HAL
open science

Synthèse et application d'inducteurs de gènes photo-activables pour le contrôle in vivo de l'expression d'un gène

Bastien Goegan

▶ **To cite this version:**

Bastien Goegan. Synthèse et application d'inducteurs de gènes photo-activables pour le contrôle in vivo de l'expression d'un gène. Chimie organique. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAF078 . tel-02003400

HAL Id: tel-02003400

https://theses.hal.science/tel-02003400v1

Submitted on 1 Feb 2019

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 :

Bastien GOEGAN

soutenue le : **10 novembre 2017**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Synthèse et application d'inducteurs de gènes photo-activables pour le contrôle *in vivo* de l'expression d'un gène

THÈSE dirigée par :

Mr. SPECHT Alexandre	Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg
Mr. BOLZE Frédéric	Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr. GAUTIER Arnaud	Maître de conférences, ENS de Paris
Mr. FRANCK Xavier	Directeur de recherche au CNRS, Université de Rouen
Mr. ROMIEU Anthony	Professeur, Université de Bourgogne

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Bastien GOEGAN

soutenue le : **10 novembre 2017**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Synthèse et application d'inducteurs de gènes photo-activables pour le contrôle *in vivo* de l'expression d'un gène

THÈSE dirigée par :

Mr. SPECHT Alexandre	Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg
Mr. BOLZE Frédéric	Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr. GAUTIER Arnaud	Maître de conférences, ENS de Paris
Mr. FRANCK Xavier	Directeur de recherche au CNRS, Université de Rouen
Mr. ROMIEU Anthony	Professeur, Université de Bourgogne

« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but.
Les sciences n'ont pas de fin. »

Erwin Chargaff

REMERCIEMENTS

L'ensemble des travaux réalisés et exposés dans ce manuscrit a été effectué au sein du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives dans l'équipe de Chimie et Neurobiologie moléculaire sous l'encadrement du Dr. Alexandre Specht et du Dr. Frédéric Bolze.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Arnaud Gautier, le Dr. Xavier Franck ainsi que le Prof. Anthony Romieu pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et bien sûr d'avoir pris de leur temps pour lire ces travaux qui m'ont occupé durant ces trois dernières années.

Alexandre, c'est à toi que j'attribue mes remerciements les plus sincères, sans toi l'ensemble de cette aventure n'aurait jamais existé. Au-delà de ces trois années de thèse, tu m'as fait découvrir les joies de la chimie lors de mes premiers stages volontaires il y a maintenant six ans... et tu as su me faire confiance en m'attribuant ce financement de thèse tant convoité alors que je n'étais qu'un étudiant parmi tant d'autres. Bien sûr je te remercie pour l'ensemble de ton encadrement et de ton savoir que j'ai essayé d'acquérir au maximum durant ces trois ans.

Frédéric, mon co-directeur dont l'expertise en photo-physique m'a été d'une grande aide, je te remercie pour l'ensemble des moments que l'on a pu passer ensemble à regarder ton plancton bioluminescent ou encore la jolie fluorescence de nos molécules, mais aussi pour l'ensemble de tes conseils avisés et ta bonne humeur inconditionnelle ; et s'il y a bien une chose que je retiens, c'est EASY.

Thomas, que je considère comme le grand sage de l'équipe, tu as toujours su avoir les mots justes lors de nos nombreuses discussions, j'ai pu apprendre énormément de choses intéressantes à tes cotés lors de ces années, merci pour tout.

Thierry LE gaulois en reconversion viking ou encore le marabout du café, je te remercie pour tout mais plus particulièrement pour toutes nos discussions historiques et sportives qui ont souvent alimenté nos journées, ce fut un réel plaisir et peut-être qu'un jour nous nous recroiserons au Valhalla en compagnie de Ragnar Lodbrok !

Sébastien, Mahboubi, mes collègues ainés des premiers jours qui êtes devenus très vite des amis, je ne vous remercierai jamais assez pour votre présence quotidienne qui a transformé le « lieu de travail » en un endroit où il fait bon vivre. Vous avez également su être des co-équipiers d'exception lors des entrainements de foot mais aussi de redoutables adversaires sur les courts de squash. Merci à vous deux pour votre soutien durant la rédaction, vous avez su me rendre la tâche moins difficile grâce à votre expérience. J'espère que l'on ne se perdra pas de vue !

Laurie, mon binôme de toujours, je te remercie d'avoir été présente durant toutes ces années pour le meilleur et pour le pire. Tu as été une coloc de bureau parfaite, merci de m'avoir enseigné la langue française au jour le jour ainsi que de m'avoir fait découvrir tes talents cachés de danseuse au labo après 19 h !

Elie, je te remercie pour les échanges quotidiens que nous avons pu avoir depuis ton arrivée au laboratoire. Mon anglais s'est considérablement amélioré grâce à toi, enfin je crois…

Juline, Kate, je vous remercie toutes les deux pour votre bonne humeur et vos sourires, je garderai de nombreux souvenirs des moments que l'on a pu partager ensemble. Courage pour la suite !

Je tiens à remercier tous mes amis ainsi que toute ma famille pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ces trois ans de thèse et d'avoir pris le temps d'essayer et de faire semblant de comprendre sur quoi je travaille.

Isabelle, merci d'avoir pris de ton temps pour aider à la relecture de cette thèse.

Papa, merci d'avoir fait en sorte que je puisse faire ces études et que je ne manque de rien durant toutes ses années à Strasbourg.

Anne, ma chère et tendre, c'est toi que je remercie le plus pour tout le soutien que tu m'as apporté durant ces années de thèse et plus particulièrement pour ces deniers mois, dans les moments de doute et de stress. Tu as su m'écouter et me faciliter chaque jour de cette rédaction en t'occupant de moi comme un prince. Merci pour tes nombreuses relectures, je sais que ça n'a pas été facile mais tu l'as fait de bon cœur et je t'en suis reconnaissant ! Je te remercie tout simplement d'être à mes côtés depuis ces nombreuses années et maintenant que les études sont finies, on va enfin pouvoir passer à autre chose.

SOMMAIRE

CHAPITRE I :
Introduction

I.1. Approche optogénétique 4

I.1.1. Channel-rhodopsines 5

I.1.1.1 Les Rhodopsines de type I 5

I.1.1.2 Les Rhodopsines de type II 7

I.1.2. Récepteur chimère d'opsine (optoXR) 8

I.1.3. Les flavoprotéines : BLUF, LOV et CRY2 10

I.2. Approche optochimique appliquée à la génétique 13

I.2.1 Photo-régulation de l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel 13

I.2.1.1 Utilisation d'ARN messagers et d'ARN interférents photo-activables 14

I.2.1.2 Utilisation d'oligonucléotides photoclivables antisens (asODN, ncPNA, morpholino) 19

I.2.2 Photo-régulation de l'expression d'un gène au niveau pré-transcriptionnel 24

I.2.2.1 Utilisation de ligands photo activables (petites molécules inductrices) 24

I.2.2.1.1 Systèmes d'expression de gènes inductibles aux hormones stéroïdiennes ER, GR, Ecdysone 24

I.2.2.1.2 Système d'expression de gènes inductible aux recombinases (CreLox). 29

I.2.2.1.3 Le système d'expression de gènes inductible à la tétracycline (Tet). 35

I.3. Les groupements protecteurs photo-labiles 42

I.3.1 Généralités et fonctionnement 42

I.3.2 Définition d'un groupement protecteur photo-labile idéal 43

I.3.3 Historique 44

I.3.3.1 Le groupement *o*-Nitrobenzyl (*o*-NB) 45

I.3.3.2 Le groupement benzoïne 46

I.3.3.3 Le groupement *p*-hydroxyphenacyl 47

I.3.3.4 Le groupement coumarinyl 48

I.3.3.5 Le groupement nitroindoline 50

I.3.4 L'Excitation bi-photonique 52
I.3.4.1 Généralités 52
I.3.4.2 Vers la conception de groupements protecteurs photo-labiles performants en excitation bi-photonique 55
I.4. Projet 58

CHAPITRE II : Vers la synthèse totale de dérivés tétracyclines photo-activables

II.1 Stratégie 61
II.2 Synthèse totale de dérivés tétracyclines 65
II.2.1 Synthèse du précurseur énone AB 65

CHAPITRE III : Hémi-synthèse de dérivés tétracyclines photo-activables

III.1 Stratégie 70
III.1.1 Une fonction plus réactive que les autres : la fonction amine 70
III.1.2 Sur qu'elle position doit être insérée la fonction amine ? 71
III.2 Hémi-synthèses de dérivés tétracyclines modifiées en position 9 72
III.2.1 Synthèse du dérivé 9-amino-doxycycline 72
III.2.2 Synthèse du dérivé 9-glycylamido-doxycycline 73
III.2.3 Applications biologiques *in vitro* des deux analogues de doxycycline **3** et **5** 74
III.3 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables EANBP 78
III.3.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile (EANBP) 78
III.3.2 Méthodes de couplages 79

III.3.2.1 La fonction chloroformiate comme agent de couplage 79
III.3.2.2 Les carbonates de *N*,*N*-disuccinimydyle comme agents de couplage 81
III.3.3 Propriétés physico-chimiques 83
III.3.3.1 Stabilité 83
III.3.3.2 Solubilité 84
III.3.3.3 Photochimie 84
III.3.3.3.1 Photolyse à 1 photon 84
III.3.3.3.2 Etudes mécanistiques de la réaction photochimique des *o*-nitrophénéthyles (o-NPP) 86
III.3.3.3.3 Hypothèse 88
III.4 Alternative aux groupements protecteurs photo-labiles *o*-NPP 91
III.4.1 Les dérivés coumarines sensibles à l'excitation bi-photonique 91
III.4.2 Mécanisme photochimique des dérivés coumarines 93

CHAPITRE IV :
Synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile de la famille des coumarines

IV.1 Stratégie 97
IV.2 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables OEG4-DEACM 98
IV.2.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile OEG4-DEACM 98
IV.2.2 Méthode de couplage 99
IV.2.2.1 La fonction chloroformiate comme agent de couplage 99
IV.2.2.2 Mécanisme parasite 102
IV.2.2.2.1 Proposition d'un mécanisme 102
IV.2.2.2.2 Alternative par inversion de la position des substituants du cycle triazole 104
IV.3 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables PEG7-DEACM 106
IV.3.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile PEG7-DEACM 106
IV.3.2 Méthode de couplage avec les dérivés amino-doxycyclines 108

IV.3.3 Propriétés physico-chimiques du dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline **34** 109
IV.3.3.1 Photolyse à un photon 109
IV.3.3.2 Stabilité 112
IV.3.3.3 Alternative 116
IV.3.4 Mise au point d'une nouvelle méthode de couplage pour le dérivé 9-glycyl-amido-doxycycline 117
IV.3.4.1 Optimisation du couplage utilisant la fonction chloroformiate 119
IV.3.4.2 Utilisation des carbonates de bis-nitrophénol 121
IV.3.4.3 Synthèse du dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline 35 par l'intermédiaire des carbonates de bis-nitrophénol 122
IV.3.5 Propriétés physico-chimiques du dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** 124
IV.3.5.1 Stabilité en milieu physiologique 124
IV.3.5.2 Photolyse à un photon 126
IV.3.5.3 Dosage de la 9-glycyl-amido-doxycycline relarguée 127
IV.3.5.3.1 Méthode 127
IV.3.5.4 Détermination du rendement quantique de photolyse à un photon (Φ_u) 128

CHAPITRE V :
Vers la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile soluble de la famille des *o*-nitrobenzyles efficace en excitation bi-photonique

V.1 Etat de l'art 133
V.2 Stratégie de synthèse 135
V.3 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables BNPET-OEG4 140
V.3.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 **50**... 140
V.3.2 Méthode de couplage pour le dérivé 9-glycyl-amido-doxycycline 146
V.3.2.1 Utilisation des carbonates de bis-nitrophénol 146
V.4 Etudes photo-physiques du chromophore BNPET 147

