation en *alpha* du carbonyle et d'une réduction de l'ester pour obtenir l'alcool **2**. L'halogène est ensuite substitué par un ester boronique ce qui mène à l'ester boronique **3**. Pour le second synthon **5**, un bis-tosylate **4** est préparé à partir du diéthylène glycol, après substitution nucléophile par le 4-iodophénol on obtient l'espèce di-halogénée **5**. Ensuite, après un double couplage de Suzuki entre **3** et **5** sous conditions micro-ondes, le dimère non-conjugué DPENB est obtenu avec un rendement de 5% en 5 étapes (Schéma 2). A partir du **DPENB** une grande variété de substrats peut être fixée. Dans notre cas, nous allons tout d'abord effectuer une estérification avec l'acide (4-méthoxyphényl)acétique (mpa) pour obtenir le DPENB-mpa$_2$. Le mpa est un chromophore qui pourra être détecté simplement par spectroscopie UV-visible, ce qui va permettre une détermination rapide de l'efficacité du GPP. Le dosage d'effecteur biologique tel que le

glutamate, qui n'absorbe pas dans la zone UV-visible nécessite un kit de dérivatisation ce qui rend la procédure beaucoup plus longue. Le mpa mime la liaison entre le DPENB et le glutamate, l'efficacité de photolibération devrait ainsi être similaire transposable d'un ligand à l'autre.

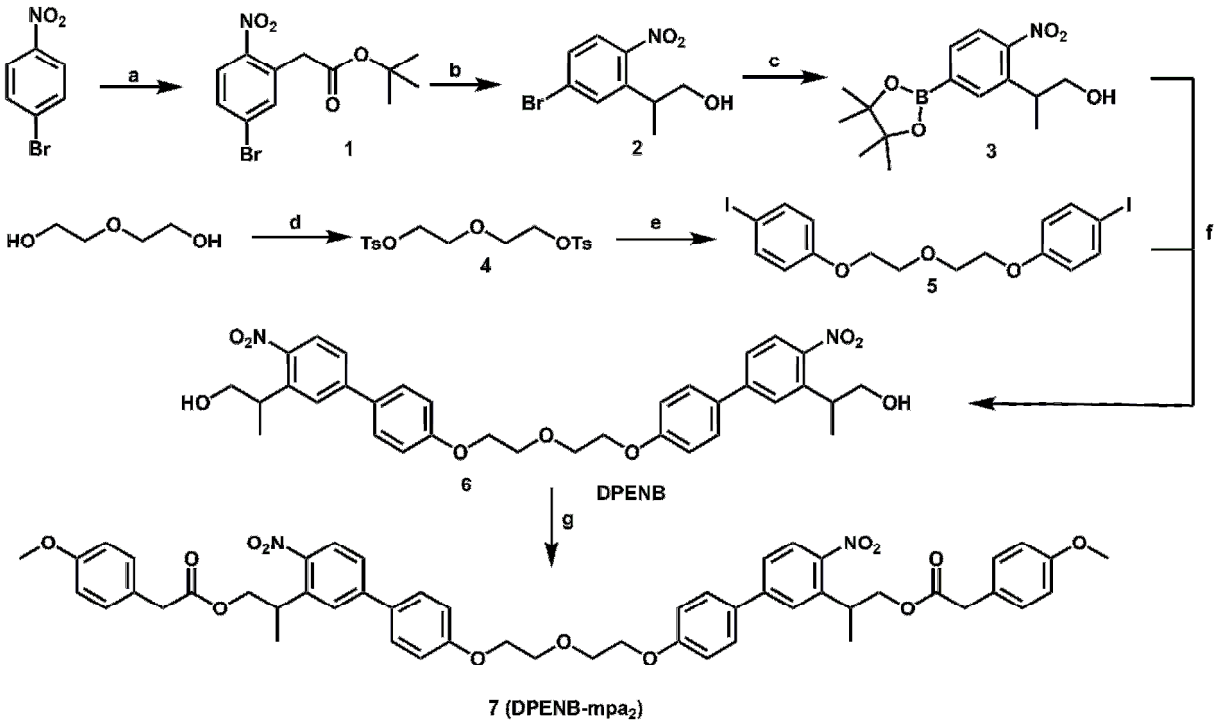


Schéma 2. *Synthèse du dimère non conjugué DPENB*

a) *tert*-butoxide de potassium, *tert*-butylchloroacetate, DMF, TA, 2 h, 99%. b) 1. NaH, CH_3I, THF, 24 h TA, 83%; 2. DIBAL-H, THF, 30 min, 0°C, 67%. c) bis(pinacolato)diborane, AcOK, Pd(dppf)Cl_2, DMSO, 80°C, 15 h, 53%. d) TsCl, Et_3N, CH_3CN, TA, 24 h, 88%. e) K_2CO_3, iodophénol, CH_3CN, 100°C, 24 h, 65% f) K_2CO_3, TBAB, Pd$(OAc)_2$, EtOH/H_2O (2:1), microondes 170°C, 15 min, 25%. g) acide 4-methoxyphenylacetique, DCC, DMAP, DCM, 15 h, TA, 44%.

II.2.2. Tétramère non conjugué

Un tétramère non conjugué, basé sur un cœur pentaérythritol a aussi été préparé, Le but va être de fixer de manière covalente quatre PENB ensembles, autour du pentaérythritol C'est à nouveau une synthèse convergente basée sur deux synthons préparés en parallèles (Schéma 3).

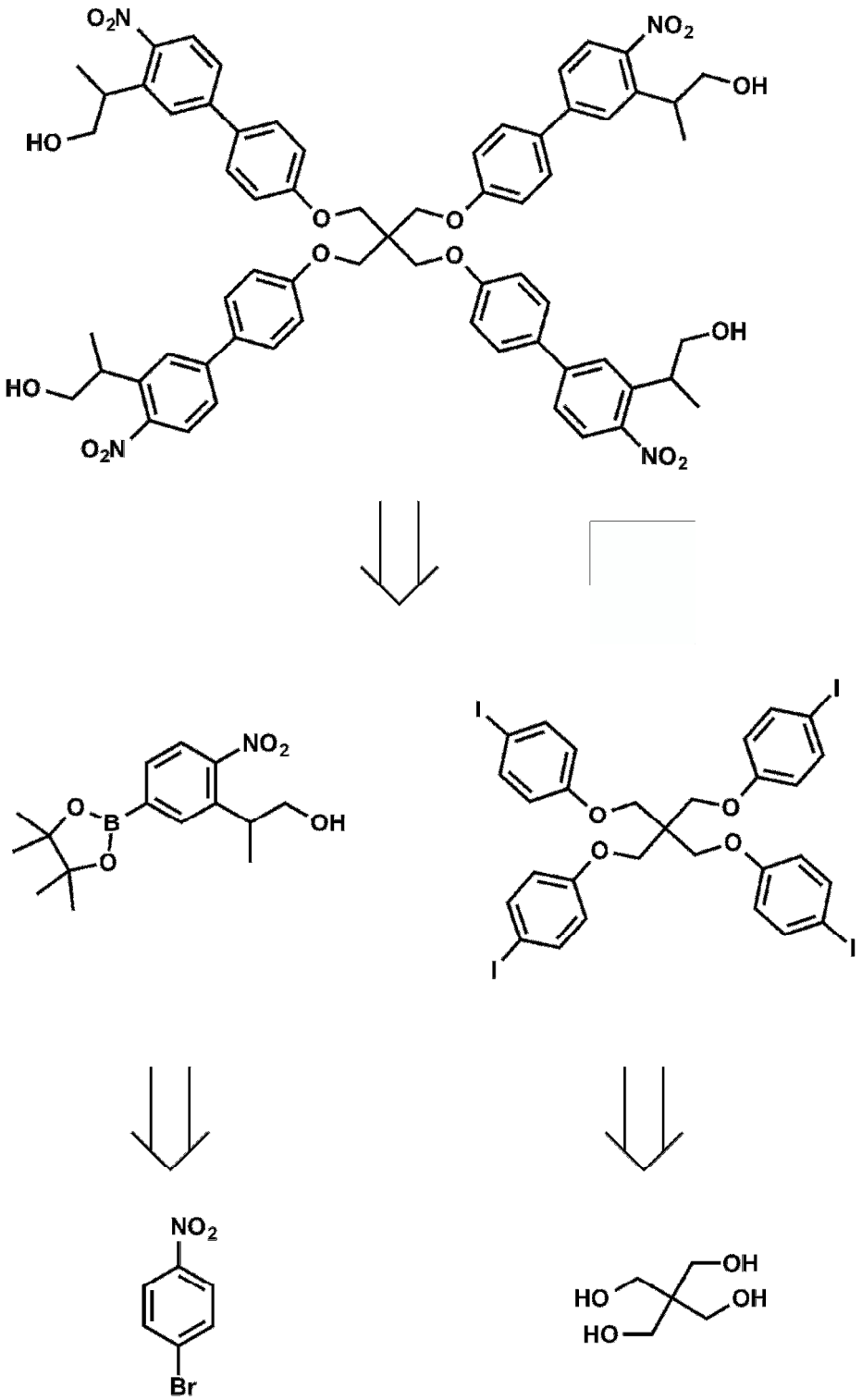


Schéma 3.*Rétrosynthèse du TPENB*

Le synthon **3** est le même que celui utilisé dans la section précédente. La même voie de synthèse que le diéthylène glycol est utilisée pour le second synthon, mais cette fois avec le pentaérythritol. On forme tout d'abord le *tétra*-tosylate **8**, qui est ensuite substitué par l'iodophénol pour obtenir l'espèce *tétra*-iodée **9**. L'étape suivante est un « tétra-couplage » de Suzuki ; cependant le manque d'efficacité de la réaction n'a pas permis d'obtenir le TPENB **10** pur avec de bons rendements. En effet, même après purification, le TPENB **10** est mélangé à deux autres composés : **10b** un dérivé n'ayant que trois dérivés nitro et ayant subi la perte de

l'iode sur son dernier cycle et le *pseudo*-TPENB **11** qui possède quatre PENB mais dont l'un a subi une déformylation. La réaction à l'origine de la dégradation du *pseudo*-TPENB ne semble pas commune. La séparation de **10** et **11** a pu être réalisée sur HPLC analytique, cependant afin de d'obtenir une quantité exploitable à l'étape finale, la décision a été prise d'effectuer le couplage du mpa sur le mélange. De plus, après estérification du mpa, la purification devrait être simplifiée du fait que l'un des composés possède quatre mpa et les deux autre trois. Finalement, seul le *pseudo*-TPENB-mpa$_3$ **12** a pu être isolé en quantité suffisante pour les premières mesures photochimiques. Le TPENB-mpa$_4$ est tout de même détecté à l'état de trace, mais ne sera hélas pas exploitable. Le produit **12** obtenu peut être considéré comme un *pseudo*-tétramère car il possède bien les quatre blocs biphényles, néanmoins seul trois mpa ont pu être greffés. Il nous a semblait pertinent d'étudier ce composé car il possède une structure très similaire à la molécule visée et pourra fournir des informations sur le processus de photolyse.

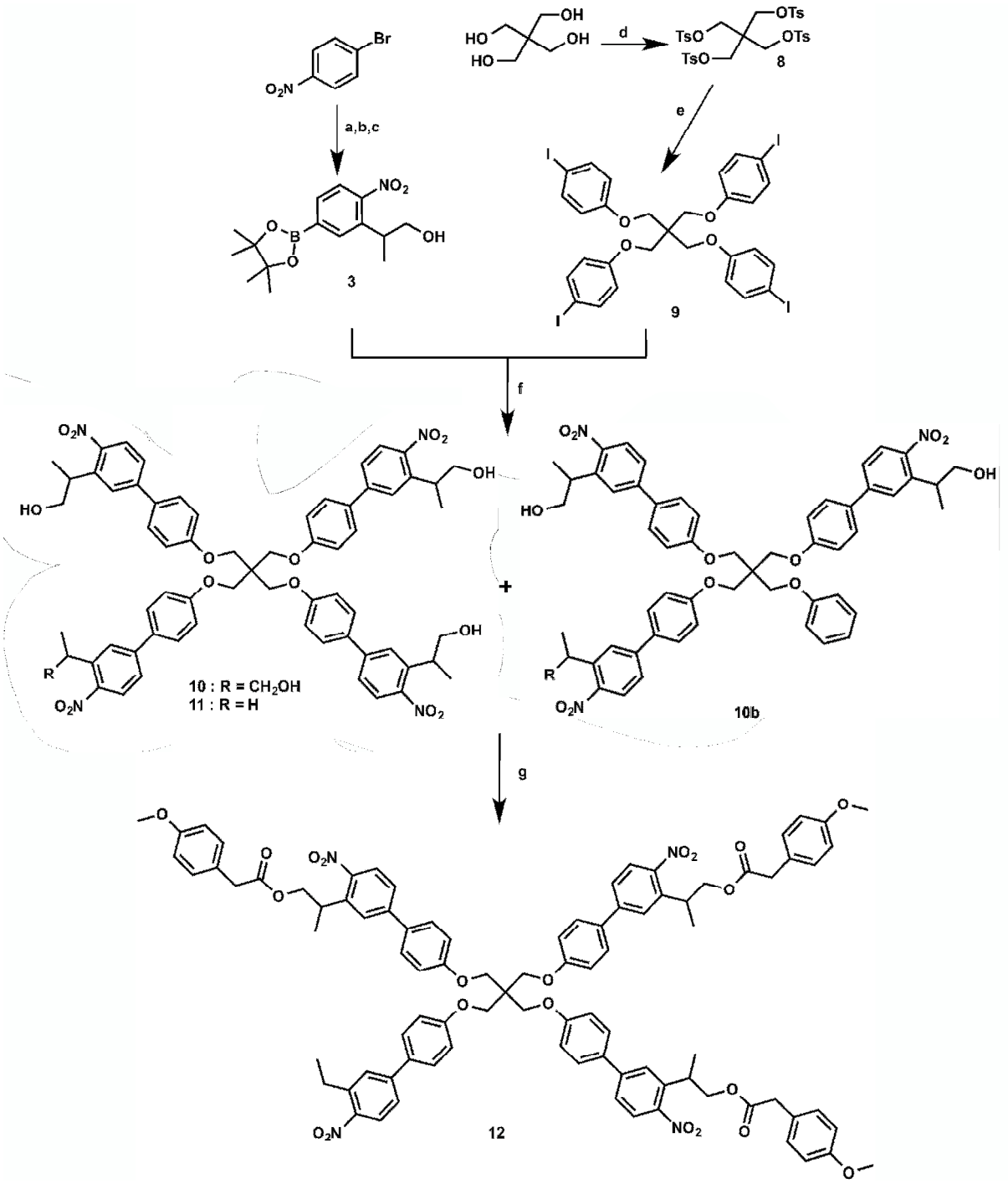


Schéma 4. *Synthèse du TPENB-mp4*

a) *tert*-butoxide de potassium, *tert*-butylchloroacetate, DMF, TA, 2 h, 99%. b) 1. NaH, CH_3I, THF, 24 h TA; 2. DIBAL-H, THF, 30 min, 0°C, 67%. c) bis(pinacolato)diborane, AcOK, $Pd(dppf)Cl_2$, DMSO, 80°C, 15 h, 53%. d) TsCl, Et_3N, CH_3CN, TA, 24 h, 30%. e) iodophenol, NaOH, DMF, 160°C, 24 h, 71%. f) K_2CO_3, TBAB, $Pd(OAc)_2$, EtOH/H_2O (2:1), microondes 160°C, 45 min, 13%. g) acide 4-methoxyphenylacetique, DCC, DMAP, DCM, 15 h, TA, 10%

II.3. Etude photophysique et photochimique des dimères et tétramères non conjugués

Le coefficient d'extinction molaire *(ε)* et le rendement de libération (R_{lib}) sont déterminés et comparés aux données de la littérature concernant PENB-Glu[26] considéré comme le monomère de cette série. (Tableau 3)

	λ_{max} (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	R_{lib} théorique	R_{lib} expérimental
PENB-Glu	**317**	**9900**	**/**	**90 %**
DPENB-mpa$_2$	**312**	**12 600**	**180 %**	**80 %**
***pseudo*-TPENB-mpa$_3$**	**335**	**25 000**	**270 %**	**70 %**

Tableau 3. *Paramètres photochimiques pour le DPENB-mpa$_2$ et du pseudo-TPENB-mpa$_3$*

Tout d'abord, étudions les résultats obtenus pour le dimère DPENB. Le premier paramètre comparé est le λ_{max}, celui-ci ne varie pas de manière significative entre PENB et le DPENB. Les molécules de la série des *o-NPP* possèdent en effet une bande d'absorption très large entre 300 et 350 nm qui ne permet pas une détermination très précise du maximum d'absorbance. Additionné à l'absorption caractéristique des GPP on note l'apparition de l'absorbance des groupements mpa à 270 nm (Figure 38). Le fait de lier de manière covalente mais non conjuguée deux PENB ensemble devrait conduire, selon la loi de Beer-Lambert, à une addition de leur ε pour un résultat attendu d'environ 19 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Hors nous observons un ε de 12 600 $M^{-1}.cm^{-1}$ ce qui suggère une interaction entre les deux blocs aromatiques responsable de l'absorbance.[85,86] On peut supposer que des interactions intramoléculaires de type π-π-stacking se mettent en place.

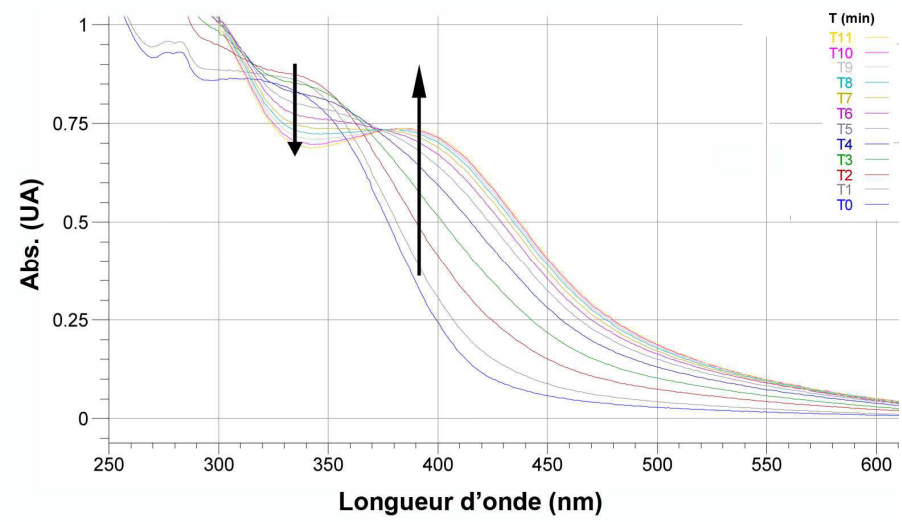


Figure 38. *Spectre d'absorption et évolution au cours de l'irradiation à 315 nm (en minutes) du DPENB-mpa$_2$. Mesures effectuées à 25 µM dans un mélange 1/1 tampon PBS1x / CH_3CN toutes les minutes pendant 11 minutes.*

L'évolution du spectre d'absorption au cours de l'irradiation est similaire à celui obtenu avec PENB-Glu, ainsi on retrouve une diminution de l'absorbance au λ_{max} qui correspond à la disparation du mpa cagé et une augmentation de l'absorbance à 300 et 390 nm qui traduit la formation du sous-produit de photolyse. La formation du sous-produit peut-être visualisée de manière plus distincte en soustrayant le spectre d'absorption à t= 0 avec chaque spectre relevé à un temps différents. On obtient ainsi un graphique où l'on distingue nettement l'évolution de la réaction de photolyse et la formation des sous-produits (Figure 39). Cependant, il est important de noter qu'il n'y a pas de points isobestiques nets, les courbes ne vont converger qu'après trois minutes d'excitation. Ce phénomène va traduire la présence d'au moins un processus photochimique supplémentaire qui ne conduit pas au photoclivage voulu, de plus de t0 à t3 les spectres semblent subir une translation qui pourrait indiquer un réarrangement de la molécule.

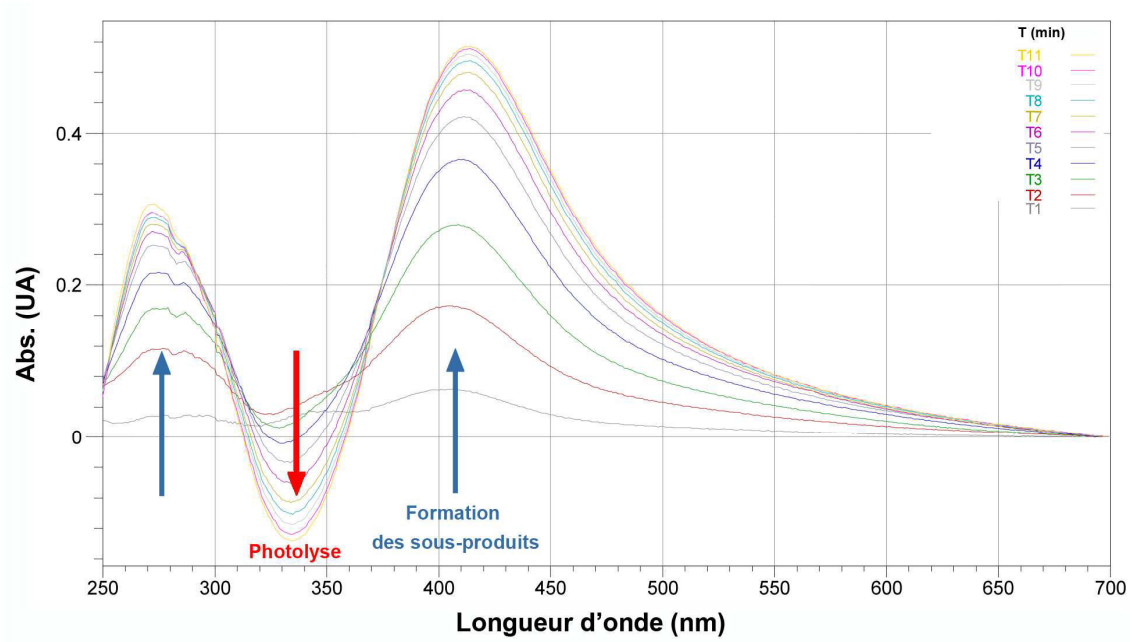


Figure 39. *Soustraction des spectres enregistrés au cours de l'irradiation à 315 nm par rapport à T0 du DPENB-mpa$_2$.*

Malgré un profil d'irradiation satisfaisant se rapprochant de celui obtenu pour le monomère, le R_{lib} est plus faible qu'attendu, après excitation seule 0.8 mpa par molécule sont libérés, ce qui est plus faible que les résultats du PENB tout en restant dans le même ordre de grandeur. Ainsi l'interaction entre les deux sous-unités PENB du dimère à l'origine de la faible absorbance perturbe également la réaction de photolyse.

Ce phénomène a aussi été observé sur le *pseudo*-TPENB-mpa$_3$ mais de manière plus accentuée. Cette fois, on constate un déplacement bathochrome du λ_{max} d'une vingtaine de nm (Figure 40). A nouveau l'ε est plus faible que celui attendu, 25 000 au lieu de 38 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ environ. Il est intéressant de noter que l'ε du *pseudo*-tétramère correspond au double de celui du dimère. Ce qui pourrait traduire une interaction par paire entre les quatre structures biphényles.

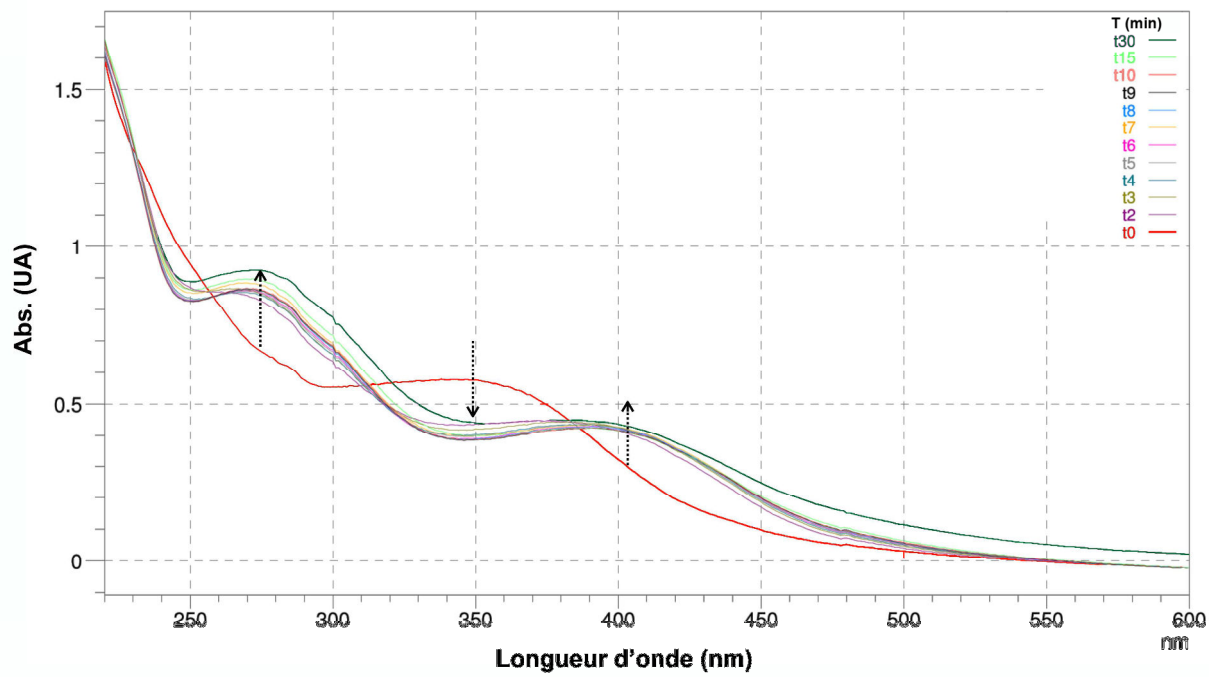


Figure 40. *Spectre d'absorption et évolution au cours de l'irradiation à 315 nm du pseudo-TPENB-mpa$_3$.*

Le profil d'irradiation va montrer une évolution rapide et également plus discrète (amplitude plus faible), en effet on constate qu'après deux minutes d'excitation un palier est atteint et va très peu varier même après 30 minutes d'irradiation. Ceci est confirmé par les spectres différentiels qui nous permettent de voir qu'il n'y a que très peu d'évolution de la photolyse dans le temps et une absence de points isobestiques qui suggère que des voies réactionnelles secondaires qui ne mènent pas à la photolyse sont empruntées (Figure 41).

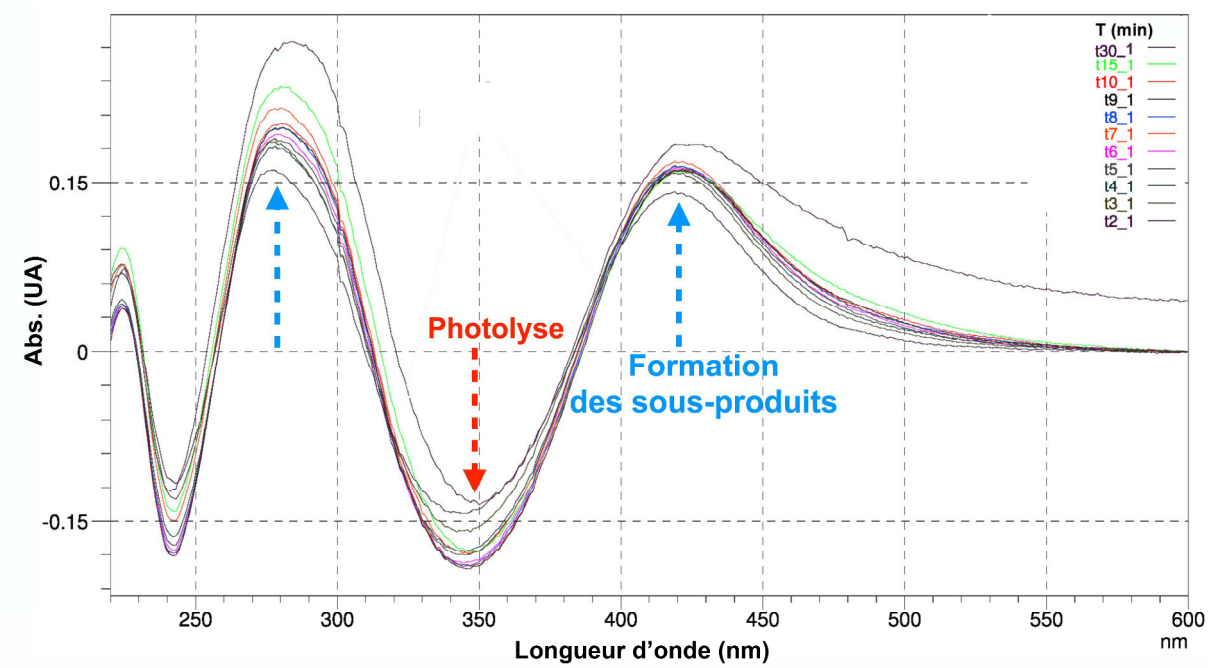


Figure 41. *Soustractions des spectres enregistrés au cours de l'irradiation par rapport à T0 du pseudo-TPENB-mpa$_3$.*

Enfin, le R_{lib} est de 0.7 mpa par molécule libérée après excitation ce qui est plus faible que pour PENB ou DPENB. On peut ainsi conclure que la quasi-totalité de la réaction de photolyse s'effectue dans les deux premières minutes (présence de deux points isobestiques) et permet de libérer 0.7 mpa par molécule.

II.4. Conclusion préliminaire

Les premières expériences ont permis de mettre en avant la présence d'interactions intramoléculaires à priori de type π-π-stacking entre les différents blocs aromatiques. L' ε nous suggère des interactions par paires (Figure 42) qui vont être à l'origine d'une diminution de l'absorbance mais également d'une perturbation de la réaction de photolyse.

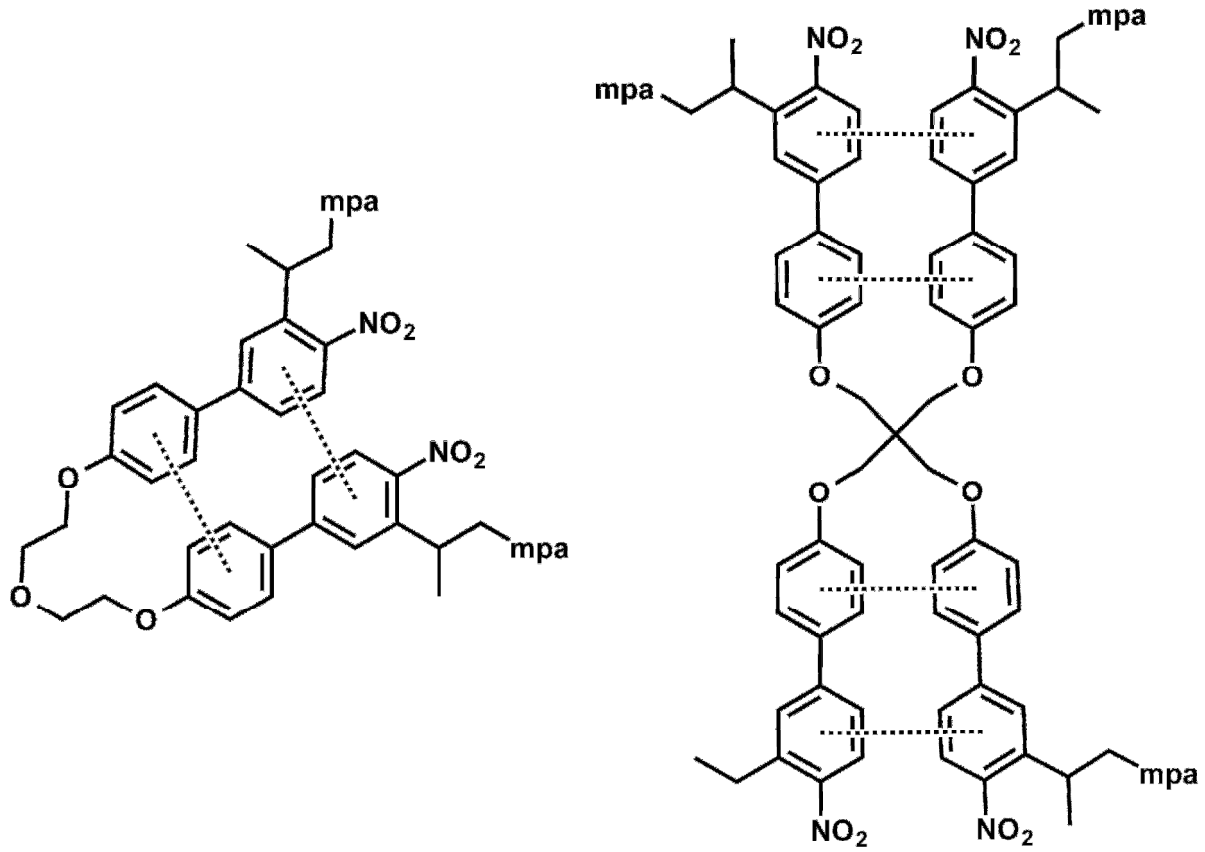


Figure 42. *Schéma des interactions de π-π-stacking possibles pour DPENB-mpa$_2$ et pseudo-TPENB-mpa$_3$.*

Si l'on considère que la photolyse des sous-unités s'effectue de manière séquentielle, les interactions intramoléculaires ne semblent pas poser de problème lors du premier photoclivage, les rendements de libération restant dans la même gamme que le monomère. Par contre, une fois qu'une des deux sous-unités de la paire se sépare de son ligand, la gêne stérique du mpa disparait et l'interaction entre les deux sous-unités peut se renforcer ce qui peut perturber le second photoclivage (Figure 43). Dans le cas du *pseudo*-tétramère, l'une des sous-unités ne peut pas fixer de ligand, l'interaction avec la sous-unité voisine sera déjà maximale. Ainsi le composé n'aurait la possibilité réelle de ne libérer qu'un seul ligand, ceci expliquerait le faible résultat du R_{lib}.

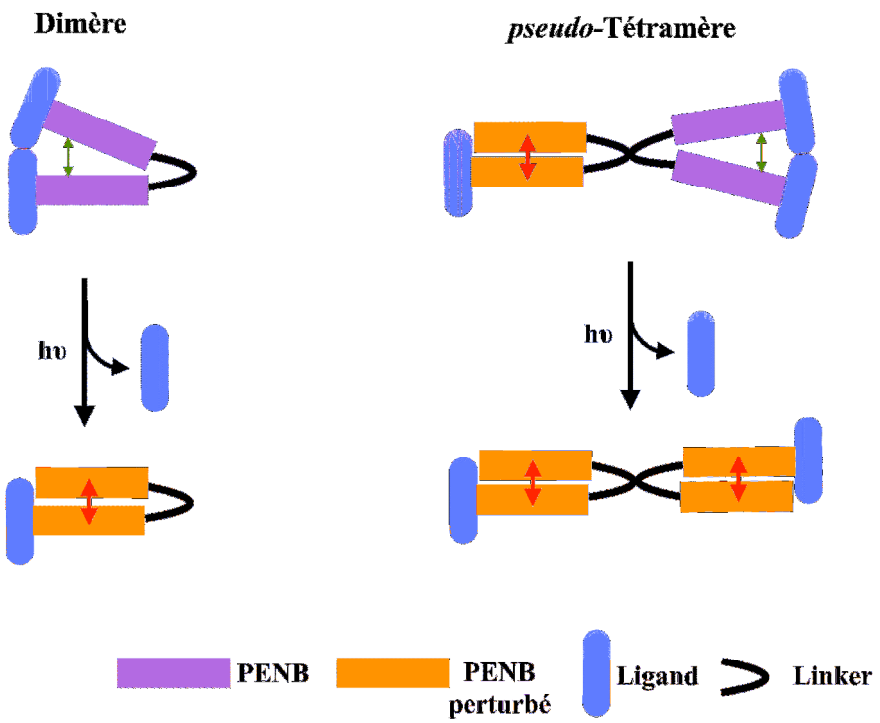


Figure 43. *Représentation possible des interactions intramoléculaires pour DPENB et pseudo-TPENB avant et après excitation*

Cette explication n'est cependant pas complète puisque nous devrions obtenir 90% de rendement de libération comme pour le PENB. Il faut considérer un autre point, les sous-produits formés après photolyse du PENB ne vont pas perturber la photochimie de ce dernier, cependant les sous-produits provenant du DPENB ou du *pseudo*-TPENB sont liés entre eux et peuvent plus facilement interagir avec les autre sous-unités n'ayant pas encore effectué le photoclivage. On peut néanmoins écarter cette possibilité pour le DPENB car son spectre d'absorption au cours de l'irradiation montre une évolution constante qui ne semble pas être perturbée par une espèce secondaire, contrairement à ce qu'on peut voir avec le *pseudo*-tétramère.

Des simulations de dynamique moléculaire avec le logiciel ChemBio3D® peuvent nous donner des informations sur le comportement de ces espèces. La dynamique moléculaire utilise la mécanique Newtownienne pour simuler les mouvements des atomes. Ces simulations sont effectuées en phase gazeuse, et n'ont pas la prétention de modéliser ce qui se passe pour nos échantillons en présence de solvant. Néanmoins les tendances présentées par celles-ci semblent pertinentes à la vue des résultats expérimentaux. Ainsi, on constate bien un rapprochement des deux blocs aromatiques avec des distances qui varient entre 3.9 et 5.0 Å. De plus, sur le TPENB, le π-stacking est présent par paires de sous-unités. Il semblerait également que le mpa n'ait pas d'influence majeure et ne participe pas à ces interactions (Figure 44).

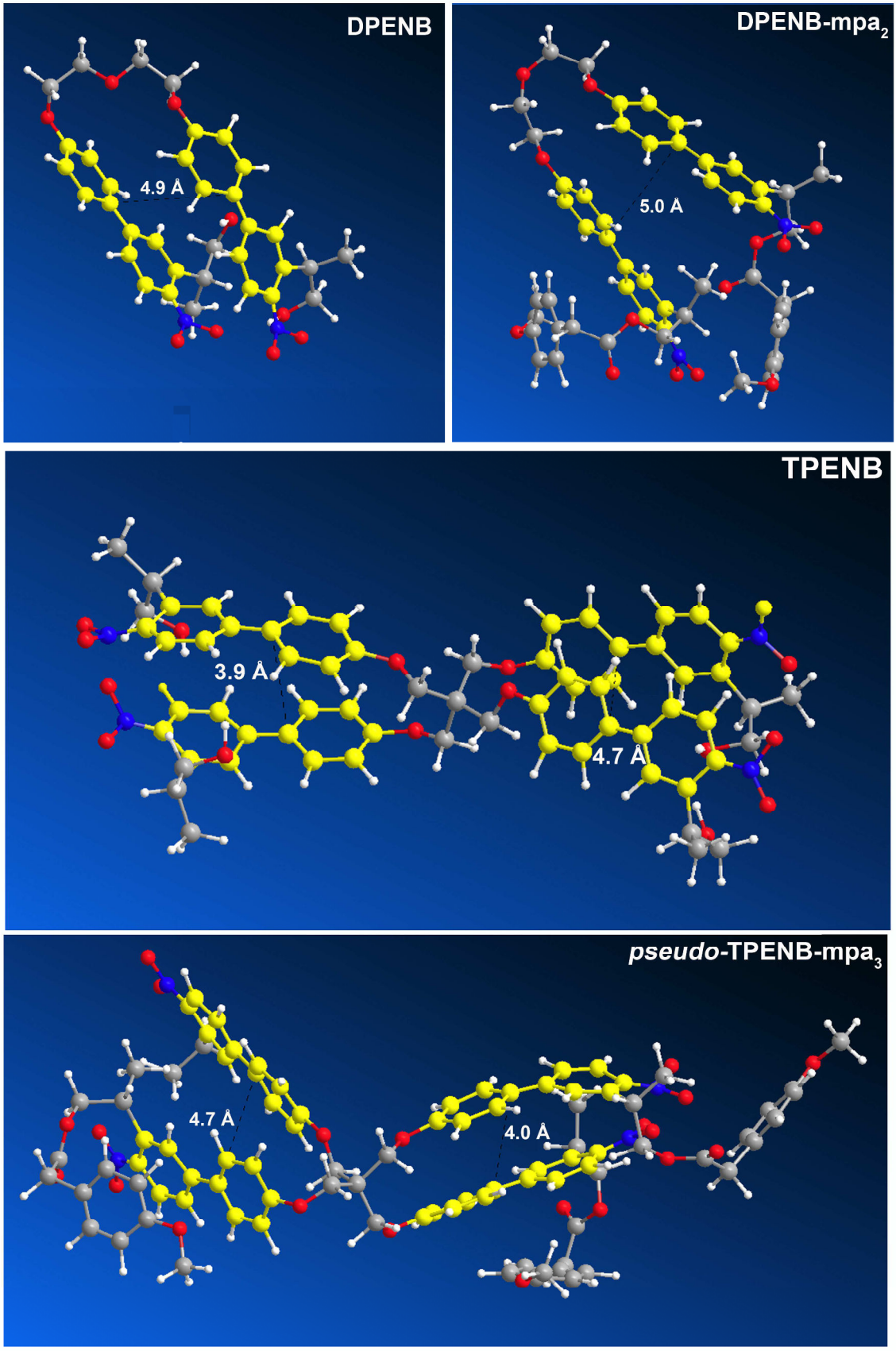


Figure 44. *Simulation de dynamique moléculaire de différents GPP nanostructurés (bloc aromatique en jaune).*

Des simulations ont également été effectuées sur des dérivés du DPENB possédant des chaînes centrales éthylène glycol plus longues (jusqu'à 32 atomes de carbones), aucune différence significative n'a été relevée sur ces simulations. La flexibilité de la chaîne éthylène glycol n'empêche pas le rapprochement des blocs aromatiques, mêmes les plus longues chaînes ont tendances à s'enrouler sur elles-mêmes, ce qui ne favorise pas l'éloignement des GPP.

II.5. Alternative

Structurer au sein d'une même plateforme des GPP à l'aide d'un simple lien organique tel que le diéthylène glycol ou le pentaérythritol ne semble pas suffisant pour obtenir un composé efficace. En effet, il semble nécessaire de supprimer les interactions possibles entre les différentes sous-unités. Pour cela, la partie centrale de la molécule doit être modifiée. Le diéthylène glycol et le pentaérythritol sont des groupements de petite taille et flexibles, ce qui peut favoriser les interactions intramoléculaires. Les expériences précédentes nous ont permis de déterminer les critères important pour le choix du cœur du composé, comme la solubilité, la taille et la flexibilité. Comme alternative, nous nous sommes tournés vers les groupements polyamidoamine (PAMAM). Ce sont des systèmes dendrimériques qui se déclinent en plusieurs générations, très solubles en milieu aqueux et possédant des amines terminales facilement fonctionnalisables. De plus, ce sont des produits commerciaux, ce qui permet d'avoir facilement accès à une large gamme de dendrimères. Cependant, ils restent flexibles et ne vont pas figer complètement la conformation des sous-unités. Il s'agit là d'un compromis car cela reste compliqué de trouver des composés solubles dans l'eau et également très rigides. Nous pensons que la longueur des chaînes sera suffisante pour éloigner les sous-unités les unes des autres. Les simulations de dynamique moléculaire effectuées préalablement sur le PAMAM de génération 0, qui peut posséder jusqu'à quatre GPP, semblent indiquer un espacement des sous-unités photosensible (Figure 45).

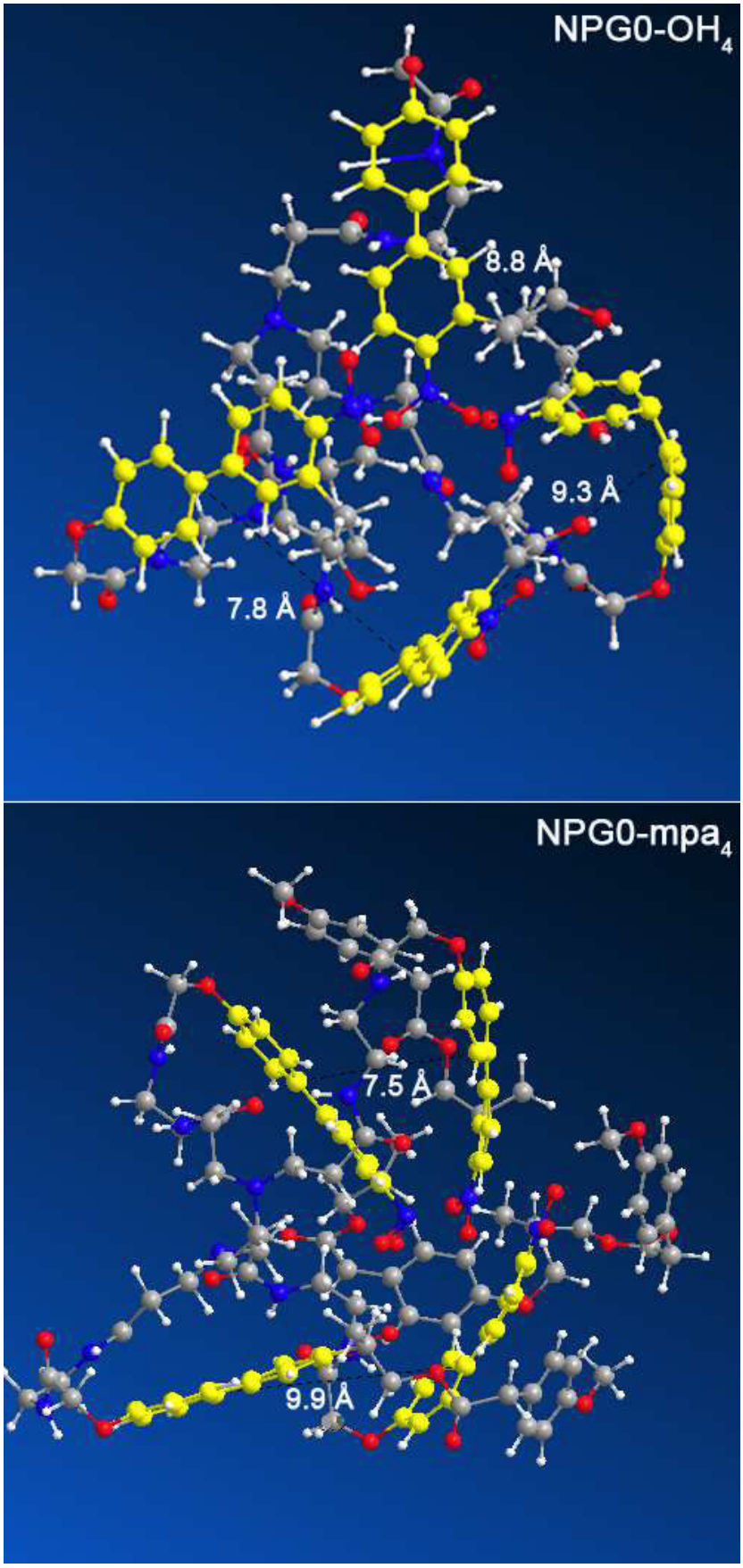


Figure 45. *Simulation de dynamique moléculaire avec le nouveaux « cœur » PAMAM (bloc aromatique en jaune).*

CHAPITRE III

DENDRIMERE DE TYPE PAMAM

III.1. Introduction

Les PolyAMidoAMines (PAMAM) sont une classe de dendrimères qui sont constitués de l'enchainement de sous-unités amides et amines. Synthétisés pour la première fois en 1985[87], c'est la première famille de dendrimère à être caractérisée et commercialisée. Ils sont parfois appelés « starburst » ce qui signifie littéralement « éclatement d'étoile » en référence à leur forme sphérique et au fait que chaque génération est de plus en plus grande.[88] Les dendrimères de types « starburst » sont séparés en trois niveaux d'architectures : le cœur initiateur, pour le PAMAM il s'agit de l'éthylène diamine, la couche intérieure liée de manière radiale au cœur initiateur, qui va définir la génération en fonction du nombre d'unités répétées, et la couche externe liée à la dernière répétition de la couche interne, qui correspond aux groupements terminaux portant les amines libres (Figure 46).

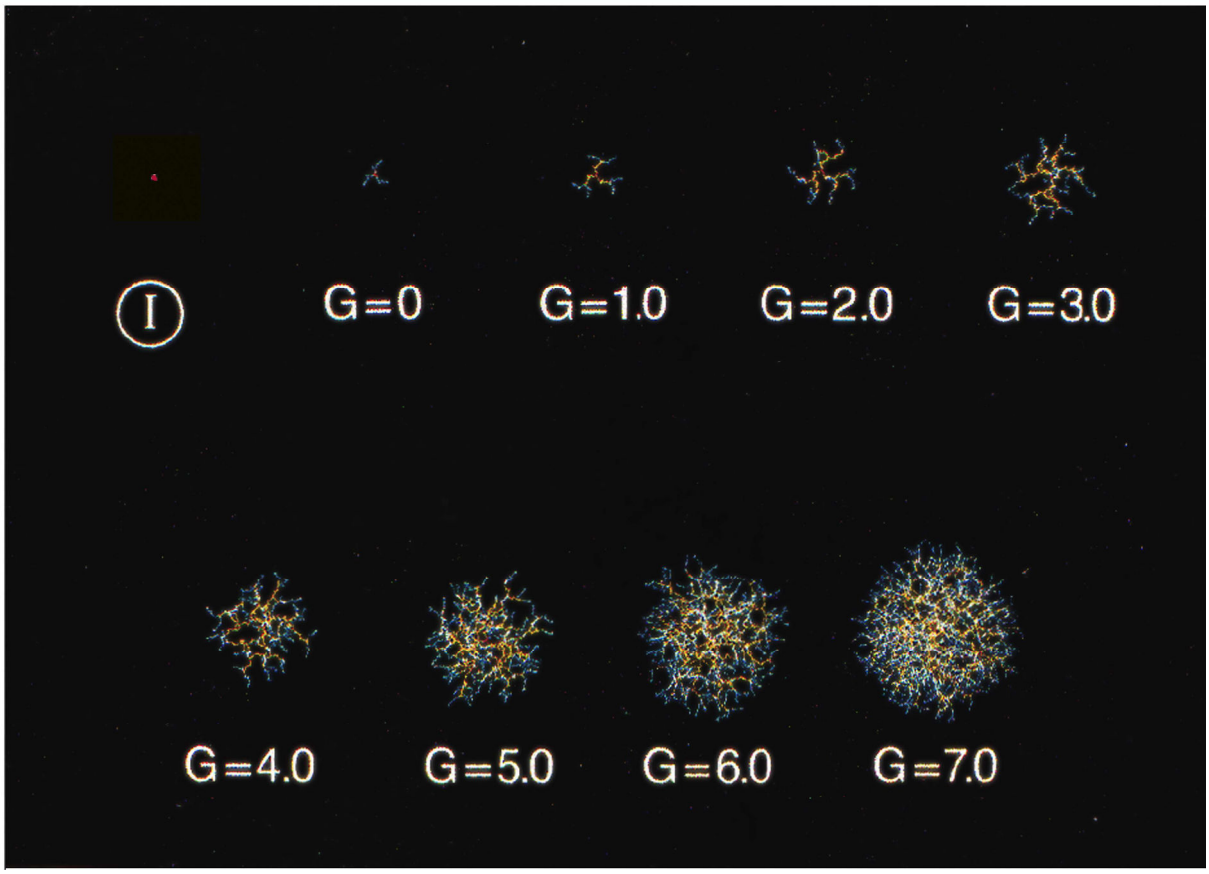


Figure 46. *Structures moléculaires simulées de différentes générations de PAMAM. Cœur initiateur (I), rouge ; couche interne, jaune ; couche externe, bleue.*[88]

La dendrimérisation des PAMAM permet un contrôle précis de leur taille et de leur forme, ce qui en fait un outil de valeur dans de nombreux domaines. Tout d'abord, leur structure comprend de nombreux hétéroatomes qui lui permettent d'être très soluble en milieux biologiques. Ils vont souvent être utilisés pour développer des nanotransporteurs du fait de ça biocompatibilité et sa fonctionnalisation aisée.[89] Ils ont également été associés à des GPP pour la libération contrôlée d'anti-cancéreux mais avec des groupements sensibles uniquement en excitation à un photon[90]. De plus, moins de 10 % des positions (8/110) disponibles sont utilisées pour lier des GPP, le reste sera fonctionnalisé avec des dérivés d'acide folique utiles pour l'adressage de cellules cancéreuses.[90,91] Enfin, certains composés destinés à l'imagerie ont aussi été associés au PAMAM et à ce jour ils restent les seuls exemples d'utilisation du

PAMAM pour structurer des fluorophores sensibles à une excitation à deux-photons.[92–94] Il faut noter que les neurosciences ont déjà employé des dérivés de PAMAM pour la nano-thérapie ou encore l'imagerie, et il semblerait qu'ils soient compatibles avec l'utilisation que nous souhaitons en faire.[95] Il faudra cependant être attentif à la taille du composé, notre but étant de provoquer des réactions de photolyse à proximité d'une fente synaptique, il sera ainsi nécessaire que la molécule puisse y accéder. Les synapses possèdent des fentes synaptiques d'environ 200 Å nous devrons donc nous limiter aux premières générations de PAMAM.[96] Les dendrimères peuvent être fonctionnalisés de différentes manières au niveau de leur groupements terminaux (amine, alcool, acide carboxylique, sel de carboxylate, ester, acide succinique …). Au regard de notre synthèse (voir III-2-1), nous avons choisi d'utiliser des PAMAM possédant des amines terminales (Figure 47). Comme nous allons travailler avec les premières générations (0 à 2), même en additionnant la taille des GPP que nous allons ajouter sur le dendrimère, il ne devrait pas y avoir de problème de taille avant la génération 7 (Tableau 4) et l'accès aux fentes synaptiques ne devrait pas poser problème.[88]

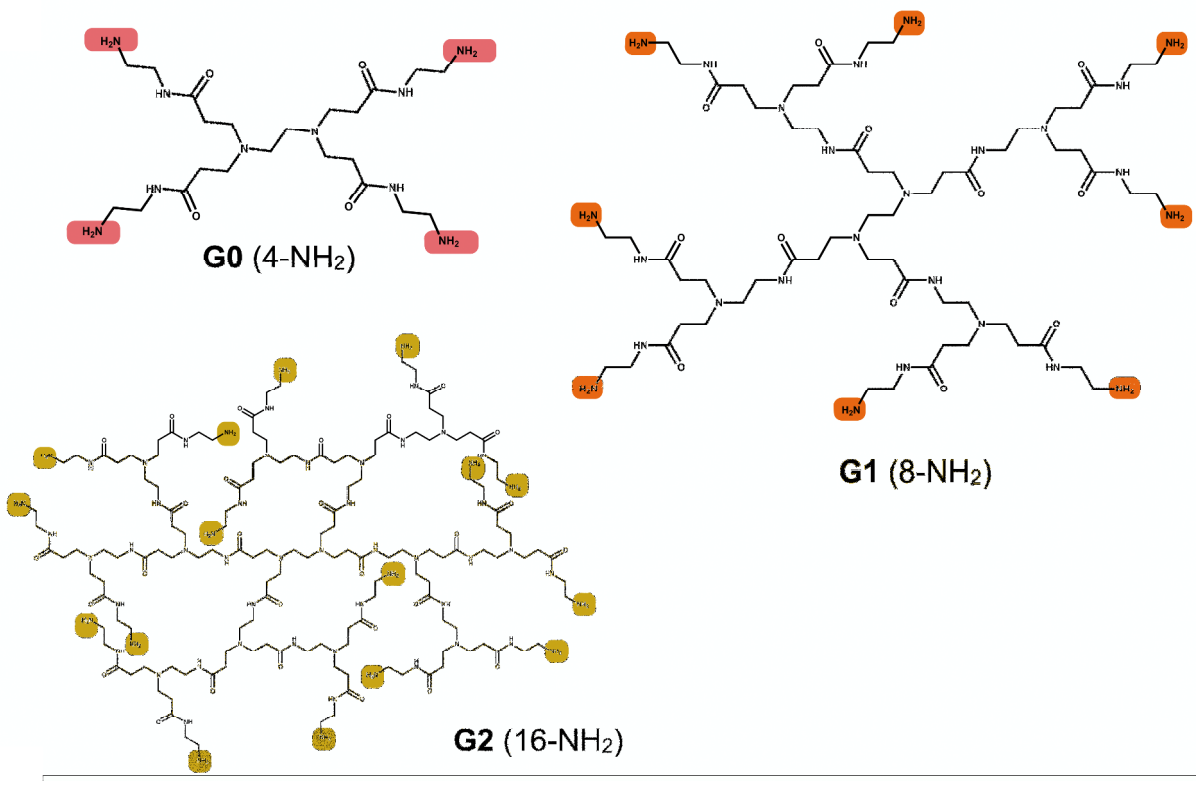


Figure 47. *Formules des PAMAM avec amines terminales (couleur) de génération 0, 1 et 2.*

Génération	*Poids moléculaire (g.mol⁻¹)*	Diamètre *(Å)*	Nombre de groupement terminal
0	517	15	4
1	1 430	22	8
2	3 256	29	16
3	6 909	36	32
4	14 215	45	64
5	28 826	54	128
6	58 048	67	256
7	116 493	81	512
8	233 383	97	1 024
9	467 162	114	2 048
10	934 720	135	4 096

Tableau 4. *Caractéristiques physiques des PAMAM-aminés.*[97]

III.2. PAMAM G0/G1

III.2.1. Synthèse

Afin de pouvoir conjuguer les GPP au PAMAM, la synthèse a dû être adaptée. Pour cela nous avons placé un acide carboxylique substitué sur le GPP qui permettra en utilisant des réactifs de couplage peptidique classiques d'obtenir une liaison amide stable à l'hydrolyse et adaptée aux milieux biologiques. D'autre part, le couplage de Suzuki se fait désormais à partir de l'acide (4-hydroxyphényl)boronique commercial plus stable que l'ester boronique utilisé précédemment. Cela permet d'obtenir un rendement global plus élevé car les réactions de couplage des GPP au PAMAM sont faites avec un large excès de GPP et en nécessite donc de grandes quantités.

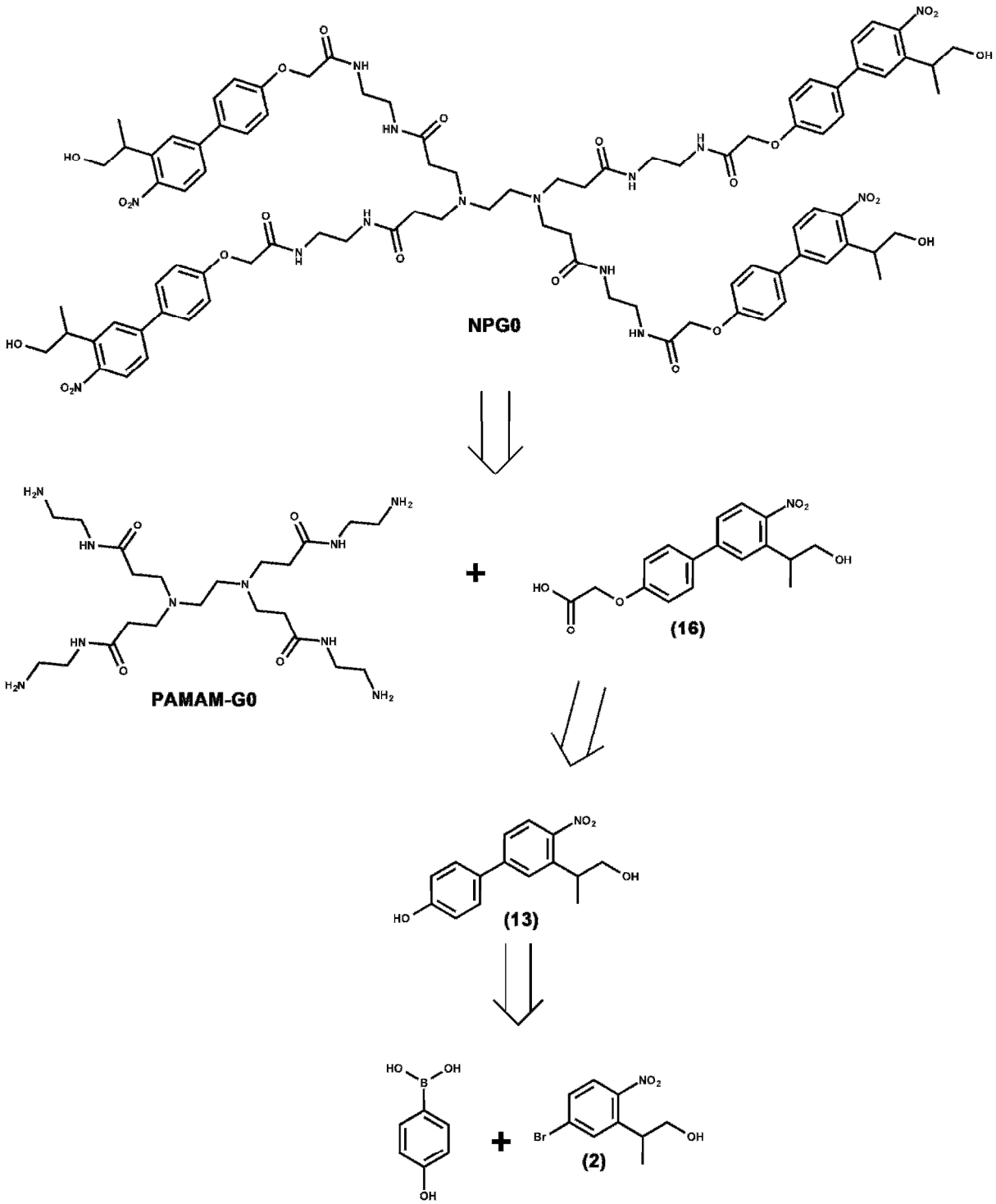


Schéma 5. *Rétrosynthèse du NPG0.*

A partir de l'alcool **2** dont la synthèse est décrite précédemment, et de l'acide (4-hydroxyphenyl)boronique, un couplage de Suzuki est utilisé pour former **13**. Une substitution nucléophile du *tert*-butylchloroacétate permet d'obtenir le composé **14**, dont l'alcool va être protégé par un groupement acétate dans le but de ne pas perturber le couplage avec le PAMAM. Pour finir, l'alcool protégé **15** est mis en présence de TFA afin de déprotéger sa fonction ester. L'acide carboxylique **16** peut ensuite être couplé avec le PAMAM. (Schéma 6)

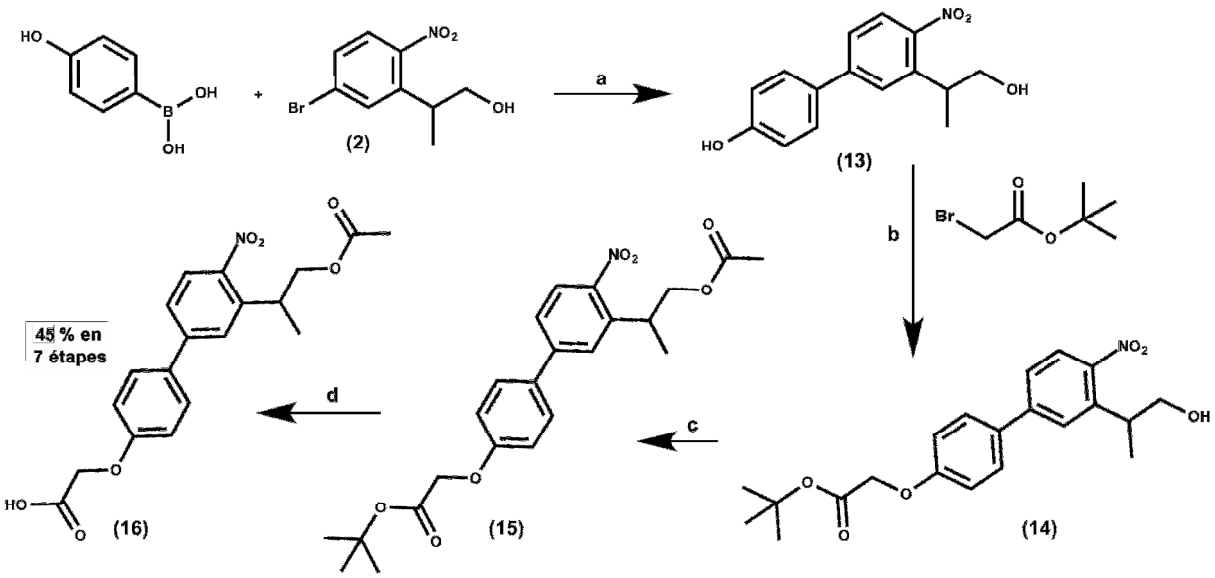


Schéma 6. *Nouvelle voie de synthèse du dérivé PENB pour le couplage aux dendrimères.*
a) TBAB, K_2CO_3, $Pd(OAc)_2$, 170 °C, 10 min., micro-ondes, eau, EtOH, 95%. b) K_2CO_3, ACN, DMF, TA, 95%. c) Ac_2O, DMAP, DCM, TA, 97%. d) TFA, DCM, TA, 95%.

Afin de mieux appréhender les propriétés de ces nouveaux composés, nous avons décidé de travailler avec les premières générations 0 et 1 qui possèdent respectivement quatre et huit groupements amines terminaux. Les mêmes conditions sont utilisées pour les deux générations. Le N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) et le 1-hydroxybenzotriazole (HoBt) vont former un ester activé à partir de l'acide **16**, qui va ensuite réagir avec les amines primaires du PAMAM pour former les liaisons amides du composé **17**. L'alcool **18** est régénéré en milieu basique dans le méthanol après une heure. Ces composés vont également être couplés par estérification de Steglich[98] au mpa pour former **19** et testés dans les mêmes conditions que les composés précédents. (Schéma 7)

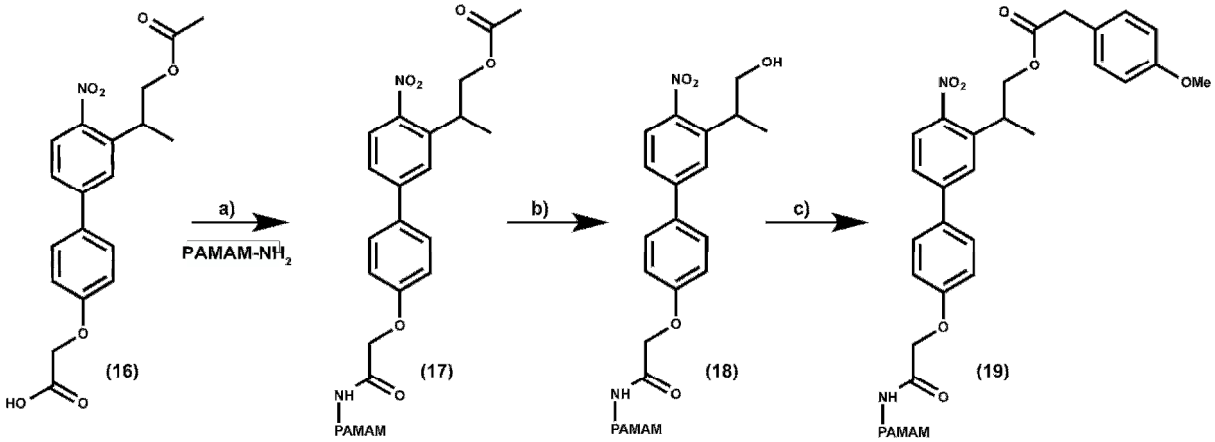


Schéma 7. *Couplage et fonctionnalisation du GPP sur un dendrimère de type PAMAM.*
a)1. DIC, HoBt, DMF, 30 min, TA. 2. PAMAM-G(x), DMF, 24h, TA, 82%(G0) / 52%(G1). b) K_2CO_3, MeOH, TA, 1h, 99% (G0 et G1). c) 1.DIC, DMAP (cat.), DMF, TA, 19h (G0) / 24h (G1), 18%(G0) / 36%(G1).

III.2.2. Caractérisation

Pour déterminer la nature des composés préparés précédemment, nous avons utilisé principalement la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton, la spectroscopie de masse ainsi que la chromatographie en phase liquide à haute performance

(HPLC). Pour commencer, les spectres ^{1}H des deux réactifs de base **16** et PAMAM-G1 sont relevés dans le méthanol deutéré (Figure 48). Pour le composé **16** l'attribution des pics s'est faite de manière séquentielle suite à l'ajout des différents groupements à chaque étape. On note la présence de résonance de protons échangeables sur le spectre du PAMAM-G0, il s'agit des groupements amines primaires de la structure, ce pic a été discriminé grâce à la littérature. [99]

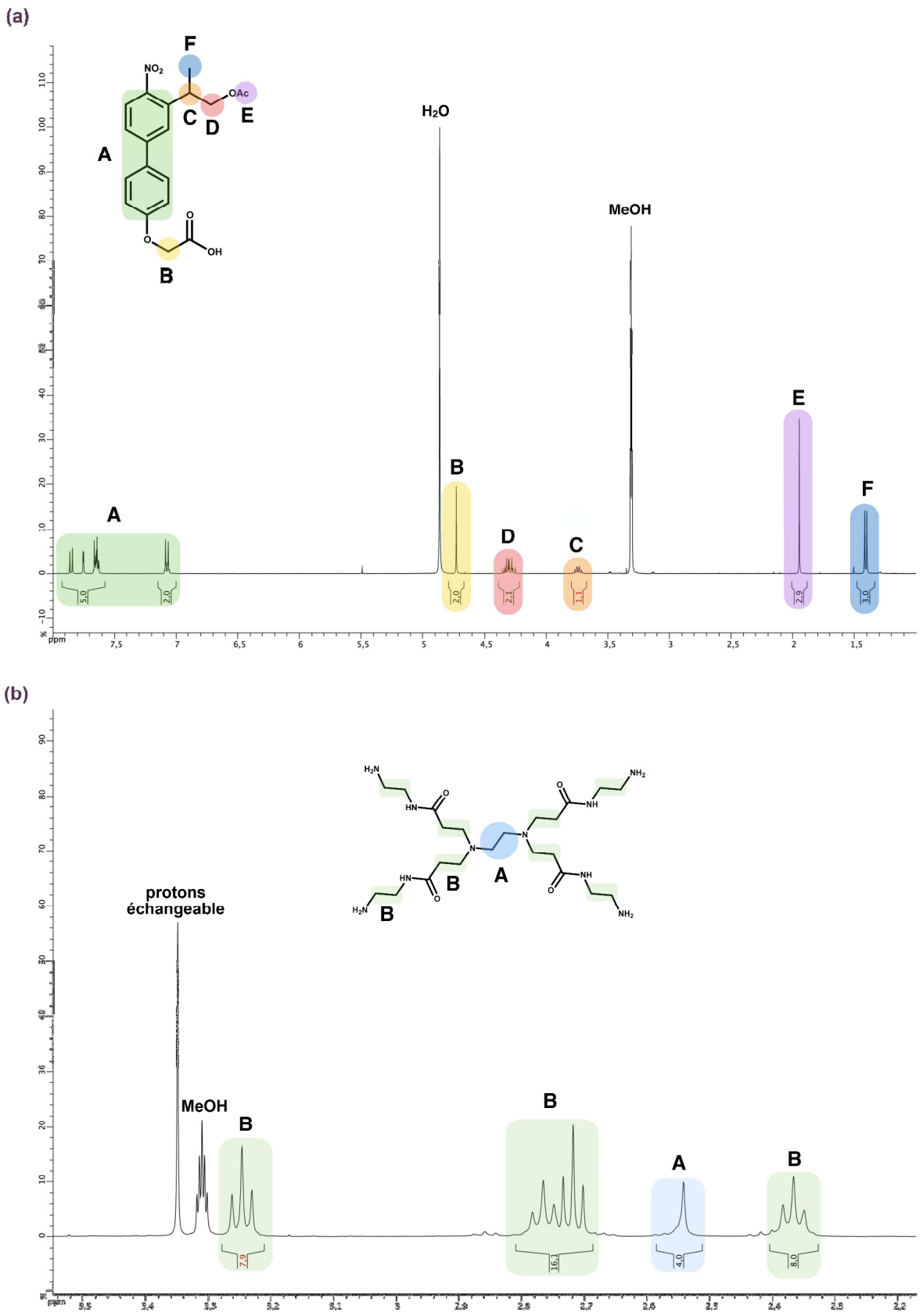


Figure 48. *Spectre RMN ^1H dans $MeOD_4$ du groupement photosensible **16** (a) et du PAMAM-G0 (b).*

Le chromatogramme HPLC de la réaction de couplage de **16** et du PAMAM-G0 nous montre la formation d'un composé majoritaire (Figure 49). Après purification, le spectre ^{1}H (Figure 50) nous confirme la fonctionnalisation des positions accessibles du PAMAM-G0 notamment représenté par un blindage (≈-0.2 ppm) des protons du CH_2 (B) de la liaison amide. Malheureusement, les pics du PAMAM vont être superposés avec ceux du solvant ce qui va rendre difficile l'intégration de cette zone et donc la confirmation par RMN du nombre de groupements photosensibles fixés. Après fixation des GPP sur le PAMAM, la molécule perd en flexibilité ce qui entraine une perte de résolution des signaux du PAMAM. Néanmoins, le chromatogramme HPLC (Figure 49) de ce composé nous permet de constater qu'il est bien le chromophore majoritaire présent dans l'échantillon et le spectre de masse vient ensuite confirmer qu'il s'agit bien du NPG0 couplé avec quatre groupements photosensibles. (Il faut noter que le NPG0 s'ionise difficilement ce qui fera apparaître dans les spectres de masse des impuretés présentes à l'état de trace mais qui ne sont ni visibles en l'HPLC ni en la RMN.)

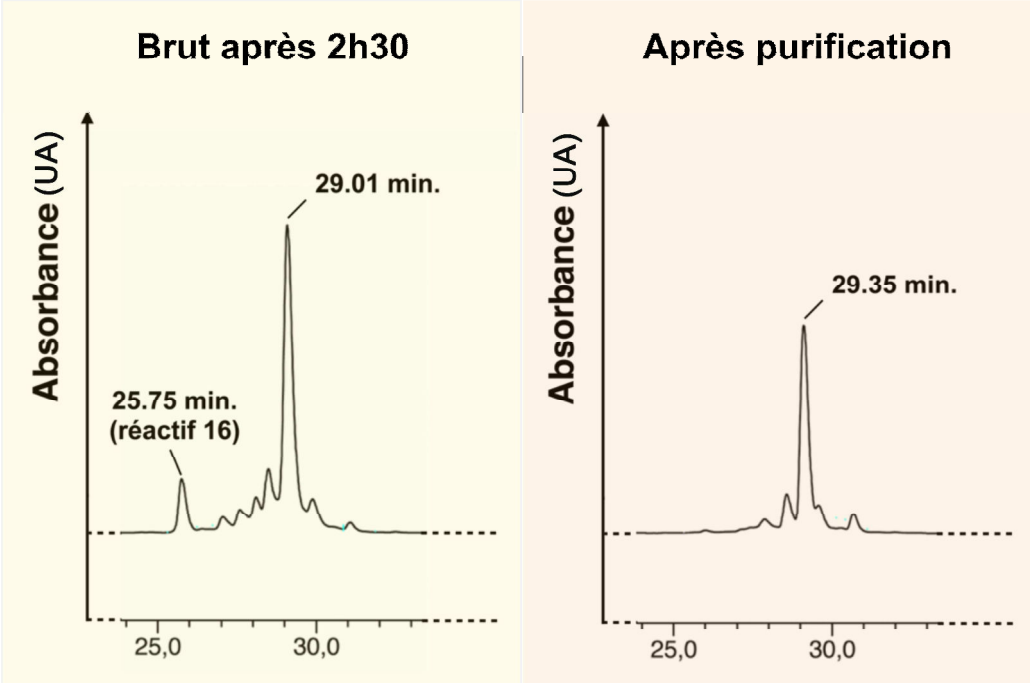


Figure 49. *Chromatogramme HPLC de la réaction de couplage entre **16** et le PAMAM-G0 après 2h30 de réaction et après purification par chromatographie FLASH-C18.*

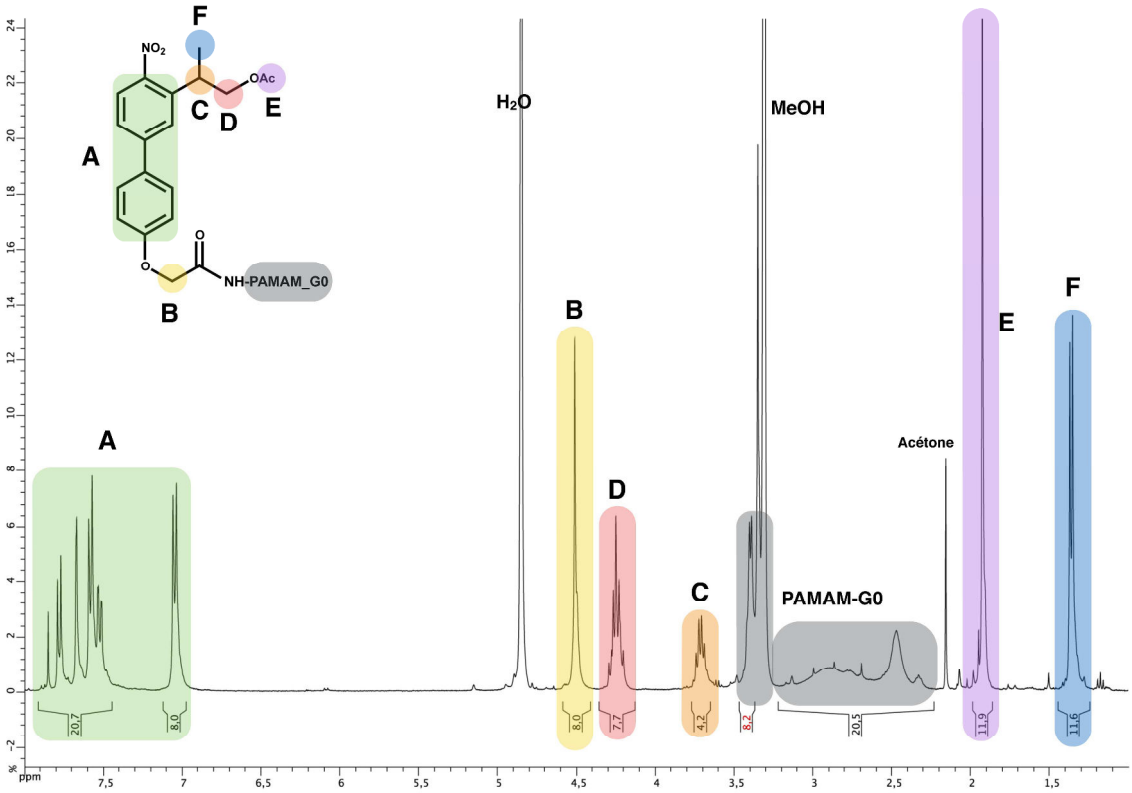


Figure 50. *Spectre RMN ^{1}H dans MeOD$_4$ du* ***NPG0 (18G0).***

La déprotection de l'alcool en milieu basique est quantitative, le chromatogramme HPLC nous permet de constater la formation d'un composé majoritaire (Figure 51), et la spectrométrie de masse nous confirme la présence de l'espèce totalement déprotégée. Le spectre RMN ^{1}H permettra de constater de la disparition du signal correspondant au CH_3 de l'acétate. L'étape de couplage au mpa sera directement effectuée dès que le chromatogramme HPLC indique que la déprotection n'évolue plus. La décision d'effectuer les deux dernières étapes de la synthèse à la suite l'une de l'autre sans isolement du produit a été prise après la perte totale du composé intermédiaire suite à un essai de purification par chromatographie Flash sur gel de silice C18.

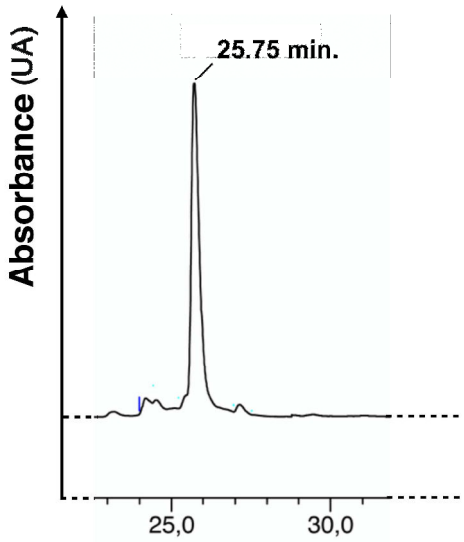


Figure 51. *Chromatogramme HPLC de* ***NPG0*** *après 2h en milieu basique.*

Enfin pour la dernière étape, le couplage des mpa, le spectre ^{1}H nous montre bien les signaux caractéristiques appartenant au mpa (encadré rouge). De plus, comme il a été établi lors des analyses que le NPG0 comporte bien quatre groupements photosensibles, les signaux et intégrales correspondants peuvent être utilisés pour déterminer le taux de greffage du mpa. On constate grâce au spectre RMN ^{1}H que quatre groupements mpa ont bien été fixés. Ce greffage complet est confirmé par la spectrométrie de masse et le chromatogramme HPLC du composé montre qu'il est majoritaire (Figure 52). Les signaux du PAMAM-G0 sont difficilement visibles sur ce spectre, principalement à cause de la présence des pics résiduels du solvant deutéré. En revanche, ces signaux sont à nouveau clairement visibles en changeant de solvant (DSMO-d6, insert en Figure 53).

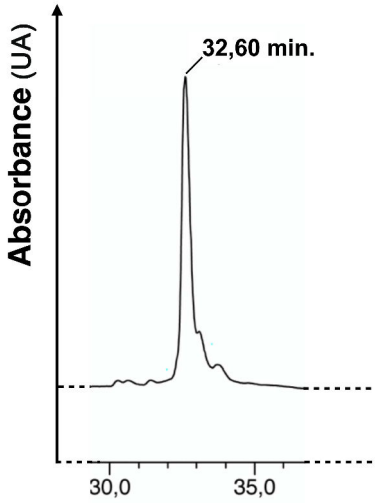


Figure 52. *Chromatogramme HPLC du* ***NPG0-mpa$_4$*** *isolé.*

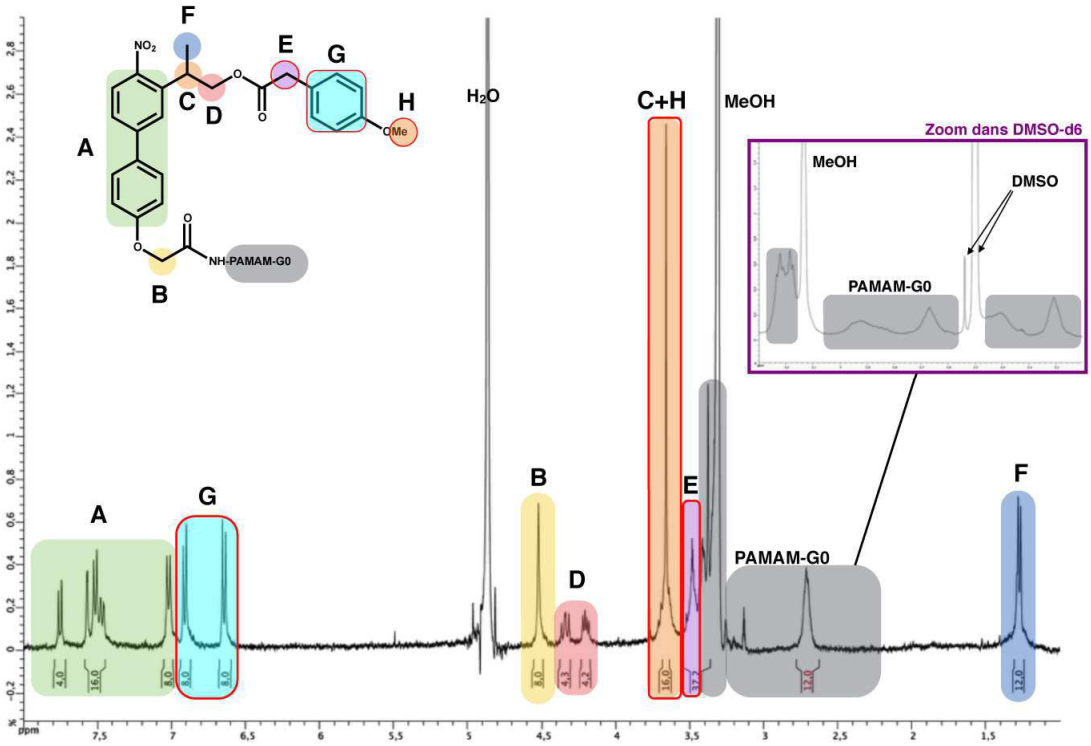


Figure 53. *Spectre RMN ^{1}H dans $MeOD_4$ du NPG0-mpa$_4$ (**19G0**).*

Le PAMAM de génération 0 reste une molécule de petite taille et l'on peut ainsi obtenir une fonctionnalisation totale de ce composé avec quatre groupements photosensibles.
La génération suivante, le PAMAM-G1, possède quant à elle huit groupements amines terminales, et la molécule pourra accueillir jusqu'à huit GPP. Pour commencer, nous avons révélé le spectre RMN ^{1}H du PAMAM-G1 (Figure 54), relevé dans le DMSO-d6 en présence de quelques gouttes de D_2O afin de faire disparaître les signaux des protons échangeables.

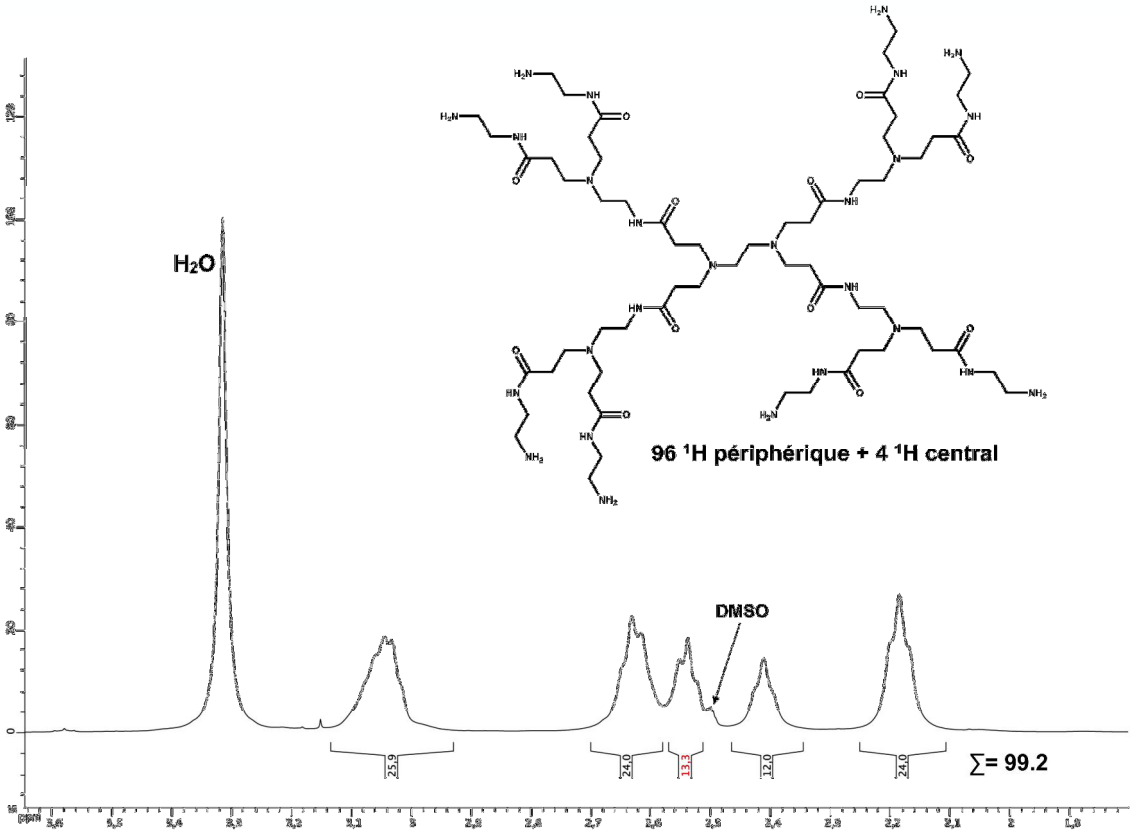


Figure 54. *Spectre RMN ^{1}H dans le DMSO-d6 avec quelques gouttes de D_2O du PAMAM-G1.*

Pour l'étape de couplage entre les groupements photosensibles et le PAMAM-G1, le chromatogramme HPLC va à nouveau nous indiquer la formation d'un pic majoritaire (Figure 55) Comme pour la génération précédente après purification, les signaux de **16** et du PAMAM-G1 sont présents dans le spectre RMN ^{1}H. Néanmoins le changement de solvant deutéré nous permet de mieux visualiser les signaux du PAMAM-G1 et cette fois une corrélation quantitative sera possible afin de déterminer le taux de greffage du dendrimère (Figure 56). La nouvelle molécule NPG1 (19-G1) possèdera ainsi huit groupements photosensibles, valeur qui est ensuite confirmée par la spectrométrie de masse.

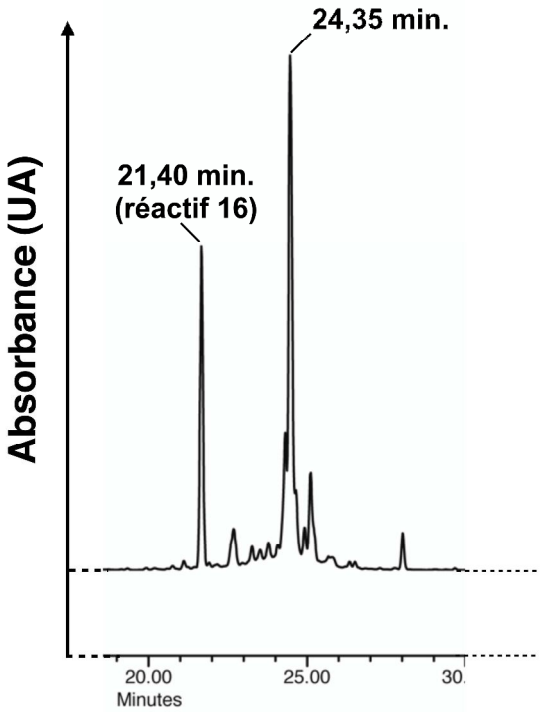


Figure 55. *Chromatogramme HPLC de la réaction de couplage entre **16** et le PAMAM-G1 après une nuit de réaction*

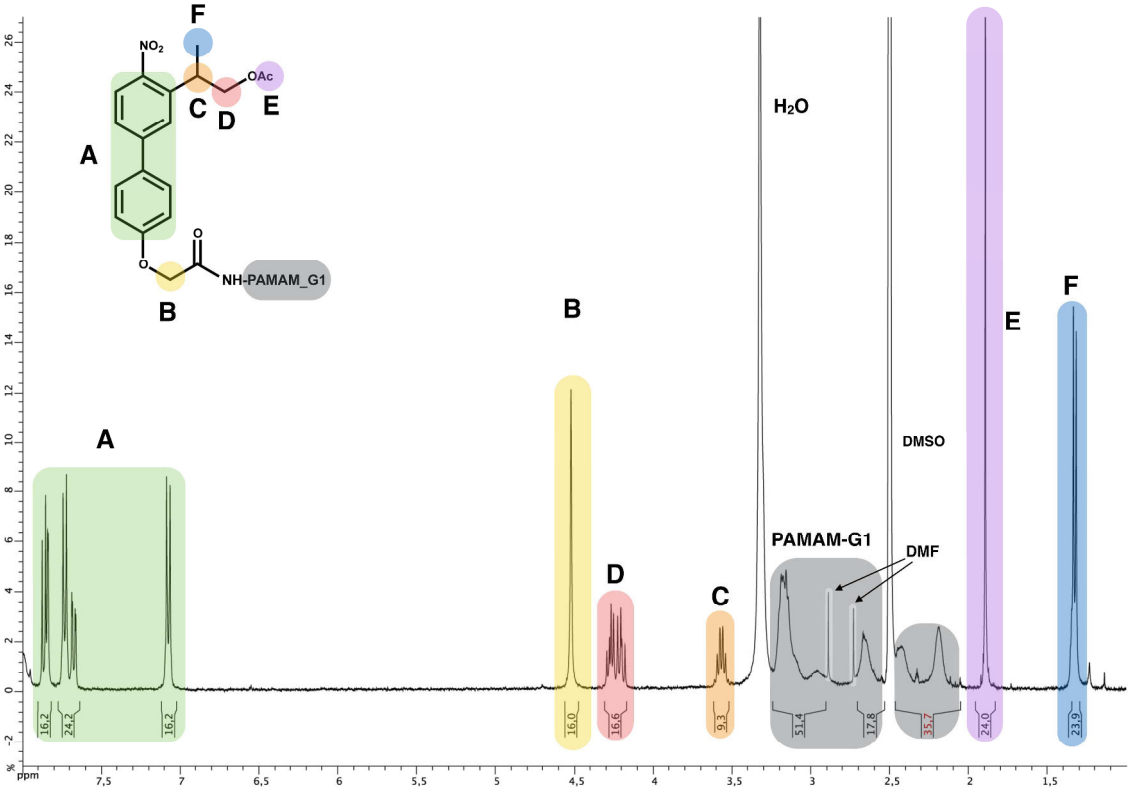


Figure 56. *Spectre RMN ^{1}H dans le DMSO-d6 du **NPG1** (**19-G1**).*

Pour l'étape de déprotection de la fonction alcool, le chromatogramme HPLC a permis de constater la formation d'un composé unique avec un nouveau temps de rétention plus faible

comme attendu (Figure 57). Dans ce cas également la déprotection est directement suivie du couplage au mpa sans purification préalable.

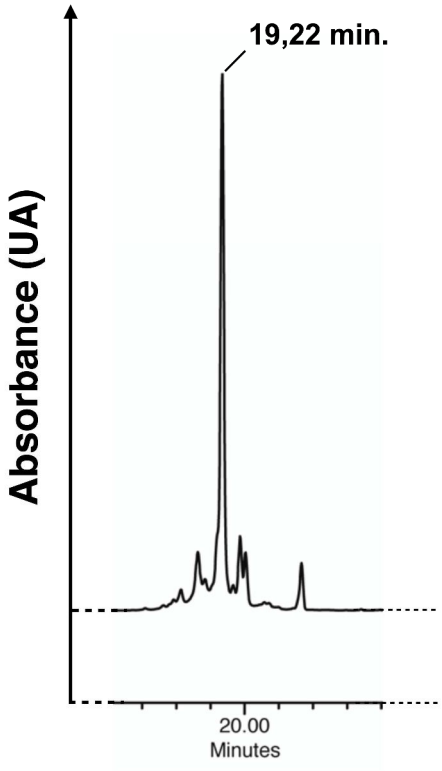


Figure 57. *Chromatogramme HPLC du **NPG1** après 17h en milieu basique.*

Pour la dernière étape, le suivi HPLC va cette fois nous montrer la formation de plusieurs composés ayant un temps de rétention très proche qui ne seront pas séparés après purification (Figure 58). Le spectre RMN ^{1}H va nous indiquer la présence du mpa mais cette fois le taux de greffage n'est pas de 100% (Figure 59). En effet les intégrations des signaux des différentes parties de la molécule nous permettent de déterminer un taux de greffage de 94% soit en moyenne 7.5 mpa par molécule. Le spectre de masse nous confirmera par la suite la présence de quatre composés majoritaires possédant 5, 6, 7 et 8 mpa fixés (Figure 60). Le taux de greffage correspondra donc au nombre de mpa présents sur chacun des différents composés moyenné en fonction de leur quantité dans l'échantillon. Ainsi à partir de la génération 1 du PAMAM, il faudra s'attendre à une distribution statistique des fonctionnalisations. Nous n'avons pas tenté de purifier ce mélange de composés car le taux de greffage était satisfaisant, de plus la séparation de composés aussi similaires aurait été très compliquée.

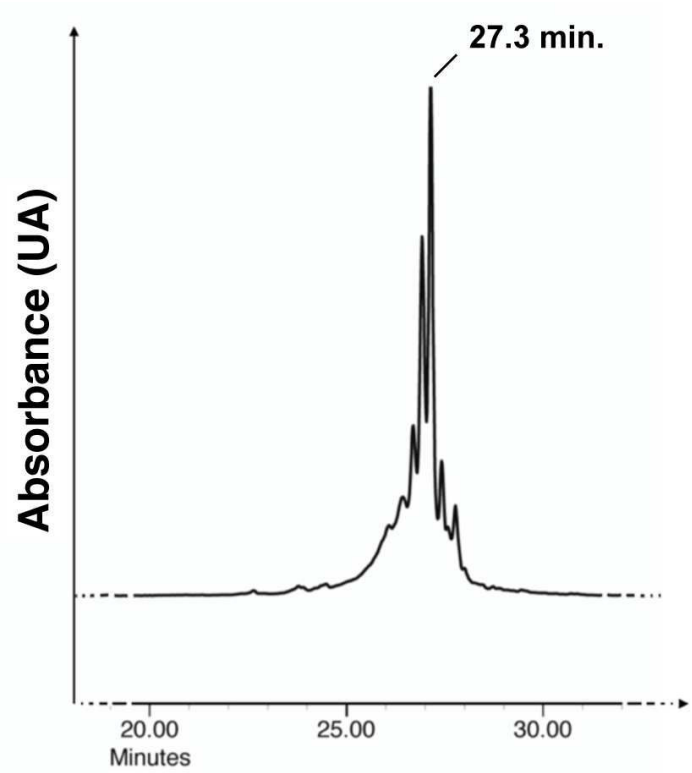


Figure 58. *Chromatogramme HPLC après purification des produits formés lors de la réaction de couplage des mpa sur* ***NPG1****.*

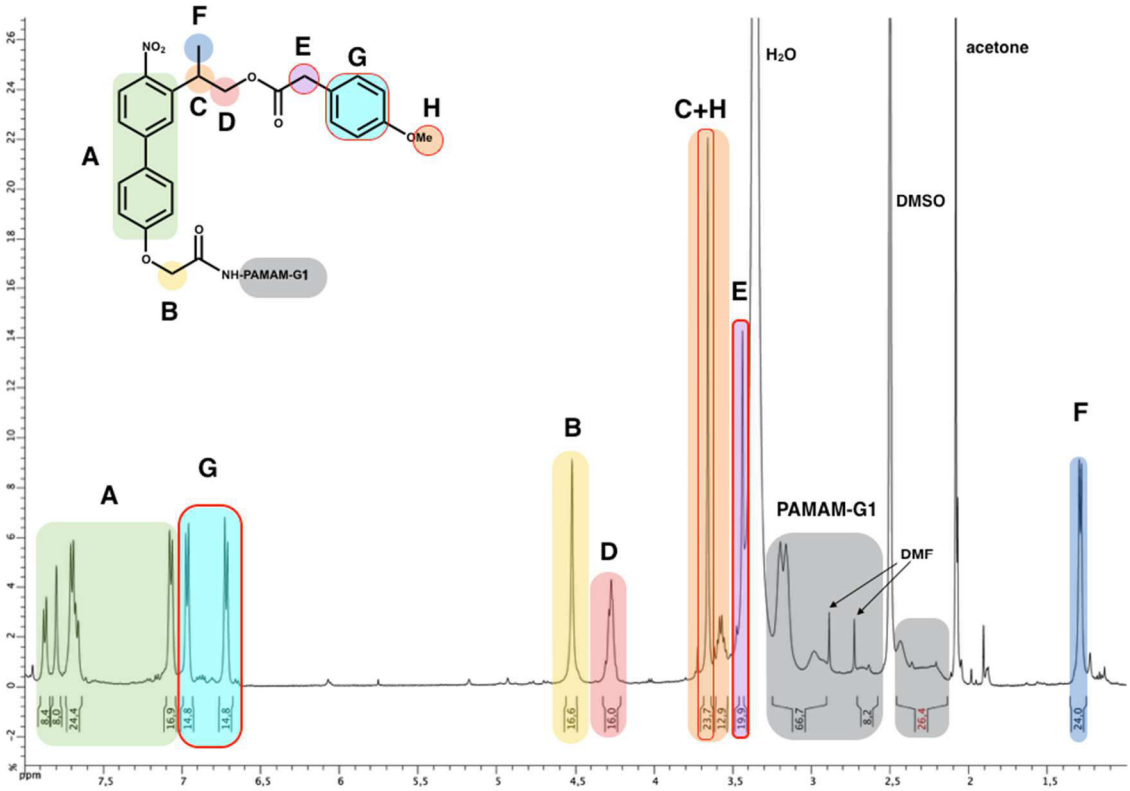


Figure 59. *Spectre RMN ^{1}H dans le DMSO-d6 du* ***NPG1-mpa$_{7.5}$*** *(****19-G1****).*

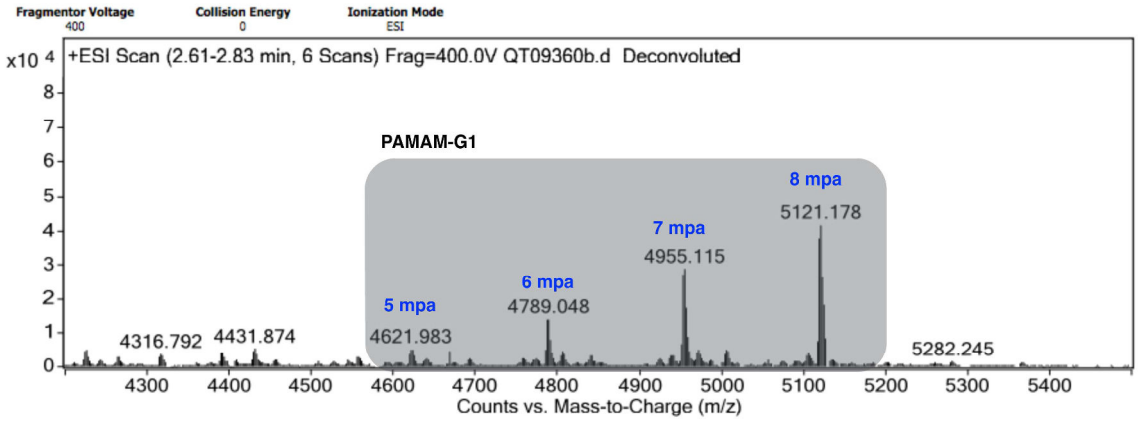


Figure 60. *Spectre de masse du mélange de* ***NPG1-mpa$_{7.5}$ (19-G1)****.* m/z calculé pour 5 mpa : 4626.05 ; 6 mpa : 4790.10 ; 7 mpa : 4954.15 ; 8 mpa : 5118.20.