V.4.1 Détermination expérimentale de la section efficace d'absorption à deux photons δ_a (ADP) 148
V.4.1.1 Mesure d'une section efficace d'ADP par la méthode de fluorescence 148
V.4.1.1.1 Détermination du rendement quantique de fluorescence ϕf de BNPET: .. 149
V.4.1.1.2 Détermination de la section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) de BNPET : 151

CHAPITRE VI :
Conclusion et perspectives

VI.1 Conclusions 156
VI.2 Perspectives 159

CHAPITRE VII :
Parties expérimentales

VII.1 Partie expérimentale : 163
VII.1.1 Appareils et services 163
VII.1.2 Supports chromatographiques 164
VII.1.3 Solvants et réactifs 165
VII.1.4 Synthèses chimiques 165
VII.1.4.1 Synthèse de l'énone AB 165
VII.1.4.2 Synthèse des analogues de doxycyclines 170
VII.1.4.3 Synthèses des groupements protecteurs photo-labiles et couplages 173
VII.2 Références bibliographiques : 204

ABREVIATIONS

AAV *: virus adéno-associé*
ADN *: Acide désoxyribonucléique*
ADP *: absorption à deux photons*
AMPc *: Adénosine mono phosphate cyclique*
ARN *: Acide ribonucléique*
ARNi *: ARN interférent*
ARNm *: ARN messager*
asODNs *: antisense oligodeoxynucleotides*
ATP *: Adénosine triphosphate*
Bhc *: 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl*
BLUF *: «blue light-utilizing flavin»*
BNPET *: 2,5-Bis-(NitroPhenylEthynyl)Thiophene*
ChR1 *: channelrhodopsins I*
ChR2 *: channelrhodopsins II*
CRY2 *: « plants light-sensitive cryptochrome »*
DDAO *: 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-Acridinone*
DEACM *: 7-N,N-diethylamino-coumarin-4-yl*
DIBAL-H *: « Di-isobutyl Aluminium Hydride »*
DIC *: N,N'-Diisopropylcarbodiimide*, *: N,N'-Diisopropylcarbodiimide*
DMF *: Diméthylformamide*
DMNPE *: 4,5-dimethoxy-2-nitrophenylethyl*
DMSO *: Diméthylsulfoxyde*
EANBP *: 2-(4'-(bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol*
EcR *: « Ecdysone receptor »*
EGTA *: « Egtazic acid »*
ER *: « Estrogen receptor »*
ER LDB *: ER « LigandDomainBinding »*
FAD *: Flavine adénine di-nucléotide*
FMN *: Flavine mono-nucléotide*
GABA *: acide γ-aminobutyrique*
GFP *: « Green fluorescent protein »*
Glu *: Acide glutamique*
GM *: Goeppert-Meyer*
GMPc *: Guanosine mono phosphate cyclique*
GR *: « Glucocorticoid receptor »*
hCMV *: « human cytomegalovirus »*
His *: Histidine*
HPLC *: Chromatographie en phase liquide à haute performance*
HRE *: « Hormone Response Element »*
Hsp90 *: « Heat shock protein »*
IP_3 *: Inositol trisphosphate*
IR *: Infrarouge*
LC-MS *: Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse*
LOV *: « light-, oxygen- or voltage-sensing »*

MCM *: 7-methoxycoumarinyl-4-methyl*
MCM-OH *: hydroxy-7-methoxycoumarinyl-4-methyl*
MO *: morpholino*
ncPNAs *: Negatively Charged Peptide Nucleic Acids*
NI *: Nitroindoline*
NLS *: « Nuclear Localisation Signal »*
NPE *: 1-(2-nitrophenyl)ethyl*
NpHR *: halorhodopsine*
NVOC-Cl *: 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformiate*
OEG *: oligoéthylène glycol*
o-NB *: o-Nitrobenzyl*
o-NPP *: o-nitrophénéthyle*
PBS *: Tampon phosphate salin*
*p*HP *: p-hydroxyphenacyl*
RCPG *: récepteurs couplés aux protéines G*
RISC *: « RNA induced silencing complex »*
RMN *: Résonance magnétique nucléaire*
siRNA *: « small interfering RNA »*
t.a *: température ambiante*
THF *: Tétrahydrofurane*
Thr *: Thréonine*
tR *: temps de rétention*
UV *: Ultraviolet*
α_1AR *: α1 Adrenergic receptor*

CHAPITRE I

INTRODUCTION :

Approches optogénétiques et optochimiques

Durant ces dernières décennies, de nombreux sujets de recherche à l'interface *Chimie-Biologie* ont vu le jour, conduisant à l'émergence de nouvelles approches permettant de mieux appréhender et comprendre la complexité des processus biologiques menant au développement d'organismes multicellulaires. Parmi ces nouvelles approches, la photo-régulation de processus moléculaires à l'aide d'un rayonnement lumineux comme stimuli externe est actuellement en plein essor. L'utilisation de la lumière comme déclencheur est une stratégie très intéressante pour étudier le fonctionnement des processus dans le domaine de la biologie. Il est aujourd'hui techniquement possible d'envoyer des pulses lumineux couvrant des gammes spatiales allant du micromètre (organelles) au centimètre (chez l'animal) ; ainsi que des gammes temporelles allant de la sub-milliseconde (réactions enzymatiques) jusqu'à plusieurs jours (renouvellement de tissus).

La nature a construit depuis bien longtemps des systèmes utilisant la lumière par l'emploi de photorécepteurs (rhodopsines, flavoprotéines, phytochromes) ayant des rôles bien spécifiques. Aujourd'hui, cette spécificité peut être outrepassée grâce à l'optogénétique. Ainsi, en modifiant et en transposant ces systèmes, la communauté scientifique dispose de nombreux outils performants pour comprendre les différents processus biologiques qui constituent notre environnement.

Néanmoins, certains processus moléculaires restent encore incompris car les outils optogénétiques actuels fonctionnent sur un mode tout ou rien et manquent parfois cruellement de précision pour comprendre toutes les voies de signalisation déclenchées.

C'est pourquoi des efforts de recherches ont été entrepris afin d'allier la génétique et la chimie afin d'obtenir des systèmes apportant plus de conditionnalité lors des études, notamment par l'utilisation de la lumière comme déclencheur. Il est aujourd'hui possible de contrôler par l'utilisation de sondes photo-activables un grand nombre d'acteurs tels que l'ADN, l'ARN et les protéines en perturbant leur fonctionnement avec la plus grande spécificité possible ainsi qu'avec une précision spatiale et temporelle élevée.

Nous allons explorer ensemble tout au long de cette introduction les différentes méthodes disponibles dans la boîte à outils du chercheur pour photo-réguler une activité biologique d'intérêt.

I.1. Approche optogénétique

L'optogénétique est un terme largement utilisé par la communauté scientifique pour décrire les techniques développées ces dernières années qui permettent de contrôler l'activité cellulaire, en particulier celle des neurones, en combinant la lumière « opto » avec des molécules photosensibles activatrices initialement présentes dans la protéine ou par l'ajout de modules photosensibles par génie génétique « génétique » (Figure 1).

Un neurone est un type cellulaire qui permet la transmission d'un courant électrique grâce à de nombreux canaux ioniques activés par des petites molécules (appelés récepteurs canaux) qui permettent le passage d'ions à travers sa membrane. Ce flux d'ions va alors déclencher une cascade de signalisation spécifique aboutissant à la transmission de l'influx nerveux. Ces récepteurs canaux ne sont naturellement pas photosensibles. Néanmoins, par le biais de l'optogénétique, il est possible de rendre les neurones photo-sensibles afin de contrôler temporellement leur activité et d'en étudier les mécanismes de signalisation résultants.

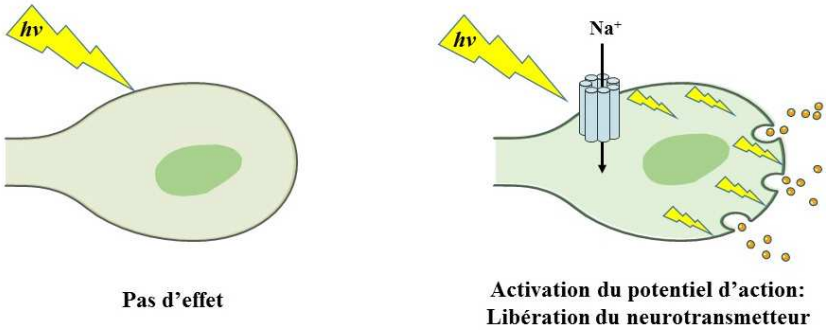


Figure 1 : Principe de l'optogénétique : Une cellule neuronale ne répondant normalement pas à un stimulus lumineux (gauche) peut être rendue photosensible « opto » par l'expression ciblée d'une protéine photosensible d'origine hétérologue « génétique » (droite). Dans cet exemple, un canal sodique est activé par la lumière permettant la libération de neurotransmetteurs suite à la dépolarisation de la membrane.

I.1.1. Channel-rhodopsines

I.1.1.1 Les Rhodopsines de type I

La première famille de protéines à avoir fait l'objet d'études pour le développement d'une approche optogénétique est celle des Rhodopsines de type I que l'on retrouve dans les algues vertes unicellulaires (*Chlamydomonas reinhardtii*). Parmi cette famille de Rhodopsines, on retrouve deux types de protéines respectivement nommées channelrhodopsin I (ChR1) qui est un canal ionique sélectif aux protons et channelrhodopsin II (ChR2) qui est canal ionique sélectif aux cations (Na^{2+}, Ca^{2+}) pour lequel nous porterons un intérêt particulier dans la suite de ce chapitre.

A travers une étude menée par le laboratoire d'Ernst Bamberg, il a été démontré, que les channelrhodopsins II (ChR2) exprimées dans des oocytes agissaient directement comme des canaux cationiques sensibles à la lumière (Nagel *et al.,* 2002, 2003). En effet, en irradiant des cultures de cellules exprimant cette protéine dans le visible, ils ont été en mesure d'ouvrir le canal et d'observer une perméabilité aux cations mono et bivalents. A l'inverse, la fermeture du canal a également été observée lorsque l'illumination était arrêtée.

Cette expérience a permis de confirmer l'hypothèse de l'implication de ces récepteurs canaux dans la phototaxie (phénomène par lequel des bactéries ou autres organismes uni- ou pluricellulaires se dirigent dans l'espace en fonction de la lumière présente dans leur environnement).

Ces canaux-rhodopsines (ChR2) sont constitués de sept segments transmembranaires auxquels un chromophore, le rétinal, est lié de façon covalente. Le rétinal possède une double liaison capable de s'isomériser de la forme tout-trans vers la forme 13-cis suite à l'absorption de la lumière bleue (Figure 2). C'est l'isomérisation de cette double liaison qui est à l'origine de l'ouverture du canal en poussant légèrement les segments transmembranaires qui le constitue. Ainsi les cations qui passent à travers ce canal peuvent déclencher différentes voies de signalisation.

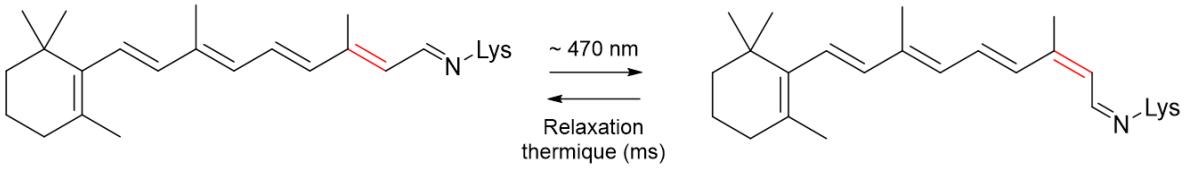


Figure 2 : Isomérisation du déhydrorétinal tout trans vers la forme 13-cis-3,4-dehydrorétinal suite à l'irradiation d'un canal rhodopsine microbien à 470 nm.

Suite à l'identification de ces ChR2 photosensibles, cette famille de protéines a fait l'objet d'une attention particulière en neurosciences. En effet, grâce aux manipulations génétiques, ces canaux sont devenus des outils performants pour la photo-stimulation des neurones chez les eucaryotes.