En conclusion, il est bien possible de fonctionnaliser complètement sur ces quatre positions libres, le PAMAM-G0. Dès le PAMAM G1 la fonctionnalisation de chaque molécule est plus difficile à définir et la distribution devient statistique. Pour déterminer le taux de greffage du composé, nous avons principalement combiné deux techniques d'analyse, la RMN qui va permettre de quantifier en moyenne le nombre de groupement fixés sur le dendrimère et la spectrométrie de masse qui nous indique les différentes espèces en présence. Etudions maintenant les paramètres photophysiques et photochimiques de ces composés.

III.2.3. Etudes des paramètres photophysiques et photochimiques

Commençons avec les résultats du NPG0-mpa$_4$ (Tableau 5), comme pour les molécules précédentes on observe une bande d'absorption large et le λ_{max} est compris entre 295 et 315 nm. Dans ce cas, le maximum d'absorbance est fixé au centre de ces deux valeurs à 305 nm. Le nombre de groupements photosensibles du dérivé de génération 0 est similaire à celui du *pseudo*-tétramère décrit précédemment, les paramètres photochimiques devraient donc s'en approcher si le PAMAM n'empêche pas le rapprochement des sous-unités photosensibles. Dans un premier temps, l'ε est mesuré dans les mêmes conditions que pour les composés précédents, c'est-à-dire dans un mélange PBS1x/ACN (1/1). Ainsi, l'ε de NPG0-mpa$_4$ est mesuré à 28 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 305 nm, ce qui est légèrement plus élevé que le *pseudo*-tétramère à 25 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Néanmoins un nouveau phénomène, inexistant dans les mesures précédentes vient modifier cette valeur. Lors de la détermination de l'ε, l'absorbance est toujours mesurée au moins deux fois de suite avec la même cuve sans modification des paramètres d'acquisition afin de constater la cohérence et la reproductibilité des mesures. Généralement, cette nouvelle mesure est strictement identique à la précédente. Avec le NPG0-mpa$_4$, la seconde mesure nous a montré une baisse significative de l'ε en l'espace de quelques secondes (intervalle entre deux mesures). Au bout de 10 minutes, l'absorbance s'est stabilisée à une valeur de 14 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ soit une diminution de 50 % (Figure 61). De plus, le milieu contenu dans la cuve se trouble. Habituellement, les mesures sont également effectuées à plusieurs concentrations afin d'ajuster les premières mesures et juger de leurs pertinences. Les mesures à concentrations plus élevées vont montrer une stabilisation plus rapide de l'ε mais des valeurs similaires. D'autre tests ont été effectués en modifiant le solvant ce qui a pour effet de maintenir l'ε à des valeurs élevées. Ces données suggèrent que le composé adopte une certaine auto-organisation au contact de solvant aqueux. Les interactions intermoléculaires

conduisant à une agrégation vont être favorisées en milieu aqueux. Ces phénomènes vont engendrer une baisse significative de la solubilité et de l'efficacité photochimique du produit.

NPG0-mpa4	Temps	λ_{max}	Solvant	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)
	0	305	PBS 1x/ ACN (1/1)	28 000
	+10 min.			14 000 (-50 %)
	pas de variation		ACN	26 000
			DMSO	30 000

Tableau 5. *Evolution dans le temps de l'ε dans différent solvant du NPG0-mpa4.*

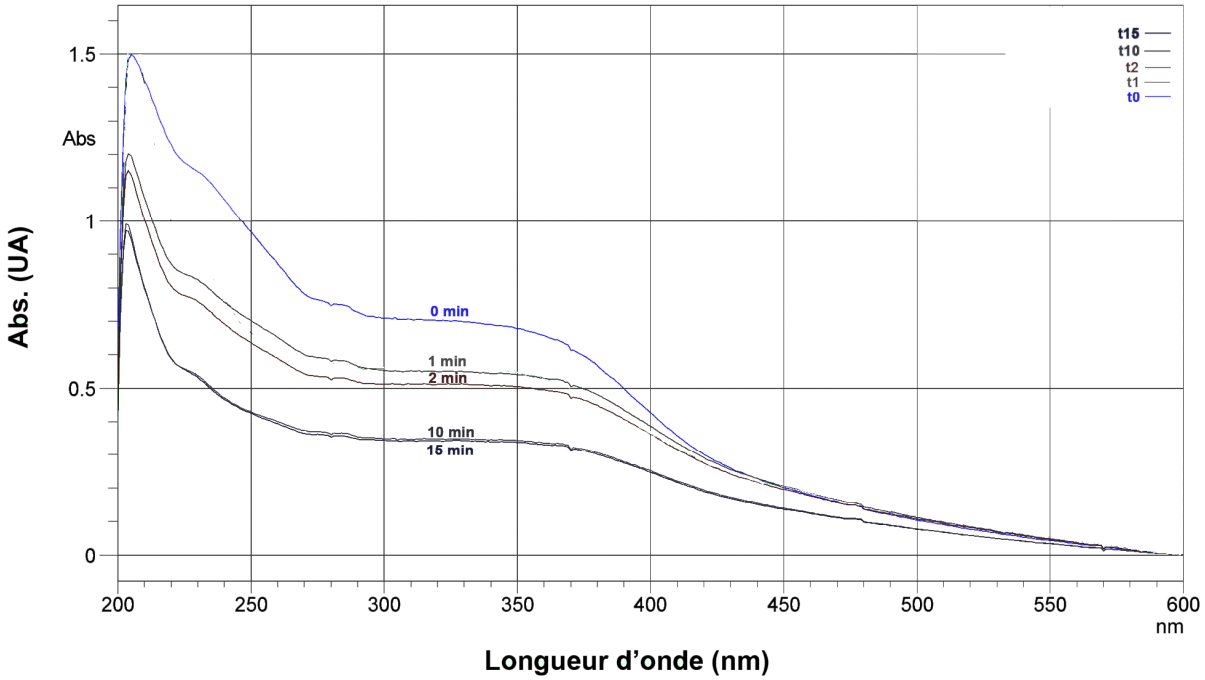


Figure 61. *Spectre d'absorption de NPG0-mpa4 dans PBS1x/ACN et évolution au cours du temps sans irradiation.*

Un rendement de libération va tout de même être déterminé. L'évolution du spectre d'absorption de NPG0-mpa4 au cours de l'irradiation ressemble beaucoup à celle du *pseudo*-tétramère (Figure 62). Il y a une diminution de l'absorbance au λ_{max} (305 nm) entre t0 et t2 et une augmentation à 250 et 380 nm. Ainsi, on constate la même stabilisation pour la réaction de photolyse après deux minutes d'excitation et l'absence de point isobestique. Le rendement de libération sera de 60 % alors que le potentiel du composé est de 360 %.

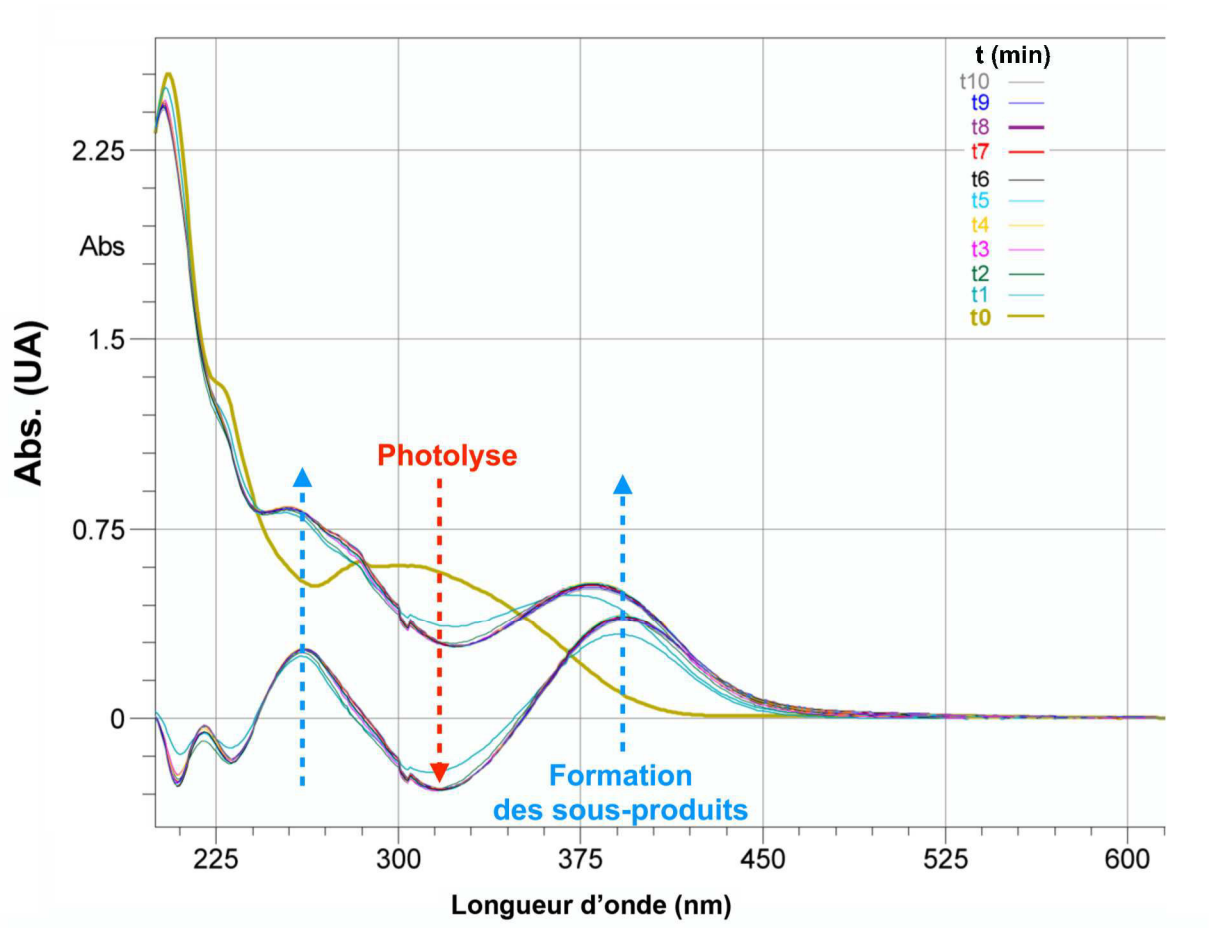


Figure 62. *Spectre d'absorption de NPG0-mpa$_4$ dans PBS1x/ACN et évolution au cours de l'irradiation à 315nm (courbes supérieures). Soustraction des spectres enregistrés au cours de l'irradiation par rapport à t0 (courbes inférieures).*

Voyons tout d'abord les résultats obtenus par le NPG1-mpa$_{7.5}$ avant de dresser un tableau comparatif et faire le bilan sur ces deux nouveaux composés.
Pour la génération 1 (Tableau 6), le produit possède une moyenne de 7.5 mpa/molécule, son ε devrait normalement avoisiner les 70 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ s'il s'affranchit des interactions intra et intermoléculaires observées sur les autres composés. Cependant, on va constater le même phénomène d'auto-organisation chez le NPG1-mpa$_{7.5}$ que pour la génération 0, l'ε va diminuer en fonction du temps, toutefois le phénomène sera ici beaucoup plus lent et se stabilisera après 24h (Figure 63). On ne va pas constater de diminution entre deux mesures ou même après quelques minutes, il faudra attendre plusieurs heures pour constater une diminution de l'ε. De plus, la concentration de l'échantillon n'aura aucune incidence, l'ε évoluera de la même manière. Un pourcentage de DMSO a été ajouté au mélange PBS1x/ACN, à 25 % on constate que l'ε est doublé mais cependant après 24h il y a toujours une diminution de 50%. On peut également noter que 12% de DMSO ne vont pas avoir d'incidence sur l'absorption.

NPG1-mpa$_{7.4}$	Temps	λ_{max}	Solvant	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)
	0	305	PBS 1x/ ACN (1/1)	**21 000**
	24h			**11 000** (-50%)
	0	305	PBS 1x/ ACN (1/1) **25% DMSO**	**40 000**
	24			**20 000** (-50%)
	0	305	PBS 1x/ ACN (1/1) **12% DMSO**	**20 000**
	24			**10 000** (-50%)
	pas de variation	305	**100% DMSO**	**44 000**

Tableau 6. *Evolution dans le temps de l'ε dans différents solvants du NPG1-mpa$_4$.*

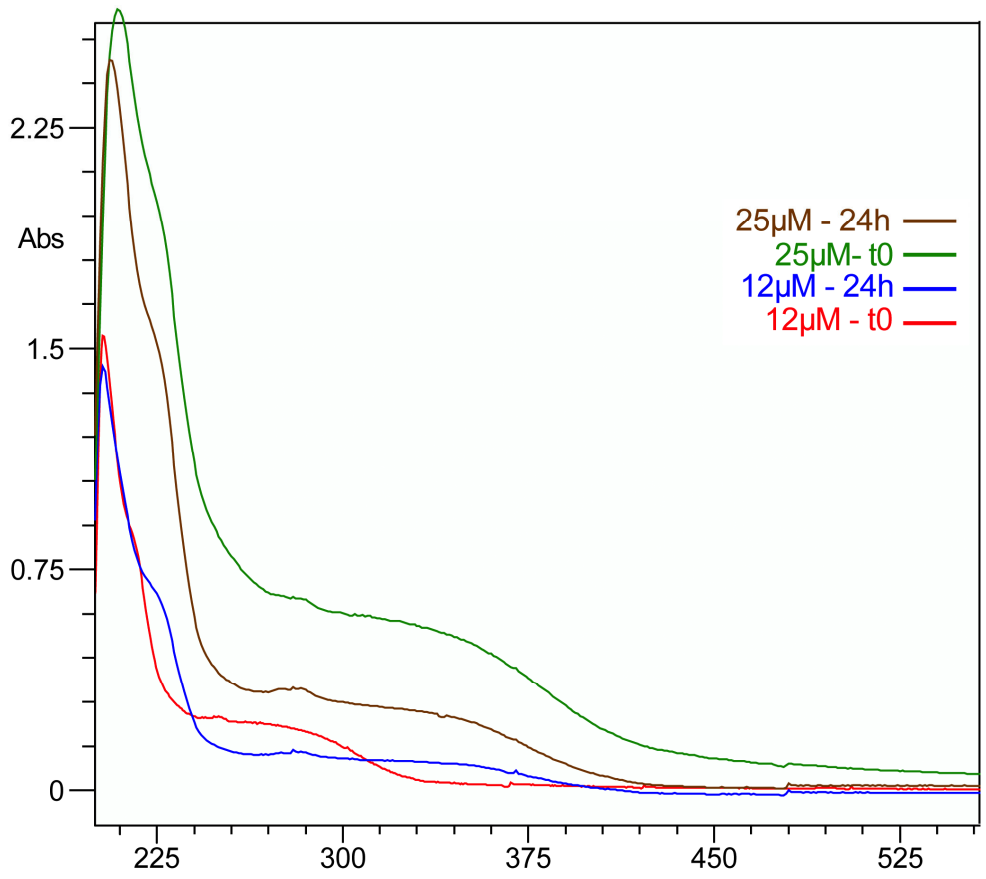


Figure 63. *Spectre d'absorption de NPG1-mpa$_{7.5}$ dans PBS1x/ACN et évolution au cours du temps sans irradiation.*

Concernant le rendement de libération de NPG1-mpa$_{7.5}$, l'évolution du spectre d'absorption après irradiation montre un changement significatif jusqu'à huit minutes avant de se stabiliser. La première minute va correspondre à 40 % de diminution de l'absorbance à 315 nm, mais contrairement aux autres profils établis jusqu'à présent, l'augmentation des absorbances aux

environs de 250 et 400 nm n'est pas visible directement sur le suivi. On peut visualiser une augmentation à 275 nm grâce au spectre de soustraction mais la variation reste faible et on ne voit pas d'augmentation au-delà. Les points isobestiques sont également absents de ce graphique. Le rendement de libération suite à l'excitation sera de 135% au lieu de 675% possible. Le rendement de libération a également été déterminé pour une solution contenant 25% de DMSO en plus du PBS1x et le l'ACN, mais les résultats obtenus restent similaires (110%).

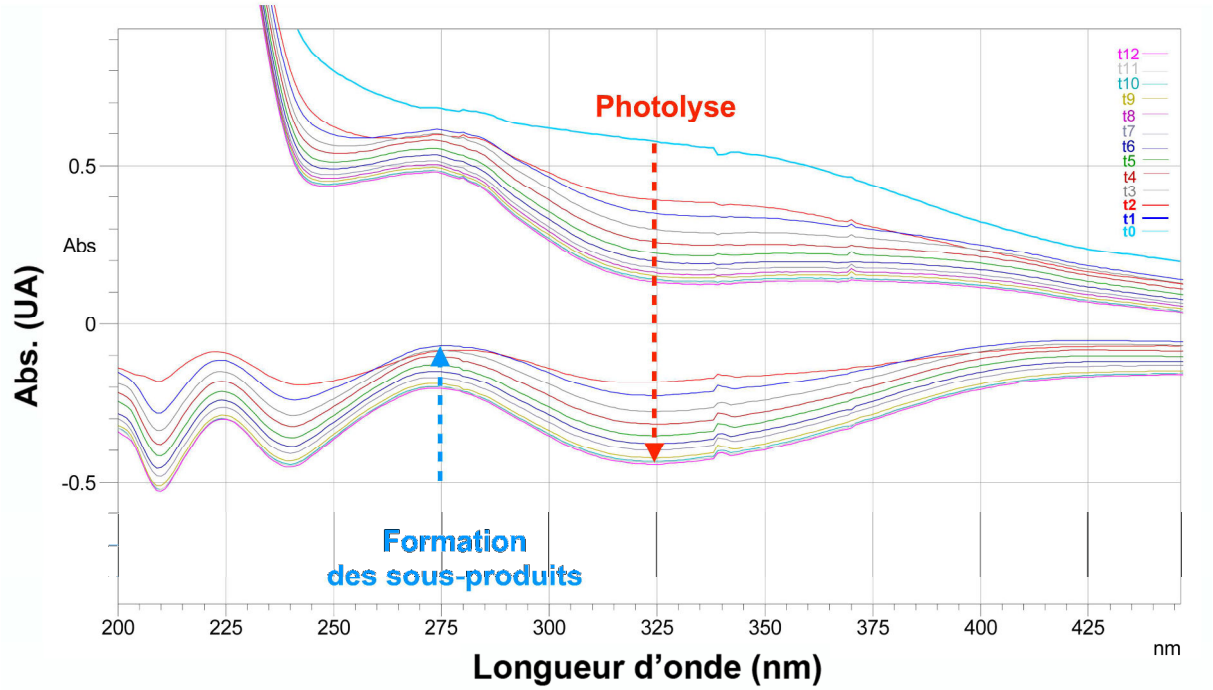


Figure 64. *Spectre d'absorption de NPG1-mpa$_{7.5}$ dans PBS1x/ACN et évolution au cours de l'irradiation à 315nm (courbes supérieures). Soustraction des spectres enregistrés au cours de l'irradiation par rapport à t0 (courbes inférieures).*

Pour conclure (Tableau 7), le NPG0-mpa$_4$ et le NPG1-mpa$_{7.5}$ ont montré un phénomène d'auto-assemblage ou d'agrégation lors de leur solubilisation dans des solvants aqueux. On a noté avec le dérivé de génération 1 que le DMSO permettait de contourner en partie ce problème et d'augmenter nettement l'absorbance, pour autant cela n'aura pas d'impact sur le rendement de libération. La différence de temps nécessaire pour arriver à l'état stationnaire semble dépendre de la taille du dendrimère utilisé. Cela pourrait s'expliquer par le fait que NPG1-mpa$_{7.5}$ est une molécule très encombrée, qui aura moins de mobilité que le composé de génération 0. Le π-π stacking constaté sur la première série de composés (DPENB et TPENB) semble toujours présent et impacter la réaction de photolyse. Car même à t0 l'absorbance est inferieur à celle attendu, si l'on considère que l'agrégation n'est pas immédiate, les interactions intramoléculaires demeurent présentes même avec le dendrimère PAMAM.

	Nombre de ligand	λ_{max} (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	R_{lib} théorique	R_{lib} expérimental
BNSF-Glu$_2$	**2**	**415**	**63 900**	**/**	**130 %**
PENB-Glu	**1**	**317**	**9900**	**/**	**90 %**
DPENB-mpa$_2$	**2**	**312**	**12 600**	**180 %**	**80 %**
***pseudo*-TPENB-mpa$_3$**	**3**	**335**	**25 000**	**270 %**	**70 %**
NPG0-mpa$_4$	**4**	**305**	**28 000**	**360 %**	**60 %**
NPG1-mpa$_{7.5}$	**8**	**305**	**21 100**	**670 %**	**135 %**

Tableau 7. *Comparaison des résultats obtenus avec différentes nanostructurations et composés de référence.*

L'ensemble de ces phénomènes, inter- et intramoléculaire, vont fortement impacter la qualité de la réaction photochimique qui ne mènera plus à la photolyse. Néanmoins, le seuil des 100% est franchi avec le NPG1-mpa$_{7.5}$ et son rendement de libération est du même ordre de grandeur que le BNSF-Glu. Le dérivé PAMAM devrait être aussi plus soluble en milieu biologique quand les groupements mpa seront remplacés par les glutamates. De plus, lors de l'application des molécules en milieux biologiques, la solution va être fortement diluée dans l'ensemble de la zone d'étude, cette dilution pourrait suffire à contrecarrer l'agrégation.

III.3. Glutamate cagé

III.3.1. Synthèses et caractérisations

Suite aux différents résultats obtenus, il nous a semblé pertinent d'essayer un ligand différent pour nos nouveaux GPP. Les problèmes apportés par les interactions hydrophobes et aromatiques sont surement renforcés par le chromophore mpa que nous utilisons pour le dosage. Ainsi, nous avons décidé d'observer le comportement des dendrimères préparés en cageant du glutamate, ligand plus difficile à doser que le mpa mais plus proche des applications biologiques envisagées. Les deux composés les plus prometteurs ont été sélectionnés : le DPENB, et le NPG1. Concernant le DPENB, une nouvelle voie de synthèse a été utilisée s'inspirant de celle mise au point pour les dérivés PAMAM (Schéma 8). Le phénol **13** est obtenu grâce à un couplage de Suzuki à partir d'un acide boronique commercial, ce qui permet d'obtenir le produit à « grande échelle », de l'ordre de la dizaine de grammes. Le phénol **13** va ensuite effectuer une substitution nucléophile sur le bis-tosylate **4** pour obtenir le DPENB **6**. Pour le dérivé NPG1, la même voie de synthèse que précédemment est utilisée (Schéma 7). Seule la dernière étape va être modifiée, le glutamate protégé sera couplé et les mêmes réactifs de couplage peptidique que pour le mpa seront utilisés (Schéma 9). Il faudra également ajouter une étape de déprotection du glutamate en milieu acide.

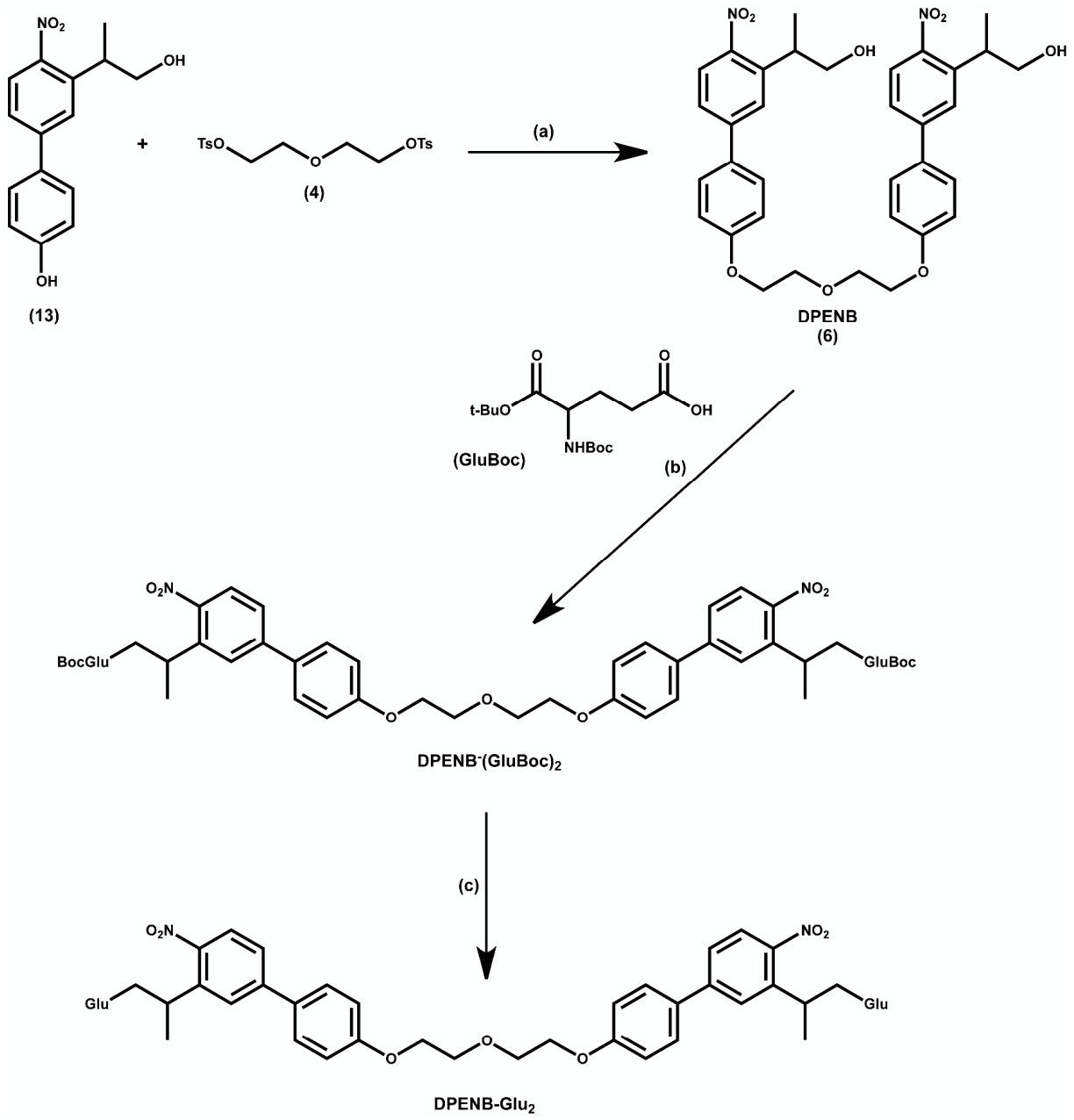


Schéma 8. *Synthèse du DPENB-Glu$_2$ (**21**).*
a) K_2CO_3, KI, DMF, 90 °C, 15h, 80%. b) GluBoc, DCC, DMAP (cat.), DMF, 0°C-TA, 24h, 96%. c) TFA, DCM, TA, 15 h, 99%.

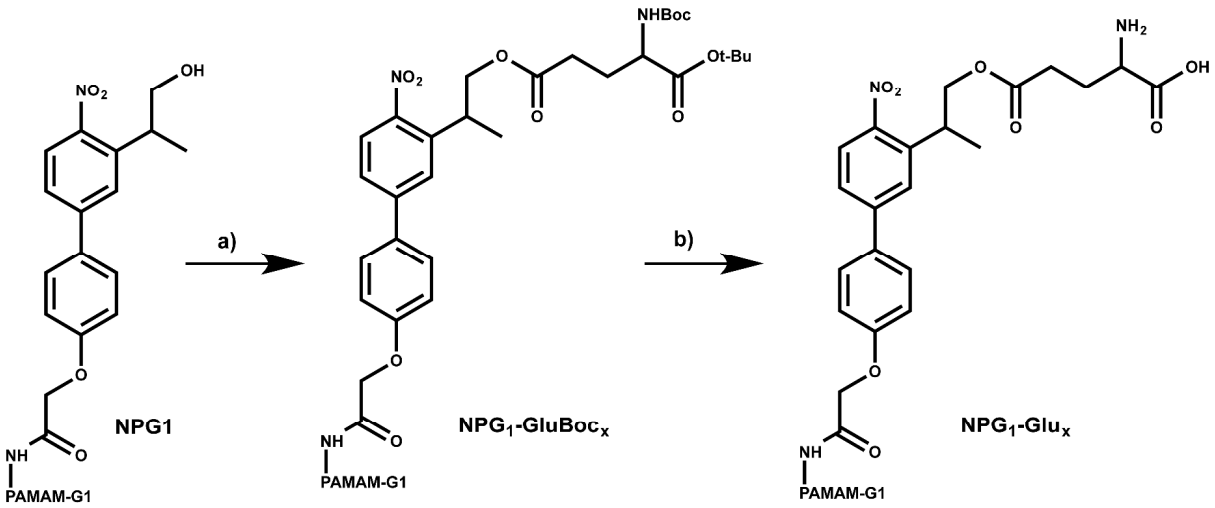


Schéma 9. *Synthèse du NPG1-Glu$_x$.*
a) GluBoc, DIC, DMF, TA, 24h, 10%. b) TFA, TA, 24h, 40%.

Le DPENB-Glu$_2$ a été caractérisé par RMN et spectrométrie de masse avec ses deux ligands. Pour le NPG1, afin d'obtenir le composé fonctionnalisé de manière totale, les conditions de couplage avec le glutamate protégé ont été optimisées par rapport au mpa. Un très large excès et une réaction sur plusieurs jours ont permis d'obtenir un pic majoritaire sur le chromatogramme HPLC du suivi de la réaction (Figure 65). Après purification, le spectre RMN ^{1}H va être mis à profit pour déterminer le nombre de ligands fixés, les protons des groupements protecteurs ainsi que le proton du carbone stéréogénique seront déterminants car les CH_2 de la chaîne alkyle sont confondus avec le solvant et les protons du PAMAM (Figure 66). Un chromatogramme HPLC du composé purifié révèlera un pic majoritaire avec, à sa base, des épaulements (Figure 65). Cela pourrait correspondre aux produits avec 7, voire moins, glutamates protégés fixés, cependant leurs quantités semblent trop faibles pour influencer les intégrations spectre RMN ^{1}H.

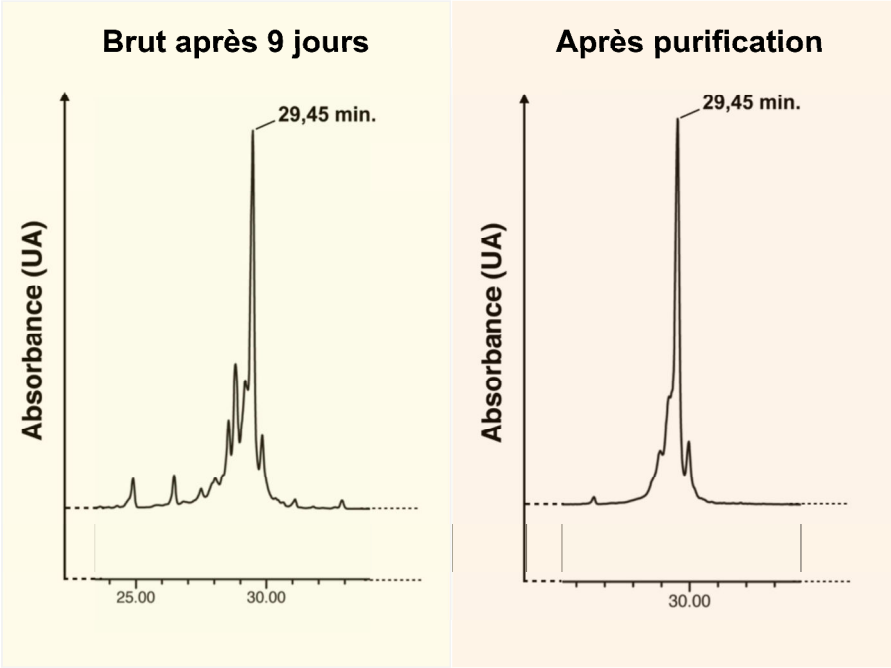


Figure 65. *Chromatogramme HPLC du NPG1-GluBoc$_8$ après 9 jours de réaction et après purification par chromatographie FLASH-C18.*

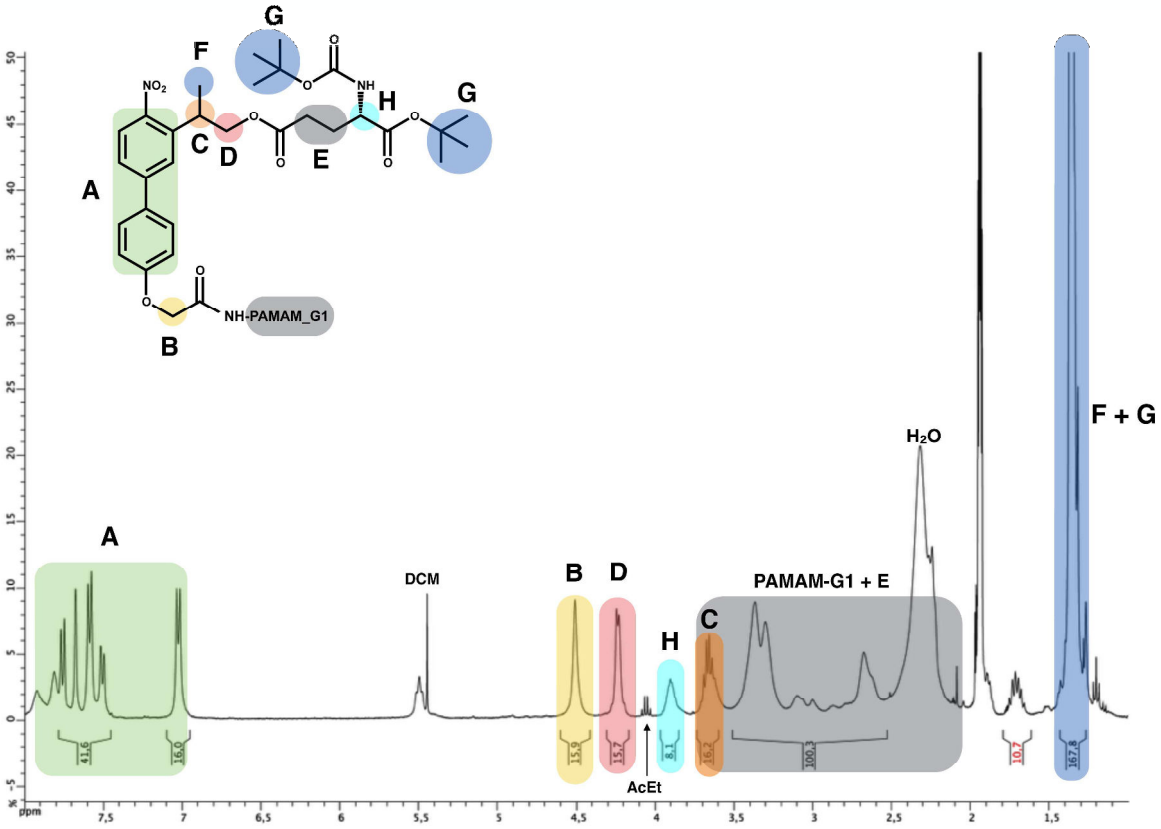


Figure 66. *Spectre RMN ^{1}H dans CH_3CN-d_3 du NPG1-GluBoc$_8$.*

Pour finir, le NPG1-GluBoc$_8$ sera déprotégé au TFA, et un chromatogramme HPLC permettra de suivre l'évolution de la réaction. Après une nuit, on retrouve un pic majoritaire (Figure 67) qui sera identifié par spectrométrie de masse comme étant la molécule avec 8 glutamates, le spectre révèle également le fait que le composé soit seul, il n'y a pas de distribution statistique comme pour le mpa. A cette étape, le produit devient très hygroscopique et l'ensemble des spectres RMN ^{1}H réalisés pour ce composé va être pollué par le signal de l'eau ce qui ne permettra pas d'intégrer les différents signaux. Cependant le spectre permet de révéler la disparition des signaux correspondant au groupement protecteur du glutamate.

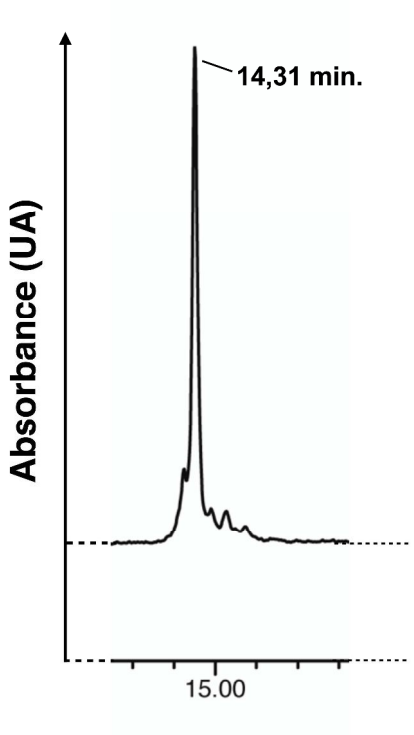


Figure 67. *Chromatogramme HPLC du* ***NPG1-GluBoc$_8$*** *après une nuit en présence de TFA.*

Nous allons maintenant déterminer les paramètres photophysiques et photochimiques de ces composés.

III.3.2. Etude des paramètres photophysiques et photochimiques

Dans un premier temps, l'ε sera déterminé à la fois pour la forme protégée et déprotégée du glutamate. Généralement, une fois déprotégé le glutamate augmente la solubilité aqueuse du GPP auquel il est fixé. A cette étape, une solution tampon seule (PBS) peut être utilisée pour déterminer l'absorbance, cela permet également de juger la solubilité du produit sans co-solvant organique. Comme le composé ne sera plus modifié, il est important qu'il possède une solubilité suffisante dans un tampon pour une utilisation en milieu biologique.
Pour commencer étudions les résultats obtenus avec le DPENB-Glu$_2$ (Tableau 8).

DPENB	Ligand	λ_{max}	Solvant	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)
	Mpa	312	PBS 1x/ ACN (1/1)	**12 000**
	GluBoc	345	PBS 1x/ EtOH* (1/1)	**17 000**
	Glu	315	PBS 1x/ ACN (1/1)	**11 000**
	Glu	350	H_2O	**12 000**
	Glu	370	PBS 1x	**5 000**

Tableau 8. *Paramètres photochimiques et photophysiques de DPENB avec différents ligands et solvants.*

Avec le glutamate protégé (GluBoc) très hydrophobe, de l'éthanol est utilisé comme co-solvant plutôt que de l'acétonitrile car la solution mère du composé est conservée dans ce même solvant. Concernant l'absorbance, on constate un déplacement du maximum à 345 nm et une augmentation de l'ε à 17 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Les groupements *tert*-butyloxycarbonyles (Boc) sont très volumineux et les glutamates, sur lesquels ils sont fixés, sont flexibles ce qui permet à ces groupements d'exercer une gène stérique sur le rapprochement intramoléculaire, contrairement au mpa qui aurait tendance à rester en périphérie de la molécule.
Une fois déprotégé, le composé est tout d'abord dissout dans une solution tampon PBS 1x, le λ_{max} va subir un effet bathochrome important et atteindre les 370 nm. De plus un précipité se forme dans le tampon (Figure 68). Du fait de sa structure très amphiphile le composé forme certainement des agrégats, ce qui provoquera une diminution drastique de son ε.[86] Dans une solution aqueuse sans tampon, le composé retrouve son absorbance classique à 12 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ avec un effet bathochrome amoindri et cette fois principalement dû à la polarité du solvant. Cependant pour des concentrations à partir de 50 μM, un auto-assemblage apparaît à nouveau traduit par l'augmentation du λ_{max} à 370 nm. Finalement, le composé a été testé dans les mêmes conditions que pour les groupements mpa, et va montrer des paramètres similaires. Ceci nous montre que le mpa n'influence finalement que très peu les interactions intra- ou intermoléculaires. Le caractère hydrophile du glutamate ne permet hélas pas au composé d'être soluble dans les milieux tampons et par extension dans les milieux biologiques.

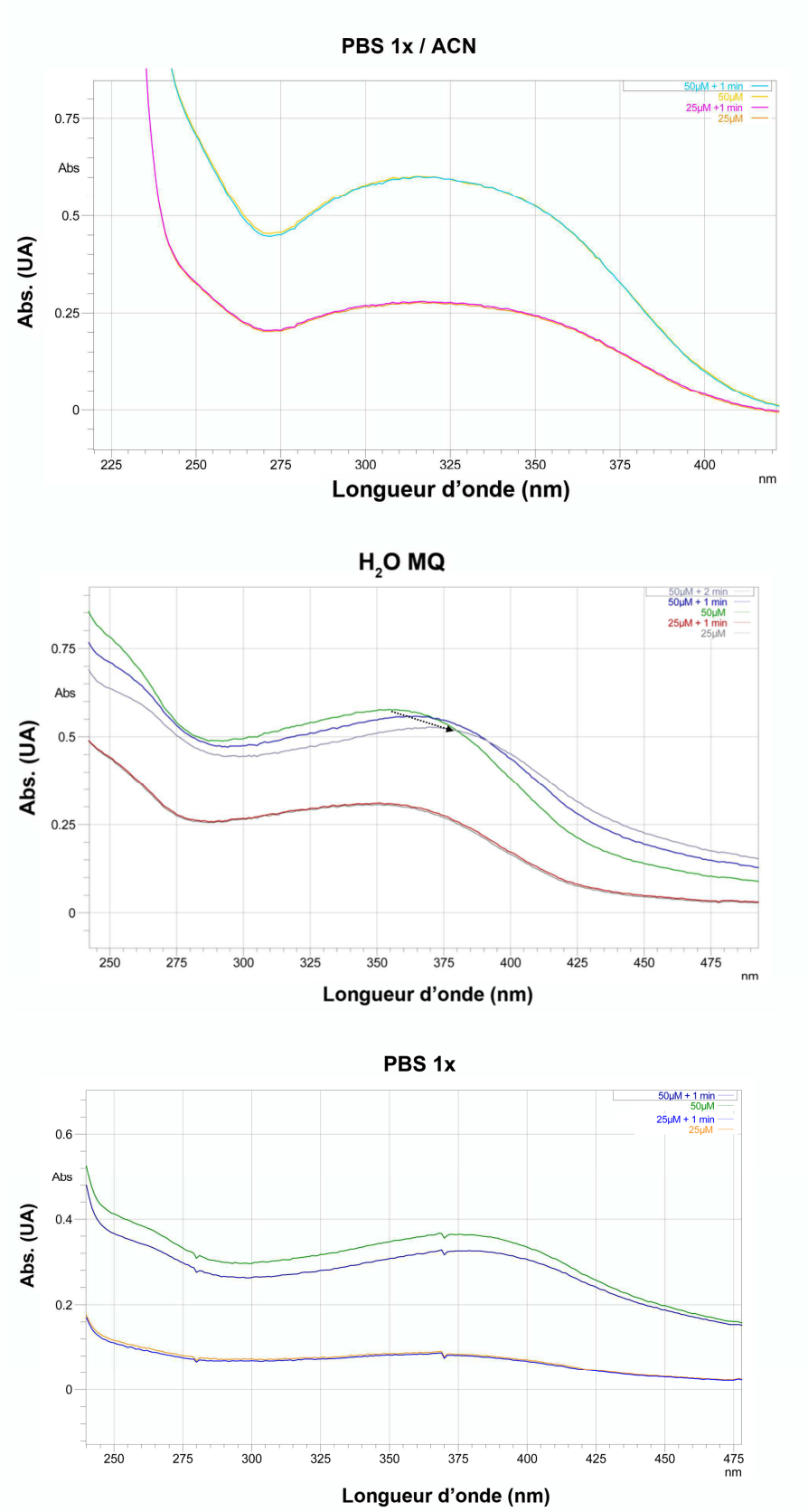


Figure 68. *Spectre d'absorption du DPENB-Glu$_2$ dans différents solvants et à différentes concentrations.*

Tournons-nous maintenant vers les résultats obtenus avec le NPG1 conjugué aux glutamates (Tableau 9). Tout d'abord intéressons-nous au NPG1-GluBoc, le λ_{max} reste similaire, mais en revanche l'ε est bien supérieure à celui obtenue avec le mpa. Cela correspond au même phénomène observé chez DPENB-GluBoc. La gêne stérique induite par les groupements protecteurs semble se confirmer. De plus, une diminution est observée après 24 h, mais elle reste cependant raisonnable. Comme lors des expériences précédentes avec le PAMAM-G1, une formation d'agrégats est visible et la solution devient turbide.

NPG1	Ligand	Moyenne de ligand fixé	Solvant		λ_{max}		ε (M^{-1}. cm^{-1})		
							t0	t20 min	t24h
	Mpa	7.5	PBS 1x/ ACN (1/1)		305		21 000	21 000	11 000
	GluBoc	8	PBS 1x/ ACN (1/1)		315		67 000	67 000	50 000
	Glu	8	PBS 1x	C	*t0*	*t20 min*	72 000	42 000	3 000
				10 μM	360	395			
				5 μM	350	385		68 000	32 000
				1 μM	350	350		72 000	72 000

Tableau 9. *Paramètres photochimiques et photophysiques de NPG1 avec différents ligands et solvants.*

Pour la dernière molécule, une fois déprotégé nous allons observer différents comportements et ce en fonction des concentrations de produits introduits dans la cuve de mesure (Figure 69). Le premier phénomène observé est un effet bathochrome sur le λ_{max} que l'on doit en partie à la mise en solution dans l'eau. L'ε observé à t0 est le même quelles que soient les concentrations utilisées, 72 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ ce qui est très proche de la valeur attendue de 79 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Cependant un suivi du milieu dans le temps va rapidement faire apparaitre le phénomène d'agrégation. L'influence de la concentration sera majeure dans l'auto-organisation des composés. En effet, l'absorbance va diminuer de 40 % lors des 20 premières minutes à 10 μM alors que la perte sera seulement de 30 % à 5 μM, cette observation étant plus marquée après 24h. Le déplacement vers le rouge du λmax peut également être expliqué par la formation de particule dans le milieu.

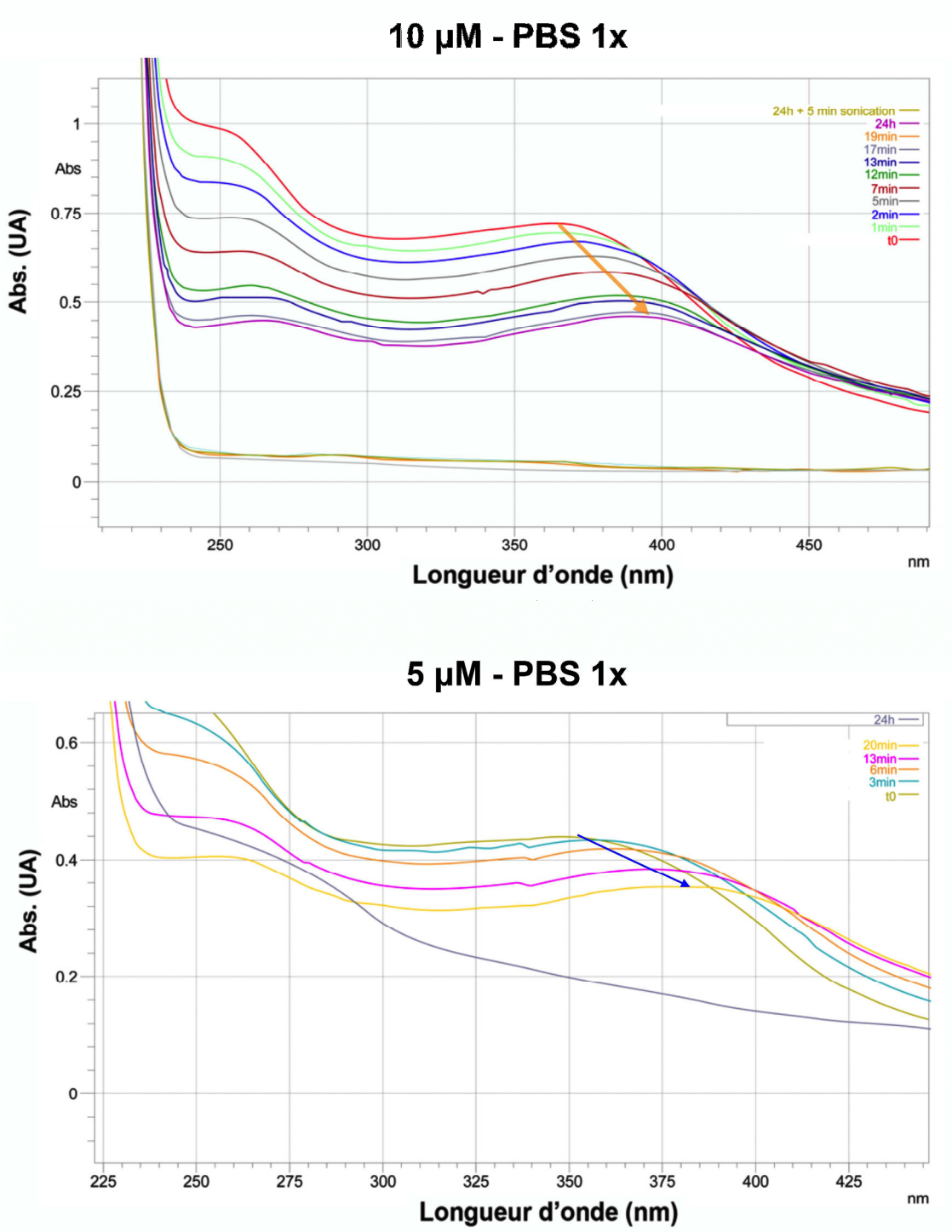


Figure 69. *Evolution dans le temps du spectre d'absorbance de NPG1-Glu$_2$ dans PBS 1x à différentes concentrations.*

Il faut noter que le composé reste stable à 1 μM, la possibilité d'avoir des interactions intermoléculaires à cette concentration est très faible (Figure 70). Malheureusement, même si le composé est à 100% de ces capacités à 1 μM seulement 8 μM de glutamate sera libérée ce qui n'est pas suffisant pour activer une synapse. L'activation d'une synapse nécessite un minimum de 100 μM de glutamate, le glutamate cagé est habituellement infusé à des concentrations de 1mM pour être sûr d'obtenir une réponse biologique.