Par exemple, l'équipe de Georg Nagel et Karl Deisseroth a construit par génie génétique le premier système permettant la photo-dépolarisation (activation) membranaire de neurones de rats en culture, ainsi que dans des tranches de cerveau, à l'échelle de la milliseconde (Boyden *et al.,* 2005).

Ils ont également mis au point la stratégie inverse par hyperpolarisation (inhibition) de la membrane neuronale par l'intermédiaire d'une autre protéine de la famille des Rhodopsines de type I appelée halorhodopsine (NpHR) retrouvée chez l'Archée *Halobacterium Natronomonas*. Cette protéine forme un canal ionique sélectif aux anions chlorures (Cl^-) dont l'ouverture induite par irradiation du rétinal à 580 nm va permettre de pomper des anions chlorure vers le cytoplasme, ce qui déclenche l'hyperpolarisation correspondante.

A travers ces deux exemples, nous venons de voir que les Rhodopsines de type I, par l'intermédiaire des protéines ChR2 et NpHR, permettaient de contrôler précisément et rapidement le potentiel membranaire d'un neurone (Excitation/Inhibition) par l'intermédiaire d'un flux d'ions photo-induit. Bien que très puissant, cet outil ne permet pas la modulation spatiale et temporelle de processus intracellulaires uniques, puisque l'ensemble des canaux va être affecté lors des irradiations, ce qui peut potentiellement entrainer l'activation d'autant de voies de signalisation possibles.

I.1.1.2 Les Rhodopsines de type II

Quelques années plus tard, des études similaires ont été effectuées sur un autre type de Rhodopsine que l'on retrouve cette fois-ci uniquement chez les eucaryotes. Il s'agit de la Rhodopsine de type II jouant un rôle important dans le phénomène de vision (mais également au niveau du rythme circadien) (Sakmar, 2002).

Cette famille de Rhodopsine de type II est également constituée de protéine ChR2 et fonctionne de la même façon que la rhodopsine de type I mais contient un chromophore différent. En effet, le rétinal n'est plus lié de façon covalente aux segments transmembranaires et l'isomérisation de ce dernier à 500 nm (Figure 3) va entrainer son déplacement du canal par hydrolyse de la protéine (Hofmann *et al.,* 2009).

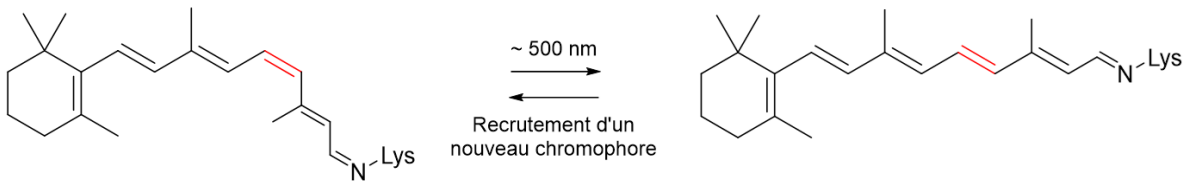


Figure 3 : Isomérisation du 11-cis rétinal vers la forme tout-11-trans suite à l'irradiation de la protéine channelrhodopsins II à 500 nm. Le recrutement d'une nouvelle molécule de rétinal est nécessaire pour réinitialiser le récepteur.

Afin de restaurer la conformation initiale du récepteur, la Rhodopsine de type II doit recruter un nouveau chromophore rétinal, ce qui a pour conséquence des temps de réinitialisation plus longs que pour la Rhodopsine de type I (10-12 ms dans un neurone) limitant ainsi la précision temporelle du système conduisant à de multiples artéfacts (Fenno *et al.,* 2011).

Il est important de mentionner qu'en regard des Rhodopsines bactériennes de type I, ces Rhodopsines de type II sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces protéines G sont impliquées dans la transmission de signal depuis le récepteur vers différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée.

Ces travaux ont nourri l'espoir de pouvoir étudier une voie de signalisation unique en développant des récepteurs chimériques photosensibles à base de Rhodopsine de type II, que nous allons aborder dans la partie suivante, afin de pouvoir photo-contrôler un messager secondaire via les protéines G.

I.1.2. Récepteur chimère d'opsine (optoXR)

Le succès rencontré par l'utilisation de ces récepteurs rhodopsines photosensibles en optogénétique a suscité un grand intérêt pour le développement d'un nouveau système apportant un meilleur contrôle spatio-temporel dans le but de découvrir de nouvelles protéines naturelles engagées dans d'autres processus intracellulaires. Par exemple, une bonne compréhension des voies de signalisation secondaires est cruciale étant donné qu'elles sont impliquées dans d'innombrables processus en biologie cellulaire (potentiels membranaires, concentrations ioniques, mobilité cellulaire, expression de gène, croissance et division cellulaires etc...).

Ainsi les récepteurs rhodopsines chimériques appelés « opto-X-Rs » ont été développés du fait de la présence redondante des RCPG impliqués dans le fonctionnement des voies de signalisation secondaires chez beaucoup d'eucaryotes. Ce concept de récepteur chimère consiste à remplacer les boucles du domaine intracellulaire de la Rhodopsine de type II (Figure 4A) par d'autres domaines de RCPG spécifiques (tels que des récepteurs adrénergiques) donnant accès à de nouveaux outils d'étude (Figure 4B et C). Suite à une irradiation lumineuse, ces systèmes, contrairement au récepteur natif, vont déclencher une seule voie de signalisation par l'intermédiaire d'un seul messager comme la guanosine mono phosphate cyclique (GMPc), l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc) ou encore l'inositol triphosphate (IP_3). Chacun de ces messagers étant impliqué dans des cascades de voies de transduction intracellulaire spécifiques, il est alors possible d'étudier les conséquences physiologiques de chacun sur le système étudié.

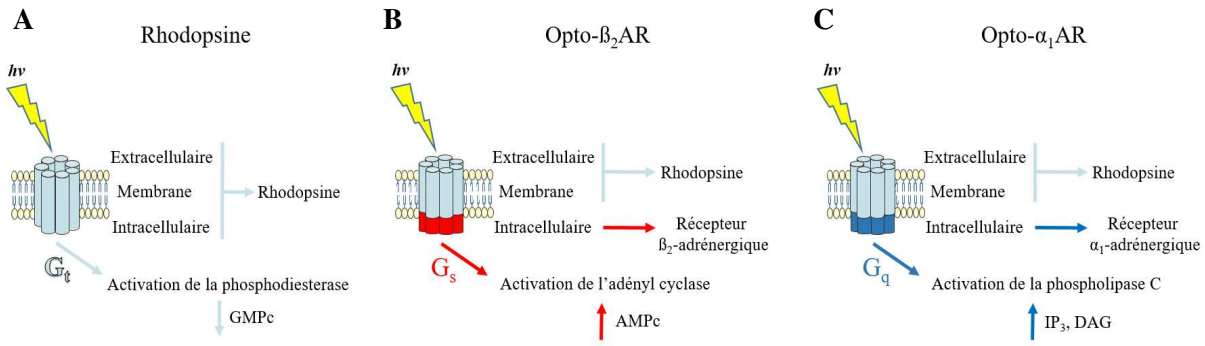


Figure 4 : OptoXR : Contrôle optogénétique d'un signal de transduction intracellulaire provenant de différents messagers secondaires A) GMPc, B) AMPc ou C) IP_3.

Par exemple, l'équipe de Hannah Bernstein et de Karl Deisseroth a mis en évidence une voie de signalisation secondaire unique utilisant un messager spécifique en étudiant le comportement d'une souris exprimant le récepteur chimérique opto-α_1AR (récepteur adrénergique) (Airan et al. 2009) (Figure 4C). A travers cette étude, ils ont pu montrer qu'ils étaient capables de contrôler le comportement du rongeur à l'aide de flashs lumineux stimulant les noyaux accumbens (impliqués dans le système de récompense et d'assuétude) exprimés au préalable dans le système opto-α_1AR.
L'utilisation de cette rhodopsine chimérique a permis d'apporter un contrôle spatio-temporel élevé afin de mettre en évidence une partie des voies de signalisation utilisant des messagers secondaires dans le cerveau de rat à l'échelle *in vivo.*

Nous venons de voir que les Rhodopsines, pionnières dans le domaine, ont principalement été utilisées en tant qu'outil permettant de contrôler *in vivo* l'activité neuronale depuis les années 2000. A ce jour, des efforts majeurs dans le screening d'autres Rhodopsines naturelles ont été entrepris, aboutissant à la création de nombreuses protéines chimériques de sorte à pouvoir couvrir le plus de cibles et de fonctions biologiques possibles avec des longueurs d'ondes d'irradiations variables (Fenno *et al.,* 2011).
Bien qu'ayant largement participé à la compréhension de nombreux mécanismes cellulaires, l'utilisation des Rhodopsines comme outil moléculaire présente certaines limites non négligeables : manque de précision temporelle, niveau de désensibilisation élevé réduisant le courant électrique de l'ordre de 80 % à pH physiologique, formation d'agrégats intracellulaires à haute concentration d'expression (Lin *et al.,* 2009).

Le cocktail formé à la fois des étonnantes avancées et des limitations de ces Rhodopsines a poussé les biologistes à agrandir leur « boite à outils » optogénétique en explorant une nouvelle catégorie de protéines naturelles photosensibles et solubles : les Flavoprotéines.

I.1.3. Les flavoprotéines : BLUF, LOV et CRY2

Ce sont des protéines photo-réceptrices naturellement présentes dans la plupart des cellules dont la structure principale est composée d'un chromophore flavine, celui-ci pouvant être lié à deux cofacteurs différents aboutissant alors à une flavine adénine di-nucléotide (FAD) ou à une flavine mono-nucléotide (FMN). Jusqu'à présent, trois types majeurs de flavoprotéines ont fait l'objet d'études : les « blue light-utilizing flavin » (BLUF) protéines, les « light-, oxygen- or voltage-sensing » (LOV) protéines et les « plants light-sensitive cryptochrome » (CRY2).

Ces photo-senseurs BLUF et LOV sont des candidats idéals pour des études optogénétiques comparé à leurs prédécesseurs (opsines) pour trois raisons majeures : ils sont solubles, de petite taille (100 à 140 acides aminés) et utilisent un chromophore flavine présent dans quasiment tous les types cellulaires.

Ce dernier, par différents mécanismes photochimiques (Figure 5), va induire un changement de conformation du récepteur. Selon le système étudié, ces changements de conformation impliquent le mouvement des extrémités C terminales des hélices α déclenchant différents types d'interactions protéines-protéines d'intérêt (Ahmad, 2016; Christie *et al.,* 2012). Ces interactions inter-protéines sont à l'origine du déclenchement de la cascade de signalisation intracellulaire.

Aujourd'hui, ces systèmes permettent la photo-régulation d'une grande variété de protéines cellulaires impliquées dans la transcription de l'ADN (Kennedy *et al.,* 2010), dans la translocation des protéines (Chen *et al.,* 2013), dans les activités enzymatiques (Raffelberg *et al.,* 2013), dans des voies de signalisation (Stierl *et al.,* 2011), dans la dégradation protéique (Renicke *et al.,* 2013) ou encore dans de très rares cas, dans l'expression de gènes *in vivo* (Schindler *et al.,* 2015; Wang *et al.,* 2012). Ces deux équipes ont par exemple réussi à photoréguler l'expression de gènes in *vivo* en irradiant leur système pendant plusieurs heures (2-15h) sous illumination ultraviolette (UV).