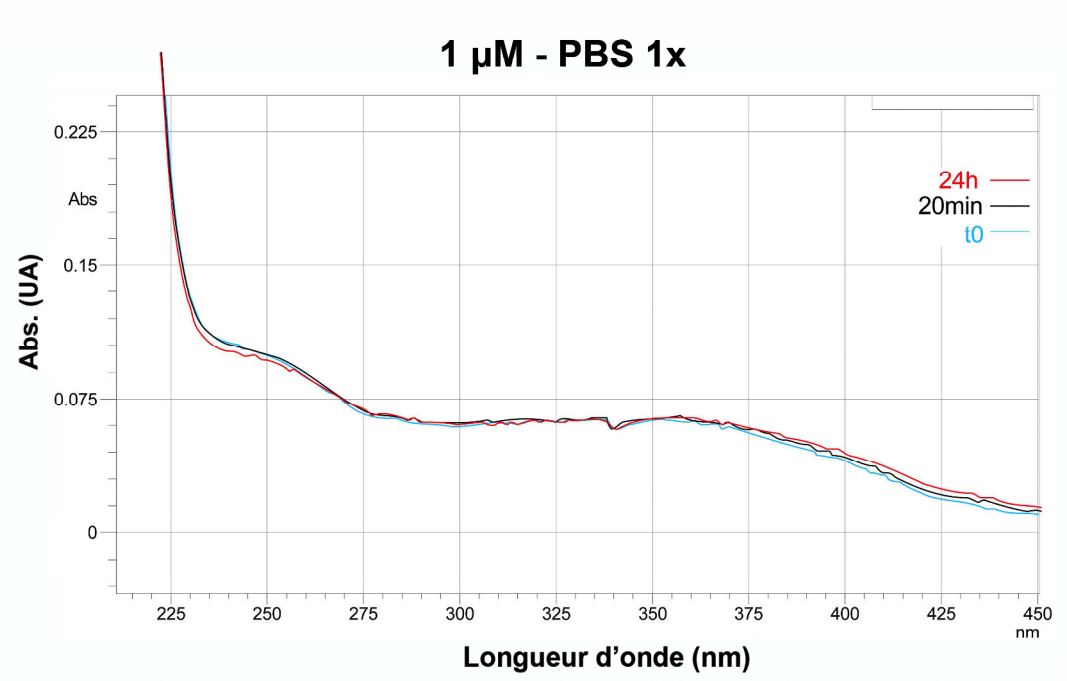


Figure 70. *Evolution dans le temps du spectre d'absorbance de NPG1-Glu$_2$ dans PBS 1x à 1 µM.*

Pour conclure, l'utilisation du glutamate à la place du mpa n'a pas permis de rendre utilisable les nouvelles plateformes synthétisées. Cependant ces expériences ont permis d'obtenir des informations utiles sur le comportement de ces composés en milieu aqueux et avec un autre type de ligand. Les groupements protecteurs Boc du glutamate vont atténuer le stacking des blocs aromatiques vraisemblablement par gène stérique ce qui suggère que l'utilisation de ligands plus volumineux pourrait rendre efficace ce type de GPP. Mais il faut garder à l'esprit que chaque photolyse entrainera la perte d'une partie de la gêne stérique et donc de l'efficacité. Le caractère hydrophobe des composés a également été mis en avant lors de l'utilisation de milieux tamponnés ou aqueux. L'effet bathochrome combiné à la diminution rapide ou lente dans le temps de l'absorbance traduit bien d'un rapprochement des GPP qui pourrait être expliqué par un phénomène d'agrégation ou la formation de particule. La structure du PENB s'y prêtre parfaitement, ainsi que celle du NPG1 qui est composée d'un cœur hydrophile mais qui possède tous ces GPP hydrophobes en périphérie. Le phénomène est immédiat chez le dimère alors qu'il est plus lent à observer pour le dérivé PAMAM G1sans doute à cause de la taille de la molécule.
Une des solutions envisagées suite à ces expériences est d'être « moins gourmand » quant au fait de vouloir fonctionnaliser l'ensemble du PAMAM. Une fonctionnalisation partielle pourrait donner l'opportunité de placer des groupements différents qui aideraient à solubiliser et maintenir éloignés les GPP les uns des autres. Un composé de ce type possèderait ainsi moins de GPP mais avec l'objectif qu'ils soient tous efficaces, de plus cela pourrait donner la voie à suivre pour les générations supérieures.

III.4. Conception de système hybride

La dénomination « hybride » est introduite pour désigner les dendrimères qui vont être composés à la fois de GPP mais également d'autres substituants. Le ratio d'espèce fixé sur le PAMAM sera désigné comme suit : GPP/R, le GPP toujours en premier puis le second substituant.

III.4.1. Phénomène de coopérativité

Pour commencer, nous avons souhaité synthétiser à partir du PAMAM-G1 une molécule qui garderait quatre amines libres et serait fonctionnalisée sur les quatre positions restantes (Figure 71). On pourrait ainsi utiliser les quatre positions restantes pour y greffer des groupements solubilisant en milieu aqueux. Pour cela nous avons effectué une réaction dans des conditions similaires à celles utilisées pour le NPG1 mais en diminuant le nombre d'équivalent de GPP (Tableau 10).

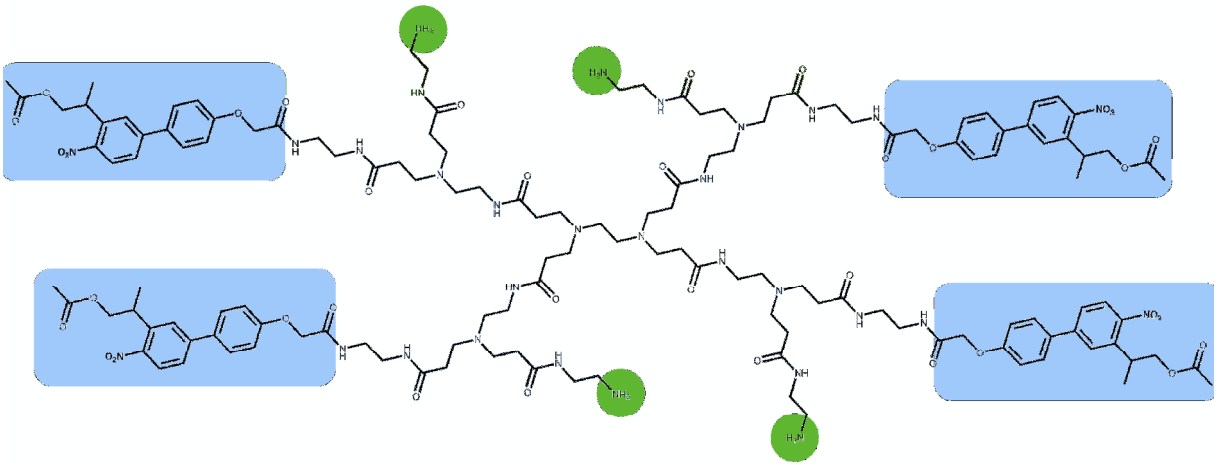


Figure 71. *PAMAM-G1 avec quatre GPP (bleu) et quatre amines libres (vert).*

		Substrats		Réactifs	Solvant	Temps
		PAMAM-G1	« 16 »			
Couplage total		1 éq.	9 éq.	20 éq. DIC 20 éq. HoBt	DMF	1 nuit
Couplage partiel	C1	1 éq.	5 éq.	10 éq. DIC 10 éq. HoBt		19h
	C2	1 éq.	4 éq.	4 éq. PyBop		22h

Tableau 10. *Conditions expérimentales utilisées pour l'obtention du PAMAM-G1 à différents niveaux de fonctionnalisation.*

Le chromatogramme HPLC du brut réactionnel avec les conditions de couplage partiel C1 va nous indiquer la formation d'un composé majoritaire (Figure 72). Suite à la purification, un spectre RMN ^{1}H et l'analyse par spectrométrie de masse nous révèlent que le composé majoritairement formé est le PAMAM-G1 avec huit GPP. Une seconde réaction faite en parallèle avec le PyBOP à la place du mélange DIC/HoBt et cette fois le chromatogramme HPLC du brut réactionnel va montrer la formation de plusieurs composés (Figure 72). A partir du temps de rétention et du profil UV, on peut déterminer que l'un des pics correspond au NPG1 possédant huit GPP et les pics le précédant sont vraisemblablement les espèces composées d'un nombre inférieur de GPP. Ce qui sera confirmé grâce à des analyses menées par la suite (Cf. Figure 73, Figure 74).

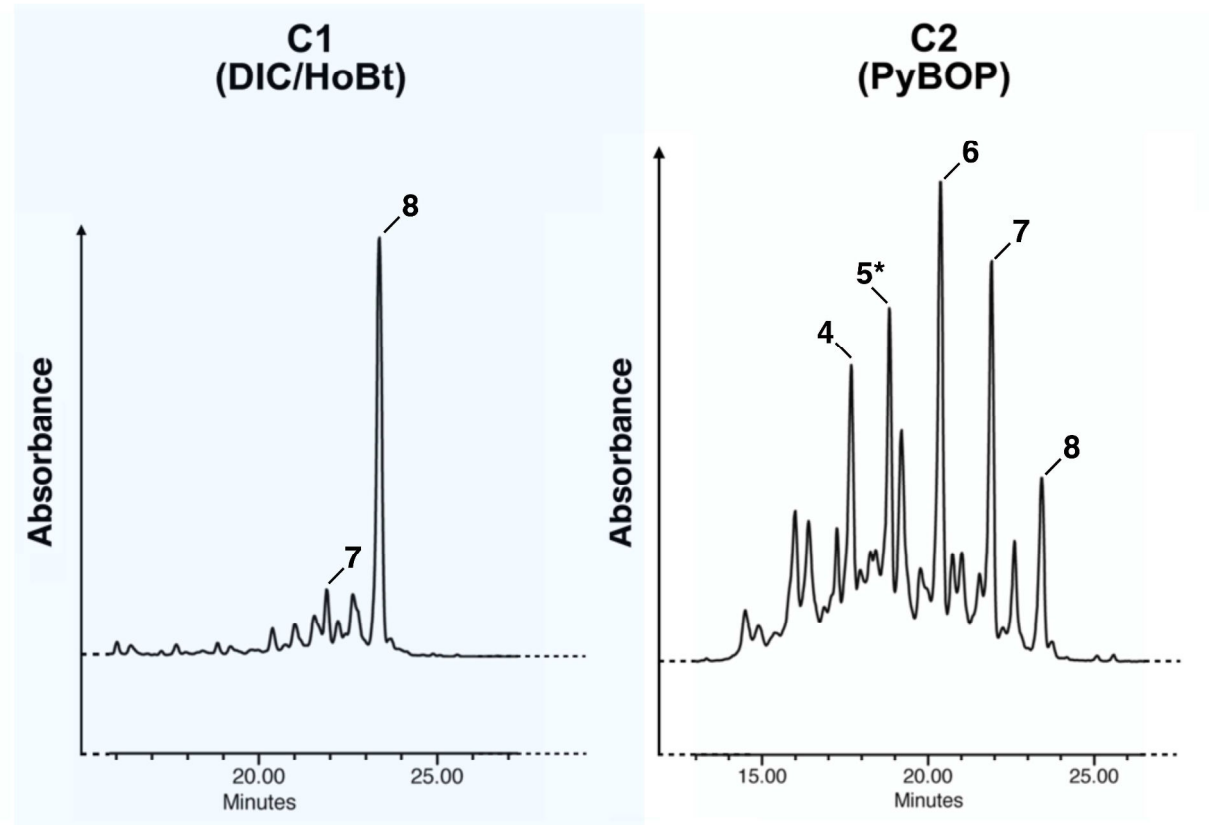


Figure 72. *Chromatogramme HPLC du brut des expériences de couplage partiel dans les deux conditions G1 (spectre complet en annexe). Les chiffres indiquent le nombre de GPP fixé sur le PAMAM*-G1. * = supposé

Ces résultats nous suggèrent un effet coopératif au cours de cette réaction. C'est-à-dire que dès que le premier GPP se fixe sur le PAMAM celui-ci devient plus attractif pour les suivants et ainsi de suite. Cependant ce phénomène semble s'atténuer avec le PyBOP, qui est un réactif de couplage peptidique plus efficace que le mélange DIC/HoBt. On peut imaginer que le PyBOP sera moins affecté par l'effet coopératif ce qui expliquerait que la distribution soit plus équilibrée, néanmoins il semble que ce soit tout de même des espèces avec plus de 4 GPP qui soit favorisées. A ce stade, il est difficile de comprendre le phénomène de « coopérativité » observé pour ces réactions, une première hypothèse serait qu'il soit la conséquence d'un rapprochement entre différents blocs aromatiques (π-π stacking). La littérature ne mentionne pas à notre connaissance de réaction similaire.
Ces résultats nous ont obligés à changer de stratégie pour fonctionnaliser en amont le PAMAM afin de priver les GPP de l'accès aux quatre positions restantes. Nous avons décidé de travailler avec l'acide sulfoacétique qui va apporter une bonne solubilité aqueuse au dérivé

mais également une charge négative qui, à pH physiologique, pourrait éloigner les blocs aromatiques les uns des autres. En outre, une seconde synthèse avec le triéthylène glycol permettra d'avoir un dérivé solubilisant dans l'eau et neutre. Dans un premier temps nous avons consacré quelques expériences à mieux comprendre le phénomène de « coopérativité », pour cela nous avons mis en place plusieurs synthèses (Tableau 11). Les séries d'expériences 1 et 2 vont être des couplages simples avec un substrat et serviront de contrôle pour la série 3. En effet, la dernière série sera une mise en compétition de l'acide sulfoacétique et des GPP. Pour l'ensemble de ces expériences, des chromatogrammes HPLC du brut réactionnel ont été réalisés. Les pics semblant les plus intéressants ont été isolés et caractérisés par spectrométrie de masse.

PAMAM-G1		A DIC / HoBt / DIPEA (éq.)	B PyBOP/DIPEA (éq.)	Solvant	Temps
1	Acide sulfoacétique (4éq.)	10 / 10 / 5	10 / 15	DMF	24h
2	Molécule 16 (GPP) (4 éq.)	10 /10	10 / 10		
3	Acide sulfoacétique + 16 (4 éq. + 4 éq.)	10 / 10 / 5	10 / 15		

Tableau 11. *Différentes conditions réactionnelles de couplage au PAMAM-G1 avec différents réactifs et différents substrats.*

Voyons maintenant les informations que nous pouvons tirer en comparant les différents profils HPLC. Les chromatogrammes HPLC des réactions avec les acides sulfoacétiques ne montrent pas d'intérêt particulier étant donné que le produit absorbe peu en UV. En revanche le produit formé sera très utile pour la synthèse des composés hybrides décrits dans la section suivante (III.4.2). Pour la série 2 (Figure 73), on constate la formation de plusieurs composés quelles que soient les conditions, **A** ou **B**. Les pics les plus intéressants seront isolés par HPLC et caractérisés par spectrométrie de masse. Pour **2A** notamment, il y a une grande différence avec le chromatogramme HPLC obtenu précédemment (Figure 72) qui montrait un produit majoritaire. Les réactions sont très similaires mais il y a quelques différences qui ont pu influencer ce résultat. Tout d'abord, les réactions ne sont pas effectuées sur le même nombre d'équivalent : 4 équivalents pour les conditions **2A** et 5 équivalents en **C1**, ensuite la concentration n'est pas la même non plus. La réaction **2A** est environ deux fois moins concentrée que **C1**. L'information principale à noter est la formation de produit possédant 8 GPP, la spectrométrie de masse nous a également permis d'identifier le composé possédant 7, 6, 4, et 3 GPP. La molécules possédant 5 GPP devrait avoir le même temps de rétention que 16 mais il était difficile d'isoler un pic dans cette zone. Pour les molécules avec une ou deux GPP, elles pourraient se trouver avec un temps de rétention aux environs des 15 minutes, mais elles semblent assez peu présentes.

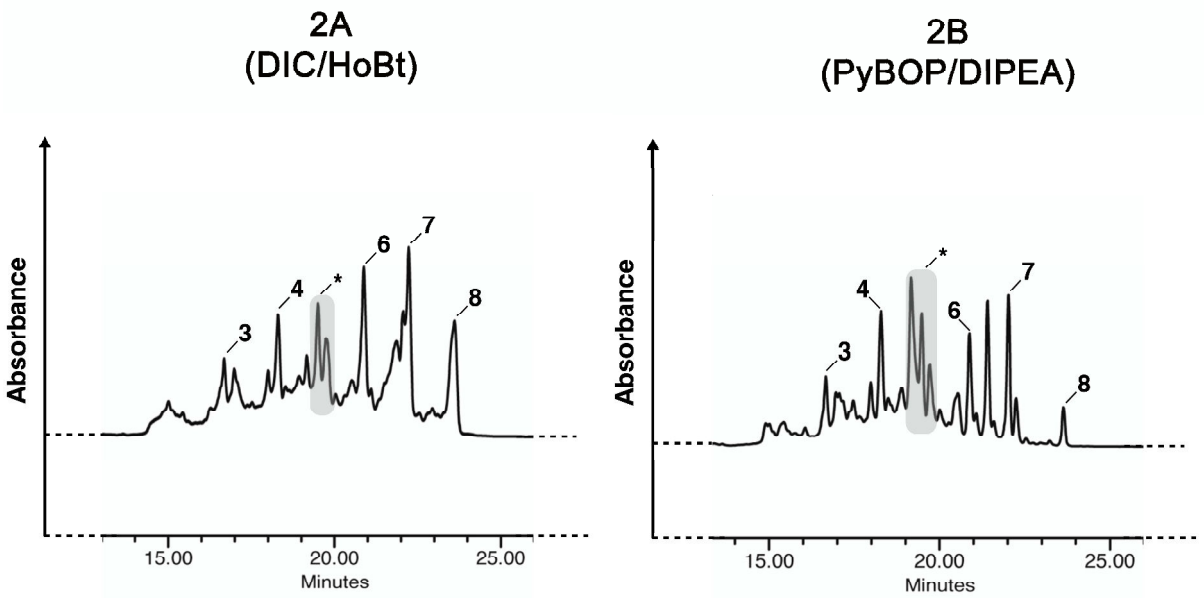


Figure 73. *Chromatogramme HPLC du brut réactionnel des réactions **2A** et **2B**. Les chiffres correspondent aux nombres de GPP fixé sur le PAMAM-G1. (*) Cette zone représente la position du réactif « 16 » et la position attendu du composé avec 5 GPP.*

Même si un spectre UV ne permet pas de juger de la quantité de composé formé, on peut s'accorder à dire qu'il n'est pas attendu dans ces conditions de voir se former des molécules possédant plus de quatre ou cinq GPP. De plus, la tendance semble être portée sur la formation majoritaire des espèces possédant 6, 7 et 8 GPP. Ainsi, comme évoqué précédemment, un phénomène de coopération pourrait bien être à l'origine de cette distribution. Il faut tout de même noter que le PyBOP semble former plutôt les espèces entre 4 et 7 GPP surement à cause de sa réactivité alors que les conditions **A** favoriseront 6, 7 et 8.
Pour les chromatogrammes HPLC de la série 3 (Figure 74), deux composés sont en compétition l'un étant très hydrosoluble l'acide sulfoacétique et l'autre plutôt hydrophobe le GPP **16**. Dans les conditions **A**, ils sont activés séparément pendant 1h, puis ajoutés au PAMAM-G1. Dans les conditions **B**, le DIPEA généralement combiné au PyBOP en mélange équimolaire sera ici ajouté en plus grande quantité afin de contrebalancer l'apport en proton de l'acide sulfoacétique pour ne pas perturber la réaction. Sur les chromatogrammes HPLC des deux réactions on va constater une forte tendance à former NPG1 les autres espèces majoritaires vont posséder une combinaison de dérivés sulfate et GPP. Dans ce mélange on retrouve, les PAMAM-G1 ayant fixé 7 GPP et un dérivé sulfate (noté 7/1), mais également 6/2 et 5/3 sont observés. De plus, on n'observe pas de produits dans la zone comprise entre 15 et 20 min., où sont visibles les espèces possédant 3 et 4 GPP. On note également une différence entre les conditions **A** où les composés 8/0 et 7/1 sont majoritaires, alors que les conditions **B** auraient tendance à favoriser 6/2 et un composé qui serait dû à la dégradation de PAMAM.

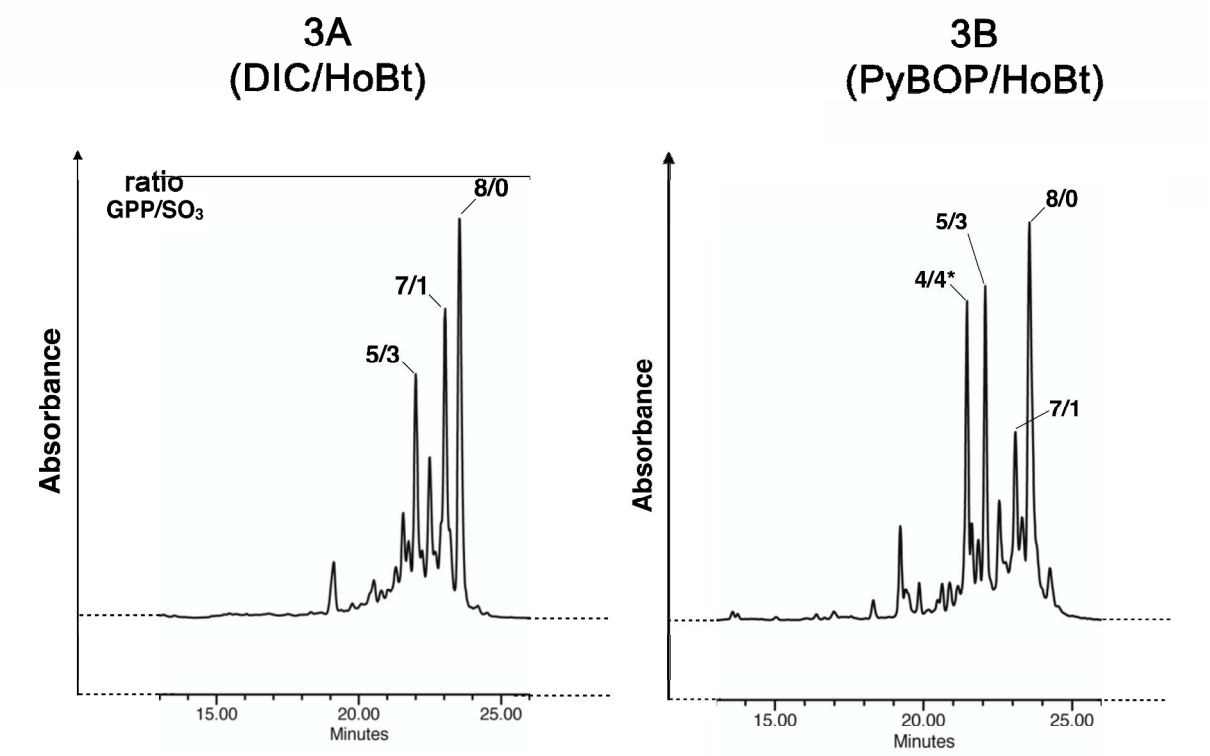


Figure 74. *Chromatogramme HPLC du brut réactionnel des réactions **3A** et **3B**. Les chiffres correspondent aux ratios GPP/dérivés sulfates fixés sur le PAMAM-G1. * L'analyse de ce pic ne montre que des fragments inexploitables, cependant le 4/4 a été identifié dans le spectre de masse du brut, et cela pourrait correspondre à sa position.*

Nous avons suggéré qu'une interaction entre les blocs aromatiques du GPP **16** pourrait être à l'origine de la fonctionnalisation excessive du PAMAM. Pour tenter de répondre à cela, nous avons ajouté du biphényle au milieu réactionnel (Figure 75). Dans les conditions de la réaction, ce composé ne devrait pas réagir mais devrait être en mesure d'engager des interactions avec les autres blocs aromatiques. Nous avons choisi d'ajouter du biphényle aux conditions réactionnelles de la synthèse 3A. Nous supposons que si le biphényle s'intercale à la place d'un GPP, aucune liaison ne pourra se créer et le sulfate aura la possibilité de réagir. Néanmoins seule l'absence de réactivité pourra être observée puisque le composé n'absorbe pas dans l'UV et à cause de sa solubilité, il est très compliqué de l'isoler dans un mélange aussi complexe.

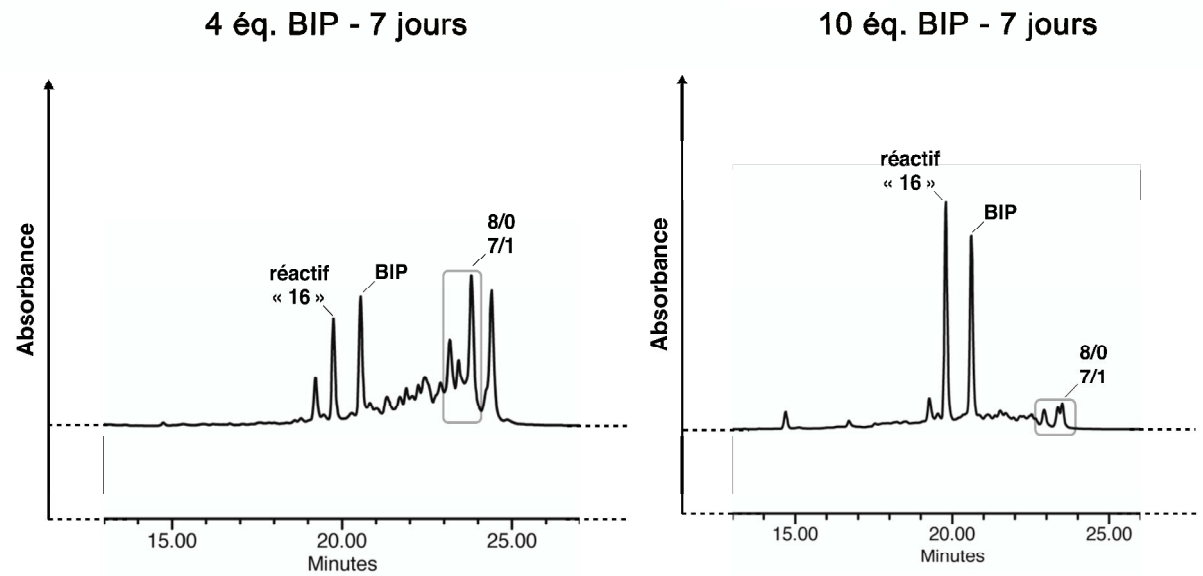


Figure 75. *Injection du brut réactionnel des réactions **3A** et **3B** avec ajout de différents équivalents de **BIP**. Les chiffres correspondent aux ratios GPP/dérivés sulfates fixés sur le PAMAM-G1.*

La première différence avec les réactions précédentes est la présence du réactif 16 même après sept jours de réaction. Dans la réaction avec 4 équivalents de biphényle, on constate la formation de composé avec un taux élevé de greffage (8/0, 7/1), il faut cependant attendre plusieurs jours pour obtenir ce résultat. De plus, lorsque l'on ajoute 10 équivalents de biphényle, la réaction n'évolue quasiment pas, on observe une légère formation de composés qui pourrait correspondre aux 8/0 et 7/1. Ainsi, l'ajout de biphényle dans le mélange réactionnel va rendre l'effet coopératif de la réaction délétère et ralentir voire stopper la réactivité du GPP **16**. On peut imaginer que le biphényle se positionne à la place de **16** et comme il ne peut pas réagir, rien ne se passe jusqu'à ce qu'une nouvelle interaction se crée avec un composé capable de se lier de manière covalente au PAMAM.
Finalement nous avons réussi à démontrer qu'il existe bien un phénomène non classique dans cette réaction et qui fait intervenir des interactions entre les aromatiques. Ce qui semble cohérent puisque les espèces hydrophiles ne semblent pas touchées par ce phénomène comme nous le verrons dans la prochaine section (III.4.2), de plus la littérature n'évoque pas ce comportement. C'est un phénomène qui peut être intéressant s'il est exploitable sur d'autres composés aromatiques et il mériterait d'être exploré plus en détails.

III.4.2. Préparation de PAMAM hybride sulfaté et pégylé

Suite aux expériences menées dans la section précédente il nous est apparu évident qu'il fallait commencer la synthèse en plaçant les espèces hydrophiles en premier. Ainsi nous avons entrepris la synthèse d'un composé fonctionnalisé avec 4 équivalents d'acide sulfoacétique et un second avec 4 équivalents d'un dérivé acide du triéthylène glycol (Schéma 10).

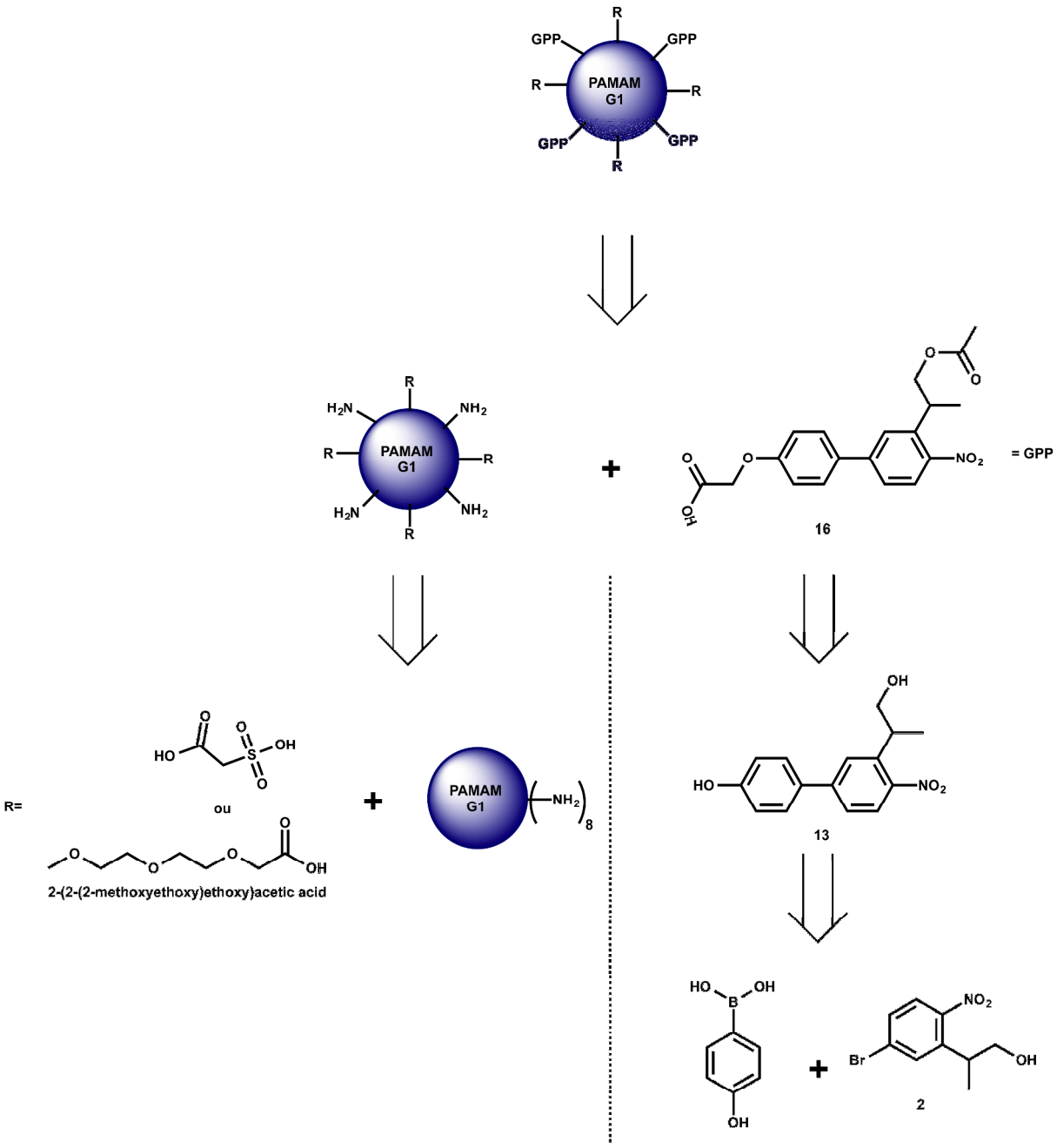


Schéma 10. *Rétrosynthèse des composés hybrides SPG1 et PPG1.*

Les deux synthèses vont s'effectuer dans des conditions similaires lors de la première étape. Comme le taux de greffage devrait être à nouveau une distribution statistique de plusieurs composés, un léger excès (4,5 équivalents) de réactif (SAS ou TEG) est utilisé afin de favoriser la formation de l'espèce avec quatre amines libres (Schéma 11). Un mélange PyBOP et de DIPEA a également été testé dans des conditions similaires avec des résultats identiques. Il faut noter que lors de la synthèse de G1-SAS, dès l'ajout du PAMAM-G1 un précipité se forme marquant le début de la réaction, ce précipité s'avérera par la suite être le produit souhaité. La solubilité du produit étant très élevée en milieu aqueux, il n'était pas envisageable de purifier ce composé sur colonne C18, il sortirait directement dans le volume mort. Des essais de dialyse ont été menés mais sans grand succès, l'ouverture (cut-off) de la membrane, même la plus petite, n'avait pas la rétention nécessaire pour conserver la majorité du produit dans la membrane. Finalement, une simple filtration du brut réactionnel avec un lavage à la DMF sera adoptée.

Pour l'étape de couplage avec **16**, concernant la voie de synthèse du SAS, les suivis HPLC ont montré une faible formation de nouveaux composés lors de l'utilisation du DIC et du HoBt. C'est pourquoi le PyBOP qui a montré de meilleurs résultats, a été choisi. Ce n'est cependant pas le cas pour la voie de synthèse du TEG. Les conditions réactionnelles de cette étape sont encore soumises à des changements, puisque c'est la dernière étape que j'ai pu atteindre au cours de cette thèse et que les produits obtenus ne sont pas encore complètement caractérisés.

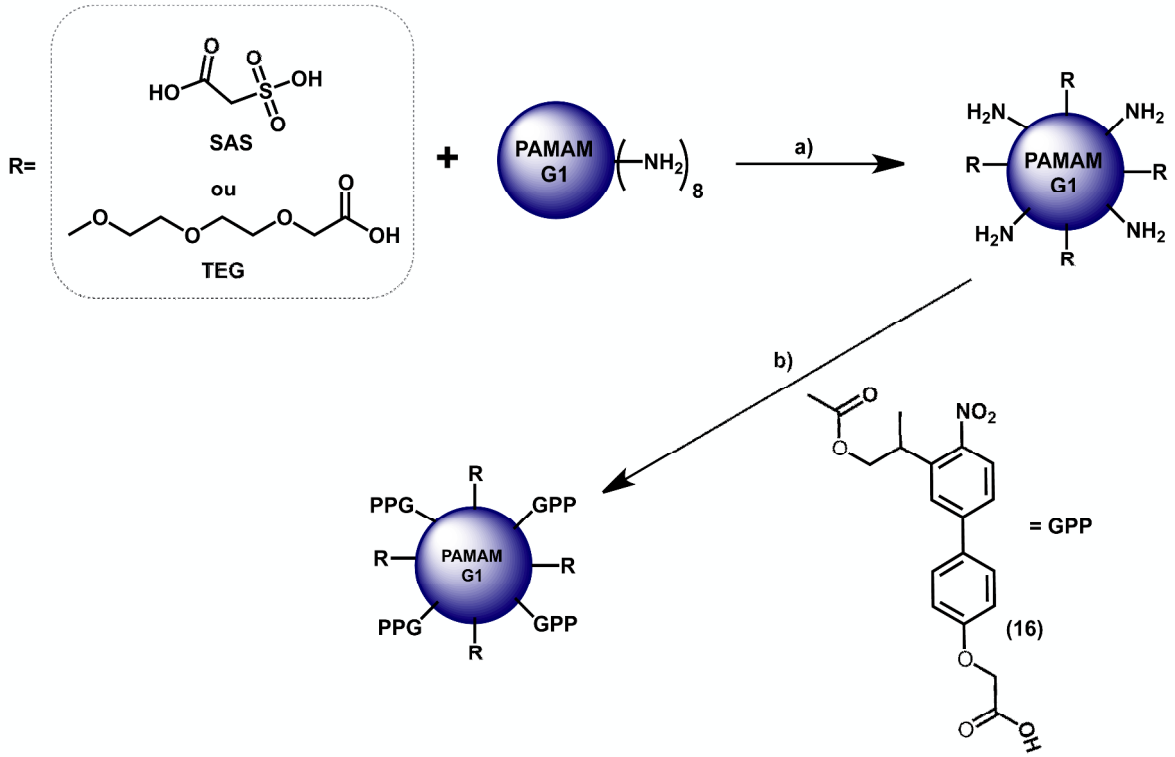


Schéma 11. *Synthèse générale des composés hybrides.*
SAS : a) DIC, HoBt, DMF, 19h, TA, 90%. b) PyBOP, DIPEA, DMF, 70°C, 1 nuit. **TEG** : a) DIC, HoBt, DMF, 19h, TA, nd%. b) DIC, HoBt, DMF, TA, 1 nuit.

III.4.3. Caractérisation

G1-SAS

La caractérisation par RMN ^{1}H du G1-SAS a fait apparaître la présence de SAS restant dans l'échantillon final. Les signaux ont pu être réattribués aux deux composés grâce à la méthode RMN DOSY[100] (Diffusion Ordered SpectroscopY) qui utilise le coefficient de diffusion des différents composés pour les discriminer (Figure 76). Enfin, la spectrométrie de masse nous confirmera la présence de PAMAM possédant 1 à 4 dérivés sulfates (3 et 4 majoritaire) ce qui est cohérent avec l'intégrale du spectre RMN ^{1}H indiquant un taux de greffage moyen de 3.7 sulfate.

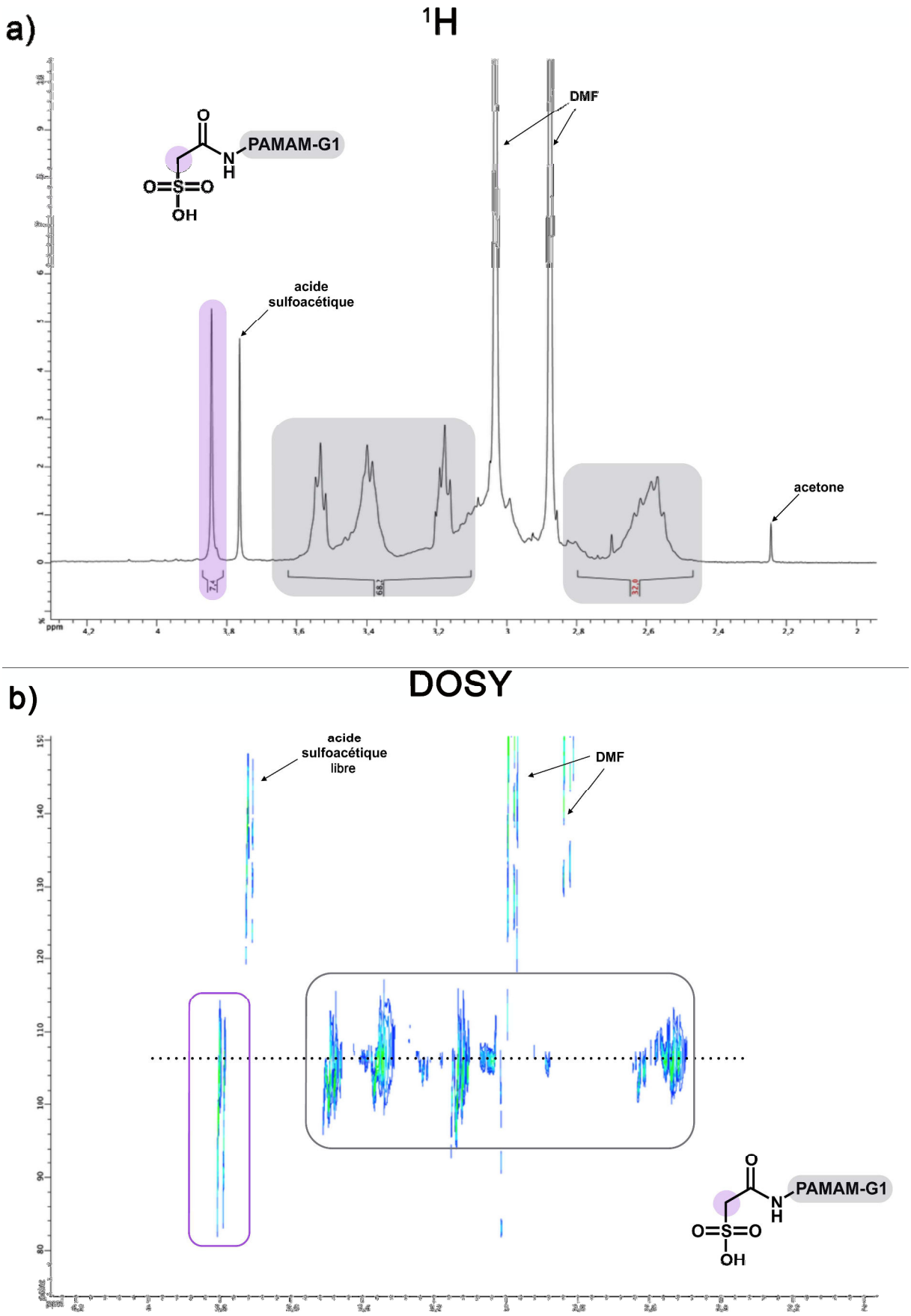


Figure 76. *Spectre RMN ^{1}H et DOSY du G1-SAS.*

Pour la seconde étape, les chromatogrammes HPLC et les spectres de masse du brut réactionnel sont encourageants mais jusqu'à présent nous n'avons pas réussi à isoler un composé d'intérêt. Actuellement, la synthèse est dirigée dans le but d'obtenir l'espèce possédant 4 GPP et 4 dérivés sulfates, afin de juger de la pertinence de ce type de composé. Néanmoins des espèces 5/3, 6/2 etc... serait également très intéressantes à étudier car elles pourraient fournir des informations tel que le nombre limite de GPP à fixer avant de perturber la photochimie.

CHAPITRE IV

QUINUCLIDINE ET INHIBITION NEURONALE

IV.1. Introduction

Le glutamate et le GABA cagés sont des outils très performants pour induire respectivement une excitation ou une inhibition d'un neurone par simple excitation lumineuse. Toutefois, l'ingénierie biologique des récepteurs canaux permet d'obtenir un degré supplémentaire de contrôle dans la perturbation neuronale. Par exemple, le développement de récepteurs canaux chimériques mis au point par l'équipe de Sternson[101] permet d'obtenir une manipulation sélective de l'activité neuronale dans un cerveau de mammifère *in vivo*. Cet outil est basé sur la combinaison de l'ingénierie protéique du récepteur à l'acétylcholine α7 nicotinique (nα7AChR) avec l'ingénierie moléculaire des ligands de ce même récepteur. Le sous-type α7 est présent en abondance dans le système nerveux central, notamment au niveau de l'hypothalamus et du cortex.
Le nα7AChR fait partie de la famille des récepteurs canaux (appelés aussi « ligand gated ion channel » (LGIC)). Ce sont des protéines transmembranaires qui en réponse à un messager chimique vont ouvrir un canal transmembranaire et autoriser le passage d'ions. Ces récepteurs canaux peuvent être séparés en deux parties : le domaine de reconnaissance des ligands (ou LBD pour « ligand binding domain ») et le domaine de passage des ions (ou IPD pour « ion pore domain ») (Figure 77).

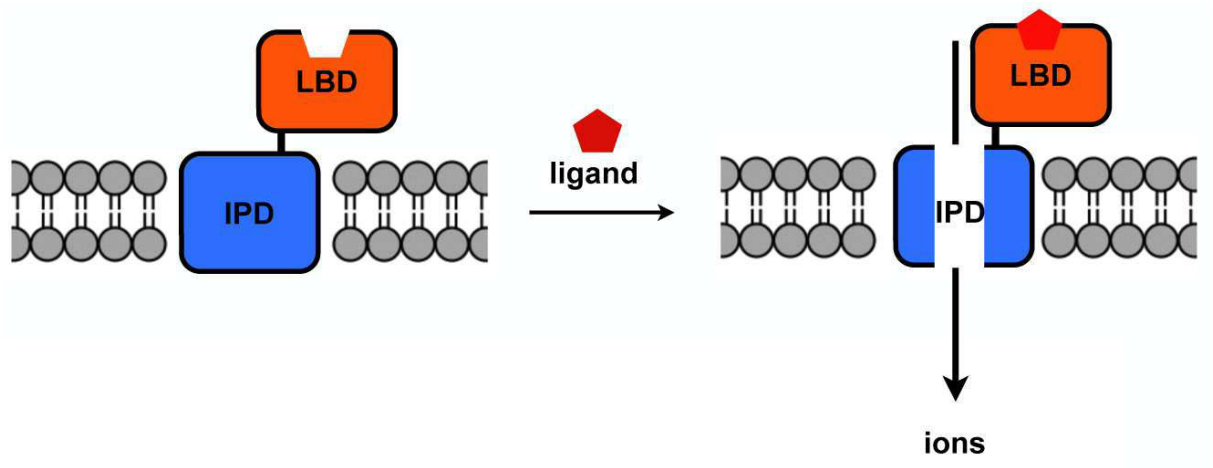


Figure 77. *Schéma simplifié d'un récepteur canal.*

Dans le but de rendre le récepteur plus sélectif aux agonistes synthétiques, le domaine de reconnaissance du nα7AChR va être modifié par évolution dirigée pour diminuer son affinité vis à vis de son agoniste naturel, l'acétylcholine (ACh). La lysine en position 141 va être remplacée par une phénylalanine afin d'obtenir un nouveau domaine de reconnaissance muté noté $\alpha 7^{L141F}$. En parallèle, un dérivé de quinuclidine, le PNU,[102] connu pour avoir une affinité élevée envers le nα7AChR a été optimisé à son tour afin d'obtenir le composé 89S, qui possède une forte affinité pour $\alpha 7^{L141F}$. Le domaine de passage des ions pourra également être modulé en fonction de l'effet recherché (Figure 78). L'association d'un domaine de reconnaissance muté et d'un domaine de passage des ions choisis donne naissance à un nouveau récepteur canal qui peut être qualifié de chimérique.

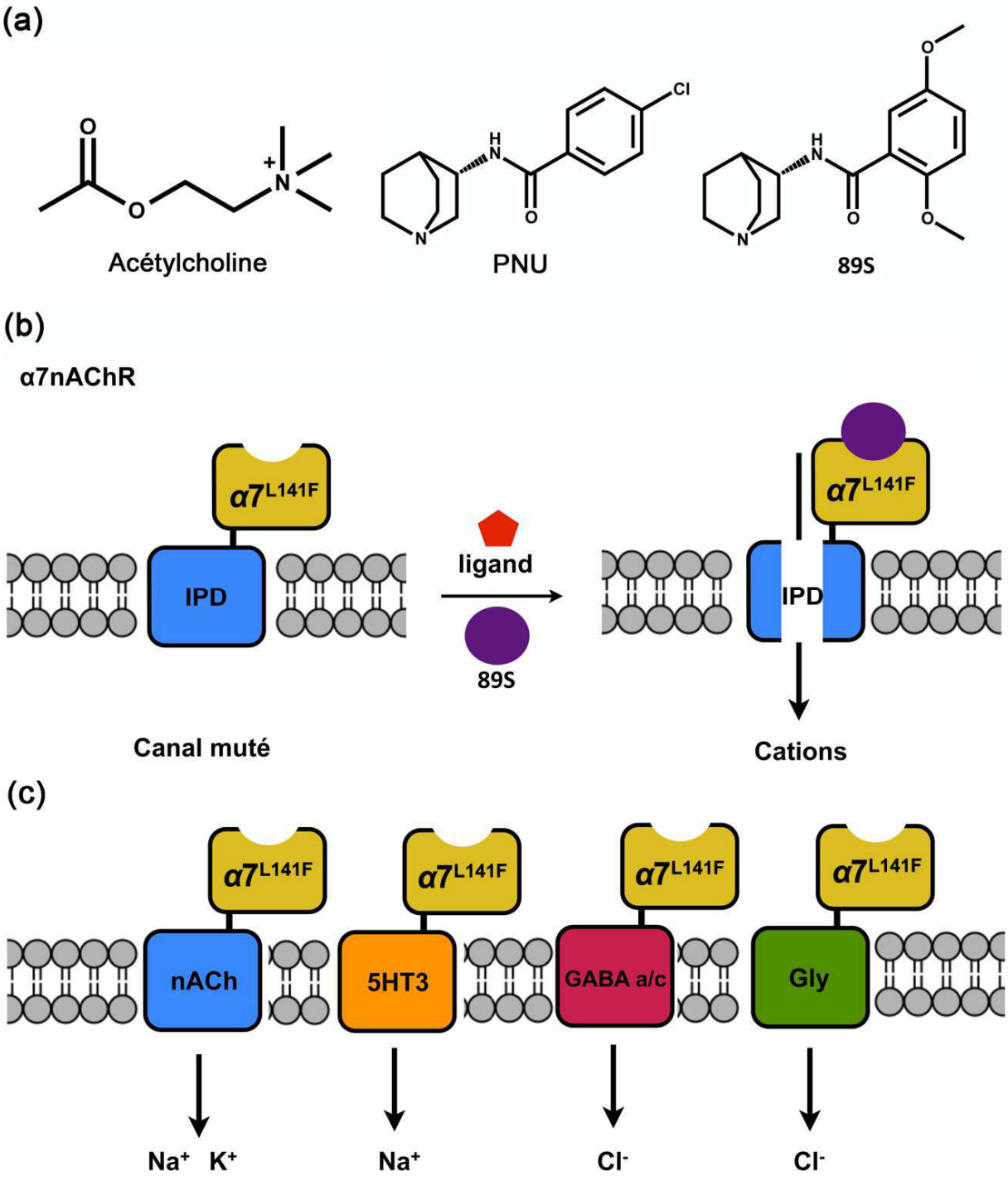
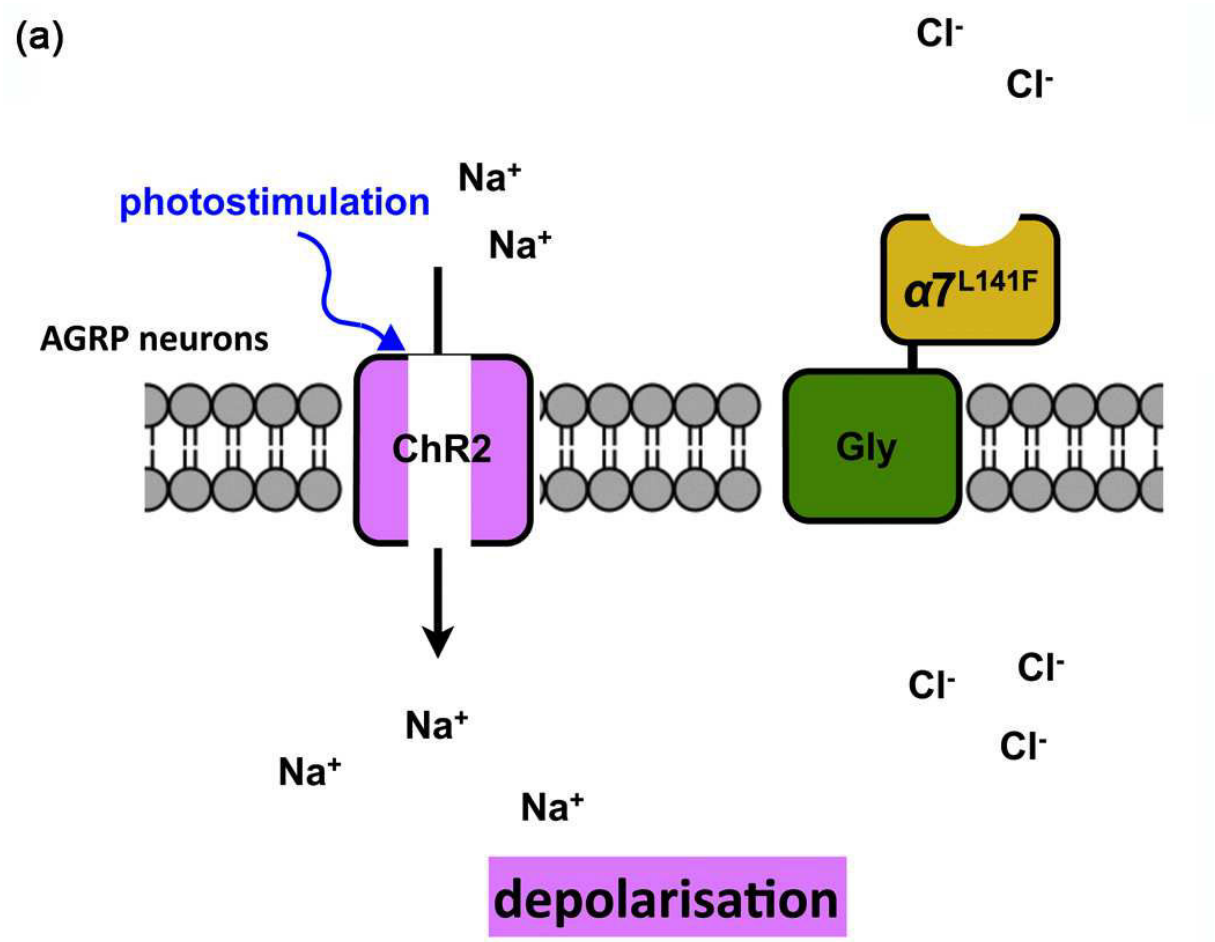


Figure 78. *Récepteur canal chimérique. (a) Agoniste naturel (Acétylcholine) et synthétique (PNU et 89S) des récepteurs α7-nicotinique et agoniste du récepteur α7 muté. (b) Récepteur canal chimérique composé d'un domaine de reconnaissance α7 muté et d'un domaine de passage des ions. Les mutations du LBD vont le rendre sélectif du 89S mais pas du ligand endogène, l'ACh. (c) Contrôle de la conductance en fonction du IPD choisis.*

Ce système peut être intégré dans l'organisme d'une souris transgénique et permettre l'observation de la relation entre l'activité neuronale et le comportement animal. Il est souvent utilisé pour réduire au silence (« silencing ») certains types de neurones. Par exemple, des

souris transgéniques co-exprimant channelrhodopsin et un récepteur canal chimérique $\alpha 7^{L141F}$-Gly sur des neurones responsable de l'appétit, les neurones AGRP, ont été créées. Le channelrhodopsin est une protéine dont le gène est extrait d'algues unicellulaire, capable d'ouvrir un canal perméant sous l'action d'une lumière bleue, laissant entrer sélectivement les ions Na^+, ce qui dépolarise les neurones et les rend excitables). Ainsi, suite à une photostimulation des neurones mutés chez les souris transgéniques, le channelrhodopsine est activé et crée une dépolarisation des neurones qui provoque une prise de nourriture de l'animal. Ce comportement peut être modulé par une injection de 89S qui va venir atténuer la dépolarisation, on pourra ainsi constater une diminution de la prise de nourriture (Figure 79). Après, 24h la souris retrouvera une prise de nourriture normale.



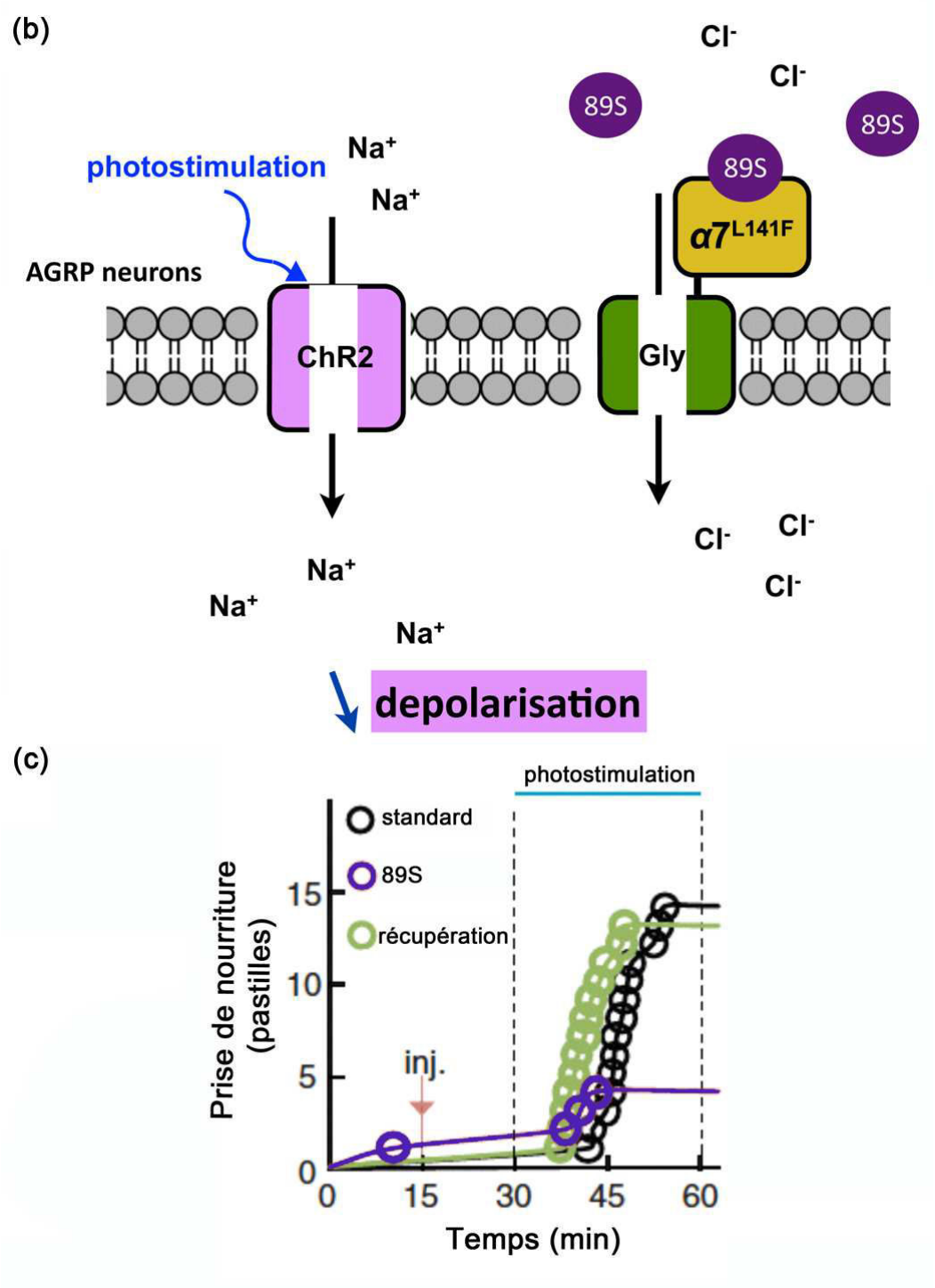


Figure 79. *Exemple de neurones rendus partiellement silencieux grâce à l'utilisation de récepteurs canaux chimériques pour supprimer la prise de nourriture évoquée par les neurones AGRP chez une souris transgénique. (a) La photostimulation de l'animal va provoquer une activation des channelrhodopsines et engendrer une dépolarisation des neurones. Cela va entraîner une prise de nourriture de la part de l'animal. (b) La photostimulation de l'animal après injection du 89S va à nouveau provoquer une dépolarisation mais beaucoup plus faible qui va se traduire par une prise de nourriture plus faible des souris. (c) Représentation de la prise de nourriture de l'animal en fonction des conditions expérimentales.*[101]

Pour notre étude, les récepteurs chimériques vont être utilisés afin de rendre silencieux les interneurones GABAergiques. Des études ont déjà été menées dans ces conditions et ont permis d'élucider certains mécanismes de régulation de l'information neuronale.[103] Malgré une grande sélectivité ce système ne permet pas l'observation d'événements neuronaux à l'échelle de la synapse. Nous souhaitons grâce au GPP apporter une résolution spatio-temporelle à cette technique afin de pouvoir contrôler quel interneurone sera réduit au silence. Dans cette optique de nouveaux dérivés de quinuclidine ont été synthétisés avec une structure autorisant le couplage aux GPP tout en conservant l'affinité pour le récepteur α7 nicotinique muté.

IV.2. Synthèse

De nombreuses études ont déjà été menées sur les dérivés de quinuclidines[104–107], cependant ils ont été synthétisés en tant qu'agoniste du récepteur *α*7 nicotinique naturel. Le système que nous souhaitons utiliser possède une mutation, et il sera important d'en tenir compte. Ainsi, le point de départ de ce projet sera le composé 89S qui possède une affinité élevée pour le récepteur muté. A partir du 89S, il est difficile d'imaginer un couplage direct avec un GPP tels que PENB. L'ajout d'une fonction phénol pourrait servir de point d'ancrage au GPP comme cela a déjà été décrit pour le couplage du DDAO au PENB grâce à une réaction de Mitsunobu (Schéma 12). [79]

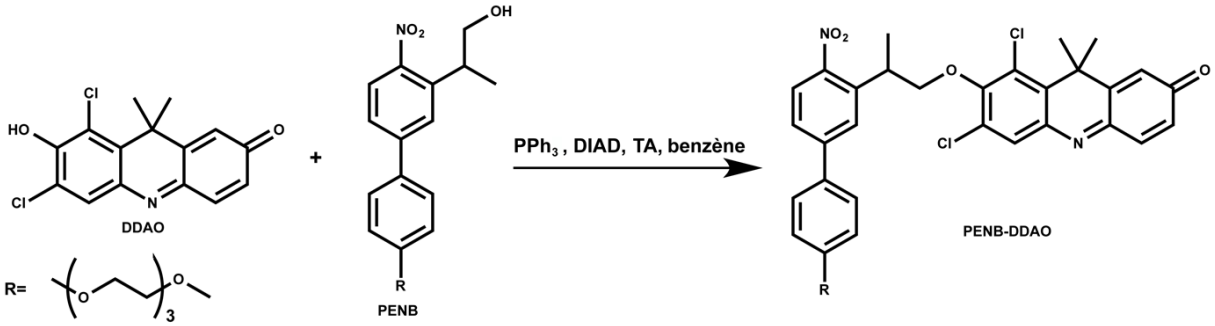


Schéma 12. *Synthèse de PENB-DDAO.*

Le cycle quinuclidine constitue la base de la reconnaissance du ligand par les récepteurs mutés ou non, c'est donc la partie benzamide qui fera l'objet de modifications (Schéma 13). De manière générale, les dérivés de quinuclidine sont obtenus en une étape grâce à la formation d'une liaison amide entre la 3-aminoquinuclidine et un dérivé d'acide benzoïque.

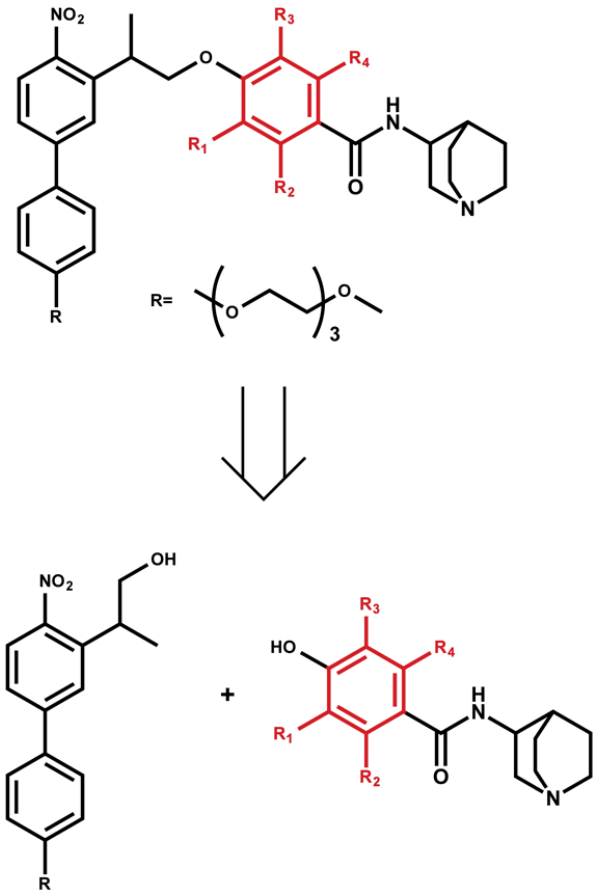


Schéma 13. *Rétrosynthèse de dérivé de quinuclidine cagé.*

Pour commencer nous avons optimisé la synthèse du composé 89S afin que l'équipe du Pr. Zemelman puisse calibrer leur protocole. Nous nous sommes basés sur la littérature[101,108] pour déterminer les conditions de synthèse (Schéma 14). Cependant, l'étape de purification par HPLC, peut s'avérer très fastidieuse sur des quantités de l'ordre du gramme même en conditions préparatives. Nous avons optimisé les étapes de purification de ce composé. Ainsi, en alternant les extractions et lavages entre un milieu acide et basique, il nous a été possible d'obtenir le composé 89S pur et avec un rendement de 80% sur des lots de plusieurs grammes.

Schéma 14. *Synthèse générale pour différents dérivés de quinuclidine.*

Pour les nouveaux dérivés possédant une fonction phénol, les mêmes conditions réactionnelles que pour le 89S sont utilisées. Ainsi, nous avons synthétisé deux molécules qui pouvaient être obtenues rapidement à partir de produits commerciaux. Toutefois, la présence du phénol nous a cette fois obligés à utiliser une purification sur colonne C-18. Malheureusement, ils ont montré une affinité trop faible pour le récepteur et une nouvelle série de composés a dû être envisagée (Tableau 12).

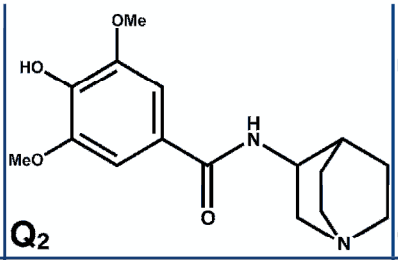
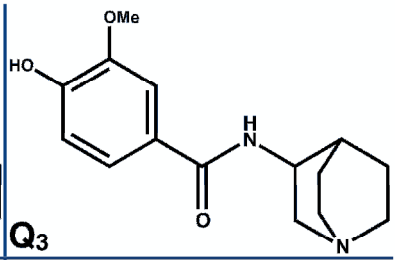
	 Q2	 Q3
rendement	16 %	49 %

Tableau 12. *Rendements des composés Q_2 et Q_3.*

IV.3. Criblage Virtuel

Avant de débuter de nouvelles synthèses, un criblage virtuel a été effectué en collaboration avec le Dr. Antoine Taly (IBPC, Paris). Nous avons tout d'abord dressé une liste des différents acides *para*-hydroxybenzoïques substitués disponibles commercialement, les molécules possédant des groupements halogénés ont été favorisées car ils vont renforcer la nucléophilie du phénate pour la réaction de couplage au GPP. Une liste de 17 composés (Figure 81) a ainsi été obtenue, 14 composés originaux possédant un groupement phénol et 3 utilisés dans l'étude du laboratoire de Sternson pour servir de référentiel. Le récepteur a été modélisé avec le logiciel « modeller » et le « docking » a été effectué à partir du logiciel « autodock vina » dans une boîte de 20 Å autour du site de reconnaissance (Figure 80).

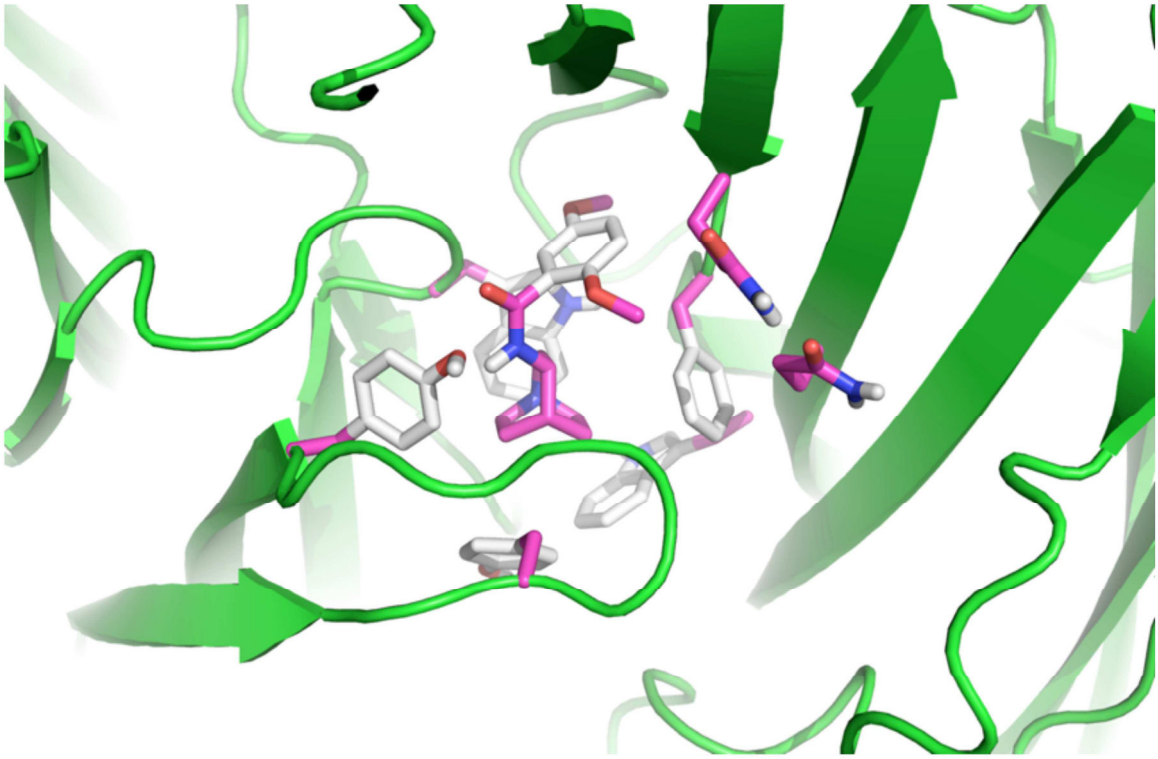


Figure 80. Docking du 89S (au centre) dans le récepteur acétylcholine α7 nicotinique portant la mutation L141F.

Les scores obtenus sont comparés au composé 89S et vont permettre de classer les composés en trois catégories : supérieur, similaire ou plus faible que l'affinité du 89S.

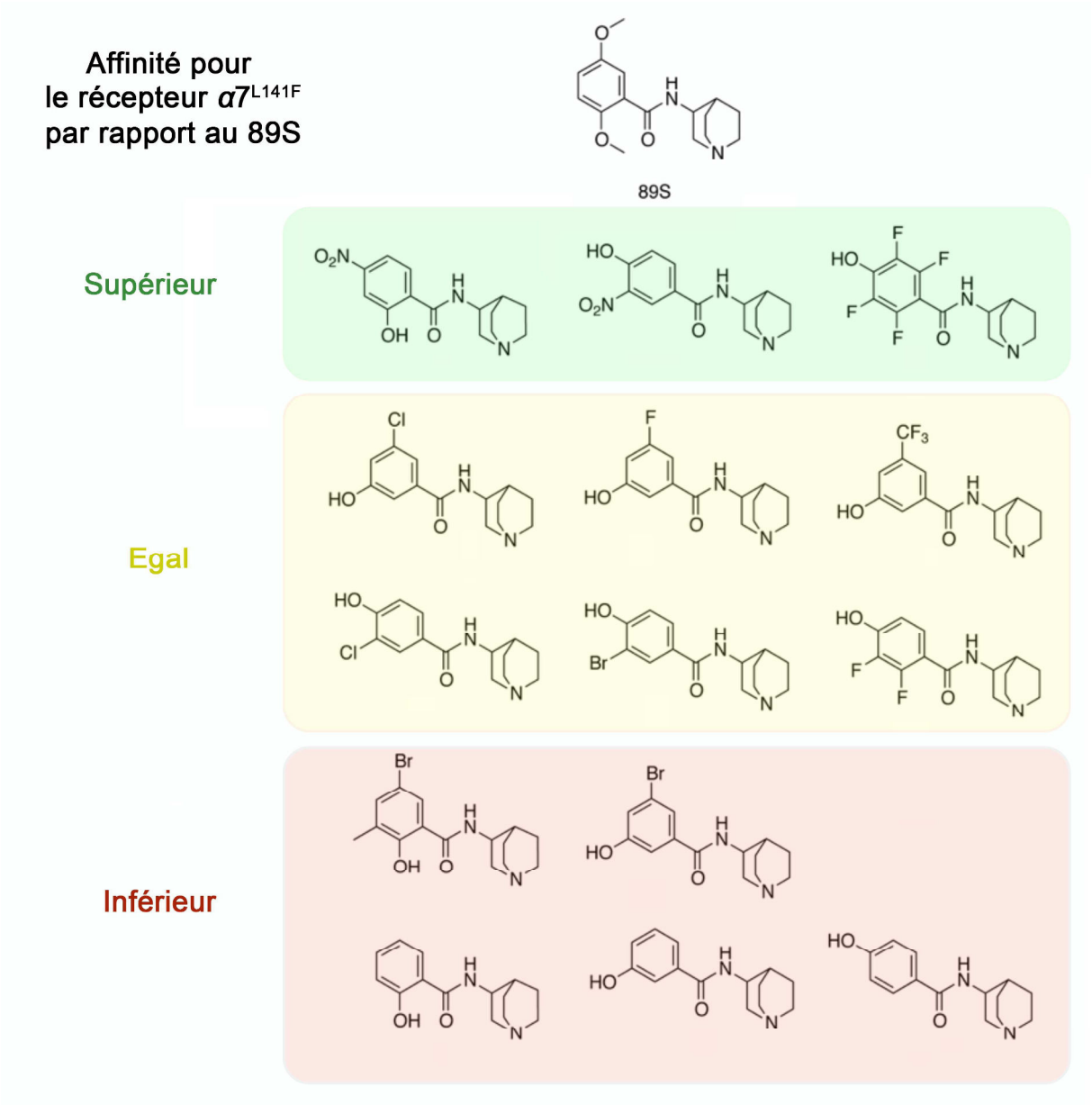


Figure 81. *Molécules soumis au « docking » avec le récepteur α7^{L141F}.*

A l'issue du criblage virtuelle, trois composés ont montré des affinités supérieures au 89S, dont deux possèdent un groupement nitro électroattracteur. Les trois composés ont été synthétisés, et il faut noter que les rendements des dérivés nitro sont particulièrement élevés (Tableau 13). Les tests biologiques concernant ces composés sont en cours dans le laboratoire du Pr. Zemelman.

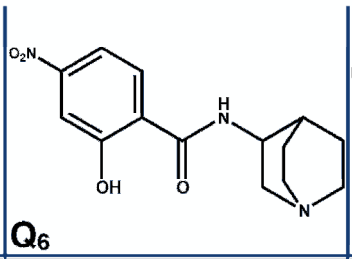
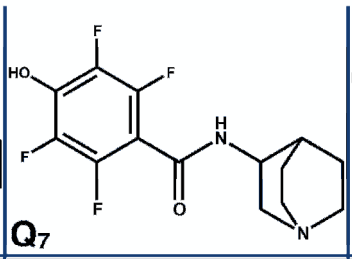
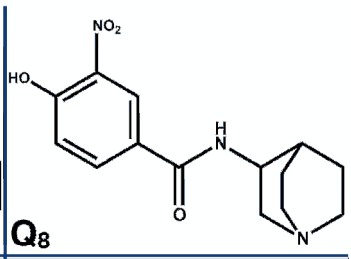
			
	Q_6	Q_7	Q_8
rendement	98 %	53 %	99 %

Tableau 13. *Rendements des composés Q_6, Q_7 et Q_8*

IV.4. Expériences *in vitro* et *in vivo*

La mise au point des tests biologiques concernant ces composés a pu être réalisée grâce à la quantité importante de 89S que nous avons pu envoyer à l'équipe du Pr. Zemelman. Ces premières expériences serviront de référence pour les tests qui seront effectués sur les nouveaux dérivés présentés dans la section précédente. Les expériences ont été réalisées sur des tranches de cerveaux possédant les récepteurs chimériques $\alpha 7^{L141F}$-Gly. Dans la première figure (82a), quand 89S est ajouté, la résistance du neurone commence à diminuer car les canaux Gly s'ouvrent et la cellule commence à laisser passer les ions chlorures. Ceci va entrainer une augmentation de la conductance traduit par une diminution du potentiel de membrane. Le paramètre suivant est la cinétique d'ouverture du canal, *Tau*. *Tau* décroît quand la conductance de la membrane augmente à cause de l'ouverture des canaux Gly par le 89S (Figure 82).

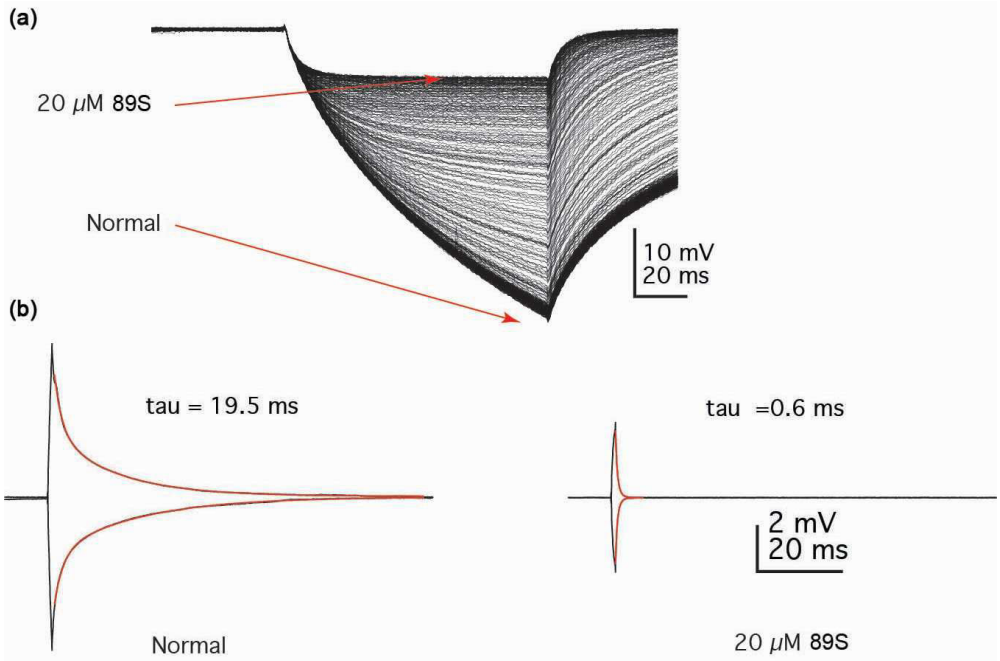
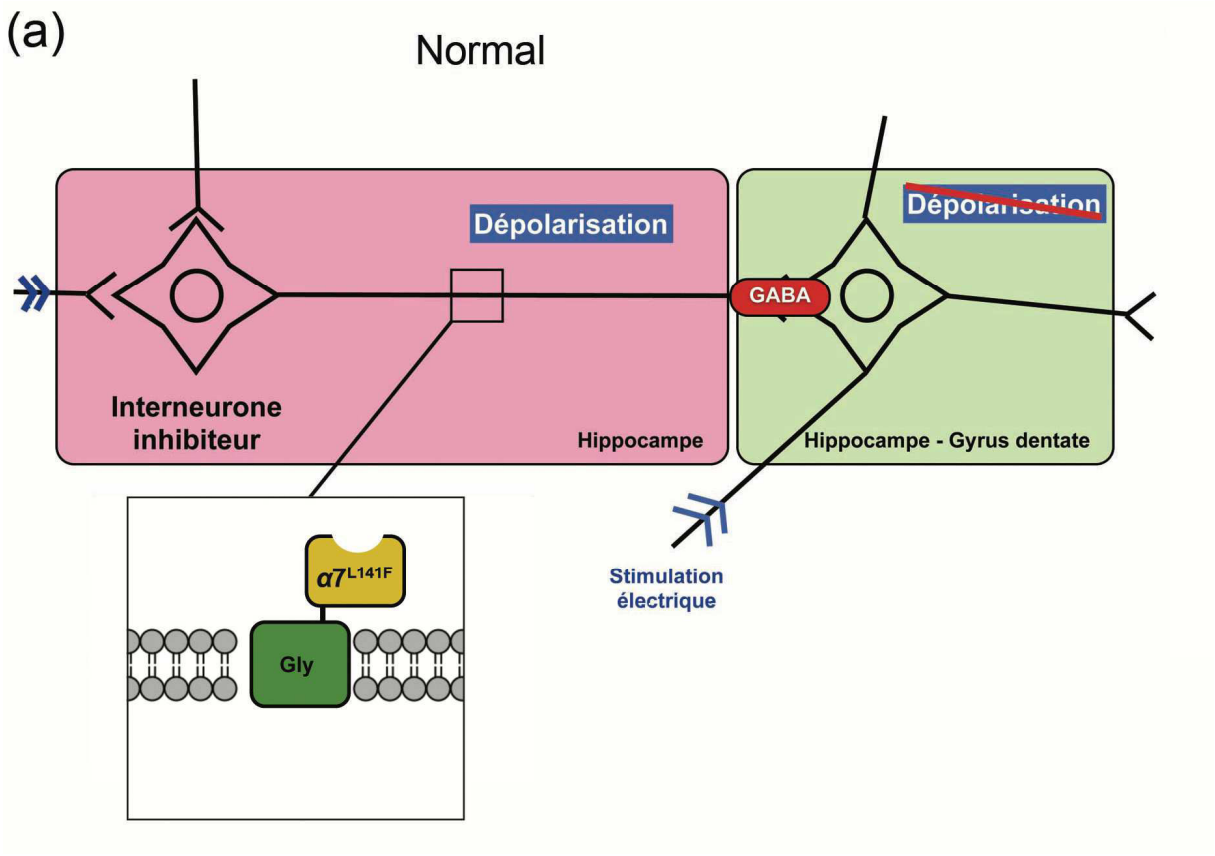


Figure 82. *Suivi des paramètres électrochimiques de la membrane avant et après ajout de 89S. (a) Enregistrement du potentiel de la membrane du neurone subissant des impulsions électriques. (b) Mesure de la constante de temps de la membrane.*

La seconde expérience correspond à une étude *in vivo*. Elle consiste en l'enregistrement électrophysiologique du gyrus dentate d'un hippocampe où les voies d'entrées sont stimulées électriquement. L'animal est anesthésié et la mutation est exprimée au niveau des interneurones inhibiteurs par transfection virale. Les stimulations électriques vont provoquer la dépolarisation des interneurones inhibiteurs et conduire à l'absence d'activité au niveau du gyrus dentate. En revanche, lorsque le 89S va être appliqué dans la zone, l'interneurone va ouvrir ces canaux Gly et perdre sa dépolarisation, ainsi le GABA ne sera plus libéré et le signal pourra continuer d'être transmis au niveau du gyrus dentate. C'est le principe de "−" + "−" = +. Le produit permet donc bien de réduire au silence les interneurones inhibiteur de l'hippocampe.



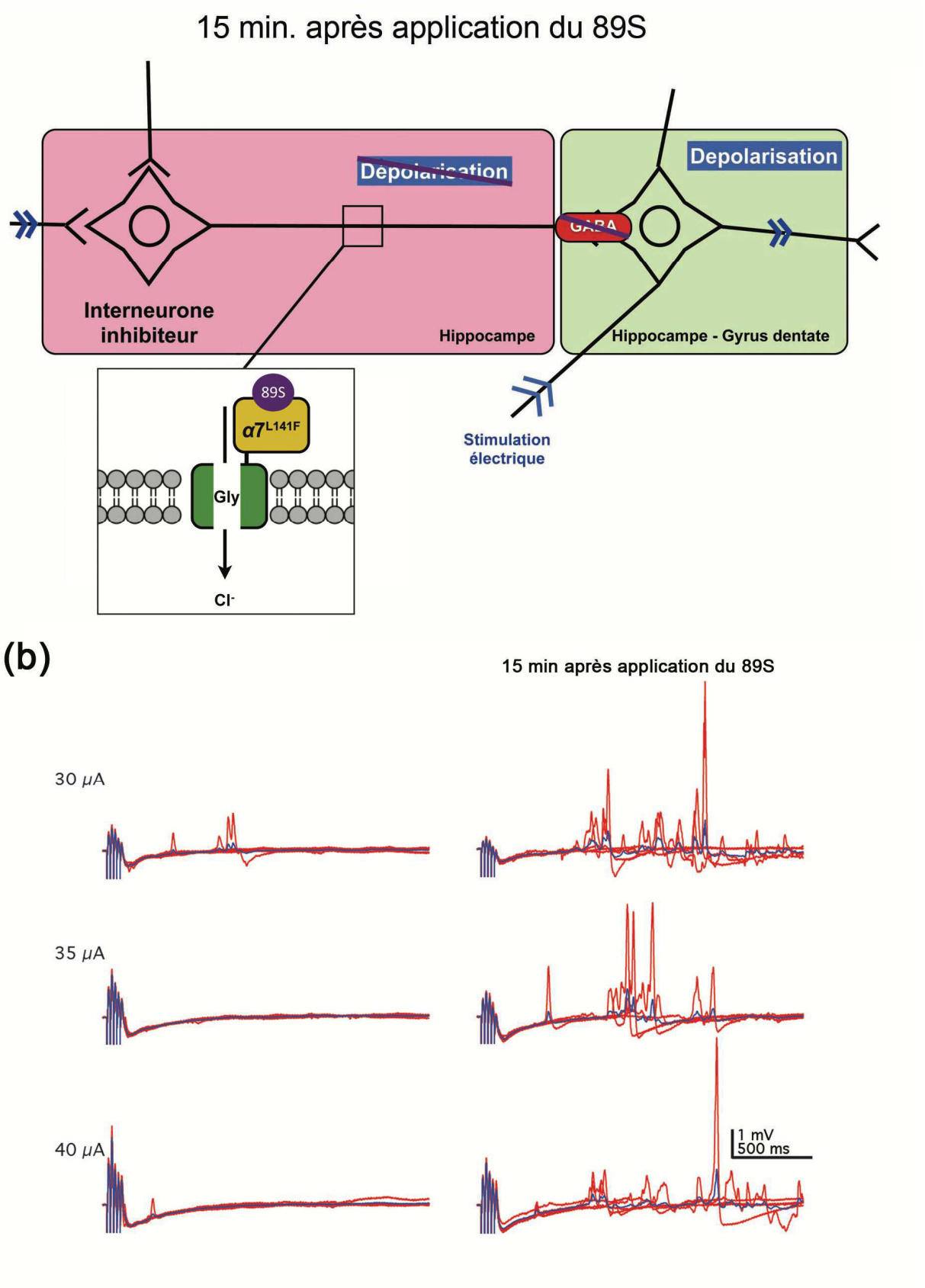


Figure 83. *Test in vivo du 89S. (a) Schéma décrivant le principe de l'expérience. (b) Enregistrement de l'activité du gyrus dentate, d'une souris transgénique possédant le canal chimérique sur ses interneurones inhibiteurs.*

CONCLUSION

Cette thèse avait pour objectif d'explorer la nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation à deux photons, avec pour finalité la mise au point de nouveaux outils pour les neurosciences. Ces travaux ont nécessité l'association de plusieurs savoir-faire, à commencer par la synthèse organique pour l'obtention de nouvelles molécules, la photophysique qui a permis de juger de la qualité des nouveaux composés, la chemoinformatique qui a dirigé notre choix de synthèse pour les dérivés de quinuclidine et la biologie qui nous a informés sur la pertinence de ces mêmes dérivés.

Nous avons débuté la nanostructuration par la synthèse de composés de petite taille basés sur le PENB. Ces deux premiers composés, le DPENB et le *pseudo*-TPENB, ont mis en évidence un problème de rapprochement des sous-unités PENB par π-π stacking. Réussir à éloigner les différents PENB constituera le défi majeur pour ce type de composé. Nous avons ensuite utilisé le dendrimère PAMAM comme plateforme centrale. Malheureusement les interactions de type π-π stacking étaient toujours présentes, et un phénomène d'agrégation, certainement dû à la structure amphiphile des composés est apparu. Le NPG1-mpa$_{7.5}$ a tout de même permis d'obtenir un rendement de libération de la substance d'intérêt supérieur à 100%, ce qui laisse entrevoir un saut de concentration photoinduit d'un effecteur biologique plus important en utilisant des générations supérieures de PAMAM.
Suite à ces résultats la synthèse de composés hydrides a débuté mais n'est pour l'instant pas terminée. Il sera très intéressant de voir si la mise en place d'un nombre inférieur de GPP ainsi que l'ajout des groupements hydrophiles, comme l'acide sulfoacétique, permettra d'obtenir une molécule qui ne s'agrège pas dans les solvants aqueux et qui possèdera de bonnes caractéristiques photochimiques. Les dérivés hybrides fonctionnalisés avec les triéthylènes glycols sont également à l'étude et sont très prometteurs, notamment en terme de solubilité.
La synthèse des composés hybrides a également permis de mettre en lumière un phénomène qui n'est pas décrit dans la littérature, une réaction « coopérative ». Nous avons effectué une série de synthèses qui a montré l'existence de ce phénomène et également différentes conditions qui vont moduler la distribution du taux de greffage des dendrimères. Ce phénomène soulève de nombreuses questions quant à son fonctionnement même si l'expérience avec le biphényle tend à montrer que des interactions aromatiques sont impliquées. De nombreuses variations devront être expérimentées, comme différents solvants, d'autres composés hydrophobes ou des générations de PAMAM supérieures et devraient permettre un bon contrôle de la fonctionnalisation des PAMAM.

L'ensemble des informations obtenues sur la dendrimérisation de GPP constitue les premières données d'un domaine peu exploré à l'heure actuelle. Nous avons ainsi établi les bases des synthèses de GPP basés sur des dendrimères, nul doute que ces informations seront précieuses pour quiconque souhaite expérimenter ces molécules. Une des perspectives les plus excitantes est celle de tenter d'adapter la nanostructuration à d'autres familles de GPP comme les coumarines ou les quinoléines. Il serait très intéressant d'observer l'évolution des propriétés de tels composés. Des molécules comme les thioxanthones, utilisées comme antennes pour les GPP[109–111], pourraient également être placées sur les dendrimères avec des GPP. Sa structure hydrophobe n'empêcherait pas le π-stacking, mais ce composé fournirait un environnement énergétiquement favorable pour provoquer une réaction photochimique, en espérant qu'elle mène à la photolyse. Nous espérons que cette thèse inspirera d'autres laboratoires pour la construction de ces nanostructures photosensibles.

Nous avons également utilisé la chemoinformatique pour diriger notre choix lors de la synthèse des dérivés de quinuclidine. Les tests biologiques sont en cours afin de savoir si l'un

des trois « hit » obtenus par modélisation est utilisable. Si c'est le cas, il faudra ensuite déterminer les conditions de couplage qui permettront de « cager » ce composé. Cet outil est très attendu par les neurophysiologistes afin d'obtenir un contrôle spatio-temporel du « silencing » de neurones avec ce système, ce qui ouvrirait la voie à un nouveau degré de résolution dans la cartographie cérébrale.

Le développement d'outils toujours plus précis et efficaces pourrait apporter de nouvelles perspectives pour l'étude de l'organe extrêmement complexe qu'est le cerveau.

PARTIE EXPERIMENTALE

VI.1. Matériels et appareillages

Solvants et réactifs
Les réactifs utilisés pour les synthèses ainsi que les solvants anhydres ont été commandés chez Sigma-Aldrich. Tous les produits et réactifs commerciaux ont été utilisés sans traitement préalable, excepté pour les différentes générations de PAMAM qui sont commercialisées en solution dans le MeOH. Ce solvant a été évaporé avant utilisation.

Chromatographies
Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur plaque d'aluminium recouverte de gel de silice 60 F254 Merck.
Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 (230-400 mesh, 0,040-0,063 mm) Merck.
Les chromatographies FLASH ont été effectuées avec un Combi flash Rf (Teledyne isco), sur des colonnes silices Simply connect BP-SUP (20 – 40 μm) en 40 g, 12 g, et 4 g ou des colonnes silices RediSep Rf Gold (HP silica) en 24 g et 4 g. Pour les colonnes C18 nous avons utilisés des Biotages SNAP Cartridge KP-C18-HS en 30 g et 12g.

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses HPLC ont été réalisées sur une chaîne de chromatographie haute performance Waters® (pompes doubles corps Waters 600 avec détecteur à barrette diode Dionex UVD340V ou pompe Waters 1525 avec détecteur Waters 2996). équipée de colonne analytique Phenomenex C18 PolarRP 4 micron (4.6, 250 mm), Thermo Betabasic 5 micron (4.6, 250 mm), Agilent Zorbax SB-C18 5 microns (4.6, 250 mm) ou Kromasil 100-5C18 (4.6, 250 mm). Les analyses sont effectuées sur un gradient partant de 100% d'H_2O MQ acidifiée avec 0.01% de TFA et montant à 100% d'acétonitrile en 30 min. Ce gradient peut être ajusté pour améliorer la séparation des différents pics.
Les purifications par HPLC ont été réalisées sur une chaîne de chromatographie haute performance Waters® (pompes doubles corps Waters 600, détecteur à barrette diode Waters 2296) équipée d'une colonne semi-préparative Phenomenex C18 PolarRP 10 micron (10, 250 mm), Thermo Betabasic 5 micron (10, 250 mm), ou Kromasil 100-5C18 (10, 250 mm).. Les purifications ont été effectuées sur un gradient similaire à celui utilisé pour l'HPLC analytique, ou bien avec une élution isocratique.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^{1}H, ^{13}C et DOSY ont été relevés sur des spectromètres RMN 300, 400 et 500 Mhz Brucker® 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 ($CHCl_3$: 7.26 ppm ; MeOH : 3.31 ppm ; CH_3CN : 1.94 ppm ; acétone : 2.05 ppm ; DMSO : 2.50 ppm en ^{1}H et $CDCl_3$: 77.16 ppm ; MeOH : 49.00 ppm ; CH_3CN : 1.31 et 118.26 ppm ; acétone : 29.84 et 206.26 ppm ; DMSO : 39.52 ppm en ^{13}C). Les abréviation s, d, t, q, m, dd, … correspondent respectivement à singulet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, doublet dédoublé,…et bs pour « broad signal ».

Spectrométrie de masse
Illkirch

Les spectres de masse LCMS ont été réalisé sur un spectromètre Agilent 1200 SL/QTof 6520 couplé à une colonne Hypersil Gold C18 de 1.9 µm de taille de particules et de 1x30 mm de dimension et les spectres ESI sur un spectromètre Agilent 1200 SL.
Esplanade
Les spectres de masse ESI ont été réalisé sur un MicroTOF (Bruker®) équipé d'une source électrospay et les MALDI sur un spectromètre AutoFlex II TOF/TOF (Bruker®) avec différentes matrices (acide caféique, acide 2,5-dihydroxybenzoique (DHB), super-DHB (mélange d'acide 2-hydroxy-5-methoxybenzoique et d'acide 2,5-dihydroxybenzoique) et dithranol.

Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption UV-visible ont été mesurés sur un spectrophotomètre double faisceau UVIKON XS.

Micro-onde

Les réactions pallodo-catalysées ont été réalisées en utilisant un micro-onde Anton Paar Monowave 300. Les réacteurs ont toujours été dégazés à l'argon avant ajout du palladium.

Dialyses

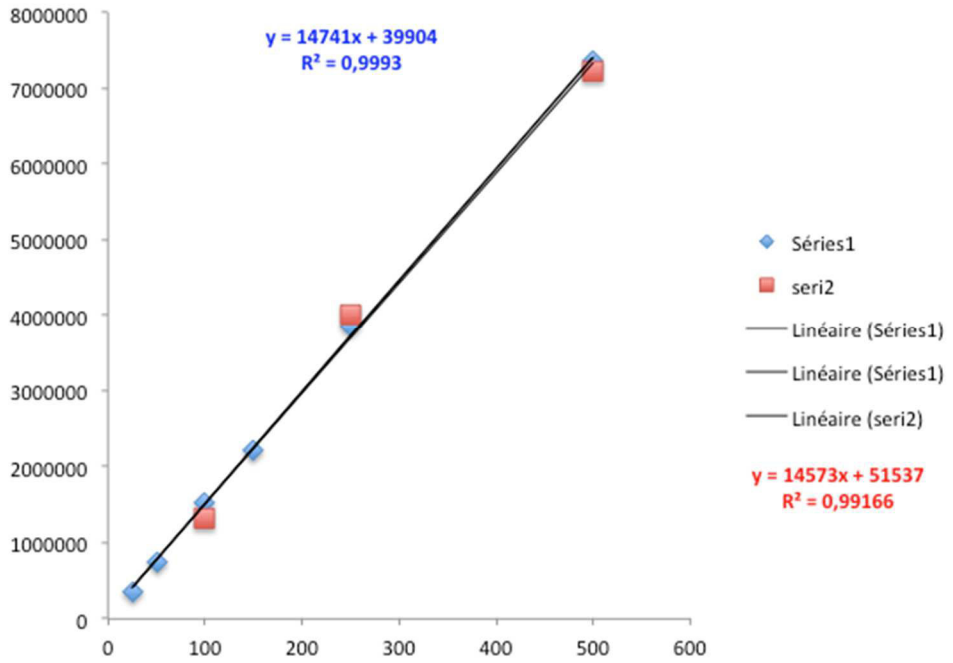
Les dialyse ont été effectuées sur des membrane Spectra/Por® 7 pré-traitées en cellulose régénéré possédant un « cut-off » de 1k Da ou 3.5 kDa. Avant utilisation les membranes sont lavées 15 minutes dans l'eau pure puis la solution à dialyser est ajoutée dans le boudin de dialyse. Le boudin de dialyse est ensuite immergé de 1 à 48h selon les besoins dans un bain d'eau pure, de méthanol ou un mélange 1/1 d'acétonitrile et d'eau dans une chambre froide à 4 °C. Le bain peut en fonction du produit à dialyser être renouvelé au cours de la manipulation.

Tampons PBS

Le tampon PBS utilisé se prépare à partir d'un mélange de 90g de NaCl, 2g de KCl, 7.5g de Na_2HPO_4 et 2g de KH_2PO_4 ; l'ensemble est solubilisé dans un litre d'eau pour obtenir une solution dix fois concentrée. 100 mL de cette solution-mère sont dilués dans un litre d'eau pure, pour obtenir le PBS 1x, son pH est ensuite ajusté à 7,4 avec du Na_2HPO_4.

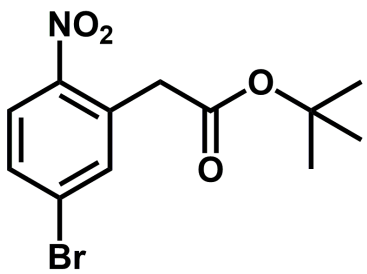
Dosage du mpa

Pour quantifier le mpa relargué dans l'échantillon irradié, il faut tout d'abord établir une courbe étalon par l'HPLC qui sera utilisée pour les mesures. Les concentrations de mpa choisies pour tracer la courbe étalon devront se trouver dans la fenêtre de relargage du produit. Les concentrations (x) seront mises en relation avec les aires sous la courbe (y) du pic du mpa dans le chromatogramme HPLC. Différentes concentrations seront injectées, deux fois chacune minimum, cela permettra d'établir par régression linéaire une droite qui devra posséder un $R^2 > 0.98$. L'équation de la droite permettra par la suite d'établir la concentration de mpa présente dans l'échantillon grâce à son aire mesurée sur le chromatogramme HPLC. Il est important que la zone d'intégration du mpa ne soit pas polluée par des impuretés. (Ci-dessous un exemple de courbe étalon)



VI.2. Synthèses

***tert*-Butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)acetate (1)**



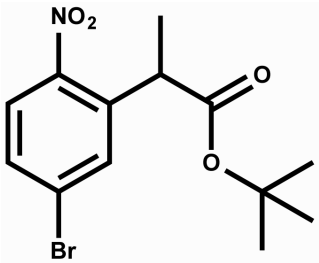
To a stirred solution of *tert*-BuOK (17.4 g, 155 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) was added through a cannula a solution of 4-bromonitrobenzene (5.00 g, 24.75 mmol) and *tert*-butyl chloroacetate (5.47 mL, 38.5 mmol) in DMF (50 mL). The reaction was carried out for 2 hours under argon at room temperature. 5 % HCl (50 mL) was poured into the mixture at 0°C. The mixture was then extracted with AcOEt, dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum to afford a brown oil/solid (8.34 g, 99 %).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.99 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.60 (dd, J=1.0, 8.8 Hz, 1H), 7.51 (d, J=1.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 2H), 1.45 (s, 9H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 168.4, 136.1, 132.3, 131.4, 128.14, 126.6, 82.2, 40.7, 27.9

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{12}H_{14}BrNO_4Na]^+$ 337.9998 found 337.9997.

(+/-)-*tert*-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propanoate.



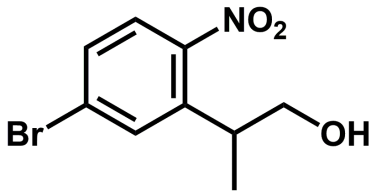
tert-butyl-2-(5-bromo-2-nitrophenyl)acetate (7.74 g, 24.5 mmol) and sodium hydride (60 % in oil, 1.00 g, 24.5 mmol) were dissolved in 80 mL of DMF. Methyl iodide (3.0 mL, 48.9 mmol) was then added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at room temperature under argon for 24 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The extract was dried over Na_2SO_4 and the combined extracts were evaporated. The crude product was purified by column chromatography (silica, heptane/EtOAc: 9/1 to 8/2 in vol. as eluent) to afford a yellowish solid (6.7 g, 83 %).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.83 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.63 (d, J=2.3 Hz, 1H), 7.55 (dd, J=2.3, 8.8 Hz, 1H), 4.22 (q, J=7.1 Hz, 1H), 1.58 (d, J=7.1 Hz, 4H), 1.41 (s, 9H)

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 171.6, 147.9, 137.7, 132.8, 130.9, 127.9, 126.3, 81.8, 27.8, 17.4.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{13}H_{16}BrNO_4Na]^+$ 352.0160 found 352.01465.