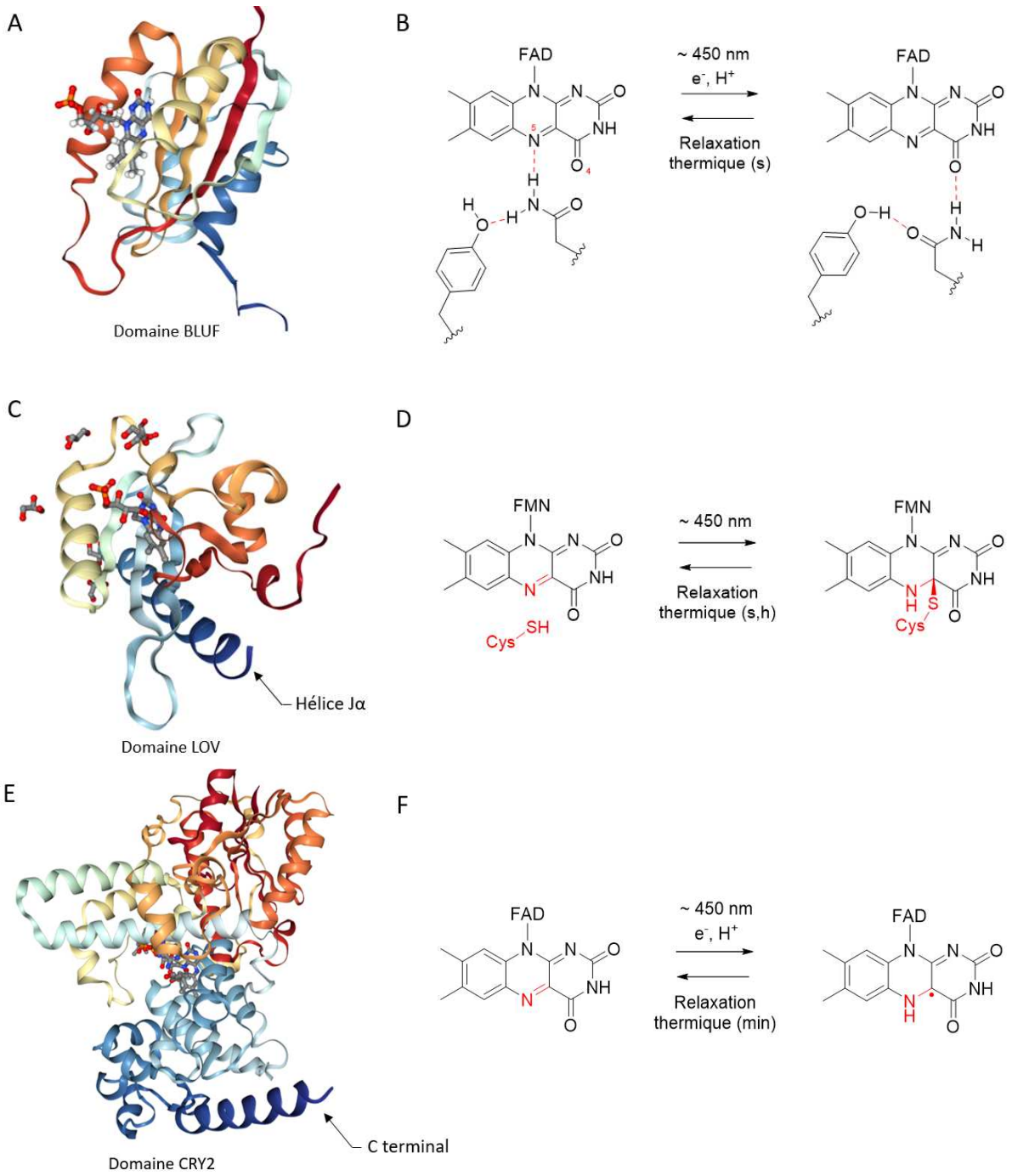


Figure 5 : Structures et photochimie des domaines BLUF, LOV et CRY2

(A) Domaine BLUF de *Klebsiella pneumonia* BlrP1 (PDB ID : 2KB2) (Wu and Gardner, 2009). La structure est représentée en ruban et le chromophore flavine en modèle bâtonnet.
(B) Photochimie du domaine BLUF. Une excitation photonique va induire le transfert d'électrons du résidu tyrosine conservé vers le chromophore flavine conduisant au réarrangement des liaisons hydrogènes N5 et O4.
(C) Domaine LOV de *Avena sativa* (oat) phot1 (PDB ID : 2V0U) (Halavaty and Moffat, 2007). La structure est représentée en ruban et le chromophore flavine en modèle bâtonnet.
(D) Photochimie du domaine LOV. Une excitation photonique va permettre la formation d'un adduit par liaison covalente thiol entre la position C4 du cycle isoalloxazine du chromophore et un résidu cystéine conservé de la protéine.
(E) Domaine CRY2 de *Arabidopsis thaliana* (PDB ID : 1U3C) (Ahmad, 2016). La structure est représentée en ruban et le chromophore flavine en modèle bâtonnet.
(F) Photochimie du domaine CRY2. Une excitation photonique va permettre le transfert d'un électron du résidu tryptophane conservé vers le chromophore flavine permettant sa réduction.

A travers ces différents types de récepteurs, nous avons vu que les outils développés par une approche optogénétique basée sur des flux d'ions sont très puissants. L'adaptation de certains systèmes d'intérêt présents dans la nature a pu faire ses preuves quant à l'élucidation de divers processus biologiques chez des organismes multicellulaires. Néanmoins, pour aller plus loin, ces systèmes commencent à montrer leurs limites. En effet, pour mener des études nécessitant l'emploi de systèmes d'expression de gènes complexes, l'optogénétique n'en est qu'à ses balbutiements et n'a pour le moment pas été en mesure de mettre au point des systèmes totalement efficaces, ces derniers faisant l'objet d'un manque de spécificité évident et demandant des temps d'irradiation bien souvent incompatibles avec les exigences de l'expérimentation *in vivo*. De plus, les manipulations génétiques actuelles ne permettent pas d'exprimer la protéine d'intérêt à l'échelle de la cellule unique. Par conséquent, l'amélioration de tels systèmes doit passer par la recherche de nouvelles protéines adaptées ou bien faire appel à une autre approche : l'optochimie appliquée à la génétique.

I.2. Approche optochimique appliquée à la génétique

De façon générale, l'ARN est connu comme étant une molécule essentielle impliquée dans divers rôles biologiques. Ceux qui nous intéressent plus particulièrement ici sont les ARN impliqués dans la régulation de l'expression des gènes : l'ARN messager (ARNm) et les ARN interférents (ARNi).

Au cours de ces dernières années, ces deux types d'ARN respectivement impliqués dans le gain ou dans la perte de fonction au niveau du phénotype sont devenus les outils les plus utilisés pour étudier l'expression d'un gène. Cependant, il est aujourd'hui très difficile de réguler de telles molécules par le biais d'une approche strictement basée sur l'optogénétique. Face à cette difficulté, il est courant de procéder à des micro-injections d'ARMm/ARNi exogènes dans des embryons pour étudier les premiers stades embryonnaires. Bien que ce système soit simple et rapide d'utilisation, son manque de conditionnalité limite grandement son utilité pour étudier des gènes ayant des fonctions pléiotropes durant l'embryogénèse. Rendre ces ARNm/ARNi spatialement et temporellement contrôlables par l'utilisation de la lumière comme activateur élargirait leur portée d'utilisation.

C'est pourquoi l'utilisation d'une approche chimique impliquant des éléments synthétiques semble préférable au profit d'une approche strictement optogénétique, étant donné que les contraintes architecturales moléculaires imposées par la nature sont nombreuses.

I.2.1 Photo-régulation de l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel

Un des concepts les plus prometteurs permettant de photoréguler l'expression d'un gène est de faire appel aux ARN « cagés », concept dans lequel l'ARN est inactivé par liaison covalente à un groupement protecteur photo-labile (que nous développerons en troisième partie) puis réactivé par photolyse à l'aide d'une irradiation lumineuse appropriée (Figure 6).

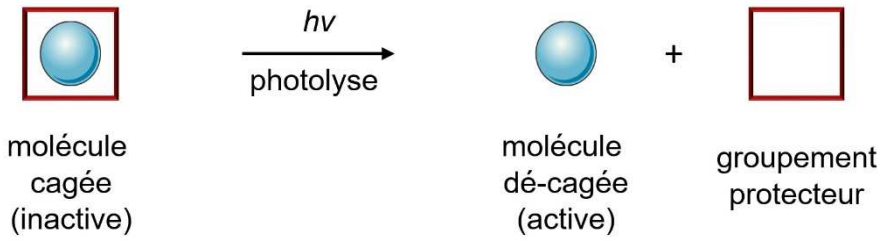


Figure 6 : Concept général d'une réaction photolytique conduisant à la libération de la molécule d'intérêt ainsi qu'un sous-produit de réaction.

Il est possible de photoréguler l'expression d'un gène en jouant sur le devenir de l'ARN cible selon deux approches distinctes. Celles-ci vont se servir de ces groupements protecteurs photo-labiles pour imposer une gêne stérique ayant deux conséquences possibles :

- l'inhibition de la traduction de l'ARNm
- la dégradation de l'ARNm par des enzymes

Dans les deux cas de figure la perturbation engendrée va permettre de réguler le taux de protéines influençant directement le phénotype ciblé.

I.2.1.1 Utilisation d'ARN messagers et d'ARN interférents photo-activables

Avant même de parler de dégradation d'ARNm ou bien d'inhibition du processus de traduction, Steven Chaulk et Andrew MacMillan ont été les premiers à utiliser le concept d'ARN « cagé » (Chaulk and MacMillan, 1998). Comme preuve de concept, ils ont à travers cette étude « cagé » un ribozyme de type « Hammerhead » qui est un segment d'ARN ayant pour fonction de catalyser des réactions de trans-estérification intramoléculaires de site spécifique sur une molécule d'ARN. A l'aide d'un groupement protecteur photo-labile de la famille des *o*-(2-nitrobenzyl), ils ont « cagé » l'ARN ribozymal par son extrémité nucléophile 2'-hydroxy, ce qui a pour conséquence la perte de sa fonction de catalyse, restaurée après photolyse du groupement protecteur photo-labile à 308 nm (Figure 7).

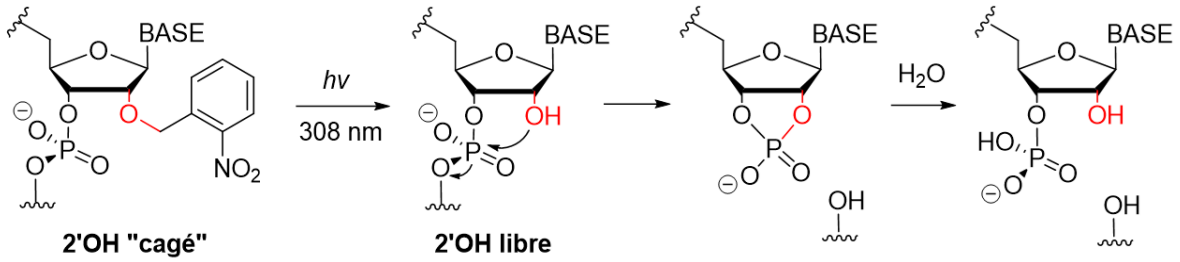


Figure 7 : Photolyse d'un ribozyme cagé en position 2' conduisant à la libération de la forme 2'OH libre responsable des réactions de trans-estérification intramoléculaires

A travers cette étude, cette équipe n'a mis en évidence aucun processus conduisant à la régulation d'une protéine et donc de gènes mais a validé le concept « d'uncaging » par lequel il est possible d'empêcher des réactions programmées par le vivant de s'effectuer et d'en étudier les conséquences.

Dans une autre étude pionnière, l'équipe de Steven Alexander et Frederick Hasselton a cette fois tenté d'agir directement au stade de la transcription. Ainsi, ils ont essayé de contrôler spatialement et temporellement l'expression d'une protéine GFP initialement transfectée dans des cellules HeLa, en « cageant » la fonction phosphodiester de l'ADN avec le groupement protecteur 4,5-dimethoxy-2-nitrophenylethyl (DMNPE) (Figure 8) (Monroe *et al.,* 1999).