(+/-)-*tert*-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propan-1-ol (2).



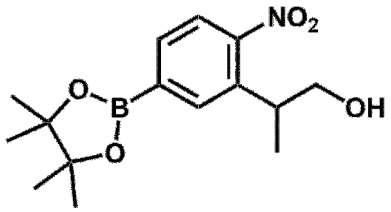
tert-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propanoate (2.0 g, 6.1 mmol) was dissolved in THF (20 mL) and stirred at 0°C. DIBAL-H 1.0 M in THF (18.2 mL, 18 mmol) was slowly added to the solution and the mixture was stirred 30 min. at the same temperature. The solution was keep to 0°C and HCl 3 M (10 mL) was added dropwise. The crude solution was extract with EtOAc and purified by FLASH chromatography (silica gel heptane/EtOAc, 8/2 in vol.) to obtain a dark oil (1.1 g, 67 %).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz), 3.78 (m, 2H), 3.53 (m, 1H), 1.31 (d, J = 7 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 149.4 140.5, 131.6, 130.4, 127.5, 125 .7, 67.6, 36.4, 17.4.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_9H_{10}BrNO_3Na]^+$ 281.9742 found 281.9724.

(+/-)-2-(2-Nitro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)propan-1-ol (3).



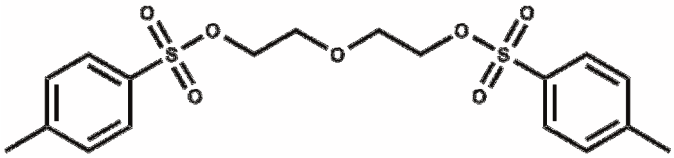
A mixture of *tert*-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propan-1-ol (800 mg, 3.08 mmol), bis(pinacolato)diboron (859 mg, 3.38 mmol), KOAc (368 mg, 3.75 mmol) and Pd(dppf)Cl_2 (169 mg, 0.23 mmol) in DMSO (40 mL) was heated to 85 °C overnight. The reaction mixture was poored into 50 mL ice-water slush and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL) and dried over $MgSO_4$. After evaporation of the solvent, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel using gradient elution of Heptane / EtOAc: 9/1 to 8/2 in vol. to give 500 mg of **3** as black red oil (53%).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.85 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.80 (m, 2H), 3.41 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 1.31-1.34 (m, 15 H).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl3): δ (ppm) = 162.6, 136.8, 134.4, 133.7, 133.6, 122.9, 84.5, 67.9, 36.5, 24.9, 17.6.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{15}H_{22}BNO_5Na]^+$ 330.1489 found 329.1522.

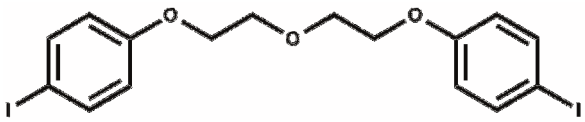
Oxybis(ethane-2,1-diyl)bis(4-methylbenzenesulfonate) (4)



A mixture of triethylene glycol (10.0 g, 94.2 mmol), tosyl chloride (44.9 g, 235.6 mmol), triehtylamine (32.7 mL, 235.6 mmol) in acetonitrile (100 mL) was stirred at r.t. overnight. Saturated $NaHCO_3$ (50 mL) was added, the mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), the organic phase was combined and washed with brine. After evaporation, a white solid was obtained (34.2 g, 87.6% yield).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 4.06 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.58 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 2.42 (s, 6H).

4,4'-((Oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(iodobenzene) (5)

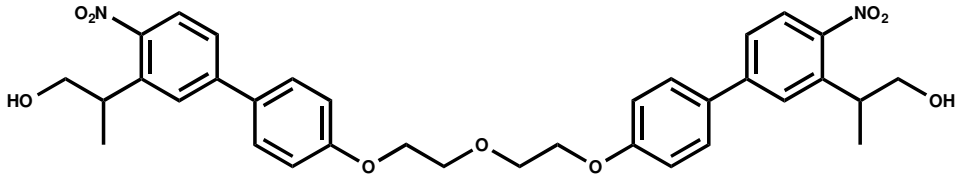


A mixture of iodophenol (5.00 g, 22.7 mmol) and K_2CO_3 (3.2 g, 23.7 mmol) in MeCN (24 mL) was stirred for 30 min. at 90 °C, followed by addition of **4** (4.5 g, 10.9 mmol) in MeCN (36 mL). The mixture was stirred for another 24 h at 90 °C, before being cooled to r.t. The precipitate was dissolved in a water and extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The extract was dried over Na_2SO_4 and the combined extracts were evaporated. We obtained the dersired product as a white powder (3.62 g, 65%).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.52 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 6.67 (d, J=8.9 Hz, 4H), 4.09 (t, J=4.8 Hz), 3.88(t, J =4.8 Hz, 4 H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{16}H_{16}I_2O_3Na]^+$ 532.9087 found 532.9078.

DPENB (6)



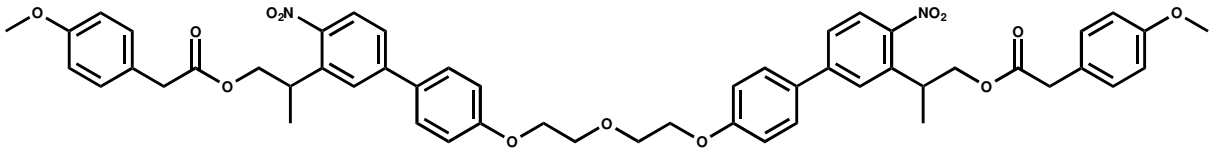
A mixture of **3** (500 mg, 1.63 mmol), **5** (332 mg, 0.65 mmol), K_2CO_3 (270 mg, 1.95 mmol), tetrabutylammonium bromide (840 mg, 2.60 mmol) and $Pd(OAc)_2$ (catalytic, 6% mol.) in EtOH (10 mL) and water (5 mL) was heated under microwave conditions at 160 °C for 30 min. Water (100 mL) was added and organics were extracted with EtOAc (200 mL). The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude product was purified by column chromatography on silica with 3/7 Heptane/EtOAc in vol. as eluant, to obtain a yellow oil (100 mg, 25%).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 7.5 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.46 (m, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 2 H), 7.0(d, J = 8.4 Hz, 4H), 4.21 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 3.96 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 3.8 (d, J = 6.5 Hz, 4H), 3.62 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.34 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

RMN DEPT135 ^{13}C (100MHz, CDCl3): δ (ppm) = 128.5, 126.2, 125.2, 125.0, 115.2, 70.0, 67.9, 67.6, 36.4, 17.6.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{34}H_{36}N_2O_9Na]^+$ 639.2319 found 639.2323.

DPENB-mpa$_2$ (7)

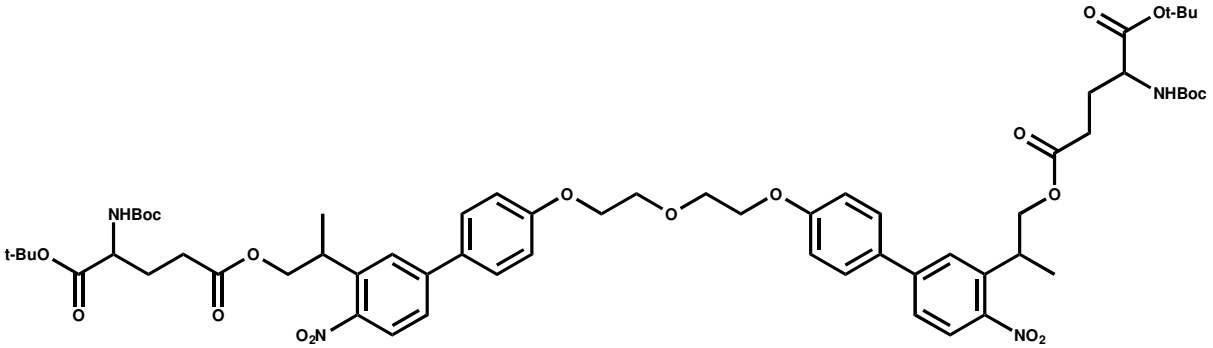


4-Methoxyphenylacetic acid (6 mg, 36 □mol) and **6** (9 mg, 15 □mol) was dissolved in dry DCM (5 mL) and cooled to 0 °C. Next, DCC (9 mg, 44 □mol) and DMAP (cat. 1% mol.) were added to the mixture and stirred overnight. Solvent was removed *in vacuo* and the mixture was purified by flash chromatography (silica gel, 1/1, Heptane/Ethyl acetate) to obtain an orange oil (5.8 mg, 43.5%).

RMN ^{1}H (400MHz, CDCl$_3$): δ (ppm) = 7.82 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.46 (m, 8H), 7.01 (m, 8H), 6.71 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 4.27(m, 4H), 4.22 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.98 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.83 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.44 (s, 3H), 1.32 (d, 6.7 Hz, 6H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{52}H_{52}N_2O_{13}Na]^+$ 935.3367 found 935.3373.

DPENB-GluBoc$_2$ (8).



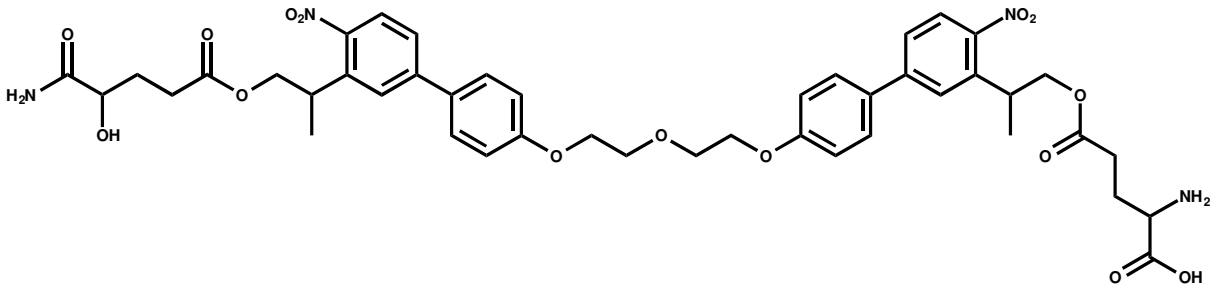
Boc-D-glutamic acid 5-*tert*-butyl ester (132.8 mg, 0.43 mmol) and **6** (108 mg, 0.17 □mol) were dissolved in dry DCM (5 mL) and cool to 0 °C. Next, DCC (90.3 mg, 0.43 □mol) and DMAP (cat. 1% mol.) were added to the mixture and stirred overnight (15h) at room temperature. Solvent was removed *in vacuo* and the mixture was purified by flash chromatography (silica gel, 6/4, Heptane/Ethyl acetate) to obtain a colored oil (200.0 mg, 96.2%).

RMN ^{1}H (500MHz, CDCl$_3$): δ (ppm) = 7.83 (dd, J = 2.0, 8.5 Hz, 2H), 7.54 (bs, 2H), 7.52 – 7.46 (m, *J*=2.0, 8.9 Hz, 6H), 7.02 (d, *J*= 8.8 Hz, 4H), 4.27(m, 4H), 4.22 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 4.17 – 4.08 (bs, 2H), 3.98 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.82 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.40 – 2.23 (m, 4H), 2.10 – 2.00 (bs, 2H), 1.86 – 1.75 (m, 2H), 1.46 – 1.34 (m, 42H).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl3): δ (ppm) = 172.9, 172.6, 159.5, 158.8, 148.7, 145.5, 138.1, 131.7, 128.5, 126.1, 125.5, 125.1, 115.2, 82.20, 79.85, 70.0, 68.6, 67.6, 53.3, 35.4, 33.1, 30.2, 28.3, 27.9, 17.9.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{62}H_{82}BN_4O_{19}Na]^+$ 1209.54 found 1209.54.

DPENB-Glu$_2$

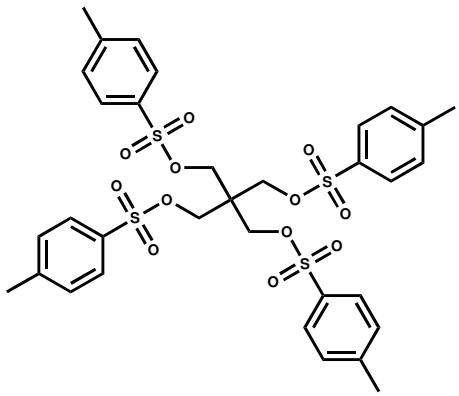


DPENB-GluBoc$_2$ (100 mg, 0.08 mmol) was dissolved in a mix of DCM and TFA (2/1; 7.5 mL) and stirred overnight under argon at room temperature. Solvents were removed *in vacuo* and the crude product was washed several times with DCM to obtain an orange oil (73.0 mg, 99%).

RMN ^{1}H (500MHz, MeOD-d4): δ (ppm) = 7.84 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.75 (d, *J*= 1.6 Hz, 2H), 7.63 (d, *J*=8.6 Hz, 4H), 7.62 (dd, *J*=1.5, 8.4 Hz, 2H), 7.08 (d, *J*= 8.6 Hz, 4H), 4.44 – 4.28 (m, 4H), 4.23 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.99 – 3.92 (m, 6H), 3.98 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.76 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.51 (td, *J*=2.5, 7.8 Hz, 2H), 2.50 (td, *J*=2.4, 7.6 Hz, 2H), 2.20 – 2.11 (m, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 2H), 1.41 (d, *J*=7.0 Hz, 6H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{44}H_{52}N_4O_{15}]^{2+}$ 876.34 found 876.34.

2,2-Bis((tosyloxy)methyl)propane-1,3-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate) (8)



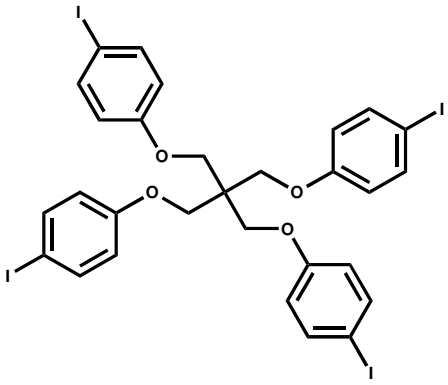
A mixture of pentaerytrithol (5.0 g, 36.73 mmol), tosyl chloride (42.0 g, 220.4 mmol), triethylamine (30.6 mL, 220.4 mmol) in acetonitrile (50 mL) was stirred at r.t. 48h. Saturated $NaHCO_3$ was added and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 200 mL). The organic phase were combined and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel, heptane/EtOAc, 50% to 100%) to yield a yellowish powder (7.0 g, 25.3% yield).

RMN ^{1}H (400MHz, CDCl$_3$): δ (ppm): 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 8H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 8H), 3.79 (s, 8H), 2.4 (s, 12H).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl3): δ (ppm): 145.7, 131.4, 130.2, 128.0, 65.63, 43.3, 21.7.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{33}H_{36}O_{12}S_4Na]^+$ 775.0987 found 775.0967.

4,4'-((2,2-Bis((4-iodophenoxy)methyl)propane-1,3-diyl)bis(oxy)) bis(iodobenzene) (9)

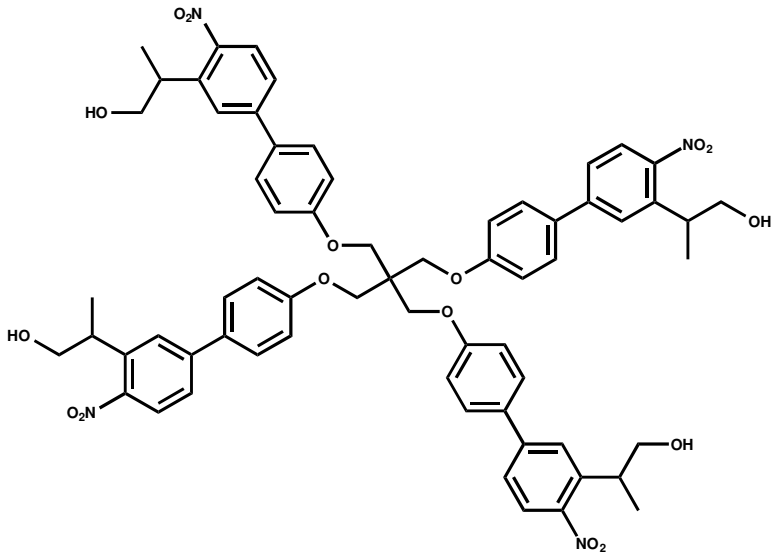


A stirred mixture of pentaerythrityl tetratosylate (1.00 g, 1,33 mmol), 4-iodophenol (1.46 g, 6.64 mmol), and NaOH (0.26 g, 6.64 mmol) in DMF (20 mL) was refluxed for 24 h. The solution was then cooled, water (100 mL) was added, and the mixture was extracted twice with diethyl ether. The organic layers were combined, washed with brine, and dried over Na_2SO_4. Removal of volatiles under reduced pressure left a residue that was purified by flash chromatography (silica gel, with heptane as eluent) to give **9** (890 mg, 0.94 mmol, 71%) as a white solid.

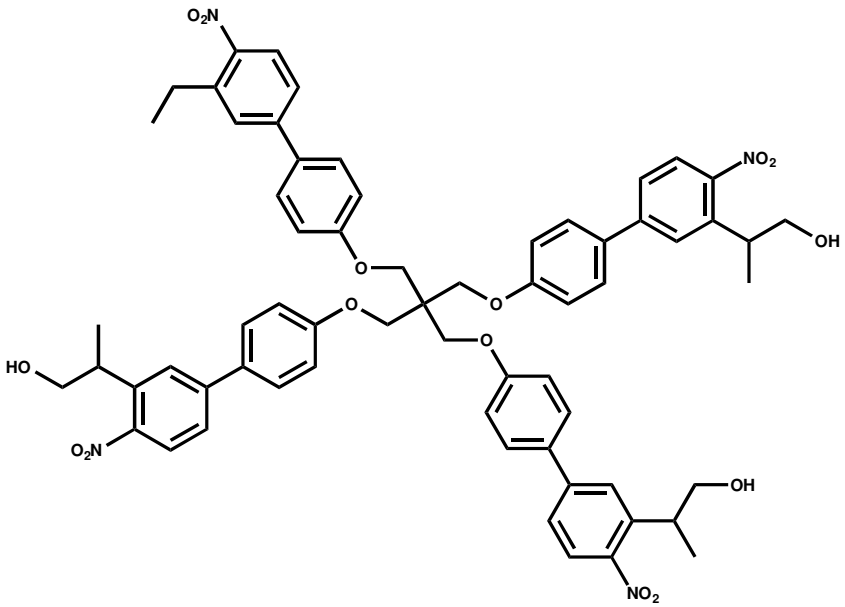
RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.51 (d, J = 9.0 Hz, 8H), 6.65 (d, J = 9.0 Hz, 8H), 4.22 (s, 8H).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 158.7, 138.5, 117.2, 83.6, 66.7, 44.9.

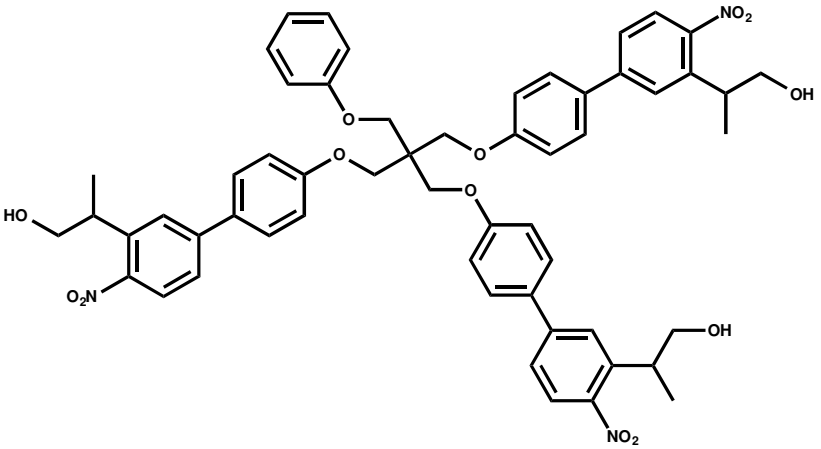
Mix of TPENB, *pseudo*-TPENB and 10b



TPENB



pseudo-TPENB



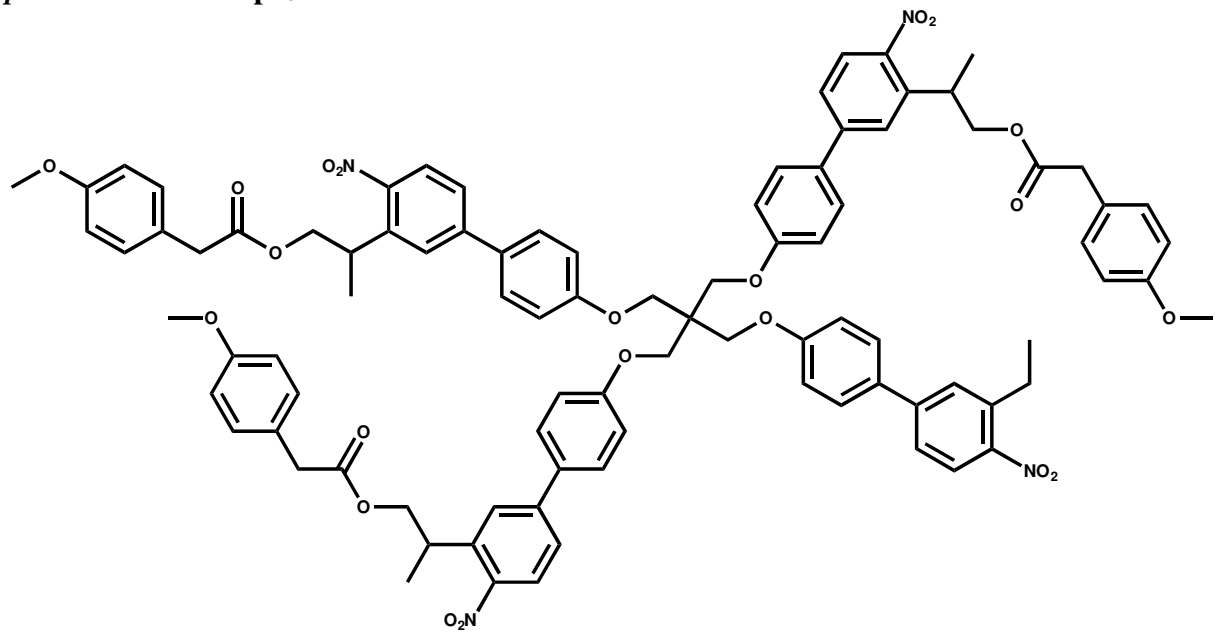
10b

A mixture of **9** (183 mg, 019 mmol), **3** (250 mg, 0.81 mmol), K_2CO_3 (160 mg, 1.16 mmol), tetrabutylammonium bromide (500 mg, 1.55 mmol) and $Pd(OAc)_2$ (cat. 0.03 mol%) in EtOH (10 mL) and water (5 mL) was heated under microwave conditions at 160 °C for 45 min. Water (100 mL) was added and organics were extracted into EtOAc (200 mL). the organic phase was removed *in vacuo* and the crude extract was purified by column chromatography on silica with 3/7 Heptane/EtOAc in vol. as eluent to obtain a brown oil (30.00 mg, 13%).

HRMS (ESI) (m/z)

TPENB:	calcd. for $[C_{65}H_{65}N_4O_{16}]^+$ 1157.4390 found 1157.4372.
***pseudo*-TPENB**:	calcd. for $[C_{64}H_{62}N_4O_{15}Na]^+$1149.4104 found 1149.4078.
10b:	calcd. for $[C_{56}H_{56}N_3O_{13}]^+$ 978.3808 found 978.3797.

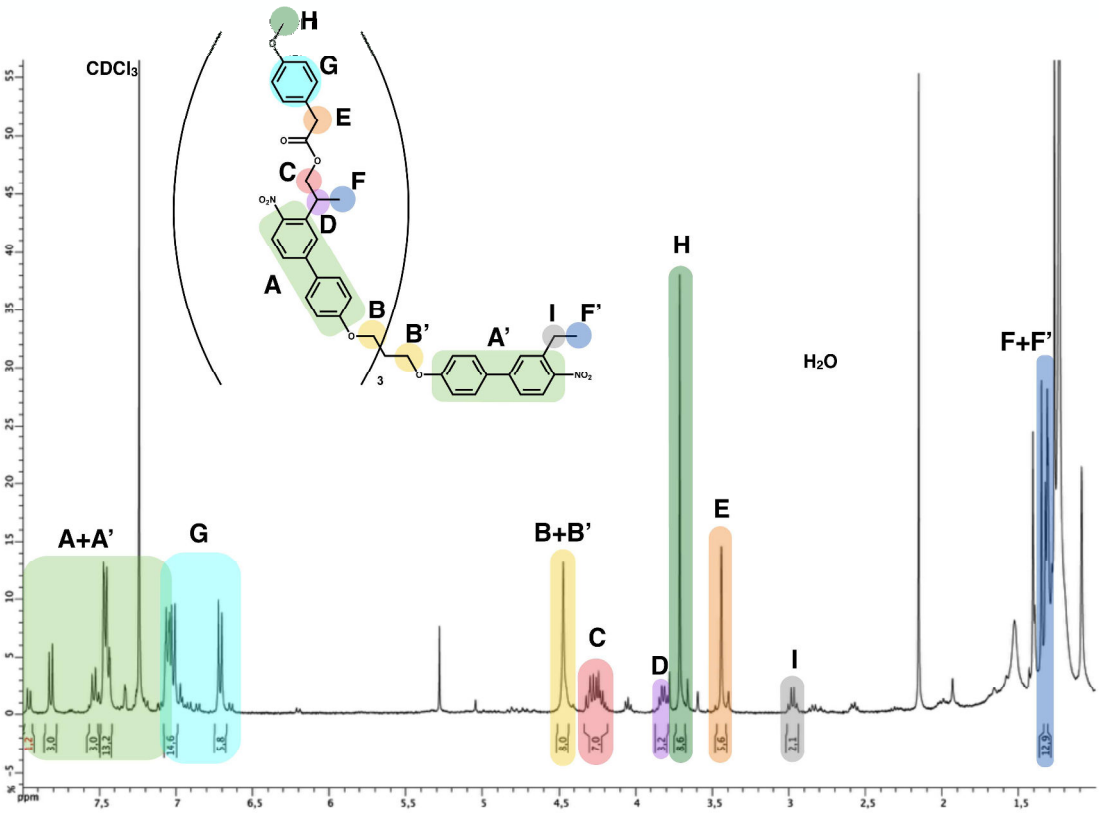
***pseudo*-TPENB-mpa3.**



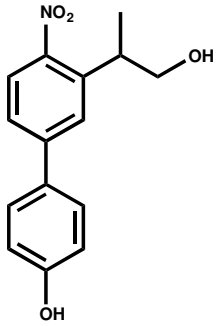
4-Methoxyphenylacetic acid (21.5 mg, 129 □mol) and a mix of **TPENB**, ***pseudo-TPENB and 10b*** (30 mg, 32.4 □mol) were dissolved in dry DCM (5 mL) and cooled to 0 °C. Next, DCC (25 mg, 120 □mol) and DMAP (cat. 1% mol) were added to the mixture and stirred overnight. The mixture was purified by flash chromatography (silica gel, 7/3, Heptane/Ethyl acetate) to obtain ***pseudo*-TPENB-mpa3** (4.6 mg, 10%).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 7.46 (m, 14H), 7.04 (m, 14H), 6.71 (d, J = 8.9 Hz, 6H), 4.47 (s, 8H), 4.26 (m, 6H), 3.82 (m, 3H), 3.71 (s, 9H), 3.44 (s, 6H), 2.97 (q, 2H), 1.32-1.30 (m, 12H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{91}H_{86}N_4O_{21}Na]^+$ 1593.5677 found 1594.5666.


CDCl3
H
G
E
C
F
D
A
B
B'
A'
I
F'
H
H2O
F+F'
A+A'
G
B+B'
C
D
E
I
ppm

3'-(1-hydroxypropan-2-yl)-4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-ol (13)



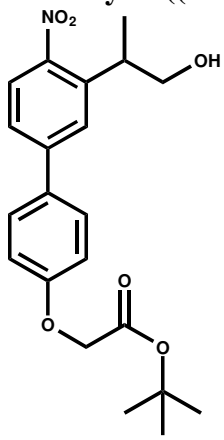
2 (950 mg, 3.65 mmol), 4-hydroxyphenylboronic acid (755 mg, 5.47 mmol), and tetrabutylammonium bromide (1,17 g, 3.65 mmol) were dissolved in 5 mL of water and 10 mL of ethanol. The mixture was introduced in a microwave reactor and degased applying vacuum for 5 min. Next, the bis(acetato)palladium (24 mg, 0.1 mmol) was added in the mixture and the microwave reactor was sealed and heated to 170 °C for 10 min. Solvents were removed *in vacuo*, the crude was dissolved in water and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The mixture was purified by Flash chromatography (silica gel, 8/2 Heptane / ethyl acetate as eluent) to obtain **13** (950 mg, 95%).

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 7.84 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.73 - 7.70 (m, 1H), 7.59 (dd, *J*=2.1, 8.4 Hz, 1H), 7.56 (d, *J*=7.7 Hz, 2H), 6.92 (d, *J*=7.7 Hz, 2H), 3.85 - 3.71 (m, 2H), 3.59 - 3.50 (m, 1H), 1.39 (d, *J*=7.0 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 158.1, 149.1, 145.4, 138.85, 130.3, 128.1, 125.7, 124.4, 124.3, 115.5, 66.4, 36.5, 16.7.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{15}H_{15}N_1O_4Na]^+$ 296.08 found 296.08.

***tert*-butyl 2-((3'-(1-hydroxypropan-2-yl)-4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)acetate (14)**



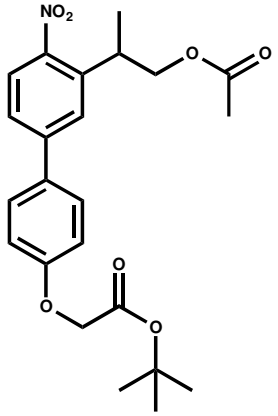
A mixture of **13** (2,5 g, 9.2 mmol) and K_2CO_3 (1.4g, 10.2 mmol) was stirred 1h in acetonitrile (200 mL). *Tert*-butyl bromoacetate (1.41 mL, 9.7 mmol) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed *under vacuum* and the crude product was dissolved in water and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The organic phase was removed *under vacuum* and dried over $MgSO_4$. The mixture was purified by flash chromatography (silica gel, 7/3 Heptane/ethyl acetate as eluent) to obtained **14** (3.4 g, 95%).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.83 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.59 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, 1H), 6.98 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.88 - 3.78 (m, 2H), 3.68 - 3.60 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.36 (d, *J*=7.0 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 168.0, 158.7, 149.4, 145.5, 139.3, 132.5, 128.8, 126.6, 125.5, 125.2, 115.393, 82.8, 68.2, 65.9, 36.6, 28.3, 17.9.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{21}H_{25}NO_6Na]^+$ 410.15 found 410.15.

***tert*-butyl 2-((3'-(1-acetoxypropan-2-yl)-4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)acetate (15)**



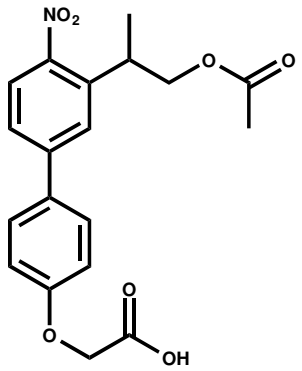
14 (1.59 g, 4.0 mmol), acetic anhydride (833.6 mg, 8.1 mmol) and DMAP (548.7 mg, 576.9 mmol) were dissolved in DCM (30 mL) and stirred overnight at rt. DCM was removed *under vacuum* and the crude was purified by chromatography (silica gel, 9/1 Heptane/Ethyl acetate). A yellow solid (**15**) was obtained (1.71 g, 97%).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.84 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.55 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, 1H), 6.98 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.30 – 4.18 (m, 2H), 3.87 - 3.79 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.38 (d, *J*=7.0 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 1710**,** 167.9, 158.7, 148.9, 145.5, 138.3, 132.5, 128.8, 126.4, 125.7, 125.2, 115.3, 82.8, 68.2, 65.9, 33.3, 28.3, 21.0, 18.0.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{23}H_{27}NO_7Na]^+$ 452.16 found 452.16.

2-((3'-(1-acetoxypropan-2-yl)-4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)acetic acid (16)



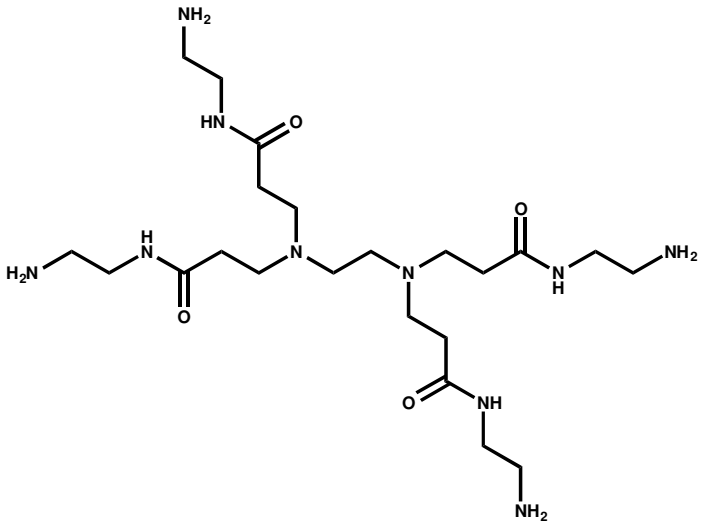
15 (1.6 g, 3.7 mmol) was dissolved in 18 mL of a DCM/TFA (2/1) mix. Solvents were removed *under vacuum* and the crude product was washed several times with DCM to obtained a brown solid **16** (1.31, 95%).

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 7.85 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.75 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.65 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, 1H), 7.07 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 4.72 (s, 2H), 4.34 – 4.26 (m, 2H), 3.78 - 3.71 (m, 1H), 1.95 (s, 3H), 1.41 (d, *J*=7.0 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 172.7**,** 172.6, 160.3, 150.5, 146.6, 139.32, 133.5, 129.7, 127.3, 126.7, 126.0, 116.4, 69.6, 66.1, 34.7, 20.8, 18.0.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{19}H_{19}NO_7Na]^+$ 396.10 found 396.10.

PAMAM-G0

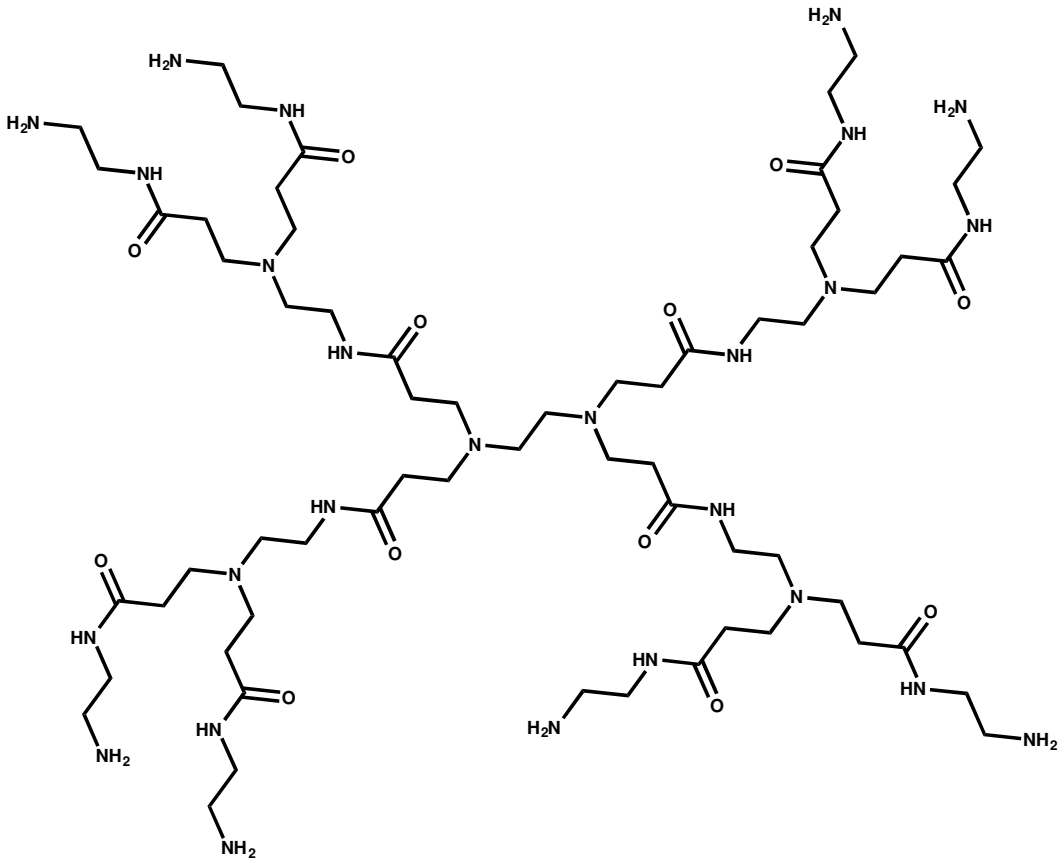


RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 3.25 (t, *J*=6.4 Hz, 8H), 2.77 (t, *J*=6.8 Hz, 8H), 2.72 (t, *J*=6.4 Hz, 8H), 2.54 (s, 4H), 2.37 (t, *J*=6.8 Hz).

From SF of ^{99} : RMN ^{13}C (75MHz, D$_2$O): δ (ppm): 174.94, 49.99, 49.12, 41.62, 39.74, 32.66.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{22}H_{48}N_{10}O_4Na]^+$ 539.37 found 539.37.

PAMAM-G1

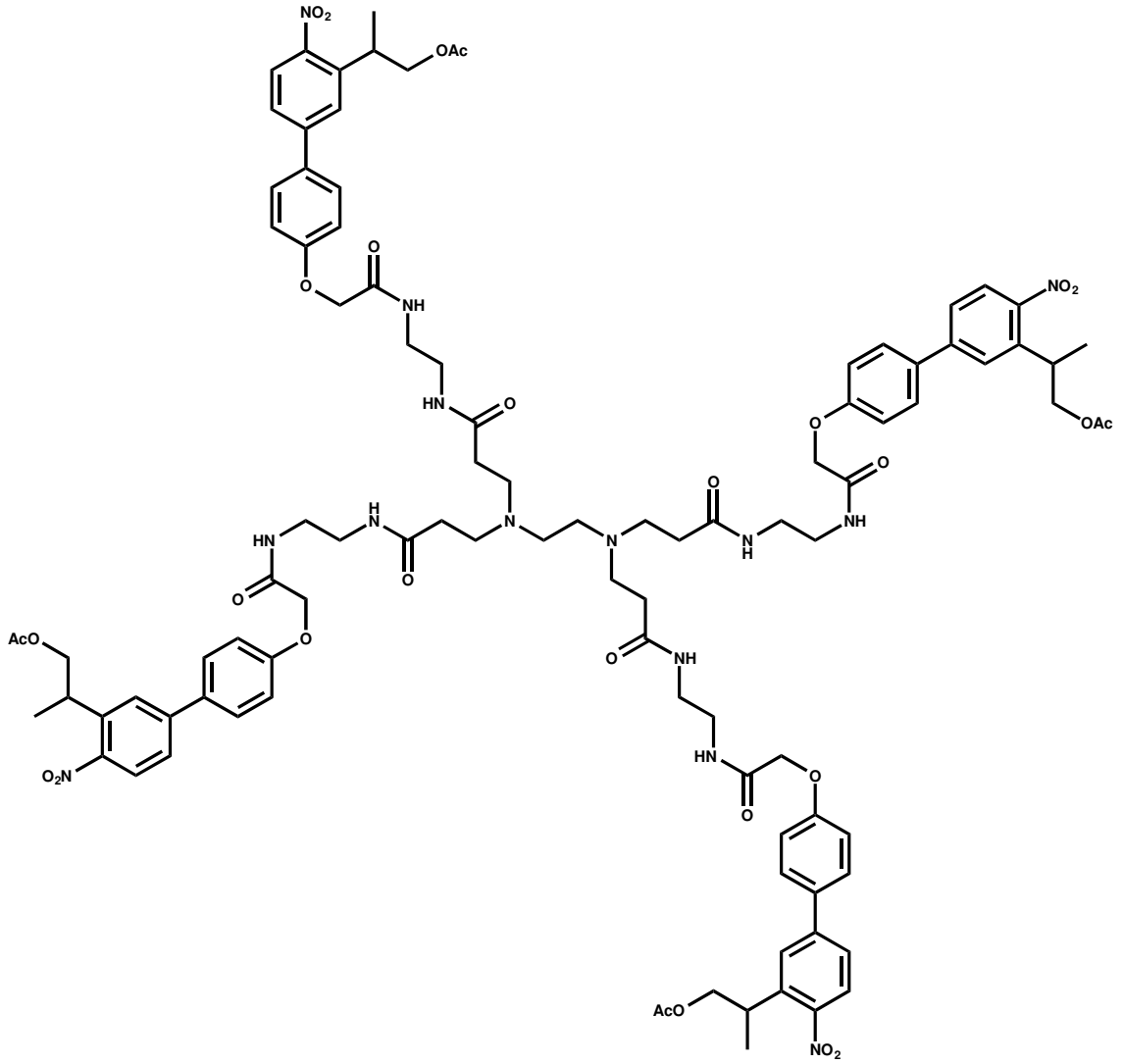


RMN ^{1}H (400MHz, DMSO-d6): δ (ppm): 3.12 – 2.98 (m, 24H), 2.70– 2.59 (m, 24H), 2.54 (t, 16H), 2.45– 2.38 (m, 12H), 2.19 (t, 24H).

RMN ^{13}C (100MHz, DMSO-d6): δ (ppm): 175.1, 174.6, 51.3, 50.1, 49.1, 48.9, 41.8, 39.8, 36.8, 32.9, 32.7.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{62}H_{133}N_{26}O_{12}]^{5+}$ 1434.05 found 1434.06.

NPG0. (17-G0)

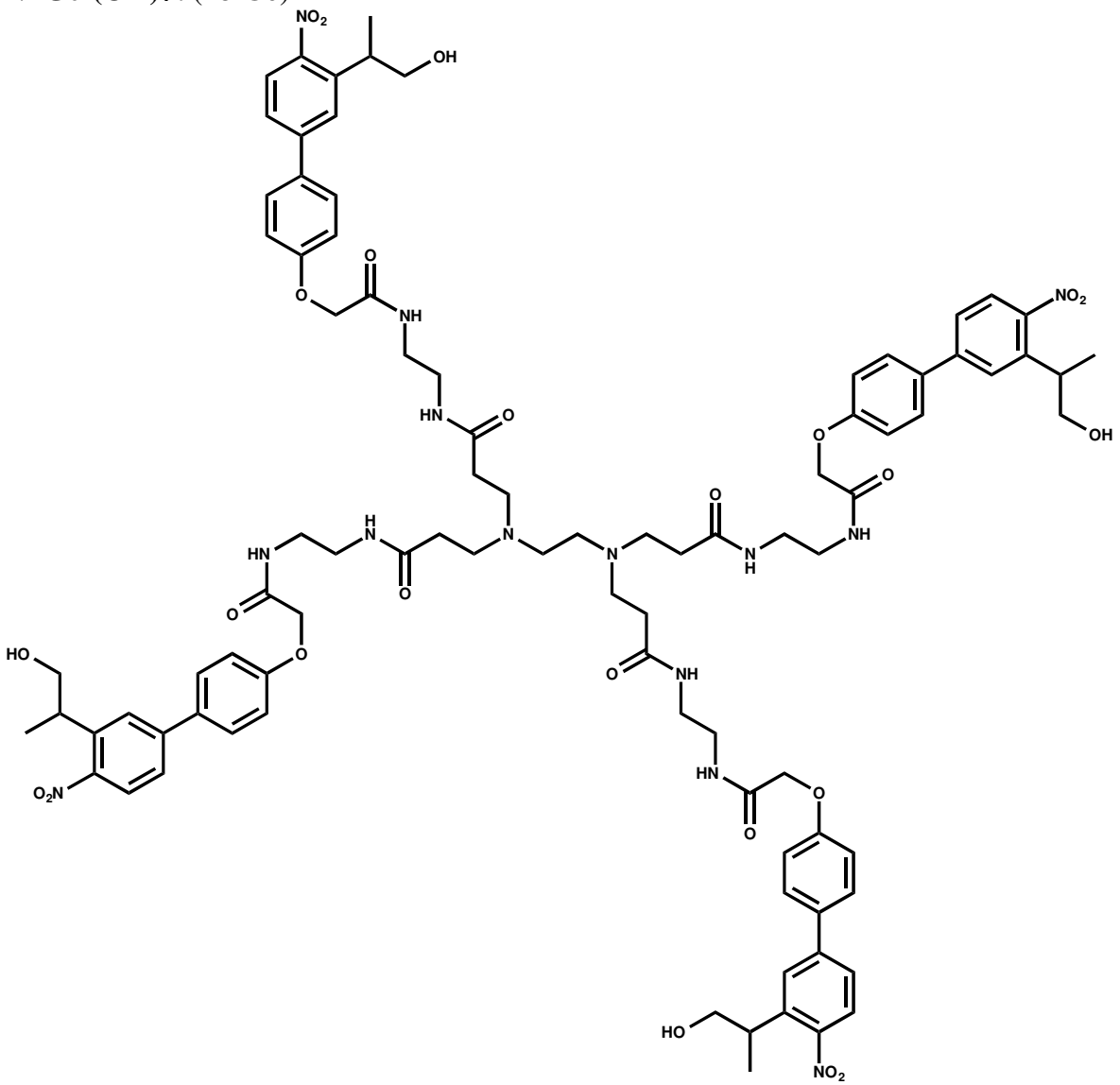


16 (200 mg, 0.53 mmol) and HOBt (144 mg, 1.07 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL). DIC (0.16 mL, 1.07 mmol) was added and the mixture was stirred for 1h. Then, PAMAM-G0 (55 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (10 mL) was added and the mixture was stirred overnight. The solvent were removed *under vacuum* and the crude was purified by flash chromatography (C18 silica gel, 45/55 to 35/65 H_20 0.1% TFA/ CH_3CN as eluent) to obtained yellowish thick oil (170 mg, 82%).

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 7.76 (d, J=8.4 Hz, 4H), 7.67 (d, *J*= 2.0 Hz, 4H), 7.57 (d, *J*=8.8 Hz, 8H), 7.51 (dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, 4H), 7.04 (d, *J*=8.8 Hz, 8H), 4.52 (s, 8H), 4.28 – 4.19 (m, 8H), 3.71 - 3.66 (m, 4H), 3.46 – 2.23 (m, 28H), 1.92 (s, 12H), 1.36 (d, *J*=7.0 Hz, 12H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{98}H_{118}N_{14}O_{28}]^{2+}$ 1938.82 found 1938.80.

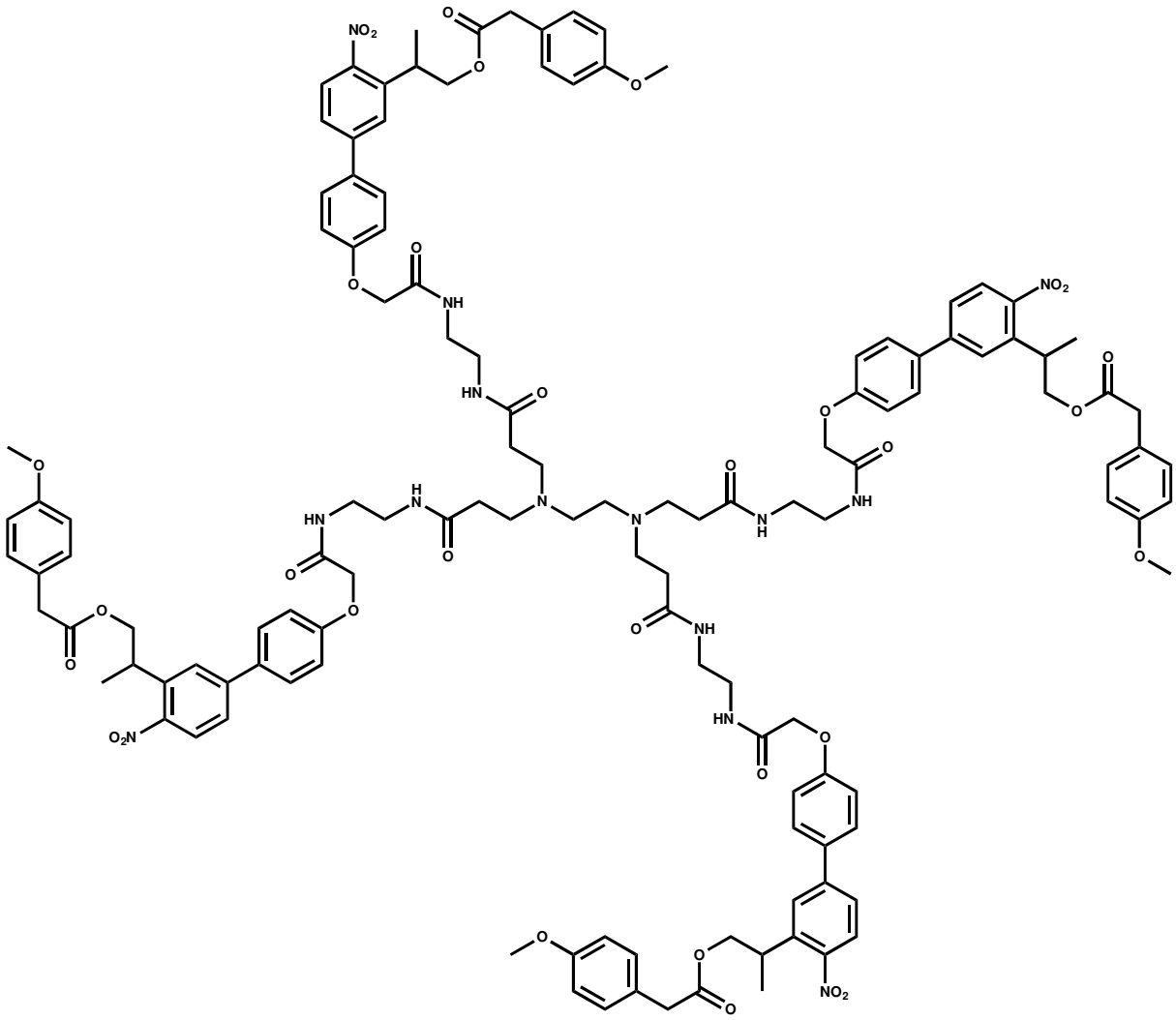
NPG0-(OH)4 . (18-G0)



NPG0 (130 mg, 0.06mmol) and K_2CO_3 (92 mg, 0.67 mmol) were dissolved in dry methanol (10 mL) and stirred 2h30 at room temperature. The solvent was removed *under vacuum* and the crude product was directly used for the next step without further purification. Quantitative reaction according to HPLC analysis.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{90}H_{110}N_{14}O_{24}]^{2+}$ 1771.78 found 1771.76.

NPG0-mpa4. (19-G0)
(Les quantités excessives de réactifs sont dûes à une erreur de calcul)

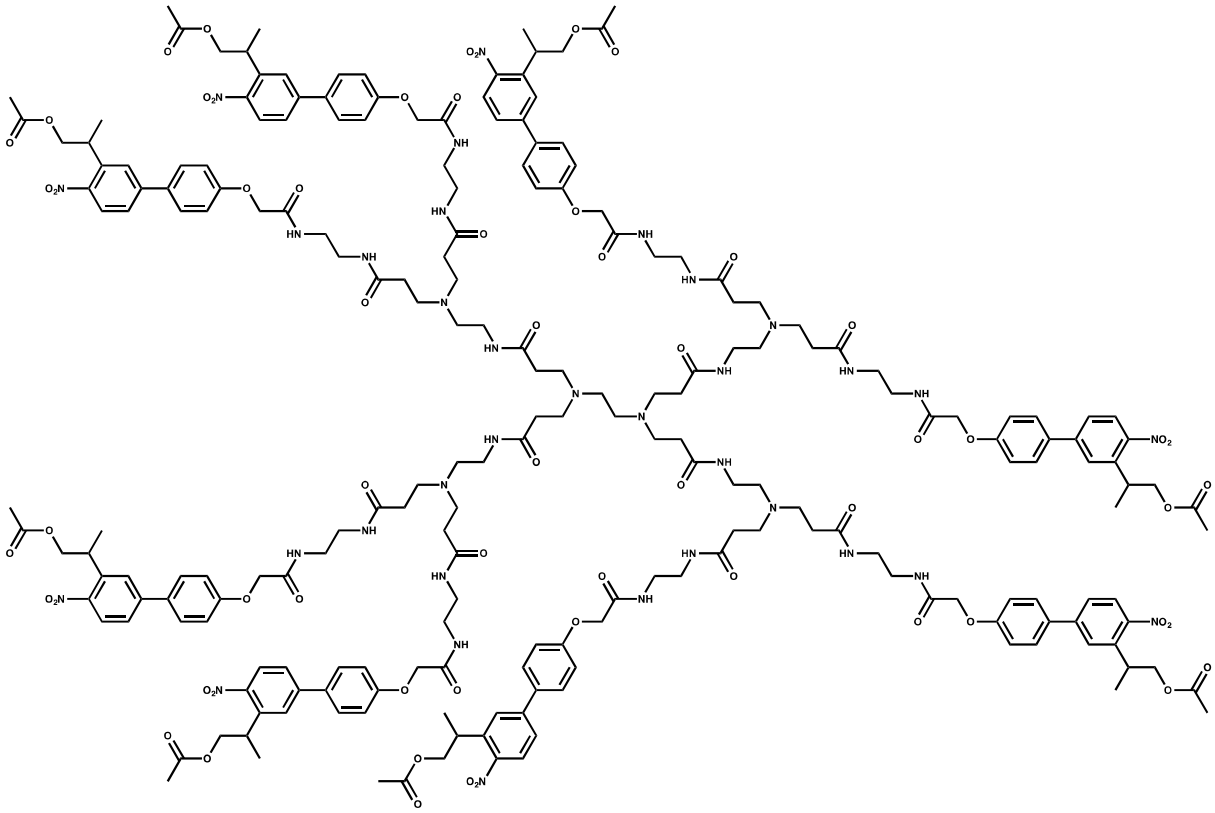


4-Methoxyphenylacetic acid (9.1 g, 54.76 mol) and DCC (1.0 g, 4.84 mmol) were dissolved in dry DMF (30 mL). **NPG0-OH4** (118 mg, 0.06 mol) and DMAP (cat. 1% mol) in dry DMF (10 mL) were added to the mixture and stirred overnight. The mixture was first purified by flash chromatography (C18 silica gel, 3/7 H_2O 0.1% TFA/CH_3CN as eluent) and in a second time purified with semi-preparative HPLC (isocratic 66/34, H_2O 0.1% TFA/CH_3CN) to obtained after lyophilisation a yellow powder (17.8 mg, 18%).

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD4): δ (ppm): 7.76 (d, J=8.4 Hz, 4H), 7.57 (d, *J*= 2.0 Hz, 4H), 7.52 (d, *J*=8.8 Hz, 8H), 7.47 (dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, 4H), 7.02 (d, *J*=8.8 Hz, 8H), 6.91 (d, *J*=8.7 Hz, 8H), 6.64 (d, *J*=8.7 Hz, 8H), 4.52 (s, 8H), 4.34 (dd, *J=8.3,* 10.6 Hz), 4.20 (dd, *J*=5.6 Hz, 10.8 Hz), 3.68 – 3.63 (m, 4H), 3.65 (s, 12H), 3.49 - 3.47 (m, 8H), 3.56 – 2.23 (m, 28H), 1.27 (d, *J*=7.0 Hz, 12H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{126}H_{142}N_{14}O_{32}]^{2+}$ 2364.99 found 2364.98.

NPG1

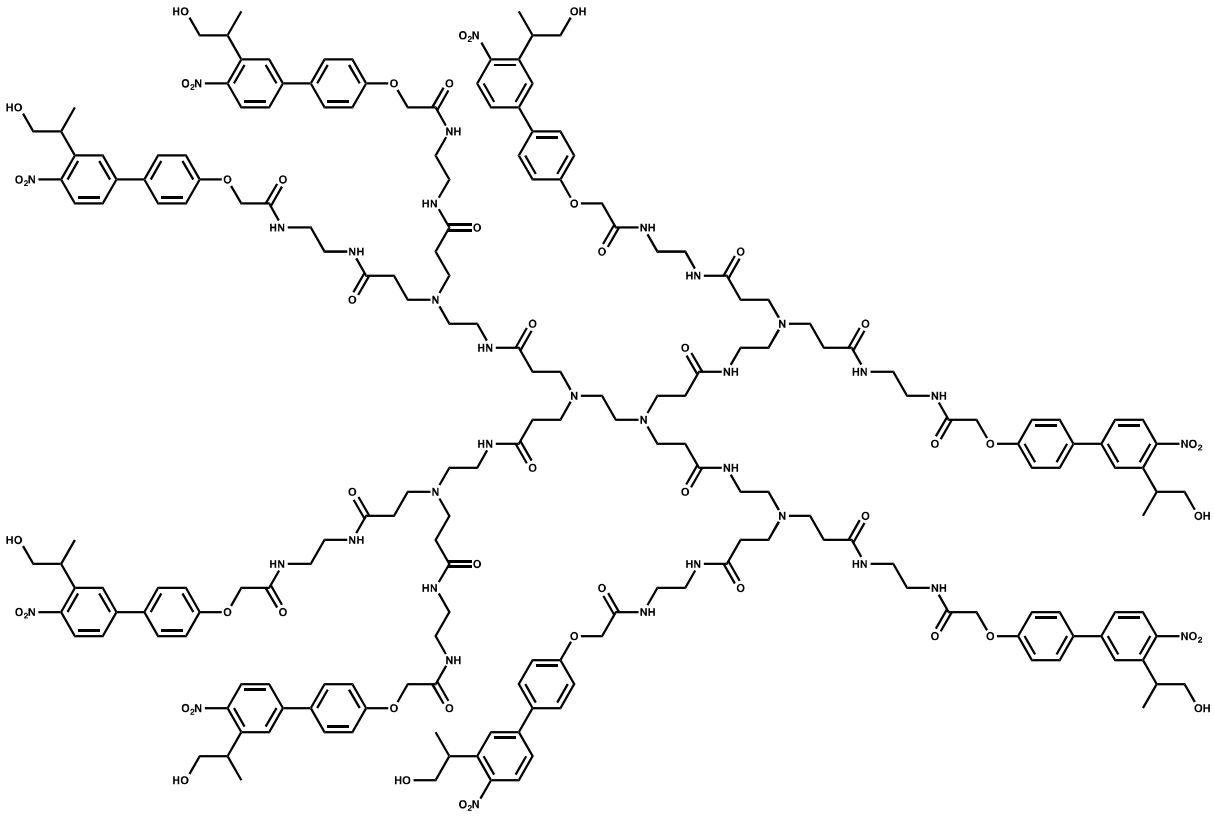


16 (200 mg, 0.53 mmol) and HOBt (161 mg, 1.19 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL). DIC (0.18 mL, 1.19 mmol) was added and the mixture was stirred for 1h. Then, PAMAM-G1 (85 mg, 0.06 mmol) in dry DMF (5 mL) was added and the mixture was stirred overnight. The solvent was removed *in vacuo* and the crude was purified by flash chromatography (C18 silica gel, 3/7 to 1/9 H_20 0.1% TFA/ CH_3CN as eluent) to obtained yellowish thick oil (140 mg, 52%).

RMN ^{1}H (400MHz, DMSO-d6): δ (ppm): 7.87 (d, J=8.6 Hz, 8H), 7.84 (d, *J*= 1.5 Hz, 8H), 7.73 (d, *J*=8.9 Hz, 16H), 7.68 (dd, *J*=1.7, 8.8 Hz, 8H), 7.08 (d, *J*=9.0 Hz, 16H), 4.53 (s, 16H), 4.29 – 4.18 (m, 16H), 3.59 - 3.54 (m, 8H), 3.24 – 2.27 (bs, 100H), 1.89 (s, 24H), 1.33 (d, *J*=6.9 Hz, 24H).

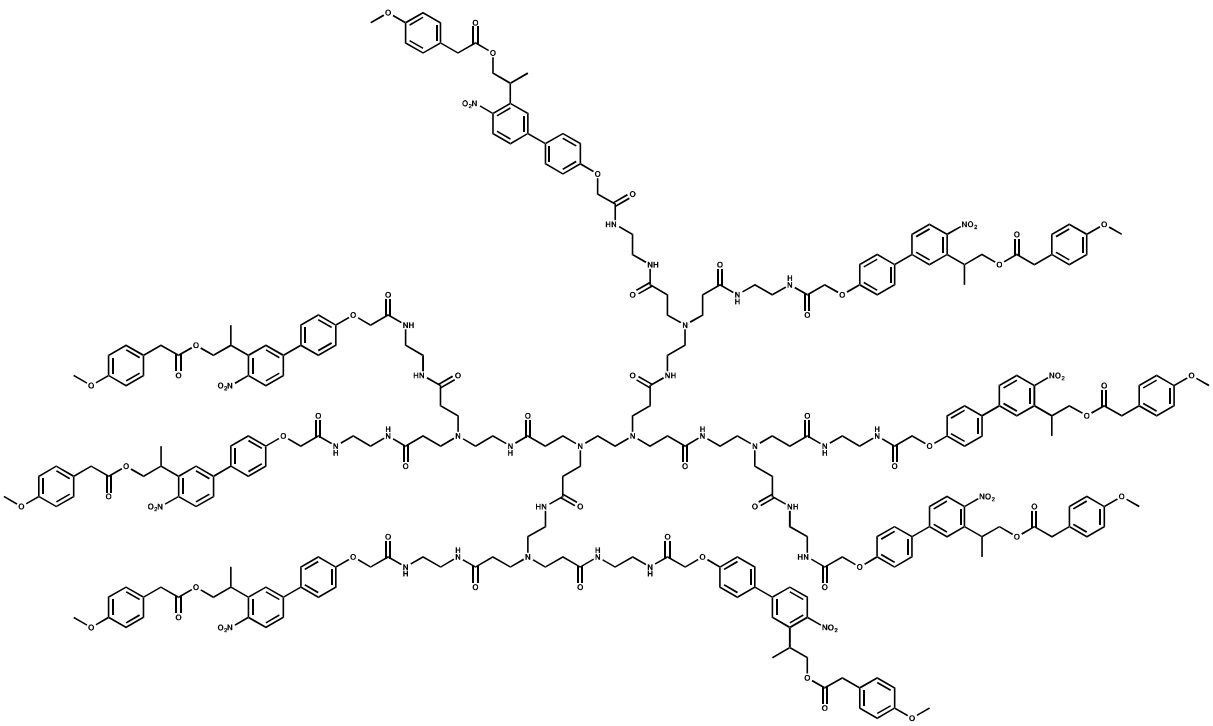
HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{214}H_{267}N_{34}O_{60}]^{3+}$ and $[C_{214}H_{266}N_{34}O_{60}]^{2+}$ 4274.89 found 4274.89.

NPG1-(OH)8 (18-G1)



NPG1 (140 mg, 0.03mmol) and K_2CO_3 (91 mg, 0.65 mmol) was dissolved in dry methanol (15 mL) and stirred overnight at room temperature. Solvent was removed *in vacuo* and the crude was directly used for the next step without purification. Quantitative reaction according to HPLC analysis.

NPG1-mpa$_{7.5}$ (19-G1)



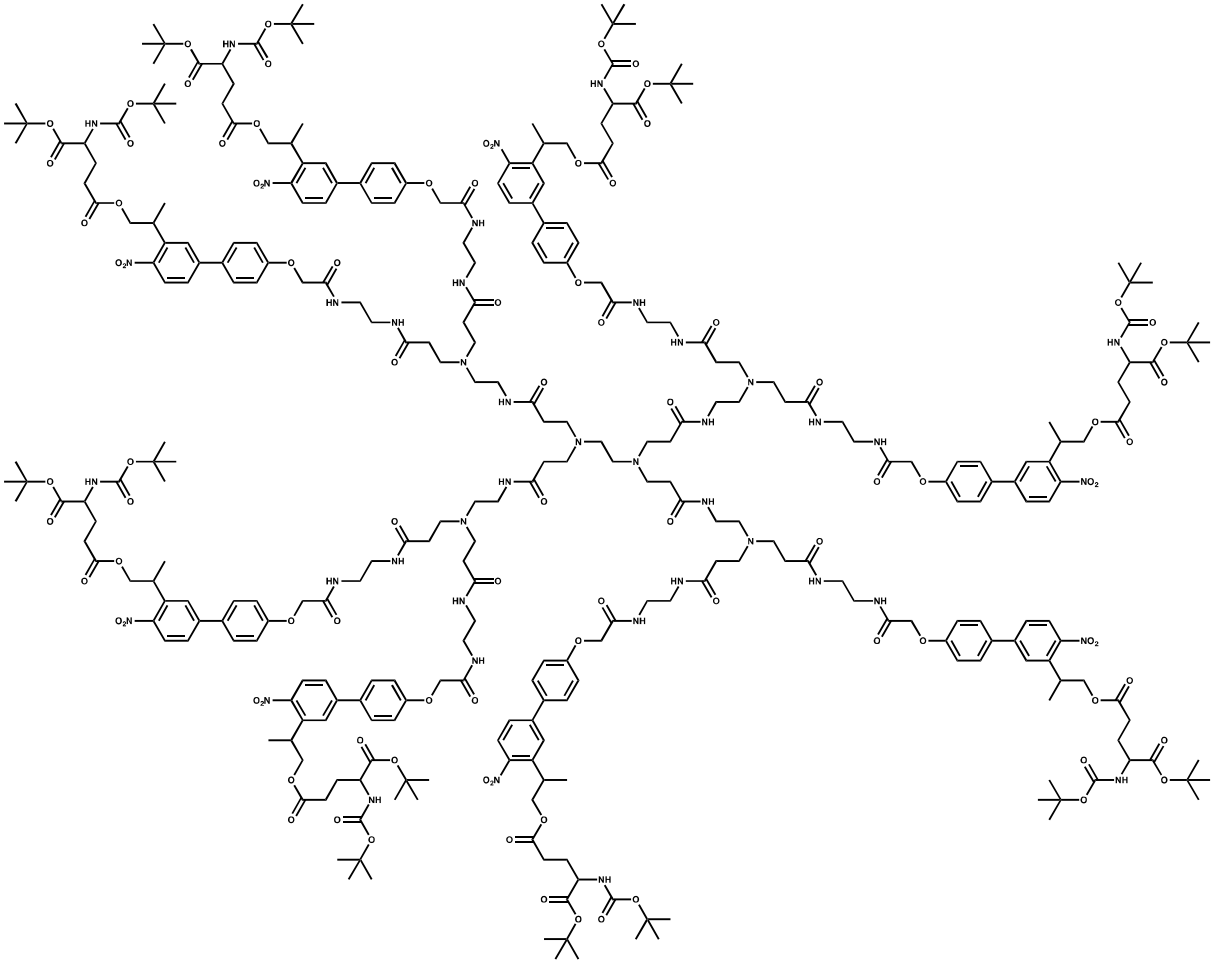
4-methoxyphenylacetic acid (1.3 g, 8.25 mol) and DIC (0.51 mL, 3.30 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL) and dry CH_3CN (5 mL). Next, **NPG1-OH$_8$** (estimated from previous step: 130 mg, 0.03 mol) in dry DMF (10 mL) was added to the mixture and stirred overnight. The mixture was purified by flash chromatography (C18 silica gel, 1/9 H_20 0.1% TFA/CH_3CN) to obtained a thick colorless oil (61 mg, 36%).

RMN ^{1}H (400MHz, DMSO-d6): δ (ppm): 7.87 (d, J=8.5 Hz, 8H), 7.79 (bs, 8H), 7.70 (d, *J*=8.7 Hz, 16H), 7.67 (d, *J*=8.4 Hz, 8H), 7.07 (d, *J*=8.7 Hz, 16H), 6.97 (d, *J*=8.5 Hz), 6.72 (d, *J*=8.5 Hz), 4.52 (bs, 16H), 4.31 – 4.24 (bs m, 16H),3.66 (bs, 24H), 3.62 - 3.54 (bs m, 8H), 3.44 (s, 16H), 3.25 – 2.13 (bs, 100H), 1.29 (d, *J*=6.8 Hz, 24H).

HRMS (ESI) (m/z):

NPG1-mpa8 calcd. for $[C_{270}H_{315}N_{34}O_{68}]^{3+}$ and $[C_{270}H_{314}N_{34}O_{68}]^{2+}$ 5124.23 found 5124.20.
NPG1-mpa7 calcd. for $[C_{261}H_{308}N_{34}O_{65}]^{4+}$ 4959.18 found 4959.16.
NPG1-mpa6 calcd. for $[C_{252}H_{300}N_{34}O_{62}]^{4+}$ and $[C_{252}H_{298}N_{34}O_{62}]^{2+}$ 4796.14 found 4796.07.
NPG1-mpa5 calcd. for $[C_{243}H_{288}N_{34}O_{59}]^{3+}$ and $[C_{214}H_{266}N_{34}O_{60}]^{2+}$ 4626.05 found 4621.98.

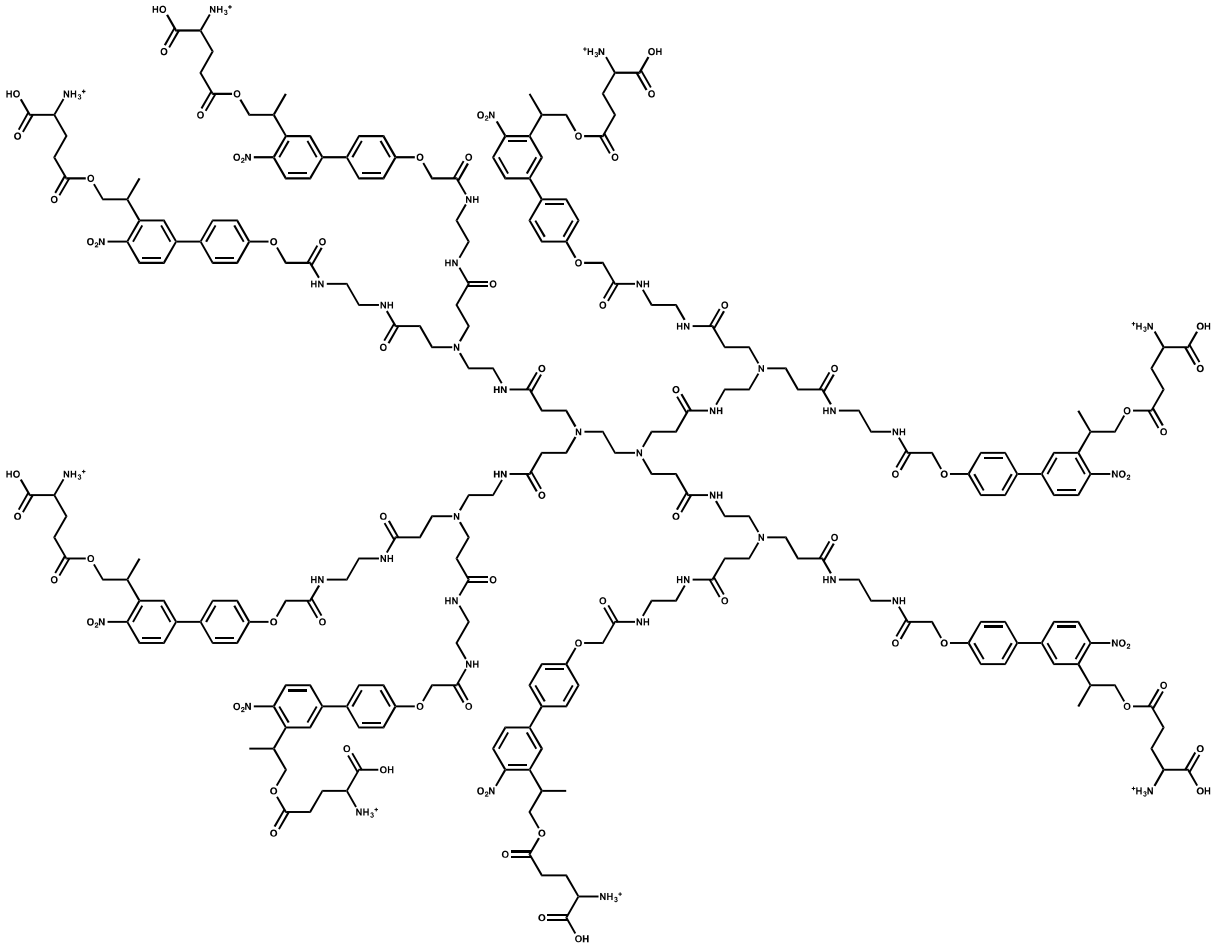
NPG1-GluBoc$_8$



Boc-D-glutamic acid 5-*tert*-butyl ester acid (1.0 g, 3.30 □mol) and DIC (0.51 mL, 3.30 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL) and dry CH_3CN (5 mL). Next, **NPG1-OH$_8$** (estimated from previous step: 130 mg, 0.03 □mol) in dry DMF (10 mL) was added to the mixture and stirred overnight. The mixture was purified by flash chromatography (C18 silica gel, 3/97 H_20 0.1% TFA/CH_3CN) to obtained a thick colorless oil (19.6 mg, 10%).

RMN ^{1}H (400MHz, DMSO-d6): δ (ppm): 7.76 (d, J=8.4 Hz, 8H), 7.67 (bs, 8H), 7.59 (d, *J*=8.4 Hz, 16H), 7.51 (d, *J*=8.4 Hz, 8H), 7.02 (d, *J*=8.4 Hz, 16H), 4.50 (bs, 16H), 4.27 – 4.19 (bs m, 16H), 3.90 (bs, 8H), 3.70 - 3.62 (bs m, 8H), 3.50 – 2.10 (bs, 116H), 1.36 (m, 168H).

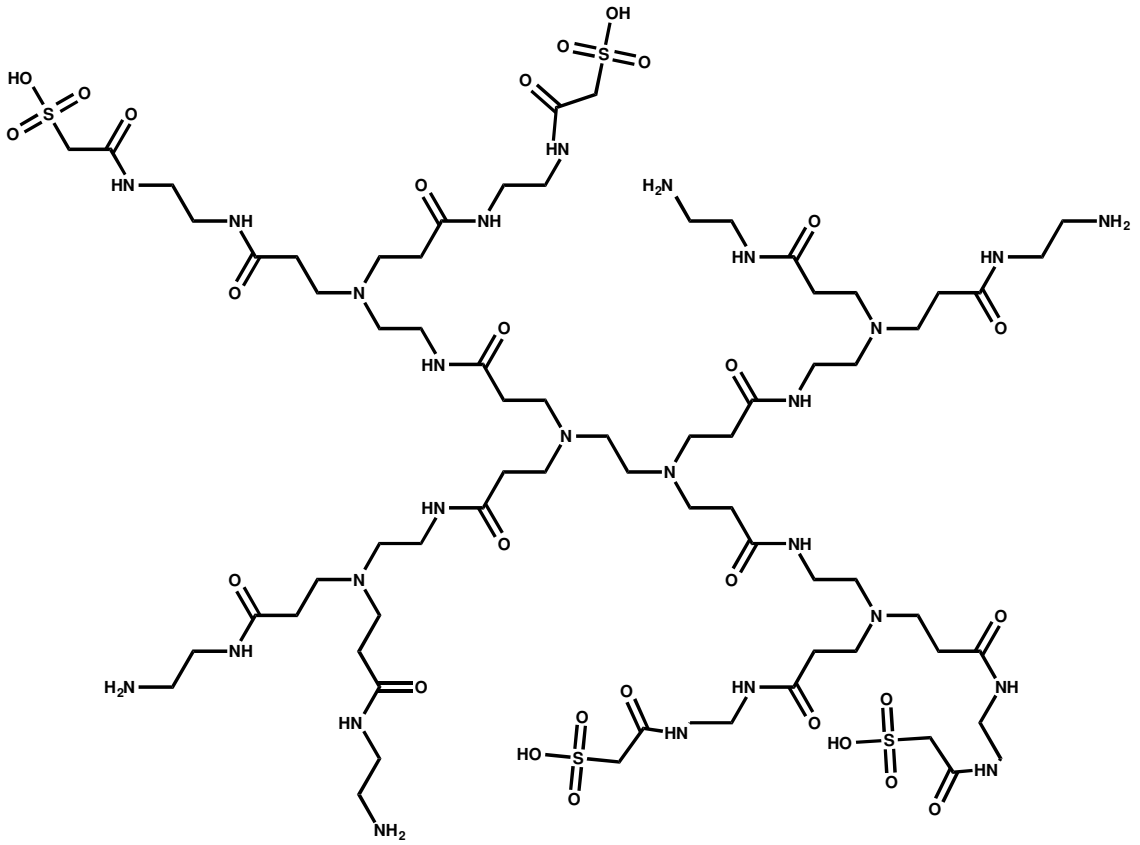
NPG1-Glu8



NPG1-GluBoc8 (19.6 mg, 3.1 μmol) was dissolved in a mixture of DCM and TFA (4/3; 14 mL) and stirred overnight at room temperature. Solvents were removed *in vacuo* and the crude was washed several times with DCM to obtain a pink thick oil (6.0 mg, 38.3%).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{238}H_{307}N_{42}O_{76}]^{3+}$ 4972.15 found 4274.89 and $[C_{238}H_{307}N_{42}O_{76}\text{-}(2NH_4^+\text{-}Li^+)]^{3+}$ 5010.20 found 5010.09.

G1-SAS



SAS (132.3 mg, 0.94 mmol) and HoBt (283.5 mg, 2.09 mmol) was dissolved in 10 ml of DMF and stirred to have a clear solution. Then, DIC (0.32 mL, 2.09 mmol) was added to the mixture and stirred 1h at room temperature. Next PAMAM-G1 (300 mg, 0.20 mmol) in DMF (10 mL) was added to the mixture and stirred overnight at room temperature. The solution was filtered on fritted funnel (size 4), and the precipitate was washed several times with dry DMF. The crude was dissolved in water and lyophilized to obtain a white powder (365 mg, 90%).

RMN ^{1}H (400MHz, D_2O): δ (ppm): 3.81 (s, 7.4H), 3.50 (t, *J*= 5.8 Hz, 14H), 3.43 – 3.28 (m, 24H), 3.25– 3.18 (m, 6H), 3.15 (t, *J*=6.0 Hz, 14H), 3.10 – 3.02 (m, 14H), 2.70 – 2.47 (m, 28H).

HRMS (ESI) (m/z):

G1-SAS$_4$ calcd. for $[C_{70}H_{138}N_{26}O_{28}S_4]^{2+}$ 1918.90 found 1918.90.
G1-SAS$_3$ calcd. for $[C_{68}H_{136}N_{26}O_{24}S_3]^{2+}$ 1796.93 found 1796.93.
G1-SAS$_2$ calcd. for $[C_{66}H_{134}N_{26}O_{20}S_2]^{2+}$ 1674.96 found 1674.97.
G1-SAS$_1$ calcd. for $[C_{64}H_{133}N_{26}O_{16}S]^{3+}$ 1554.00 found 1554.00.

Experimental details about reaction of hybrid section (III.4)

C1: 16 (200 mg, 0.53 mmol) and HOBt (145 mg, 1.07 mmol) were dissolved in dry DMF (10 mL). DIC (0.18 mL, 1.07 mmol) was added and the mixture was stirred for 1h. Then, PAMAM-G1 (153 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (10 mL) was added and the mixture was stirred overnight.

C2: 16 (200 mg, 0.53 mmol) and PAMAM-G1 (191 mg, 0.13 mmol) was dissolved in dry DMF (20 mL). Then, PyBOP (279 mg, 0.53 mmol) was added and the mixture was stirred overnight.

1A: sulfoacetic acid (41 mg, 0.29 mmol) and HOBt (100 mg, 0.73 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL). DIC (0. 11 mL, 0.73 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. Then, PAMAM-G1 (105 mg, 0.07 mmol) in dry DMF (10 mL) was added and the mixture was stirred 24h at room temperature at room temperature.

1B: sulfoacetic acid (41 mg, 0.29 mmol) and PAMAM-G1 (105 mg, 0.07 mmol) was dissolved in dry DMF (15 mL). Then, PyBOP (380 mg, 0.73 mmol) and DIPEA (0.18 mL, 1.09 mmol) were added 24h at room temperature.

2A: **16** (109 mg, 0.29 mmol) and HOBt (100 mg, 0.73 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL). DIC (0. 11 mL, 0.73 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. Then, PAMAM-G1 (105 mg, 0.07 mmol) in dry DMF (10 mL) was added and the mixture was stirred 24h at room temperature.

2B: **16** (109 mg, 0.29 mmol) and PAMAM-G1 (105 mg, 0.07 mmol) was dissolved in dry DMF (15 mL). Then, PyBOP (380 mg, 0.73 mmol) and DIPEA (0.12 mL, 0.73 mmol) were added and the mixture was stirred 24h at room temperature.

3A: 16 (109 mg, 0.29 mmol) and HOBt (50 mg, 0.36 mmol) were dissolved in dry DMF (5 mL), then DIC (0.06 mL, 0.36 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. In the same time, a second flask was prepared with sulfoacetic acid (41 mg, 0.29 mmol) and HOBt (50 mg, 0.36 mmol) in dry DMF (5 mL), then DIC (0.06 mL, 0.36 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. Next, the two solutions were added *via canula* into a third flask which contained PAMAM-G1 (105 mg, 0.07 mmol) in dry DMF (5 mL) and finally the mixture was stirred 24h at room temperature.

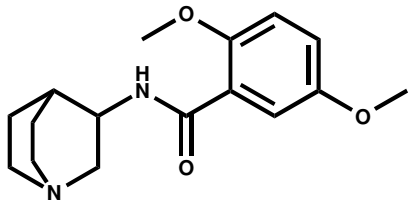
3B: sulfoacetic acid (41 mg, 0.29 mmol), **16** (109 mg, 0.29 mmol) and PAMAM-G1 (105 mg, 0.07 mmol) were dissolved in dry DMF (15 mL). Then, PyBOP (380 mg, 0.73 mmol) and DIPEA (0.18 mL, 1.09 mmol) were added 24h at room temperature.

BIP (4 eq.): 16 (56 mg, 0.15 mmol) and HOBt (25 mg, 0.18 mmol) were dissolved in dry DMF (2.5 mL), then DIC (29 µL, 0.18 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. In the same time, a second flask was prepared with sulfoacetic acid (21 mg, 0.15 mmol) and HOBt (25 mg, 0.18 mmol) in dry DMF (2.5 mL), then DIC (29 µL, 0.18 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. Next, the two solutions were added *via canula* into a third flask which contained PAMAM-G1 (54 mg, 37 µmol) and biphenyl (23 mg, 0.15 mmol) in dry DMF (5 mL) and finally the mixture was stirred 7 day at room temperature.

BIP (10 eq.): 16 (56 mg, 0.15 mmol) and HOBt (25 mg, 0.18 mmol) were dissolved in dry DMF (2.5 mL), then DIC (29 μL, 0.18 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. In the same time, a second flask was prepared with sulfoacetic acid (21 mg, 0.15 mmol) and HOBt (25 mg, 0.18 mmol) in dry DMF (2.5 mL), then DIC (29 μL, 0.18 mmol) was added and the mixture was stirred for 2h. Next, the two solutions were added *via canula* into a third flask, which contained PAMAM-G1 (54 mg, 37 μmol) and biphenyl (58 mg, 0.37 mmol) in dry DMF (5 mL) and finally the mixture was stirred 7 day at room temperature.

Quinuclidine derivatives

89S



Hydroxy benzotriazole (2,25g, 16.47 mmol) and 2-5-dimethoxybenzoic acid (2.4 g, 13.17 mmol) were added to a flask with DMF (196 mL). Dicyclohexylcarbodiimide (3.39 g, 16.47 mmol) was added to the mixture and stirred 1 h at room temperature. Next, diisopropylethylamine (4.79 mL, 28.98 mmol) and (S)-(-)-3-aminoquinuclidine dihydrochloride (2,623g, 13,17 mmol) were added to the mixture and stirred overnight at room temperature. Methanol (about 75 mL) was added to the reaction mixture to yield to a clear solution. The organic solvent was removed *under vaccum* and the residue was dissolved in an aqueous solution acidified with HCl 1M to pH 4.5 and washed with DCM (5x300 mL). The aqueous layer was basified with aqueous sodium hydroxide (50%) to pH>12 and extracted with ethyl acetate (5x300 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated *under vaccum*. A brown oil of N-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-yl]-2-hydroperoxy-5-methoxybenzamide (2,9 g, 76 % yield) was obtained by lyophylisation in a acid aqueous solution with pH<5.

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 7.36 (dd, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J*=2.4 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (ddd, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.52 – 3.26 (m, 5H), 2.36 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 2.00 (m, 1H).

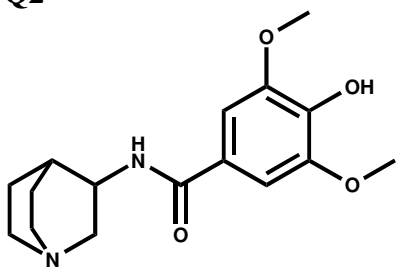
RMN ^{13}C (100MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 168.3, 155.1, 153.1, 123.6 119.6, 116.4, 114.4, 57.3, 56.4, 53.9, 47.6, 47.2, 46.2, 25.8, 22.8, 18.6.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{16}H_{23}N_2O_3]^+$ 291.17 found 291.17.

General method for the preparation of quinuclidine phenol derivatives

HoBt (1.25 eq.) and substituted benzoic acid (1 eq.) were added to a flask with DMF. DIC (1.25 eq.) was added to the mixture and stirred 1h at room temperature. Next, DIPEA (2.25 eq.) and (S)-(-)-3-aminoquinuclidine dihydrochloride, 1 eq.) were added to the mixture and stirred overnight at room temperature. Solvent was removed *under vaccum* and the crude product was purified by different chromatography according to the compound.

Q2



Purification: 1. Manual chromatography on silica gel with 100% ethyl acetate to elute reactant and 100% MeOH to elute **Q2.**

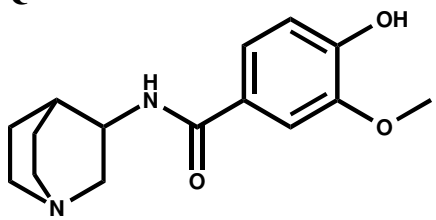
2. Flash chromatography on C18-silica gel with 100% H_2O 0.1% TFA to completely purified the product; yield =16%.

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 7.25 (s, 2H), 4.43 (m, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.82 (ddd, 1H), 3.55 – 3.30 (m, 5H), 2.36 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.93 (m, 1H).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 170.4, 148.9, 140.49, 125.5, 106.4, 56.9, 54.3, 47.8, 47.4, 42.7, 23.5, and 20.48.

BRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{16}H_{23}N_2O_4]^+$ 307.16 found 307.2.

Q3

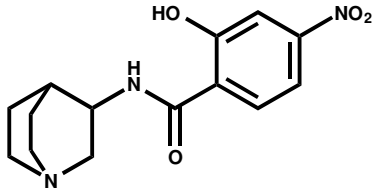


Purification: Flash chromatography on C18-silica gel with 8/2 H_2O 0.1% TFA/CH_3CN; yield = 49%.

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 7.49 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J*=2.2, 8.0 Hz, 1H), 6.85 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 4.42 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (ddd, 1H), 3.53 – 3.32 (m, 5H), 2.36 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.93 (m, 1H).

BRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{15}H_{21}N_2O_3]^+$ 277.15 found 277.2.

Q6



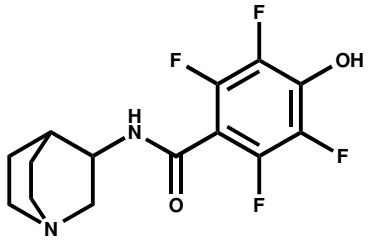
Purification: Flash chromatography on C18-silica gel from 9/1 to 8/2 H_2O 0.1% TFA/CH_3CN; yield = 98%.

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 8.06 (d, 1H), 7.78 – 7.73 (m, 2H), 4.48 (m, 1H), 3.85 (ddd, 1H), 3.49 – 3.32 (m, 5H), 2.40 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.99 (m, 1H).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 167.8, 159.1, 150, 8, 129.9, 122.1, 113.1, 111.6, 52.3, 46.1, 45.8, 45.1, 24.1, 21.3, and 17.1.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{14}H_{18}N_3O_4]^+$ 292.12 found 292.12.

Q7

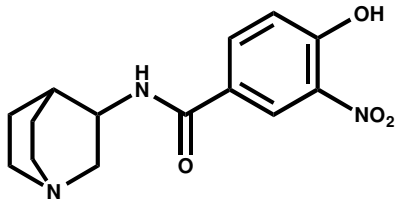


Purification: Flash chromatography on C18-silica gel 9/1 H_2O 0.1% TFA/CH_3CN; yield = 53%.

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 4.46 (m, 1H), 3.85 (ddd, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 3H), 3.15 (dd, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.96 (m, 1H).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{14}H_{15}F_4N_2O_2]^+$ 319.10 found 319.10.

Q8.



Purification: Flash chromatography on C18-silica gel 95/5 H_2O 0.1% TFA/CH_3CN; yield = 99%.

RMN ^{1}H (400MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 8.59 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J*=2.5, 9.1 Hz, 1H), 7.1 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.82 (ddd, 1H), 3.49 – 3.32 (m, 4H), 3.29 – 3.22 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 1.92 (m, 1H).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD$_4$): δ (ppm): 167.0, 159.2, 135.0, 134.4, 125.2, 123.1, 121.1, 52.1, 46.3, 45.8, 45.4, 24.3, 21.5, and 17.1.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for $[C_{14}H_{18}N_3O_4]^+$ 292.12 found 292.12.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rajasekharan Pillai, V. N. Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis. *Synthesis* **1980,** 1–26 (1980).
2. Bochet, C. G. Orthogonal Photolysis of Protecting Groups. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40,** 2071–2073 (2001).
3. Riguet, E. & Bochet, C. G. New Safety-Catch Photolabile Protecting Group. *Org. Lett.* **9,** 5453–5456 (2007).
4. Hansen, M. J., Velema, W. A., Lerch, M. M., Szymanski, W. & Feringa, B. L. Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: strategies and applications in dynamic systems. *Chem Soc Rev* **44,** 3358–3377 (2015).
5. Klán, P. *et al.* Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **113,** 119–191 (2013).
6. Specht, A., Bolze, F., Omran, Z., Nicoud, J. & Goeldner, M. Photochemical tools to study dynamic biological processes. *HFSP J.* **3,** 255–264 (2009).
7. Kaplan, J. H., Forbush, B. & Hoffman, J. F. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium:potassium pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry (Mosc.)* **17,** 1929–1935 (1978).
8. Engels, J. & Schlaeger, E. J. Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-benzyltriesters. *J. Med. Chem.* **20,** 907–911 (1977).
9. Amatrudo, J. M., Olson, J. P., Agarwal, H. K. & Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds for multichromic optical interrogation of neural systems. *Eur. J. Neurosci.* **41,** 5–16 (2015).
10. Mayer, G. & Heckel, A. Biologically Active Molecules with a 'Light Switch'. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45,** 4900–4921 (2006).
11. Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods* **4,** 619–628 (2007).
12. Brieke, C., Rohrbach, F., Gottschalk, A., Mayer, G. & Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51,** 8446–8476 (2012).
13. Ouyang, X. & Chen, J. K. Synthetic Strategies for Studying Embryonic Development. *Chem. Biol.* **17,** 590–606 (2010).
14. Sudmeyer, T. *et al.* Efficient 2(nd) and 4(th) harmonic generation of a single-frequency, continuous-wave fiber amplifier. *Opt. Express* **16,** 1546–1551 (2008).
15. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, 2006). at <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-46312-4>
16. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **401,** 273–294 (1931).
17. Kaiser, W. & Garrett, C. G. B. Two-Photon Excitation in CaF2 : Eu2+. *Phys. Rev. Lett.* **7,** 229–231 (1961).
18. Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G. & Anderson, H. L. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48,** 3244–3266 (2009).
19. Yushchenko, D. A. & Schultz, C. Tissue Clearing for Optical Anatomy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52,** 10949–10951 (2013).
20. Vogel, A. & Venugopalan, V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem. Rev.* **103,** 577–644 (2003).
21. Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* **2,** 932–940 (2005).
22. Furuta, T. *et al.* Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis.

Proc. Natl. Acad. Sci. **96,** 1193–1200 (1999).
23. Matsuzaki, M. *et al.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* **4,** 1086–1092 (2001).
24. Albota, M. Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Sections. *Science* **281,** 1653–1656 (1998).
25. Hammett, L. P. The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **59,** 96–103 (1937).
26. Specht, A. *et al.* The donor–acceptor biphenyl platform: A versatile chromophore for the engineering of highly efficient two-photon sensitive photoremovable protecting groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11,** 578 (2012).
27. Gug, S. *et al.* Photolabile glutamate protecting group with high one- and two-photon uncaging efficiencies. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **9,** 1303–1307 (2008).
28. Specht, A. *et al.* New Photoremovable Protecting Groups for Carboxylic Acids with High Photolytic Efficiencies at Near-UV Irradiation. Application to the Photocontrolled Release of L-Glutamate. *ChemBioChem* **7,** 1690–1695 (2006).
29. Tran, C. *et al.* Two-Photon 'Caging' Groups: Effect of Position Isomery on the Photorelease Properties of Aminoquinoline-Derived Photolabile Protecting Groups. *Org. Lett.* **17,** 402–405 (2015).
30. Petit, M. *et al.* Substitution Effect on the One- and Two-photon Sensitivity of DMAQ 'Caging' Groups. *Org. Lett.* **14,** 6366–6369 (2012).
31. Mongin, O., Porrès, L., Charlot, M., Katan, C. & Blanchard-Desce, M. Synthesis, Fluorescence, and Two-Photon Absorption of a Series of Elongated Rodlike and Banana-Shaped Quadrupolar Fluorophores: A Comprehensive Study of Structure–Property Relationships. *Chem. – Eur. J.* **13,** 1481–1498 (2007).
32. He, G. S., Tan, L.-S., Zheng, Q. & Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **108,** 1245–1330 (2008).
33. Gug, S. *et al.* Molecular Engineering of Photoremovable Protecting Groups for Two-Photon Uncaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47,** 9525–9529 (2008).
34. Picard, S. *et al.* Octupolar chimeric compounds built from quinoline caged acetate moieties: a novel approach for 2-photon uncaging of biomolecules. *New J. Chem.* **37,** 3899 (2013).
35. Dunkel, P. *et al.* Quinoline-derived two-photon sensitive quadrupolar probes. *Org Biomol Chem* **12,** 9899–9908 (2014).
36. Cueto Díaz, E. J. *et al.* Cooperative Dyads for Two-Photon Uncaging. *Org. Lett.* **17,** 102–105 (2015).
37. Ciuciu, A. I. *et al.* Model dyads for 2PA uncaging of a protecting group via photoinduced electron transfer. *Phys Chem Chem Phys* **17,** 6554–6564 (2015).
38. Korzycka, K. A. *et al.* Two-photon sensitive protecting groups operating via intramolecular electron transfer: uncaging of GABA and tryptophan. *Chem Sci* **6,** 2419–2426 (2015).
39. Shamis, M., Lode, H. N. & Shabat, D. Bioactivation of Self-Immolative Dendritic Prodrugs by Catalytic Antibody 38C2. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 1726–1731 (2004).
40. Fomina, N., McFearin, C. L. & Almutairi, A. Increasing materials' response to two-photon NIR light via self-immolative dendritic scaffolds. *Chem. Commun.* **48,** 9138 (2012).
41. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248,** 73–76 (1990).
42. Kherlopian, A. R. *et al.* A review of imaging techniques for systems biology. *BMC*

Syst. Biol. **2,** 74 (2008).
43. Hayek, A., Bolze, F., Nicoud, J.-F., Baldeck, P. L. & Mély, Y. Synthesis and characterization of water-soluble two-photon excited blue fluorescent chromophores for bioimaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* **5,** 102–106 (2006).
44. Fundamentals and Applications in Multiphoton Excitation Microscopy. at <https://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>
45. Cumpston, B. H. *et al.* Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature* **398,** 51–54 (1999).
46. Lee, K.-S., Kim, R. H., Yang, D.-Y. & Park, S. H. Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **33,** 631–681 (2008).
47. Cabrini, S. & Kawata, S. *Nanofabrication Handbook*. (CRC Press, 2012).
48. Li, Z. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of several aromatic ketone-based two-photon initiators. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **49,** 3688–3699 (2011).
49. Liu, Z. *et al.* Spatiotemporally Controllable and Cytocompatible Approach Builds 3D Cell Culture Matrix by Photo-Uncaged-Thiol Michael Addition Reaction. *Adv. Mater.* **26,** 3912–3917 (2014).
50. Gatterdam, V. *et al.* Three-dimensional protein networks assembled by two-photon activation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53,** 5680–5684 (2014).
51. Babin, J. *et al.* A New Two-Photon-Sensitive Block Copolymer Nanocarrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48,** 3329–3332 (2009).
52. Yan, B., Boyer, J.-C., Branda, N. R. & Zhao, Y. Near-Infrared Light-Triggered Dissociation of Block Copolymer Micelles Using Upconverting Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **133,** 19714–19717 (2011).
53. Cao, J. *et al.* Near-infrared light-triggered micelles for fast controlled drug release in deep tissue. *Biomaterials* **34,** 6272–6283 (2013).
54. Ji, W. *et al.* Coumarin-containing photo-responsive nanocomposites for NIR light-triggered controlled drug release via a two-photon process. *J. Mater. Chem. B* **1,** 5942 (2013).
55. Carling, C.-J., Viger, M. L., Nguyen Huu, V. A., Garcia, A. V. & Almutairi, A. In vivo visible light-triggered drug release from an implanted depot. *Chem Sci* **6,** 335–341 (2015).
56. Warther, D. *et al.* Two-photon uncaging: New prospects in neuroscience and cellular biology. *Bioorg. Med. Chem.* **18,** 7753–7758 (2010).
57. Ben Brahim, M. & Faouzi, B. M. Neuromatiq. at <http://neuromatiq.net/neuromatiq/Neuromatiq.html>
58. Milburn, T. *et al.* Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand. *Biochemistry (Mosc.)* **28,** 49–55 (1989).
59. Pettit, D. L., Wang, S. S.-H., Gee, K. R. & Augustine, G. J. Chemical Two-Photon Uncaging: a Novel Approach to Mapping Glutamate Receptors. *Neuron* **19,** 465–471 (1997).
60. Canepari, M., Nelson, L., Papageorgiou, G., Corrie, J. E. T. & Ogden, D. Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolinyl-and 4-methoxy-7-nitroindolinyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters. *J. Neurosci. Methods* **112,** 29–42 (2001).
61. Carter, A. G. & Sabatini, B. L. State-Dependent Calcium Signaling in Dendritic Spines of Striatal Medium Spiny Neurons. *Neuron* **44,** 483–493 (2004).

62. Nikolenko, V., Poskanzer, K. E. & Yuste, R. Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits. *Nat. Methods* **4,** 943–950 (2007).
63. Molnár, P. & Nadler, J. V. γ-Aminobutyrate, α-carboxy-2-nitrobenzyl ester selectively blocks inhibitory synaptic transmission in rat dentate gyrus. *Eur. J. Pharmacol.* **391,** 255–262 (2000).
64. Cürten, B., Kullmann, P. H. M., Bier, M. E., Kandler, K. & Schmidt, B. F. Synthesis, Photophysical, Photochemical and Biological Properties of Caged GABA, 4-[[(2H-1-Benzopyran-2-one-7-amino-4-methoxy) carbonyl] amino] Butanoic Acid¶. *Photochem. Photobiol.* **81,** 641–648 (2005).
65. Rial Verde, E. M., Zayat, L., Etchenique, R. & Yuste, R. Photorelease of GABA with Visible Light Using an Inorganic Caging Group. *Front. Neural Circuits* **2,** (2008).
66. Matsuzaki, M., Hayama, T., Kasai, H. & Ellis-Davies, G. C. R. Two-photon uncaging of γ-aminobutyric acid in intact brain tissue. *Nat. Chem. Biol.* **6,** 255–257 (2010).
67. Olson, J. P. *et al.* Optically Selective Two-photon Uncaging of Glutamate at 900 nm. *J. Am. Chem. Soc.* **135,** 5954–5957 (2013).
68. Andersen, P. *The Hippocampus Book*. (Oxford University Press, USA, 2007).
69. O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* **34,** 171–175 (1971).
70. O'Keefe, J. & Nadel, L. *The hippocampus as a cognitive map*. (Clarendon Press ; Oxford University Press, 1978).
71. Gray, H., Lewis, W. H. & Bartleby.com, I. *Anatomy of the human body*. (Bartleby.com, 2000). at <http://www.bartleby.com/107/>
72. Bruno, D. & Lemardelé, S. LA PLASTICITÉ DES RÉSEAUX DE NEURONES. at <http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_07/a_07_cl/a_07_cl_tra/a_07_cl_tra.html>
73. Colgin, L. L., Moser, E. I. & Moser, M.-B. Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci.* **31,** 469–477 (2008).
74. Buzsáki, G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* **7,** 446–451 (2004).
75. Dombeck, D. A., Harvey, C. D., Tian, L., Looger, L. L. & Tank, D. W. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat. Neurosci.* **13,** 1433–1440 (2010).
76. Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F. & Gulyás, A. I. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* **102,** 527–540 (2001).
77. Kullmann, D. M. Interneuron networks in the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21,** 709–716 (2011).
78. Johnston, D. CA1 pryamidal neuron in hippocampus. at <https://www.biosci.utexas.edu/directory/userdetails.aspx?id=1899>
79. Warther, D. *et al.* Live-cell one- and two-photon uncaging of a far-red emitting acridinone fluorophore. *J. Am. Chem. Soc.* **132,** 2585–2590 (2010).
80. Gug, S. *Synthèse et caractérisation de groupements protecteurs photolabiles à deux photons : Applications biologiques*. (Strasbourg 1, 2008). at <http://www.theses.fr/2008STR13200>
81. Pelliccioli, A. P. & Wirz, J. Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1,** 441–458 (2002).
82. Donato, L. *et al.* Water-Soluble, Donor-Acceptor Biphenyl Derivatives in the 2-(o-Nitrophenyl)propyl Series: Highly Efficient Two-Photon Uncaging of the Neurotransmitter γ-Aminobutyric Acid at λ=800 nm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51,** 1840–1843 (2012).