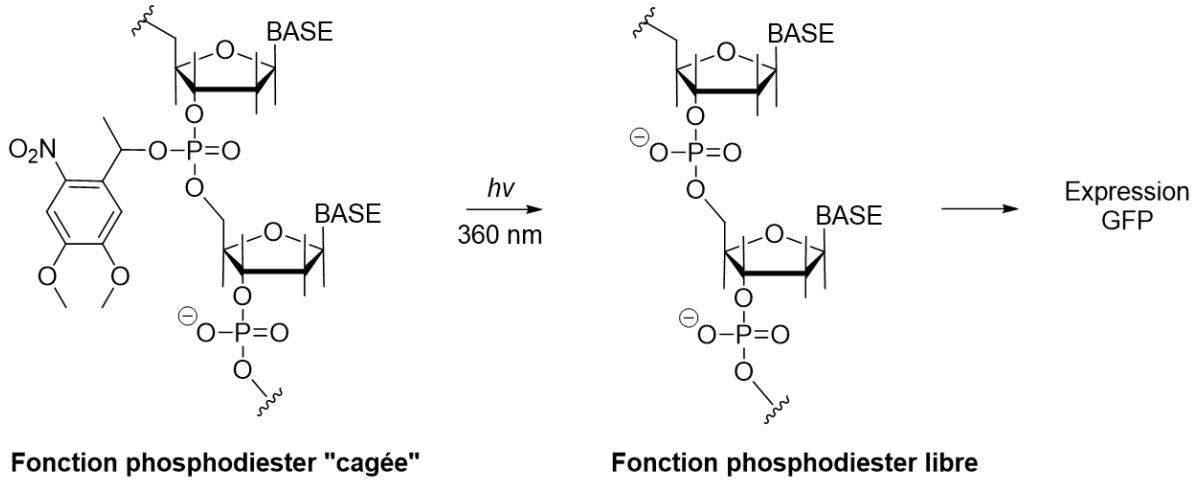


Figure 8 : Photolyse d'un fragment d'ADN cagé à l'aide du groupement protecteur photo-labile DMNPE sur une des fonctions phosphodiesters conduisant à la libération de l'ADN codant pour une GFP. (Une seule cage est représentée pour simplifier)

En comparant le plasmide « cagé » au plasmide intact exprimant la GFP, ils ont été en mesure de masquer une partie de son expression à hauteur de 75 %. L'activité basale restante est en partie expliquée par un nombre aléatoire de groupements protecteurs photo-labiles fixés sur l'ensemble de la structure de l'ADN qui n'a pas suffi à masquer la totalité de la séquence responsable du gène ciblé. Par exemple, sur deux fonctions phosphodiesters présentes, une seule fonction a été aléatoirement cagée (Figure 8).

Ces deux études pionnières ont montré qu'il était possible de « cager » des molécules d'ARN/ADN avec plus ou moins de facilité, ouvrant ainsi la porte à de futures expérimentations, par exemple dans l'embryon. Néanmoins, pour étudier les mécanismes évoluant dans les premiers stades embryonnaires, il est important d'avoir recours à des groupements protecteurs photo-labiles dont la photolyse *in vivo* nécessite un minimum d'énergie afin de réduire au maximum les photo-dommages sur le tissu embryonnaire. De plus, il est indispensable de procéder à une fonctionnalisation de la position 3' phosphodiester ou 2' hydroxyl à l'aide de groupements protecteurs de façon la plus abondante possible pour éviter une activité basale trop intense.

Pour répondre à cette nouvelle problématique, l'équipe de Hitoshi Okatomo a cagé les liaisons phosphodiesters de l'ARN de manière aléatoire à l'aide de la 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc) à raison de 30 Bhc par kilobase d'ARN de sorte à minimiser le nombre de liaisons phosphodiesters libres (Figure 9 A) (Ando et al. 2001).

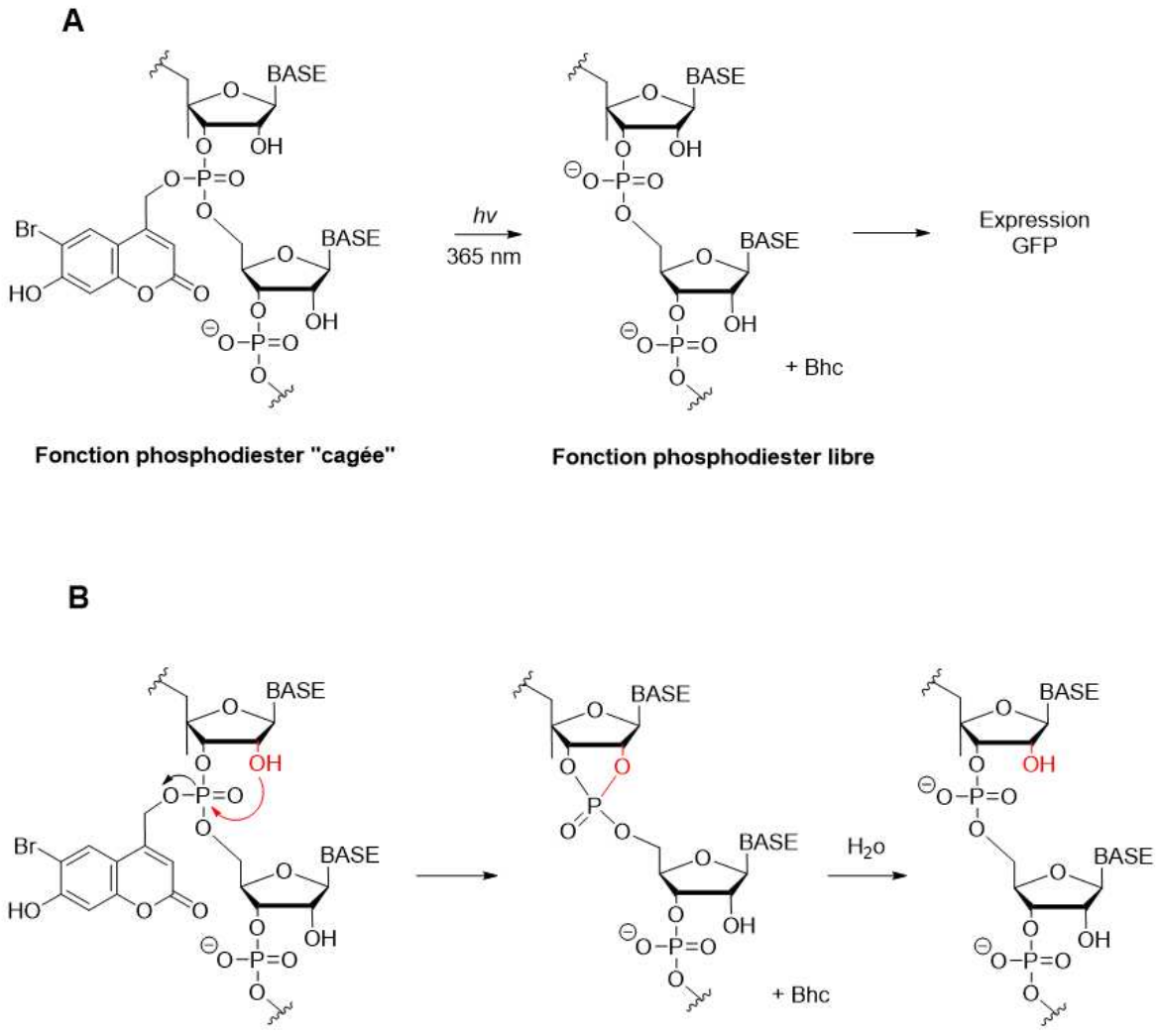


Figure 9 : A) ARNm cagé aléatoirement en position 5' phosphodiester à l'aide d'une coumarine (Bhc). Le produit de photolyse de cet ARNm « cagé » permet d'exprimer la GFP. **B)** Attaque intramoléculaire entre l'extrémité nucléophile 2'-OH du ribose et la liaison « cage »-phosphotriester étant responsable du caractère instable de cet ARNm « cagé ». Suite à l'hydrolyse, l'ARN va engendrer de l'activité basale avant même d'avoir été photolysé. (Une seule « cage » est représentée pour simplifier)

Comme preuve de principe, ils ont « cagé » un ARNm codant pour les gènes rapporteurs de GFP et de *ß*-galactosidase et les ont injectés dans l'embryon de poisson zèbre. L'irradiation UV à 365 nm de ces rapporteurs « cagés » induit comme attendu leur expression, mais représente seulement 10 % du signal par rapport à une micro-injection référence d'ARNm.
De plus, l'irradiation entraine un faible saut de concentration limitant leur utilisation pour un grand nombre d'expérimentations.

Cette nouvelle étude a permis de montrer que malgré l'utilisation d'une nouvelle « cage », cette stratégie « d'ARNm cagé » comportait toujours les deux mêmes problèmes :

- Faible saut de concentration étant expliqué par une mauvaise efficacité de photolyse. On parle dans cet exemple de procéder à la photolyse simultanée de trente groupements protecteurs photo-labiles par kilobase d'ARN.
- Un niveau d'expression basal non négligeable expliqué en partie par l'instabilité chimique de ces ARNm « cagés » avant photolyse faisant état d'attaques intramoléculaires entre les extrémités nucléophiles 2'-OH du ribose et les liaisons cage-phosphotriester (Figure 9 B).

Suite à ces conclusions, différentes équipes ont essayé de réguler l'expression d'un gène en contrôlant la machinerie par l'utilisation de « small interfering RNA » (siRNA). En effet, ces duplex d'ARN d'une vingtaine de nucléotides peuvent être employés pour inhiber l'expression d'un gène dans une séquence spécifique donnée par l'intermédiaire du processus d'ARN interférent (Dykxhoorn *et al.,* 2003). Dans ce processus, le siRNA va se lier à un complexe protéique (RISC : « RNA induced silencing complex ») ayant pour fonction la dégradation de l'ARNm cible, cette destruction étant rendue possible du fait de la complémentarité entre l'ARNm et le brin antisens du siRNA.

En rendant ces siRNA photosensibles par l'utilisation de groupements protecteurs photo-labiles, ils ont également pu être étudiés suivant le concept d'« uncaging » vu précédemment. Ainsi, en liant un groupement protecteur sur ces siRNA par liaison covalente, il est possible d'empêcher l'interaction siRNA-RISC par blocage stérique prévenant toute dégradation de l'ARNm cible. A l'inverse, la photo-libération du siRNA suite à une irradiation lumineuse va, à terme du processus, engendrer le clivage de l'ARNm inhibant l'expression du gène ciblé.

L'équipe de Simon Friedman a été la première à utiliser ce concept de siRNA « cagé » (Shah *et al.,* 2005) en dérivant le système de « GFP-targeting siRNA » développé par l'équipe de Ya-Lin Chiu et Tariq Ranade en y couplant un groupement protecteur photo-labile de type DMNPE sur les liaisons phosphodiesters à raison de 1,4 groupements par duplex de siRNA (Figure 10) (Chiu and Rana, 2002).

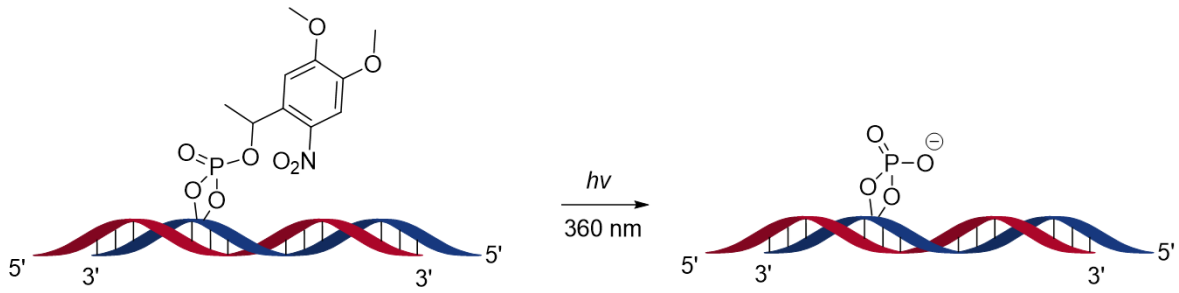


Figure 10 : Représentation du concept de siRNA cagé par le groupement protecteur photo-labile DMNPE.