83. Makosza, M. & Winiarski, J. Vicarious nucleophilic substitution of hydrogen. *Acc. Chem. Res.* **20,** 282–289 (1987).
84. Makosza, M. Synthesis of heterocyclic compounds via vicarious nucleophilic substitution of hydrogen. *Pure Appl. Chem.* **69,** (1997).
85. Nakano, T., Takewaki, K., Yade, T. & Okamoto, Y. Dibenzofulvene, a 1,1-Diphenylethylene Analogue, Gives a π-Stacked Polymer by Anionic, Free-Radical, and Cationic Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **123,** 9182–9183 (2001).
86. Nakano, T. Synthesis, structure and function of π-stacked polymers. *Polym. J.* **42,** 103–123 (2010).
87. Tomalia, D. A. *et al.* A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **17,** 117–132 (1985).
88. Tomalia, D. A., Naylor, A. M. & Goddard, W. A. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29,** 138–175 (1990).
89. Wong, P. T. & Choi, S. K. Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic Delivery Systems. *Chem. Rev.* **115,** 3388–3432 (2015).
90. Choi, S. K. *et al.* A photochemical approach for controlled drug release in targeted drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **20,** 1281–1290 (2012).
91. Choi, S. K. *et al.* Light-controlled release of caged doxorubicin from folate receptor-targeting PAMAMdendrimer nanoconjugate. *Chem. Commun.* **46,** 2632–2634 (2010).
92. Tsai, H.-C., Imae, T., Calderó, G. & Solans, C. Two-photon confocal imaging study: cell uptake of two photon dyes-labeled PAMAM dendrons in HeLa cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100,** 746–756 (2012).
93. Bakalova, Zhelev, Z., Kokuryo, D., Spasov, L. & Aoki, I. Chemical nature and structure of organic coating of quantum dots is crucial for their application in imaging diagnostics. *Int. J. Nanomedicine* 1719 (2011). doi:10.2147/IJN.S17995
94. Ji, Y. & Qian, Y. pH dependent one-/two-photon fluorescence emission properties and mechanism of the dendrimer PAMAM triphenylamine imine. *RSC Adv.* **5,** 74940–74946 (2015).
95. Xu, L., Zhang, H. & Wu, Y. Dendrimer Advances for the Central Nervous System Delivery of Therapeutics. *ACS Chem. Neurosci.* **5,** 2–13 (2014).
96. Ribrault, C., Sekimoto, K. & Triller, A. From the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* **12,** 375–387 (2011).
97. Vögtle, F. *Dendrimers III: Design, Dimension, Function*. (Springer, 2003).
98. Neises, B. & Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17,** 522–524 (1978).
99. Hung, W.-I. *et al.* Synthesis and electroactive properties of poly(amidoamine) dendrimers with an aniline pentamer shell. *J. Mater. Chem.* **21,** 4581–4587 (2011).
100. Morris, K. F. & Johnson, C. S. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **114,** 3139–3141 (1992).
101. Magnus, C. J. *et al.* Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science* **333,** 1292–1296 (2011).
102. Bodnar, A. L. *et al.* Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Med. Chem.* **48,** 905–908 (2005).
103. Lovett-Barron, M. *et al.* Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat. Neurosci.* **15,** 423–430 (2012).

104. Tatsumi, R. *et al.* (+)-3-[2-(Benzo[b]thiophen-2-yl)-2-oxoethyl]-1-azabicyclo[2.2.2]octane as potent agonists for the α7 nicotinic acetylcholine receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14,** 3781–3784 (2004).
105. Walker, D. P. *et al.* Design, synthesis, structure–activity relationship, and in vivo activity of azabicyclic aryl amides as α7 nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **14,** 8219–8248 (2006).
106. Acker, B. A. *et al.* Discovery of N-[(3R,5R)-1-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide as an agonist of the α7 nicotinic acetylcholine receptor: In vitro and in vivo activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18,** 3611–3615 (2008).
107. Hauser, T. A. *et al.* TC-5619: An alpha7 neuronal nicotinic receptor-selective agonist that demonstrates efficacy in animal models of the positive and negative symptoms and cognitive dysfunction of schizophrenia. *Biochem. Pharmacol.* **78,** 803–812 (2009).
108. Sternson, S., Lee, P. & Looger, L. Preparation of quinuclidine derivatives for binding and activation of mutated chimeric receptors. 97pp. (2010).
109. Smirnova, J., Wöll, D., Pfleiderer, W. & Steiner, U. E. Synthesis of Caged Nucleosides with Photoremovable Protecting Groups Linked to Intramolecular Antennae. *Helv. Chim. Acta* **88,** 891–904 (2005).
110. Wöll, D. *et al.* Intramolecular Sensitization of Photocleavage of the Photolabile 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl (NPPOC) Protecting Group: Photoproducts and Photokinetics of the Release of Nucleosides. *Chem. – Eur. J.* **14,** 6490–6497 (2008).
111. Wöll, D. *et al.* On the Mechanism of Intramolecular Sensitization of Photocleavage of the 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl (NPPOC) Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **129,** 12148–12158 (2007).

PUBLICATION

ChemPubSoc Europe
DOI: 10.1002/chem.201501619
CHEMISTRY A European Journal
Full Paper

Electrochemistry |Hot Paper|

Synthesis and Characterization of Carbazole-Linked Porphyrin Tweezers

Yi Chang,[a] Clément Michelin,[a] Léo Bucher,[a] Nicolas Desbois,[a] Claude P. Gros,*[a] Sébastien Piant,[b] Frédéric Bolze,*[b] Yuanyuan Fang,[c] Xiaoqin Jiang,[c] and Karl M. Kadish*[c]

Abstract: Herein the synthesis, spectroscopic characterization, two-photon absorption and electrochemical properties of 3,6-disubstituted carbazole tweezers is reported. A dimer resulting from a Glaser homocoupling was isolated during a Sonogashira coupling reaction between a diethynyl-carbazole spacer and a 5-bromo-triarylporphyrin and the properties of this original compound were compared with the 3,6-disubstituted carbazole bisporphyrin tweezers. The dyads reported herein present a two-photon absorption maximum at 920 nm with two-photon absorption cross-section in the 1200 GM range. Despite a strong linear absorption in the Soret region and moderate fluorescence quantum yield, they both lead to a high brightness reaching 30000 $M^{-1}cm^{-1}$.

Introduction

In recent years, porphyrin tweezers have attracted the interest of synthetic chemists because of the possibility to fine-tune the electrochemical and photophysical properties of these species with an aim towards developing their use for application in the areas of optoelectronic derivatives,[1] photovoltaic devices,[2] nonlinear optics[3] and biology.[4] A number of conjugated molecules have been used as bridges to link porphyrin macrocycles to each other, forming dimers with different geometries, varying from co-facial to linear. Of particular interest are bridges containing nitrogen heterocycles such as diketopyrrolopyrrole and carbazoles.[1,5]

Porphyrin dimers with 2,7-carbazole linkers were synthesized by Senge and co-workers who examined these as light-emitting devices with efficient red electroluminescence.[1] These 2,7-disubstituted carbazole derivatives were shown to exhibit efficient red electroluminescence. The two-photon absorption properties of a bisporphyrin linked by carbazole at the 3,6-positions were also recently described in the 800–900 nm range.[5f] However, to our knowledge, the two-photon absorption and electrochemical properties of a 3,6-disubstituted carbazole tweezer porphyrin compound have never been reported. This is addressed in the current study with the two tweezer Zn^{II} bis-porphyrin compounds **1a** and **1b** the structures of which are shown in Scheme 1, along with several related molecules which were also examined for comparison with the bisporphyrins.

[a] Dr. Y. Chang, Dr. C. Michelin, L. Bucher, Dr. N. Desbois, Prof. Dr. C. P. Gros
Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (UMR 6302)
9 Avenue Alain Savary, BP 47870, 21078 Dijon Cedex (France)
E-mail: claude.gros@u-bourgogne.fr

[b] S. Piant, Dr. F. Bolze
Conception et Application des Molécules Bioactives (UMR 7199)
Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch (France)
E-mail: frederic.bolze@unistra.fr

[c] Dr. Y. Fang, X. Jiang, Prof. Dr. K. M. Kadish
Department of Chemistry
University of Houston, Houston, TX 77204-5003 (USA)
E-mail: kadish@central.uh.edu

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/chem.201501619.

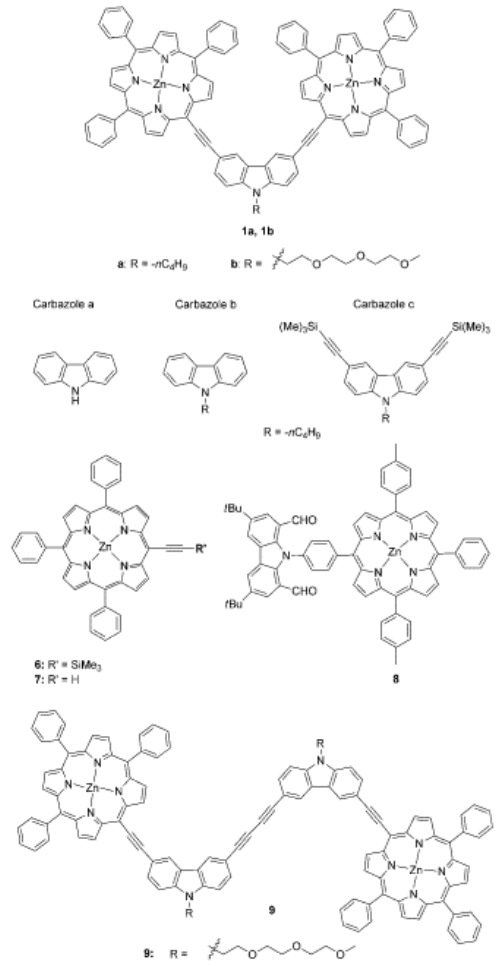
Results and Discussion

The target structures of tweezers **1a** and **1b** are shown in Scheme 1. The alkyl substituent on the nitrogen atom of **1a** was introduced to increase the solubility. A bisporphyrin linked by a carbazole containing the triethylene glycol unit was synthesized (**1b**) in order to investigate how this group would affect the compound's optical and electronic properties. The utilized synthetic route for obtaining the spacers and tweezers are shown in Scheme 2 and Scheme 3. Diethynylcarbazole tweezers **1a** and **1b** were obtained by a one-pot coupling of the bromoporphyrin precursor with the diethynyl-carbazole central core.

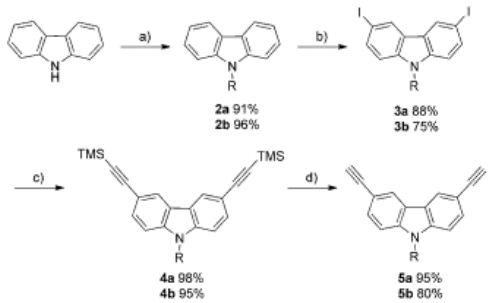
Palladium-catalyzed coupling of the 5-bromo-10,15,20-triphenylporphyrin[6] (1.0 equiv) and the carbazolethynylene unit **5a** or **5b** (1.0 equiv) afforded **1a** and **1b** in 13 and 29% yield, respectively. Formation of byproduct **9** was also observed. The compounds were purified and fully characterized by mass spectrometry, ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy in $CHCl_3$.

Scheme 4 shows the coupling reaction, which led to the bis-carbazole porphyrin ethynylene dimer **9**. This homocoupling reaction, known as the Glaser reaction,[7] is frequently encountered during Sonogashira carbon–carbon coupling reactions[8] and from a mechanistic point of view has many similarities with the palladium/alkyne reaction except in the last step of the catalytic cycle. The bisporphyrin **9** was isolated in 11% yield and fully characterized by ^{1}H NMR spectroscopy and HRMS MALDI/TOF mass spectrometry. A perfect match be-

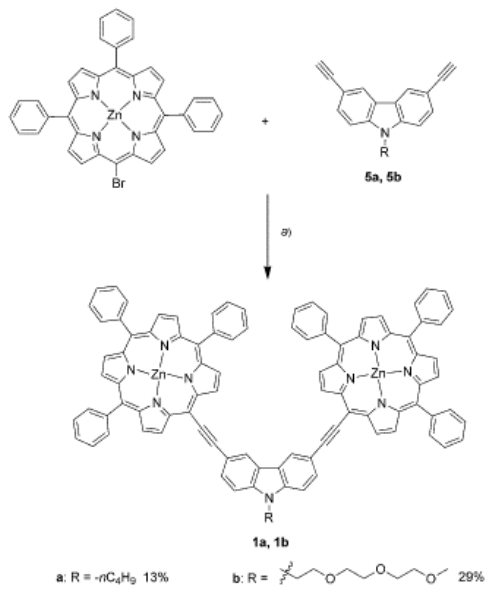
© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 1. Structures of the investigated porphyrin and carbazole derivatives.



Scheme 2. Synthesis of diethynylcarbazole spacers **5a** and **5b**. a) RBr, tetrabutylammonium bromide (TBAB), NaOH, toluene; b) NIS, AcOH, $CHCl_3$, RT, 6 h; c) (trimethylsilyl)acetylene, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, CuI, Et_3N, THF, RT, 48 h; d) NaOH, EtOH, RT, 1 h.

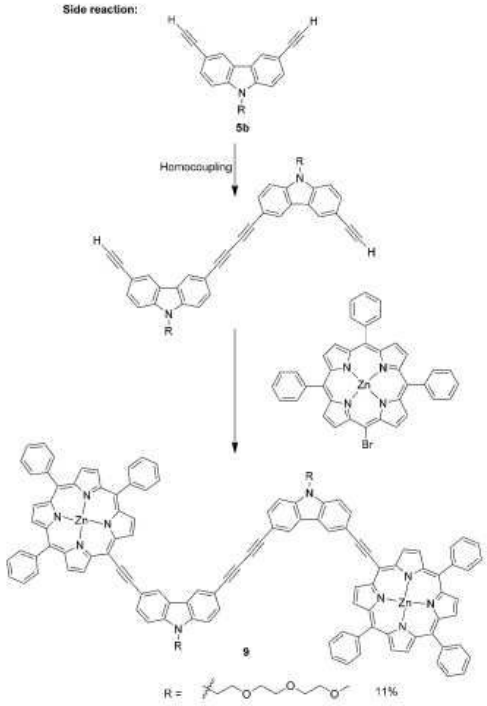


Scheme 3. Synthesis of diethynyl-carbazole tweezers **1a** and **1b**. a) $Pd(dba)_2$, PPh_3, CuI, Et_3N, pyridine, 80 °C, overnight.

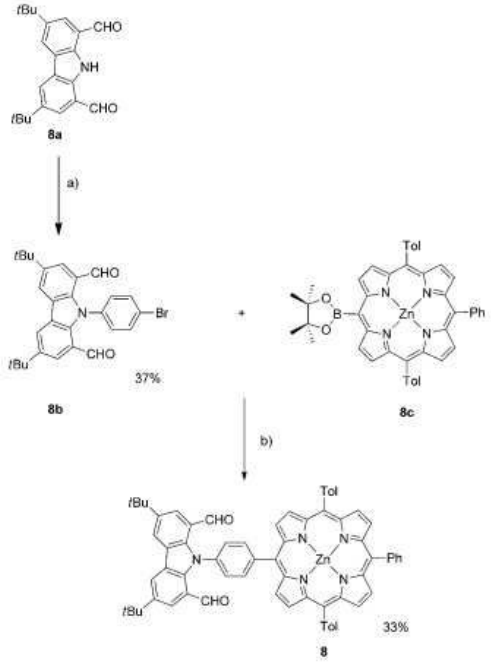
tween the experimental and the simulated ionic patterns convincingly confirmed the structure of the compound (see the Supporting Information). For example, the calculated mass of **9** ($C_{122}H_{88}N_{10}O_6Zn_2$) is equal to 1916.5466 Da, in agreement with the experimental value of 1916.5432 Da (corresponding to $[M]^{+\cdot}$).

The experimental conditions were varied to optimize the coupling reaction between *para*-dibromobenzene and carbazole 1,8-dialdehyde (**8a**).[5a] The best yield was obtained after 5 h of reflux in nitrobenzene in the presence of crown ether 18-C-6 and copper(I) iodide (1.0 equiv). The use of this more soluble copper(I) salt (compared to NaI) led to a significant improvement in the efficiency of the reaction. Moreover, by replacing *ortho*-dichlorobenzene (classically used) by a polar acceptor solvent such as nitrobenzene, the reaction time was reduced to 5 h (instead of 14 h) and the coupling product **8b** was obtained in 37% yield (Scheme 5). The coupling of the porphyrin[9] and the carbazole was achieved through Suzuki coupling[10] between the porphyrin **8c** and the brominated carbazole **8b** in the presence of the palladium(II) catalyst in a basic toluene/DMF medium at 80 °C for 24 h. The substitution of bromine by iodine, a stronger nucleophile, promotes oxidative addition to palladium (step 2, Scheme 5). The por-

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 4. Synthesis of carbazole dimer **9**.



Scheme 5. Synthesis of *N*-carbazole porphyrin **8**. a) 1,4-Dibromobenzene, CuI, K_2CO_3, 18-C-6, nitrobenzene, reflux, 5 h; b) NaI, Cs_2CO_3, $[PdCl(\eta_3\text{-}C_3H_5)]_2$, PPh_3, toluene/DMF, 80 °C, 24 h.

phyrin-carbazole derivative **8** was isolated in 33% yield (Scheme 5).

One- and two-photon photophysics

The two synthesized dimers in Scheme 1 exhibit very similar absorption and emission photophysical properties (Table 1).

Both porphyrin tweezers possess an intense Soret band at 449 nm, with a slightly higher intensity for **1b** than for **1a**, and three lower energy Q bands at 539, 577 and 633/634 nm (Figure 1). Compared to the parent monomeric alkynyltriaryl zinc porphyrin **6** (Scheme 1), described by Senge and co-workers,[5e] one can note a significant increase in the absorption efficiency, as expected for conjugated porphyrin dimers (about 400000 and 70000 for the Soret and Q bands, respectively, for **1b**/**1a** as compared to 200000 and 8000 for the monoporphyrin). The diyne dimer **9**, for its part, exhibits blue shifted emission bands and lower molecular extinction coefficients, indicating a lower conjugation in the system, and a possible face-to-face geometry.

The bisporphyrin **1a** and **1b** both exhibit a similar photoluminescence behavior, with $\lambda_{max}^{em} = 643/644$ nm and a quantum yield of 8–8.5%. The excited state lifetime was measured as 1.31 ns for the two compounds. The vibrational progression is clearly visible on the emission spectrum with $\Delta\nu = 1184\ cm^{-1}$. These values are comparable with similar reported compounds bearing an imidazole group at the *meso* position of the porphyrin rings,[5f] but these compounds exhibit a small bathochromic shift of 376 cm^{-1} as compared to the currently examined dyads **1a** and **1b**.

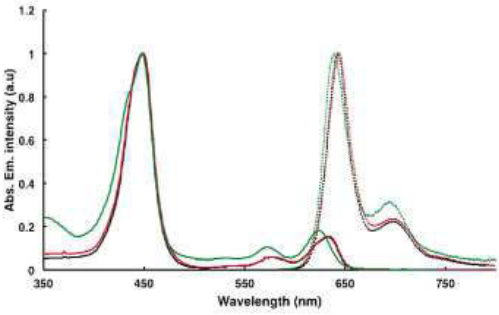


Figure 1. Absorption (solid line) and emission (dashed line) spectra of **1a** (red), **1b** (black) and **9** (green) in CH_2Cl_2 solution.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

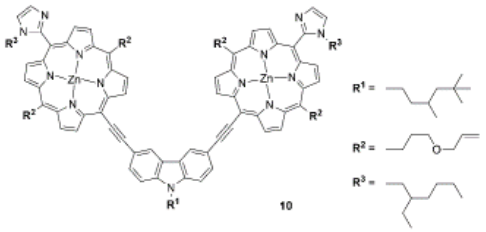
Table 1. Photophysical properties of **1a**, **1b**, **7** and **9** in CH_2Cl_2 at 298 K.

Compound	λ_{abs}[1] [nm]	ε [$M^{-1}cm^{-1}$]	λ_{em}[1] [nm]	Φ_{em}[a][1] [%]	τ [ns]
1a	449	398000	644	8.1	1.31
	539	8500			
	577	25000			
	634	65500			
1b	449	457000	643	8.5	1.31
	(453)[d]				
	539	9900			
	577	28500			
	(584)[d]				
	633	72000			
	(642)[d]				
monomer **7**[b]	429	204000			
	566	8100			
	608	5700			
3,6-carba-imidazole[c]	450		660	15	
	651		717		
9	435	190000	639	25.0	
	448	240000			
	527	8000			
	570	16000			
	619	30000			

[a] Using cresyl violet as standard $\Phi = 56\%$; [b] ref. [5e]; [c] ref. [5f]; [d] values in pyridine as solvent in bracket.

The two-photon absorption (TPA) properties of **1a** and **1b** were investigated by the up-converted fluorescence method (Figure 2). There is an intense TPA band with an absorption maximum at 910–920 nm with $\sigma_2 \approx 1000$ GM and less intense bands at 830 and 750 nm, with σ_2 in the 400 GM range. A significant contribution from one photon absorption is seen for wavelengths <750 nm, with a deviation from the quadratic dependency law characteristic of pure two-photon processes.

A similar system **10** (Scheme 6), with an additional imidazole group at the 11 position on the porphyrin macrocycle, showed a stronger TPA band with $\sigma_2 = 720$ GM at 830 nm and weaker bands at 880 nm with $\sigma_2 = 500$ GM.[5f] This clearly indicates the crucial role of the substitution pattern of the porphyrinic moiety on the TPA properties. The diyne molecule **9** showed very low two-photon absorption cross sections in the 750–1000 nm region, <25 GM, despite having a diyne linker which generally leads to a large TPA cross section in porphyrinic dyads. Indeed, studies on various co-facial bisporphyrin systems (e.g., $(DPO)Zn_2$, $(DPA)Zn_2$ and $(DPX)Zn_2$ Pacman bisporphyrins dyads)[5a] have demonstrated very low TPA cross sections, similar to simple porphyrin systems with $\sigma_2 < 50$ GM, values close to the TPA properties of a monoporphyrin system.[12]



Scheme 6. Structure of a carbazole-bridged porphyrin dimer.

Electrochemistry and spectroelectrochemistry

Electron-transfer reactions of the investigated tweezer compounds can occur at the conjugated π-ring system of the porphyrin macrocycle(s) or, in the case of oxidations, at the electroactive carbazole bridge. In the present study, the exact site of electron transfer was assigned on the basis of spectroelectrochemistry and by comparing oxidation and reduction potentials for the individual redox active parts of the molecule when measured outside of the dyad.

An example of one such comparison is given in Figure 3 for **1a**, (TPP)Zn and carbazole b in CH_2Cl_2 containing 0.1 M TBAP.

Porphyrin **1a** in CH_2Cl_2 and 0.1 M TBAP exhibits two reductions at $E_{1/2} = -1.20$ and -1.71 V and four oxidations at $E_p =$

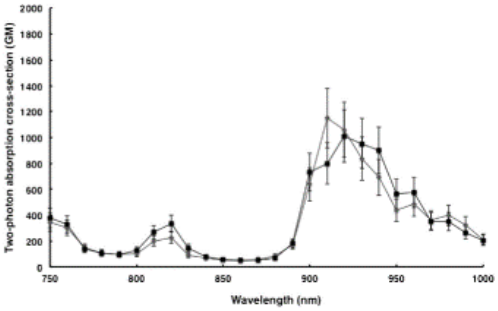


Figure 2. Two-photon excitation spectra of **1a** (◆) and **1b** (■) in CH_2Cl_2 at 298 K.

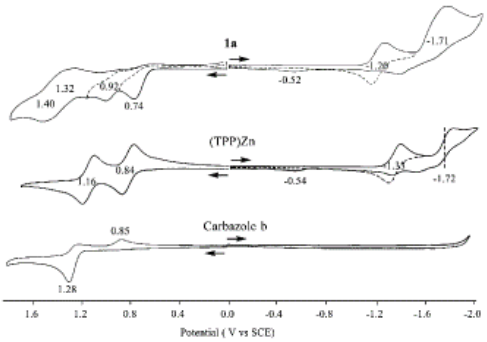


Figure 3. Cyclic voltammograms of **1a**, (TPP)Zn and carbazole b in CH_2Cl_2, 0.1 M TBAP, scan rate $= 0.1$ V s^{-1}.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

0.74 V and $E_{1/2}=0.92$, 1.32 and 1.40 V. Under the same solution conditions, (TPP)Zn shows two reductions at $E_{1/2}=-1.33$ and -1.72 V and two oxidations at $E_{1/2}=0.84$ and 1.16 V. The four redox processes of (TPP)Zn are all porphyrin ring-centered to form a porphyrin π anion radical and dianion upon reduction and a porphyrin π cation radical and dication upon oxidation.

The first reversible reduction of (TPP)Zn at -1.33 V becomes irreversible when the potential sweep is reversed after the second reduction and, under these conditions, a new reoxidation peak is observed at $E_p=-0.54$ V. The carbazole b linker group is not reduced within the negative potential limit of the CH_2Cl_2 solvent but it is irreversibly oxidized at $E_p=1.28$ V for a scan rate of 0.1 V s^{-1} and this process is coupled with a reduction peak at $E_p=0.85$ V. A similar irreversible oxidation occurs for carbazoles a and c with E_p located at 1.32 and 1.44 V, respectively, in CH_2Cl_2 (Table 2).

The peak currents for the first oxidation and first reduction of the bisporphyrin **1a** in CH_2Cl_2 are approximately equal to each other (Figure 3) and this fact suggests the same number of electrons transferred in each step, two upon reduction and two upon oxidation. However, the shape of the current–voltage curve for the first oxidation of **1a** is consistent with a fast chemical reaction following a reversible electron transfer (an electrochemical EC mechanism) and this is followed by a second reversible oxidation at $E_{1/2}=0.92$ V, the peak current of which is smaller than that of the first process by approximately 50% (Figure 3). This suggests that two electrons are abstracted in the first oxidation of **1a** to give a bisporphyrin biscation radical followed at a more positive potential by another electron abstraction to give a triply charged mixed oxidation state species, which is then further oxidized by one more electron in the range of +1.32 to +1.40 V. The electroactive carbazole linker of **1a** is also oxidized at 1.32–1.40 V but it was not possible to determine if this oxidation occurs before or after oxidation at the porphyrin π ring system, which occurs in the same potential region. It is important to point out that the second oxidation at 0.92 V (**1a**) or 0.95 V (**1b**) in CH_2Cl_2 are both substantially shifted in a negative direction as compared to the second oxidation of (TPP)Zn at 1.16 V in the same solvent.

Attempts were made to slow down the chemical reaction following the first oxidation of **1a** but the peak remained irreversible at all temperatures from RT to -45 °C, as shown in Figure S29 in the Supporting Information. This indicates the occurrence of a very fast chemical reaction. Similar redox behavior was observed for **1b** in CH_2Cl_2, with the large separation in potential between the second and third oxidations being explained by the presence of two equivalent and interacting redox centers, as was reported for other porphyrin dyads with a face-to-face arrangement.[13]

Cyclic voltammograms of compounds **1a** and **1b** were also measured in pyridine and benzonitrile and a summary of redox potentials is given in Table 2 along with redox potentials for reduction and oxidation of the related compounds **6**–**9**. Almost the same peak or half wave potentials are observed for the

Table 2. Half-wave and peak potentials (V vs. SCE) of investigated compounds in CH_2Cl_2, PhCN and pyridine containing 0.1 M TBAP.

Solvent	Cpd	Oxidation				Reduction		
		4th	3rd	2nd	1st	1st	2nd	3rd
CH_2Cl_2	**1a**	1.40	1.32	0.92	0.74[a]	−1.20	−1.71	
	1b	1.37	1.26	0.95	0.74[a]	−1.27	−1.73	
	9			0.96[a]	0.76[a]	−1.34	−1.46	−1.71
	6	1.32	1.17	1.02	0.83	−1.26	−1.70	
	7			1.06	0.85[a]	−1.28	−1.65	−1.80
	8			1.11	0.80	−1.34	−1.75	
	(TPP)Zn			1.16	0.84	−1.33	−1.72	
	carb a		1.32[a]					
	carb b		1.28[a]					
	carb c		1.44[a]					
PhCN	**1a**		1.33	0.99	0.78[a]	−1.30	−1.74	
	1b		1.32	0.95	0.77[a]	−1.30	−1.73	
	9			0.98	0.73	−1.28	−1.63	−1.88
	6	1.69	1.54	1.21	0.88	−1.23	−1.64	
	7		1.40[a]	1.13[a]	0.89[a]	−1.30	−1.69[a]	−1.86
	(TPP)Zn			1.13	0.83	−1.34	−1.72	
	carb a		1.30[a]					
	carb b		1.28[a]					
Py[b]	**1a**			1.05	0.82[a]	−1.25	−1.76	
	1b			1.05	0.77[a]	−1.25	−1.78	
	9				0.84[a]	−1.31	−1.86	−2.06[a]
	6				0.95[a]	−1.21	−1.81[a]	−1.96
	7				0.91[a]	−1.21	−1.80[a]	−1.93
	(TPP)Zn			1.09	0.83	−1.39	−1.66	

[a] Irreversible peak potential at scan rate = 0.1 V s^{-1}; [b] carbazole oxidation is not observed in pyridine due to the solvent oxidation potential window.

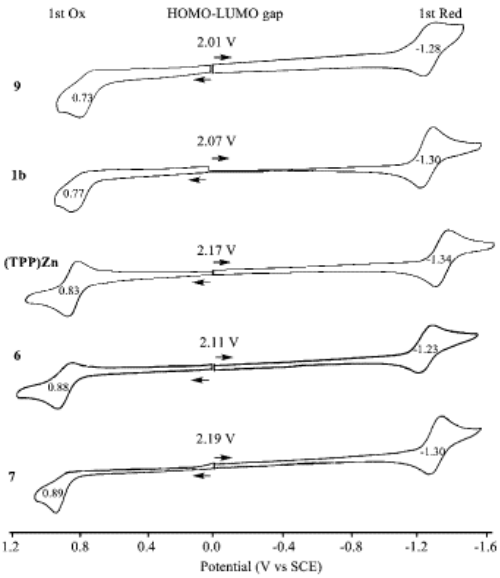


Figure 4. Cyclic voltammograms illustration HOMO–LUMO gap of **9**, **1b**, (TPP)Zn, **6** and **7** in PhCN containing 0.1 M TBAP, scan rate = 0.1 V s^{-1}.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

mono- and bisporphyrin derivatives but differences do exist as illustrated in Figure 4 which shows the first reduction and first oxidation for **9**, **1b**, **6**, **7** and (TPP)Zn in PhCN containing 0.1 M TBAP.

As seen in Figure 4 and Table 2, the easiest oxidation occurs in PhCN for the linked bisporphyrins **1a**, **1b** and **9** and the hardest for the monoporphyrins **6** and **7**. The HOMO–LUMO gap ranges from 2.01 to 2.19 V, with the smallest values being observed for the linked bisporphyrins **1a**, **1b** and **9** (Figure 4 and Table 2), consistent with the larger conjugated π system of these species.

As indicated above, the initial site of electron transfer is the conjugated macrocycle for all of the examined porphyrins, both upon oxidation and reduction, but this is not reflected in the UV–visible spectrum of the electroreduced compounds **9**, **1a** and **1b**. Examples of the spectral changes during reduction of **6**, **1b** and **9** in PhCN at a controlled potential of −1.50 V are illustrated in Figure 5 and suggest a reduction product of **1b** and **9** having substantial electron density on the linking group. This is not the case for **6** where the significant loss of intensity for all bands clearly indicates reduction at the conjugated π system of the macrocycle.

Similar types of UV–visible spectral changes are observed during the first controlled potential reduction of **9** in PhCN, CH_2Cl_2 and pyridine. This is illustrated in Figure 6 where all of the bands red shift upon electron addition to give a final product with a Soret band at 454–460 nm and an intense Q band at 651–655 nm.

As shown in Figure 7, the neutral compound **1b** in CH_2Cl_2 has bands at 446, 570 and 624 nm, while the species generated after the first reduction at a controlled potential of −1.45 V has bands at 456, 596 and 652 nm. When the applied potential is set at −1.95 V, the newly formed bands at 456 and 652 nm decrease in intensity and the final spectrum is characterized by a Soret-like band at 484 nm and a broad Q band at 771 nm.

Similar spectral changes are seen for the two reductions of **1b** in pyridine. The neutral compound has major absorbance at 453, 578 and 642 nm and these peaks are red-shifted to 457 and 657 nm after reduction (Figure 7b). Upon further reduction in pyridine, the Soret and Q band both decrease in intensity as a broad band between 700 to 900 nm is formed.

Finally, it should be noted that compound **1a** also displays similar types of shifts in the UV/Vis spectrum upon reduction and the final product upon reduction in PhCN is characterized by bands at 453 and 655 nm.

The cyclic voltammetric data suggest that the first two electron abstractions are from the porphyrin macrocycle and this

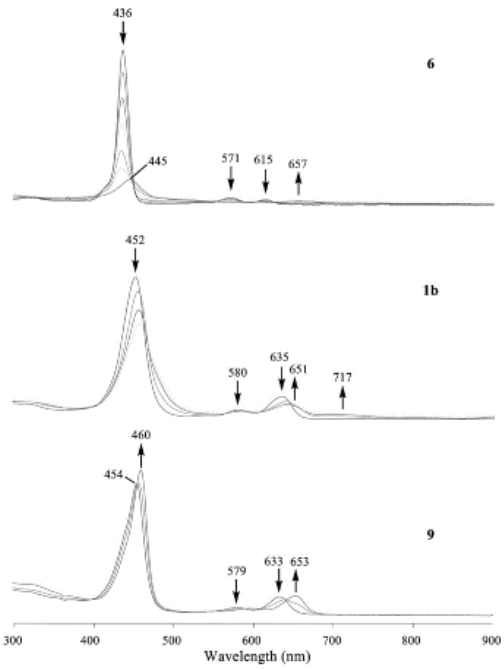


Figure 5. UV/Vis spectrum change of **6**, **1b** and **9** in PhCN upon first reduction at −1.50 V, 0.1 M TBAP.

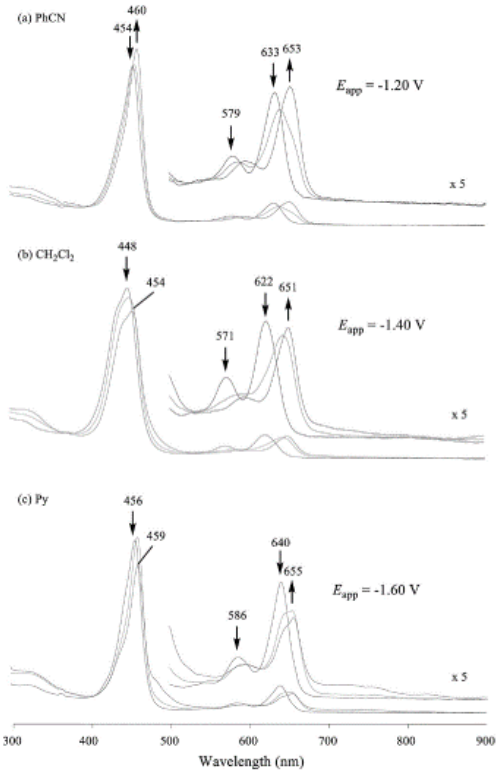


Figure 6. Thin-layer UV/Vis spectrum change of compound **9** during first reduction in: a) PhCN, b) CH_2Cl_2, and c) Py containing 0.1 M TBAP.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

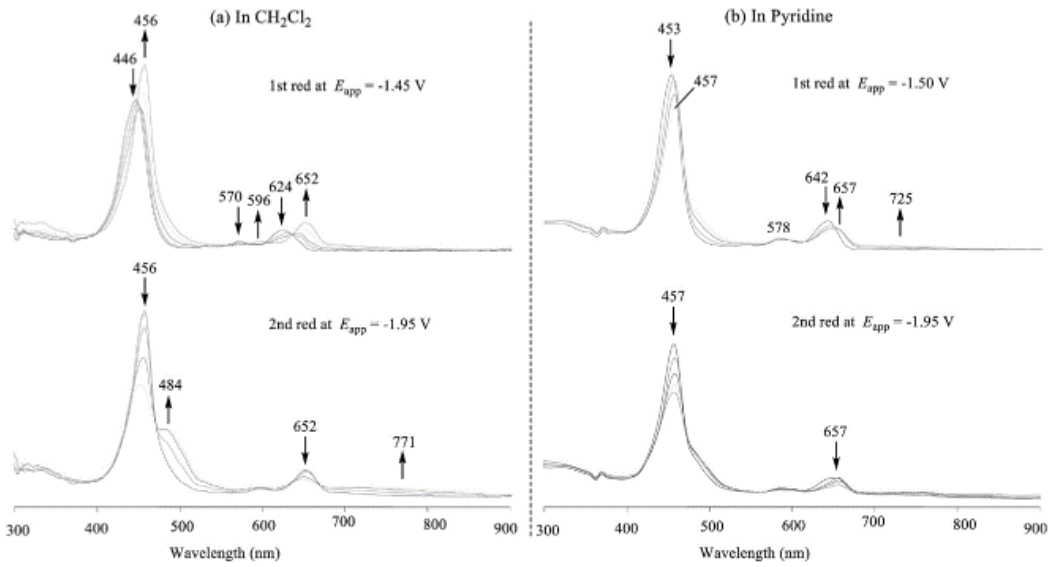


Figure 7. UV/Vis spectral changes of **1 b** during controlled potential reduction in: a) CH_2Cl_2, and b) pyridine, 0.1 M TBAP.

conclusion is verified by spectroelectrochemical monitoring of the controlled potential oxidations in CH_2Cl_2 and PhCN (Figure 8). In the first oxidations, the bands at 446 and 624 nm for the neutral compound **1 b** both decrease in intensity as a broad band centered at 804 nm in CH_2Cl_2 or 812 nm in PhCN appears, indicating a porphyrin ring-centered electron transfer. The intensity of the Soret band continues to decrease when the applied potential is shifted to 1.15 or 1.20 V and the final UV–visible spectrum is consistent with that of a porphyrin dication.

Summary

In conclusion, the synthesis and physicochemical characterization of diyne dimer **9**, a *N*-carbazole porphyrin **8** and two Zn-porphyrin tweezers with a 9-substituted carbazole as a linker has been described. Both compounds **1 a**, **1 b** show strong linear absorption in the Soret region and moderate fluorescence quantum yield, leading to high brightness reaching 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$. Furthermore, these dyads present a two-photon absorption maximum at 920 nm with two-photon

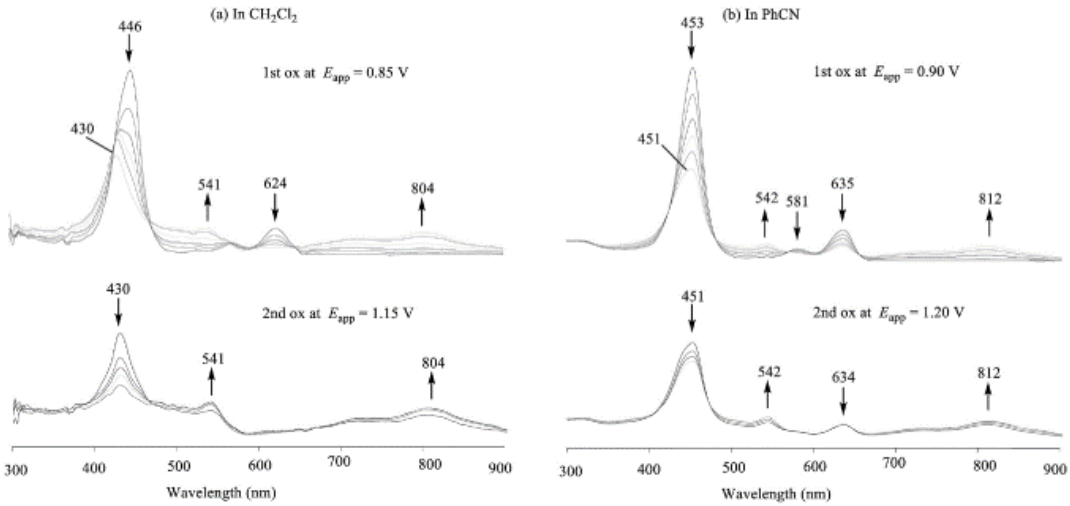


Figure 8. UV/Vis spectral changes of **1 b** during controlled potential oxidation in: a) CH_2Cl_2, and b) PhCN, 0.1 M TBAP.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

absorption cross-section in the 1200 GM range. Further work is under investigation to study the effect of the linker (e.g., heterofluorene vs. carbazole) between the two porphyrin units.

Acknowledgements

The Centre National de la Recherche Scientifique (ICMUB, UMR CNRS 6302) is gratefully thanked for financial support. Support was also provided by the Robert A. Welch Foundation (KMK, grant E-680) and by the CNRS, the Université de Bourgogne and the Conseil Régional de Bourgogne through the 3 MIM integrated project (Marquage de Molécules par les Métaux pour l'Imagerie Médicale). Y.C. thanks the Conseil Régional de Bourgogne for a postdoctoral grant. We are thankful to Dr. Philippe Richard for molecular modeling of **9**. Dr. Fanny Picquet and Mrs. Marie José Penouilh are warmly acknowledged for technical support. The authors are very thankful to Dr. Benoit Habermeyer and Porphychem Company for providing some porphyrin precursors.

Keywords: carbazoles · electrochemistry · Glaser coupling · Sonogashira coupling · synthetic methods

[1] A. Ryan, B. Tuffy, S. Horn, W. J. Blau, M. O. Senge, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8248–8254.
[2] L.-L. Li, E. W. G. Diau, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 291–304.
[3] a) K. Ogawa, *Applied Sci.* **2014**, *4*, 1–18; b) M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3292–3316.
[4] a) E. Dahlstedt, H. A. Collins, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Khurana, B. C. Wilson, D. Phillips, H. L. Anderson, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 897–904; b) M. K. Kuimova, H. A. Collins, M. Balaz, E. Dahlstedt, J. A. Levitt, N. Sergent, K. Suhling, M. Drobizhev, N. S. Makarov, A. Rebane, H. L. Anderson, D. Phillips, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 889–896.
[5] a) C. P. Gros, S. M. Aly, M. El Ojaimi, J.-M. Barbe, F. Brisach, A. S. Abd-El-Aziz, P. D. Harvey, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11*, 244–257; b) C.-H. Lee, H. Yoon, P. Kim, S. Cho, D. Kim, W.-D. Jang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4246–4248; c) Y. Liu, H. Lin, J. Li, J. T. Dy, K. Tamaki, J. Nakazaki, D. Nakayama, C. Nishiyama, S. Uchida, T. Kubob, H. Segawa, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 16703–16712; d) A. Nowak-Król, M. Grzybowski, J. Romiszewski, M. Drobizhev, G. Wicks, M. Chotkowski, A. Rebane, E. Gorecka, D. T. Gryko, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8368–8370; e) A. Ryan, A. Gehrold, R. Perusitti, M. Pintea, M. Fazekas, O. B. Locos, F. Blaikie, M. O. Senge, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5817–5844; f) O. Vamavski, J. E. Raymond, Z. Seok Yoon, T. Yotsutuji, K. Ogawa, Y. Kobuke, T. Goodson, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 28474–28481.
[6] R. D. Hartnell, A. J. Edwards, D. P. Arnold, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 695–707.
[7] C. Glaser, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1869**, *2*, 422–424.
[8] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470.
[9] B. Habermeyer, A. Takai, C. P. Gros, M. El Ojaimi, J.-M. Barbe, S. Fukuzumi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10670–10681.
[10] N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Organomet. Chem.* **1981**, *204-223*, 769.
[11] A. S. Hinman, B. J. Pavelich, A. E. Kondo, S. Pons, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1987**, *234*, 145–162.
[12] M. Drobizhev, A. Karotki, M. Kruk, N. Zh. Mamardashvili, A. Rebane, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *361*, 504–512.
[13] a) Y. Fang, K. M. Kadish, P. Chen, Y. Gorbunova, Y. Enakieva, A. Tsivadze, A. Bessmertnykh-Lemeune, R. Guilard, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2013**, *17*, 1035–1045; b) P. Chen, H. Lau, B. Habermeyer, C. P. Gros, J.-M. Barbe, K. M. Kadish, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2011**, *15*, 467–479; c) Z. Ou, J. Shao, H. Zhao, K. Ohkubo, I. H. Wasbotten, S. Fukuzumi, A. Ghosh, K. M. Kadish, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2004**, *8*, 1236–1247; d) J.-M. Barbe, B. Habermeyer, T. Khoury, C. P. Gros, P. Richard, P. Chen, K. M. Kadish, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 8929–8940; e) R. Guilard, F. Jérome, J.-M. Barbe, C. P. Gros, Z. Ou, J. Shao, J. Fischer, R. Weiss, K. M. Kadish, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 4856–4865; f) R. Guilard, C. P. Gros, J.-M. Barbe, E. Espinosa, F. Jérome, A. Tabard, J.-M. Latour, J. Shao, Z. Ou, K. M. Kadish, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7441–7455; g) K. M. Kadish, Z. Ou, J. Shao, C. P. Gros, J.-M. Barbe, F. Jérome, F. Bolze, F. Burdet, R. Guilard, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3990–4005.

Received: April 25, 2015
Published online on July 14, 2015

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Sébastien PIANT

Nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation biphotonique

EDSC
École Doctorale des Sciences Chimiques

Résumé

Les groupements protecteurs photolabiles sont utilisés pour de nombreuses applications, notamment en neuroscience pour la libération de neurotransmetteurs avec un contrôle spatio-temporel très fin. La démocratisation des lasers pulsés infrarouges a permis la mise au point de nouveaux composés sensibles à l'excitation à deux photons, de plus en plus efficace. Cependant, l'ingénierie moléculaire des cages n'est pas la seule méthode qui peut être utilisée pour améliorer l'efficacité des de ces composés. Mon travail de thèse a ainsi abordé cette problématique sous l'angle de la nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation à deux photons. Nous avons débuté cette étude avec des composés de petite taille (dimère et tétramère) basés sur des groupements photosensible type *ortho*-nitrophénéthyle. Nous avons ensuite fonctionnalisé des dendrimères de type polyamidoamine, cependant les propriétés photophysiques et photochimiques de ces nouveaux composés suggèrent que des interactions intramoléculaires perturbent l'efficacité de la réaction de photolibération. Des dendrimères partiellement fonctionnalisés ont ensuite été envisagés.

Mots clés : groupement protecteur photosensible, absorption à deux photons, PAMAM, nanostructuration, quinuclidine.

Résumé en anglais

Photosensitive protecting groups have been used for many applications, including neuroscience for the release of neurotransmitters with an amazing spatio-temporal control. New compounds sensitive to two-photon excitation were developed with the spread out of pulsed infrared lasers. However, cages molecular engineering is not the only way to improve such compounds. This manuscript focuses on nanostructuration to improve the overall efficiency of two-photon sensitive protecting groups. We started our study with small compound as dimer and tetramer based on the *ortho*-nitrophenethyl architecture. Next, polyamidoamine dendrimers were tested, but photophysics and photochemistry properties of these new compounds suggest that intramolecular interactions disturb photochemical reaction. Synthesis of partially functionalized dendrimer was considering in a next step.

Keywords: photosensitive protecting group, two-photon absorption, PAMAM, nanostructuration.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Sébastien PIANT

Nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation biphotonique

EDSC
École Doctorale des Sciences Chimiques

Résumé

Les groupements protecteurs photolabiles sont utilisés pour de nombreuses applications, notamment en neuroscience pour la libération de neurotransmetteurs avec un contrôle spatio-temporel très fin. La démocratisation des lasers pulsés infrarouges a permis la mise au point de nouveaux composés sensibles à l'excitation à deux photons, de plus en plus efficace. Cependant, l'ingénierie moléculaire des cages n'est pas la seule méthode qui peut être utilisée pour améliorer l'efficacité des de ces composés. Mon travail de thèse a ainsi abordé cette problématique sous l'angle de la nanostructuration de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation à deux photons. Nous avons débuté cette étude avec des composés de petite taille (dimère et tétramère) basés sur des groupements photosensible type *ortho*-nitrophénéthyle. Nous avons ensuite fonctionnalisé des dendrimères de type polyamidoamine, cependant les propriétés photophysiques et photochimiques de ces nouveaux composés suggèrent que des interactions intramoléculaires perturbent l'efficacité de la réaction de photolibération. Des dendrimères partiellement fonctionnalisés ont ensuite été envisagés.

Mots clés : groupement protecteur photosensible, absorption à deux photons, PAMAM, nanostructuration, quinuclidine.

Résumé en anglais

Photosensitive protecting groups have been used for many applications, including neuroscience for the release of neurotransmitters with an amazing spatio-temporal control. New compounds sensitive to two-photon excitation were developed with the spread out of pulsed infrared lasers. However, cages molecular engineering is not the only way to improve such compounds. This manuscript focuses on nanostructuration to improve the overall efficiency of two-photon sensitive protecting groups. We started our study with small compound as dimer and tetramer based on the *ortho*-nitrophenethyl architecture. Next, polyamidoamine dendrimers were tested, but photophysics and photochemistry properties of these new compounds suggest that intramolecular interactions disturb photochemical reaction. Synthesis of partially functionalized dendrimer was considering in a next step.

Keywords: photosensitive protecting group, two-photon absorption, PAMAM, nanostructuration.