Dans cette étude, l'équipe de Simon Friedman a co-transfecté deux séquences dans des cultures cellulaires, l'une contenant le siRNA responsable de la dégradation de l'ARNm exprimant la GFP et l'autre contenant un siRNA contrôle n'ayant aucun effet sur l'expression de la GFP. L'irradiation UV de leurs cellules a conduit à l'inhibition de l'expression du gène comme attendu. Néanmoins l'absence d'irradiation conduit également à l'inhibition du gène cible par une activité basale inversement proportionnelle au nombre de « cages » présentes sur le siRNA cible.

Ils ont également montré que le fait d'augmenter le nombre de groupements protecteurs photo-labiles sur les duplex de siRNA permettait de diminuer cette activité basale mais conduisait également à une large augmentation de la cytotoxicité. En effet, la quantité d'énergie nécessaire pour procéder à la photo libération de l'ensemble des groupements protecteurs photo-labiles devenait trop importante.

Suite à cette étude, de nombreuses modifications ont été faites dans le but de minimiser le plus possible cette activité résiduelle en travaillant sur l'extrémité 5' du siRNA (Shah and Friedman, 2007), sur le remplacement de l'extrémité 2' OH nucléophile du ribose par un fluor (Blidner *et al.,* 2008), directement sur le double brin d'ARN (précurseur des siRNA) avant qu'il ne soit pris en charge par la nucléase DICER (Shah *et al.,* 2009), ou encore sur l'utilisation d'un groupement protecteur plus volumineux (Jain *et al.,* 2011). Néanmoins, toutes ces tentatives ont conduit à de minimes améliorations n'abrogeant toutefois pas les limites de ces siRNA « cagés » en termes de résolution spatio-temporelle et d'efficacité de photo-conversion.

En conclusion, peu importe le type d'ARN/ADN ciblé, ces résultats indiquent que ces problèmes (activité basale intense et instabilité chimique) sont inhérents à l'approche utilisant le concept d'ARN/ADN « cagés » sur les positions nucléobase/phosphodiester.

I.2.1.2 Utilisation d'oligonucléotides photoclivables antisens (asODN, ncPNA, morpholino)

Bien que l'utilisation d'ARN interférents soit une méthode efficace pour les études de perte de fonction chez le ver ou la drosophile, elle est beaucoup moins employée chez les organismes tels que le poisson zèbre ou encore chez xenope. De plus, leur activité résiduelle, leur cytotoxicité combinée à la faible résistance *in vivo* du double brin d'ARN ont pour conséquence de restreindre leurs applications aux stades préliminaires du développement. Ainsi des oligonucléotides non naturels synthétiques photo-activables ont vu le jour et peuvent potentiellement surpasser certaines de ces limitations.

La fixation d'un oligonucléotide synthétique, appelé antisens, sur une séquence complémentaire d'un ARNm choisi pour cible peut entrainer l'inhibition de la synthèse protéique correspondante. Deux mécanismes sont responsables de cette inhibition : le ribosome n'ayant plus accès au simple brin de l'ARNm en question, l'étape de traduction va alors être interrompue (Figure 11 A), ou bien l'appariement de l'oligonucléotide antisens à l'ARNm cible va entrainer la dégradation de ce dernier par le recrutement d'une RNase-H (Figure 11 B).

En modifiant chimiquement ces oligonucléotides antisens à l'aide d'attaches photosensibles (PS) par l'intermédiaire d'un lien photoclivable contenant un dérivé nitrobenzyle (*o*-NB) (Figure 11C), il a été possible de leur conférer des propriétés photochimiques intéressantes permettant de les manipuler avec un contrôle temporel élevé. Il s'agit là d'un moyen de photoréguler artificiellement et de façon spécifique l'expression du gène cible. Cette approche a l'avantage de ne plus avoir à « cager » l'ensemble des fonctions présentes sur l'ARNm, ce qui entraine des activités basales bien plus faibles que par l'approche de « caging » vue dans la partie précédente. Néanmoins cette nouvelle approche nécessite un design précis afin de synthétiser des oligonucléotides antisens uniques ayant une affinité la plus grande possible pour chaque ARNm étudié.

Nous allons maintenant passer en revue les trois types d'oligonucléotides antisens les plus courant ayant fait l'objet d'études pour photo-contrôler la régulation de gènes.

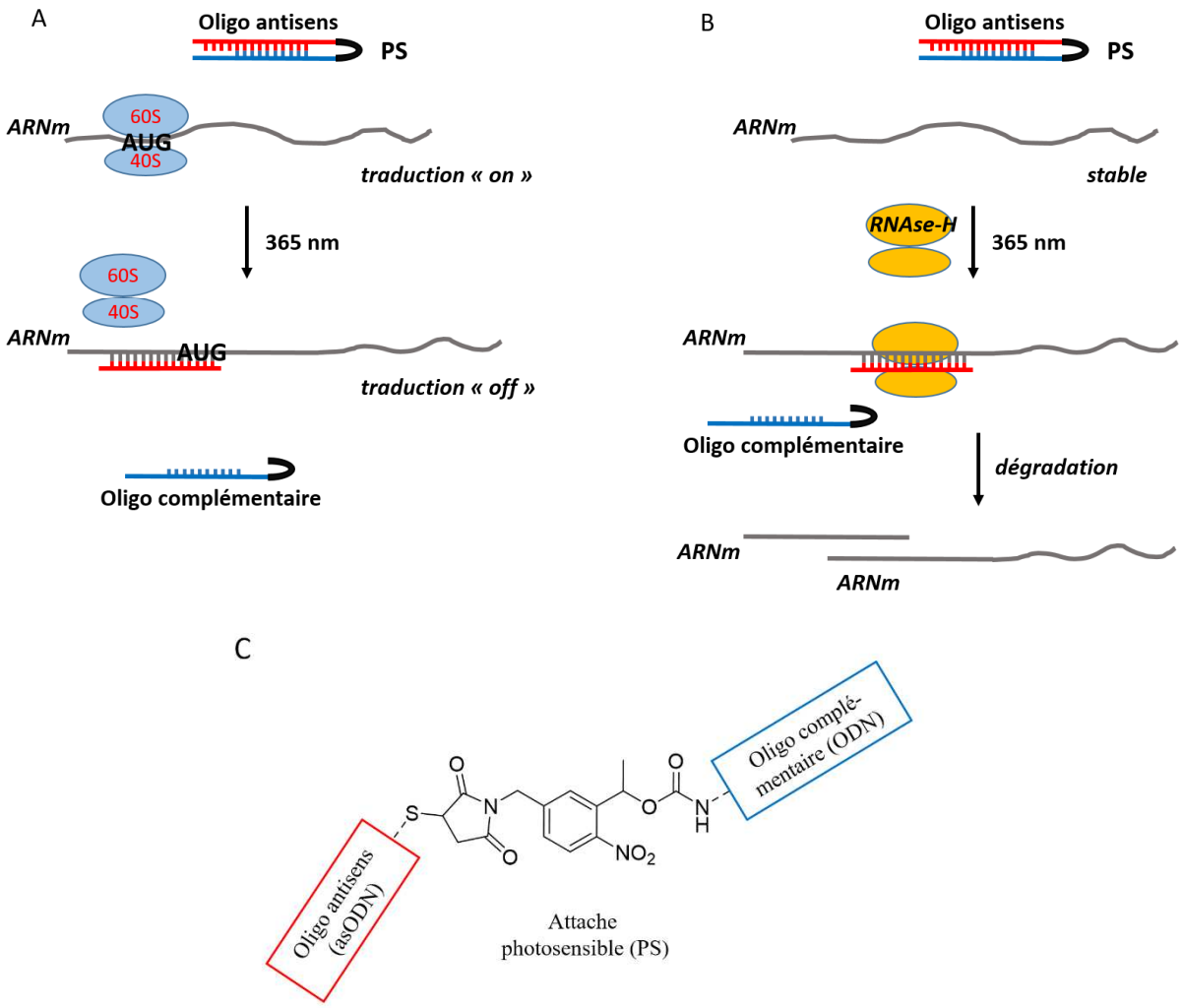


Figure 11 : Différentes approches permettant de photoréguler l'expression d'un gène à l'aide d'oligonucléotides antisens photo-activables :

A) Après clivage du linker photo-sensible (PS), l'oligonucléotide antisens va s'hybrider avec l'ARNm stoppant sa traduction par la gêne stérique occasionnée.
B) Dans des cellules de mammifères, après clivage du linker photo sensible (PS), l'oligonucléotide antisens s'hybride avec l'ARNm et recrute une ribonucléase endogène (RNase H, dans cet exemple).
C) Lien photoactivable (PS) contenant un dérivé *o*-nitrobenzyle

Les oligonucléotides « asODNs »

Les oligonucléotides antisens photo-activables appelés « asODNs » (antisense oligodeoxynucleotides) (Figure 12A) ont par exemple été utilisés pour photoréguler l'expression du gène *c-myb* (facteur de transcription hématopoïétique) directement lié au cancer à travers une série d'études effectuées par l'équipe de Ivan Dmochowski (Tang and Dmochowski, 2006, 2007; Tang *et al.,* 2008).

Afin de lui conférer sa propriété de photosensibilité, l'asODN est chimiquement lié à un oligonucléotide sens complémentaire par l'intermédiaire d'un lien photoclivable contenant un dérivé nitrobenzyle (*o*-NB) (Figure 11C). Ainsi, le duplex formé entre les deux oligonucléotides sens/antisens par interaction de Watson-Crick (appelé épingle à cheveux photosensible) empêche ce dernier de s'hybrider avec l'ARNm cible et ne perturbe pas le processus de traduction ou d'épissage.

La photolyse à 365 nm permet de briser ce lien photosensible, libérant l'oligonucléotide antisens dont l'appariement par complémentarité à l'ARNm cible déclenche le recrutement d'une RNaseH responsable de la dégradation du brin d'ARNm (Figure 11B).

Par cette approche, ils ont montré qu'en absence de lumière le duplex photo-activable formé entre l'oligonucléotide antisens (asODN) et l'oligonucléotide complémentaire était un outil performant pour l'étude de gène/fonction puisqu'une très faible activité basale a été observée (traduite par un faible recrutement en RNase-H).

A l'inverse, après irradiation, ils ont pu observer dans des cellules K562 (leucémie) humaines une diminution en protéine *c-myb* d'un facteur supérieur à 2. Ces travaux ont abouti au premier exemple de ciblage d'un gène lié au cancer en utilisant des oligonucléotides photo-activables.

Les oligonucléotides « ncPNAs »

Dans une autre étude toujours effectuée par l'équipe de Ivan Dmochowski, ils ont cette fois-ci synthétisé un oligonucléotide antisens photoactivable à partir d'acides nucléiques peptidiques chargés négativement (ncPNAs : Negatively Charged Peptide Nucleic Acids) (Figure 12B) (Tang *et al.,* 2007). Contrairement aux oligonucléotides naturels, les oligonucléotides ncPNAs sont plus résistants aux enzymes présentes dans les cellules (grâce à leur squelette peptidique). Ces « épingles à cheveux » vont donc être capables de réguler

l'expression d'un gène en agissant directement sur la traduction en empêchant le ribosome de s'apparier au brin de l'ARMm suite à l'encombrement engendré (Figure 11A).

Suite à une irradiation lumineuse, l'« épingle à cheveux » intramoléculaire est brisée libérant ainsi l'oligonucléotide antisens (ncPNA) capable d'agir directement sur l'initiation de la traduction en bloquant de façon stérique l'accroche du ribosome sur l'ARNm cible.

Dans cette étude, c'est la séquence Kozak que l'on retrouve sur les ARNm de *zebrafish chordin* qui est ciblée. La chordine est une protéine ayant un rôle important lors du développement embryonnaire du poisson zèbre (Miller-Bertoglio *et al.,* 1997). A travers cette étude, ils montrent que dans le noir leur « épingle à cheveux » photoactivable ne conduit qu'à « peu » de phénotype *chordino* (15 %, taille de la queue réduite et cerveau mal formé). Après irradiation UV, 81 % des embryons présentent le phénotype *chordino*, prouvant ainsi que la libération de l'oligonucléotide antisens ncPNA ciblant l'ARNm chordine a permis de bloquer la traduction en protéine chordine par encombrement stérique.

Les oligonucléotides « morpholinos »

Il existe un dernier type d'oligonucléotides antisens photoactivable synthétique ayant fait ses preuves sur différents types d'embryons comme celui du poisson zèbre mais également celui des ascidies (Satou *et al.,* 2001), des oursins (Coffman *et al.,* 2004), des grenouilles (Heasman *et al.,* 2000), des poulets et des rats (Coonrod *et al.,* 2001); il s'agit de l'oligonucléotide antisens de type « morpholino » (MO).

C'est un oligonucléotide non naturel formé par des hétérocycles de type morpholines reliés les uns aux autres par un squelette phosphorodiamidate (fonction phosphate dont les deux groupements hydroxyles sont remplacés par des groupements amines secondaires) (Figure 12C) afin de créer le « backbone » d'une oligonucléotidique.

Conjointement aux oligonucléotides antisens « ncPNA », ce squelette modifié rend les oligonucléotides antisens de type « morpholino » résistants aux nucléases présentes dans les différents embryons, leur conférant une stabilité atteignant plusieurs jours (Bill *et al.,* 2009; Nasevicius and Ekker, 2000).

En utilisant cette approche, l'équipe de James K Chen et Surajit Sinha a photo-régulé le gène *no tail (ntl)* responsable de la formation de la queue et de la chorde chez le poisson zèbre avec un contrôle spatio-temporel élevé (Shestopalov *et al.,* 2007). Ainsi ils ont démontré que le facteur de transcription de la famille des protéines T-box était nécessaire dans le processus de migration et de différenciation des cellules notochordes.

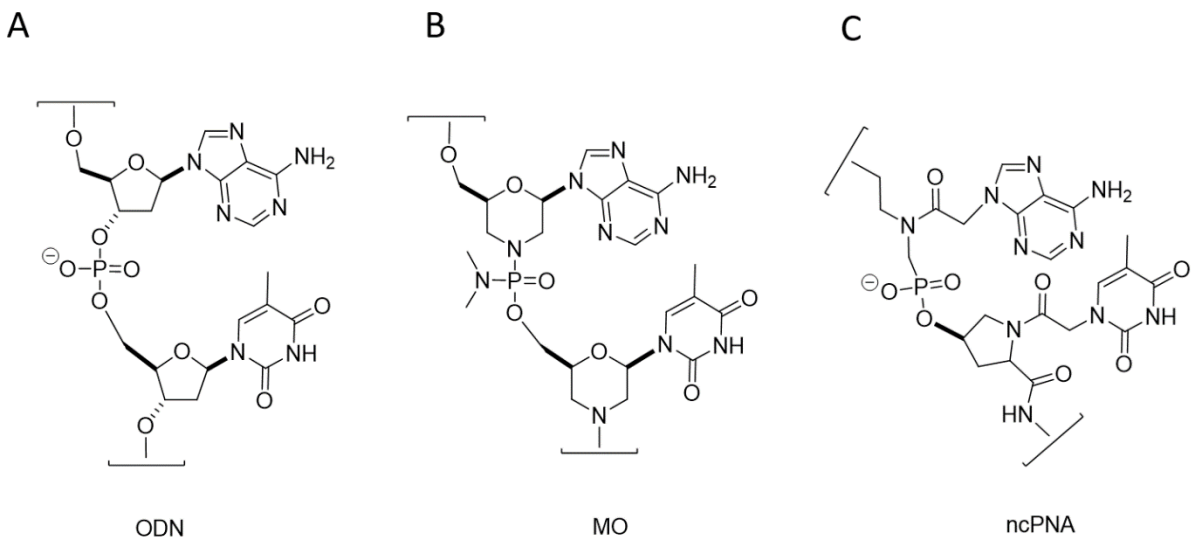


Figure 12 : Structures chimiques non naturelles d'oligonucléotides utilisés pour réguler l'expression de gènes embryonnaires. A) ODN : oligodeoxynucleotide B) MO : Morpholino C) ncPNA : non-charged peptide nucleic acid.

Nous avons pu voir à travers ces exemples qu'il est possible de réguler avec succès l'expression d'un gène cible ayant un rôle primordial dans le développement embryonnaire à l'aide d'oligonucléotides synthétiques non naturels. Deux stratégies différentes existent, l'une implique le recrutement d'enzymes dégradant l'ARN messager tandis que l'autre empêche le ribosome d'initier la traduction. Néanmoins dans ces études, l'expression basale reste toujours problématique diminuant ainsi la capacité à manipuler ces systèmes avec une résolution spatiale et temporelle élevée. De plus, perturber la régulation d'un gène cible par l'utilisation de ces oligonucléotides antisens « cagés » nécessite des concentrations atteignant au minimum l'échelle du milimolaire, ce qui les rend pour la plupart très peu solubles. Enfin, dans la plupart des cas, la précision temporelle par laquelle ces systèmes peuvent perturber la fonction embryonnaire d'un gène est limitée par des processus endogènes. Par conséquent, nous allons voir dans le point suivant comment ces limites peuvent être en partie contournées en photo-régulant l'expression d'un gène au niveau pré-transcriptionnel.

I.2.2 Photo-régulation de l'expression d'un gène au niveau pré-transcriptionnel

Il existe aujourd'hui, grâce aux techniques de mutagénèses dirigées, une multitude de systèmes permettant d'exprimer un gène d'intérêt à l'aide de petites molécules jouant le rôle d'initiateur dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules bactériennes, les levures ou encore les cellules mammaliennes (Banaszynski and Wandless, 2006; Buskirk and Liu, 2005).

Ces systèmes sont généralement composés d'un récepteur naturel d'intérêt prélevé d'un organisme A et transféré vers un organisme B, ainsi que d'une petite molécule naturelle ou non-naturelle jouant le rôle de ligand orthogonal par rapport aux autres molécules endogènes de l'organisme étudié. Bien que cette technique permette d'étudier la fonction d'un gène cible avec un contrôle temporel de l'ordre de la minute ou de l'heure, elle ne permet pas de le faire à l'échelle de la cellule unique.

Comme nous avons pu le voir précédemment, placer de tels systèmes sous le contrôle de la lumière par l'utilisation de groupements protecteurs photo-labiles est une des façons les plus simples pour accéder à des systèmes apportant ce contrôle spatio-temporel tant recherché par les biologistes du développement. Nous allons voir par la suite comment ces systèmes ont été utilisés chez les organismes supérieurs afin de photo-réguler l'expression d'un gène à l'aide de petites molécules impliquant des facteurs de transcription ou des recombinases agissant directement *in vivo* sur la régulation de la transcription.

I.2.2.1 Utilisation de ligands photo activables (petites molécules inductrices)

I.2.2.1.1 Systèmes d'expression de gènes inductibles aux hormones stéroïdiennes ER, GR, Ecdysone

Gal4-GR non « cagé »

Dans le domaine de la biologie moléculaire, les récepteurs nucléaires font partie d'une super-famille composée de protéines naturelles que l'on retrouve dans différents types cellulaires. Ces récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription inductibles par l'utilisation de ligands de type hormones stéroïdiennes ou autres lipides endogènes. Ils sont impliqués dans le contrôle de la transcription par leur liaison à une séquence d'ADN spécifique conduisant à la modulation de l'expression de gènes cibles.

Dans cette super famille on retrouve les récepteurs inductibles aux œstrogènes (ER), glucocorticoïdes (GR) et ecdysone (EcR). Ce sont des facteurs de transcription modulaire présents dans le cytoplasme uniquement lorsqu'ils sont sous leur forme inactive. Leur localisation strictement cytosolique provient du complexe qu'ils forment avec la protéine chaperonne Hsp90 (« Heat shock protein »). La liaison d'un ligand stéroïdien avec l'un de ces récepteurs nucléaires va induire un changement de conformation ainsi qu'une dimérisation (homo ou hétéro selon le récepteur) ayant pour conséquence la dissociation entre le facteur de transcription et la protéine Hsp90. Ces récepteurs possèdent une séquence NLS (« Nuclear Localisation Signal ») responsable de leur translocation vers le noyau, lieu dans lequel ils vont se lier à l'ADN via une courte séquence nucléotidique appelée HRE (« Hormone Response Element »). La liaison d'un de ces facteurs de transcription sur le promoteur de l'ADN a pour conséquence d'activer le processus de transcription en ARN messager du gène concerné.

L'équipe de Peggy Kolm et Haezl Sive a été la première à « détourner » ces récepteurs nucléaires naturels (ER et GR) en fabriquant des récepteurs chimères permettant d'étudier certains gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Kolm and Sive, 1995). Ils ont pour cela fusionné le domaine de liaison du ligand œstrogène ou glucocorticoïde au facteur de transcription MyoD qui joue le rôle d'inducteur dans la différenciation cellulaire musculaire. Ils ont, dans des embryons de grenouilles, procédé à des micros-injections d'ARNm codant pour MyoD-GR montrant qu'en absence de ligand ces cellules musculaires se développaient normalement. L'addition d'un ligand synthétique (le dexamethasone) dans le milieu cellulaire induit la formation de cellules musculaires de façon ectopique. Ils ont ainsi démontré pour la première fois qu'il était possible d'agir sur la transcription d'un gène impliqué dans le développement embryonnaire en utilisant un système d'expression inductible par un ligand synthétique.

Afin de généraliser cette approche, l'équipe de Jos Joore a créé une nouvelle construction chimérique en couplant le domaine de liaison du ligand glucocorticoïde au facteur de transcription Gal4 (Figure 13) (de Graaf *et al.,* 1998).

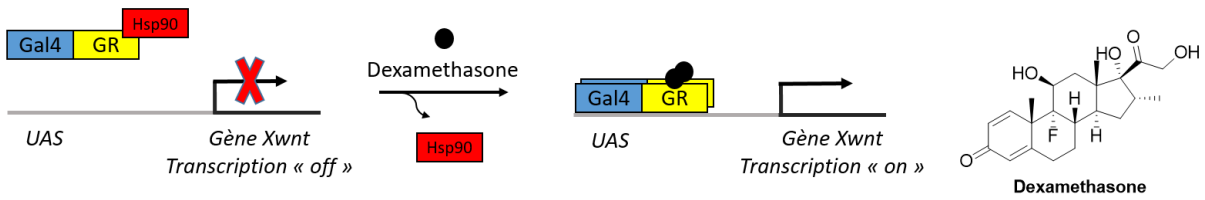


Figure 13 : Représentation schématique du sytème inductible Gal4-GR activable par un ligand stéroidien dexamethasone.

En absence de dexamethasone, le gène cible n'est pas transcrit en ARNm correspondant car le facteur de transcription GR est séquestré dans le cytoplasme par la présence d'une protéine Hsp90. En présence de dexamethasone, le changement conformationnel résultant de l'attache du ligand au domaine de liaison du récepteur glucocorticoïde permet sa translocation dans le noyau par détachement de la protéine Hsp90 déclenchant le processus de transcription de l'ADN cible en ARN messager.

Ce dernier est un facteur de transcription non endogène aux métazoaires, ayant pour particularité de reconnaitre une séquence activatrice spécifique (UAS : Upstream Activating Sequence) unique chez les levures et se trouvant en amont du promoteur étudié. Cette construction chimérique permet alors d'exprimer de façon orthogonale n'importe quel transgène possédant cette séquence UAS en utilisant un ligand glucocorticoïde comme inducteur.

En injectant dans des œufs de poisson zèbre le plasmide codant pour le système Gal4-GR ainsi que le plasmide codant pour le transgène UAS responsable de la transcription de Xwnt (gène impliqué dans l'induction du mésoderme ventral), l'équipe de Jos Joore a pu activer l'expression de ce morphogène à l'aide du ligand synthétique (Dexamethasone) conduisant à des anomalies morphologiques avec un contrôle temporel élevé.

Gal4-GR « cagé »

Afin d'ajouter la dimension spatiale qu'il manquait aux travaux précédents, (Hayashi *et al.,* 2006) ont fait appel aux groupements protecteurs photo-labiles afin de photo-réguler l'expression du transgène étudié avec une résolution spatiale et temporelle. Ils ont ainsi « cagés » la fonction alcool du ligand dexamethasone à l'aide de l'*o*-(2-nitrobenzyle) et se sont servi du système Gal4-GR pour y exprimer un gène (IAA14) responsable de la croissance des racines chez les plantes (Figure 14). Ce gène étant fusionné avec un rapporteur de fluorescence, ils ont pu observer par microscopie confocale la croissance localisée des racines aux endroits où la photo-libération a eu lieu.

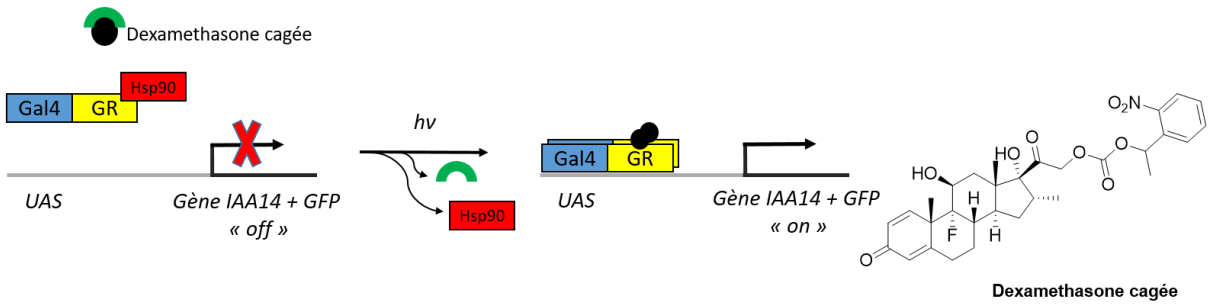


Figure 14 : Représentation schématique du sytème photo-inductible Gal4-GR activable par un ligand stéroïdien dexamethasone utilisant le concept d'« uncaging ».

En absence de lumière, le gène cible n'est pas transcrit en ARNm correspondant car le facteur de transcription GR est séquestré dans le cytoplasme par la présence d'une protéine Hsp90. Suite à une irradiation lumineuse appropriée, une quantité suffisante de ligand dexamethasone va être libéré selon le concept d'« uncaging » ce qui provoque un changement conformationnel au sein de la protéine permettant sa translocation dans le noyau et déclenche le processus de transcription de l'ADN cible en ARN messager.

Bien que le système Gal4/UAS soit un facteur de transcription non endogène aux métazoaires, ce qui fait de lui un candidat idéal pour l'étude de gène/fonction, le système Gal4-GR est tout de même assujetti à des interactions potentielles avec des récepteurs glucocorticoïdes endogènes (phénomène de « crosstalk »). Par exemple, les équipes de Shlomo Melmed et Robert Tanguay ont pu agir sur le développement de la glande pituitaire, la régénération de tissus et d'autres processus physiologique chez le poisson zèbre par l'utilisation de glucocorticoïdes agonistes exogènes (Liu *et al.,* 2003; Mathew *et al.,* 2007).

VP16-EcR non « cagé »

Il existe une autre alternative au système Gal4-GR qui est également basée sur un système naturel inductible. Il s'agit d'utiliser les récepteurs inductibles aux hormones de type ecdysone (EcR) impliqués dans la mue des insectes durant laquelle une cascade de changements morphologiques est déclenchée par l'hormone stéroïdienne 20-hydroxyecdysone.

Le fait d'utiliser un système évolutivement éloigné permet d'étudier l'embryologie des vertébrés en diminuant les phénomènes de communication croisée.

Ces récepteurs à l'ecdysone (EcR) font également partie de la super-famille des récepteurs nucléaires, ainsi ils fonctionnent de la même façon que les récepteurs aux glucocorticoïdes. A savoir qu'en absence d'hormones stéroïdiennes, ces récepteurs de l'ecdysone sont séquestrés dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes Hsp90. Ce n'est qu'après liaison d'un ligand stéroïdien que ces récepteurs vont s'hétérodimériser avec un autre récepteur hormonal appelé USP (UltraSPiracle) qui fait partie de la famille des récepteurs

rétinoïdes X (RXR). Ce complexe hétérodimérique est transloqué dans le noyau pour initier la transcription du gène cible en se liant sur les régions promotrices EcRE (Ecdysone Response Elements).

En se basant sur ce système naturel, l'équipe de Ronald Evans a développé un système d'expression de gène inductible s'adressant à l'étude du modèle vertébré (culture de cellules de mammifères et souris transgéniques) en co-exprimant le facteur de transcription « VP16-EcR » obtenu par le remplacement du domaine d'activation des récepteurs ecdysones par celui du virus VP16 ainsi que le facteur de transcription « RXR » mammalien (Figure 15) (No *et al.*, 1996).

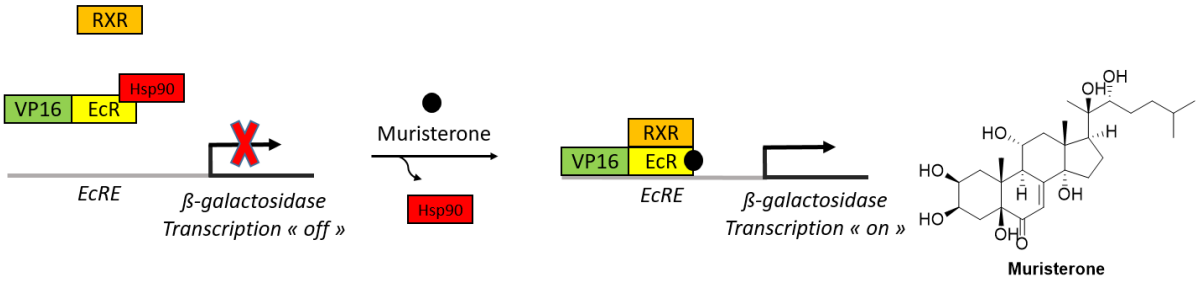


Figure 25 : Représentation schématique du sytème inductible VP16-EcR activable par un ligand stéroïdien muristerone.

En absence de muristerone, le gène cible n'est pas transcrit en ARNm correspondant car le facteur de transcription EcR est séquestré dans le cytoplasme par la présence d'une protéine Hsp90. En présence de muristerine, le changement conformationnel résultant de l'attache du ligand au domaine de liaison du récepteur glucocorticoïde et du recrutement d'un co-activateur RXR permet sa translocation dans le noyau par détachement de la protéine Hsp90 déclenchant le processus de transcription de l'ADN cible en ARN messager.

En utilisant cette construction chimérique, ils ont été en mesure de réguler temporellement l'expression d'un gène chez une souris transgénique par l'administration de la muristerone (un analogue d'ecdysone retrouvé chez les plantes).

VP16-EcR « cagé »

Afin d'apporter le contrôle spatial manquant à l'étude précédente, l'équipe de David Lawrence a mis au point la synthèse d'une version de *ß*-ecdysone « cagée » en utilisant le groupement protecteur photo-labile 4,5-dimethoxy-2-nitrophenylethyl (DMNPE) (Figure 16) (Lin *et al.*, 2002). En co-transfectant le facteur de transcription « VP16-EcR » ainsi que le facteur de transcription « RXR » humain dans une lignée de cellules 293T (cellules

embryonnaires de rein humain), ils ont été en mesure de photo-réguler l'expression du transgène responsable de l'expression de la luciférase aux endroits où les spots lumineux ont été effectués.

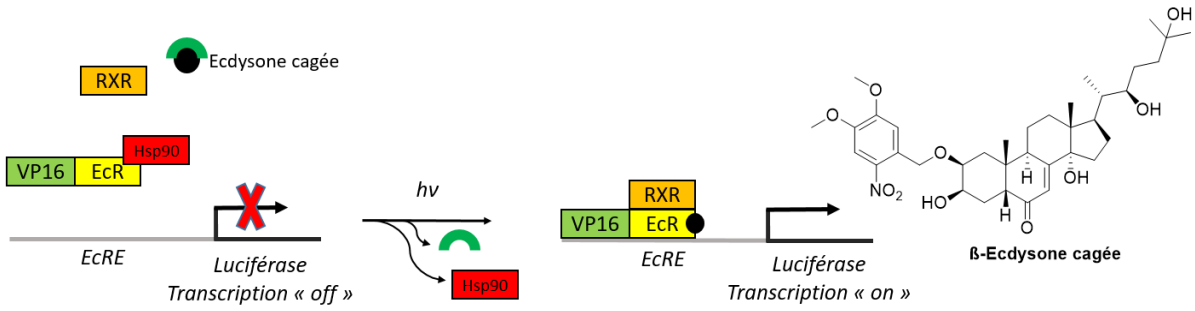


Figure 16 : Représentation schématique du sytème photo-inductible VP16-EcR activable par un ligand stéroïdien *β*-ecdysone utilisant le concept d' « uncaging ».

En absence de lumière, le gène cible n'est pas transcrit en ARNm correspondant car le facteur de transcription EcR est séquestré dans le cytoplasme par la présence d'une protéine Hsp90. Suite à une irradiation lumineuse appropriée, une quantité suffisante de ligand *β*-ecdysone va être libérée selon le concept d' « uncaging » ce qui provoque un changement conformationnel au sein de la protéine permettant sa translocation dans le noyau et déclenche le processus de transcription de l'ADN cible en ARN messager.

Ces différentes constructions basées sur le système inductible des récepteurs d'ecdysones d'insectes ont permis de diminuer de façon non négligeable les phénomènes de communications croisées qui limitaient en grande partie l'utilisation des systèmes inductibles basés sur les récepteurs glucocorticoïdes. Néanmoins, il subsiste toujours un inconvénient provenant des co-activateurs RXR nécessaires au fonctionnement de ce système. En effet, ces derniers sont connus pour avoir des rôles pléiotropes durant le développement embryonnaire. Par conséquent, la co-expression exogène de ces co-activateurs reste un problème majeur pour interroger la fonction d'un gène de façon complétement spécifique (solutionné par (Esengil *et al.,* 2007) par l'utilisation d'un système EcR chez la plante qui n'a pas besoin de ces RXR).

I.2.2.1.2 Système d'expression de gènes inductible aux recombinases (CreLox).

Il existe une autre méthode ayant également fait ses preuves quant au questionnement de la fonction d'un gène d'intérêt. Il s'agit d'utiliser des souris génétiquement modifiées par la technologie de Knock-Out (KO) et obtenues par recombinaison homologue (Thomas and Capecchi, 1987) de sorte à pouvoir étudier l'incidence du gène supprimé sur l'animal vivant.

Il existe toutefois de sérieuses limites quant à l'utilisation de cette stratégie qui sont essentiellement dues à l'introduction de modifications génétiques dans la lignée germinale permettant d'obtenir ces souris KO. Par exemple, certaines mutations peuvent avoir des effets

pléiotropes sur le développement embryonnaire, ce qui conduit à des phénotypes complexes pouvant mener à des erreurs d'interprétation quant à la réelle fonction du gène supprimé.

Pour contourner ces limitations, une nouvelle stratégie permettant le « knock out » conditionnel d'un gène cible par l'expression d'une Cre-recombinase a été développée ; il s'agit du système Cre-*LoxP*. C'est à l'heure actuelle un des systèmes les plus avancés et utilisés pour le contrôle spatial et temporel de l'inactivation d'un gène chez la souris.

La Cre recombinase est une enzyme isolée chez le bactériophage P1 (Sternberg and Hamilton, 1981) capable de catalyser la recombinaison de l'ADN entre deux sites de reconnaissance appelés « *LoxP* ». Un site *LoxP* est une séquence d'ADN composée de 34 paires de bases (pb) comprenant à chaque extrémité 13 pb palindromiques (il est donc impossible de retrouver cette séquence dans un génome eucaryote) reliées entre elles par une région séparatrice de 8 pb (figure 17 A). Lorsqu'une séquence d'ADN est contenue entre deux sites de *LoxP*, on va parler de séquence « floxée ». Lorsque la Cre recombinase est exprimée dans un système, elle reconnait la séquence palindromique des deux sites *LoxP* et va procéder selon leur orientation à une délétion, inversion ou translocation de la séquence d'ADN floxée (Figure 17 B).

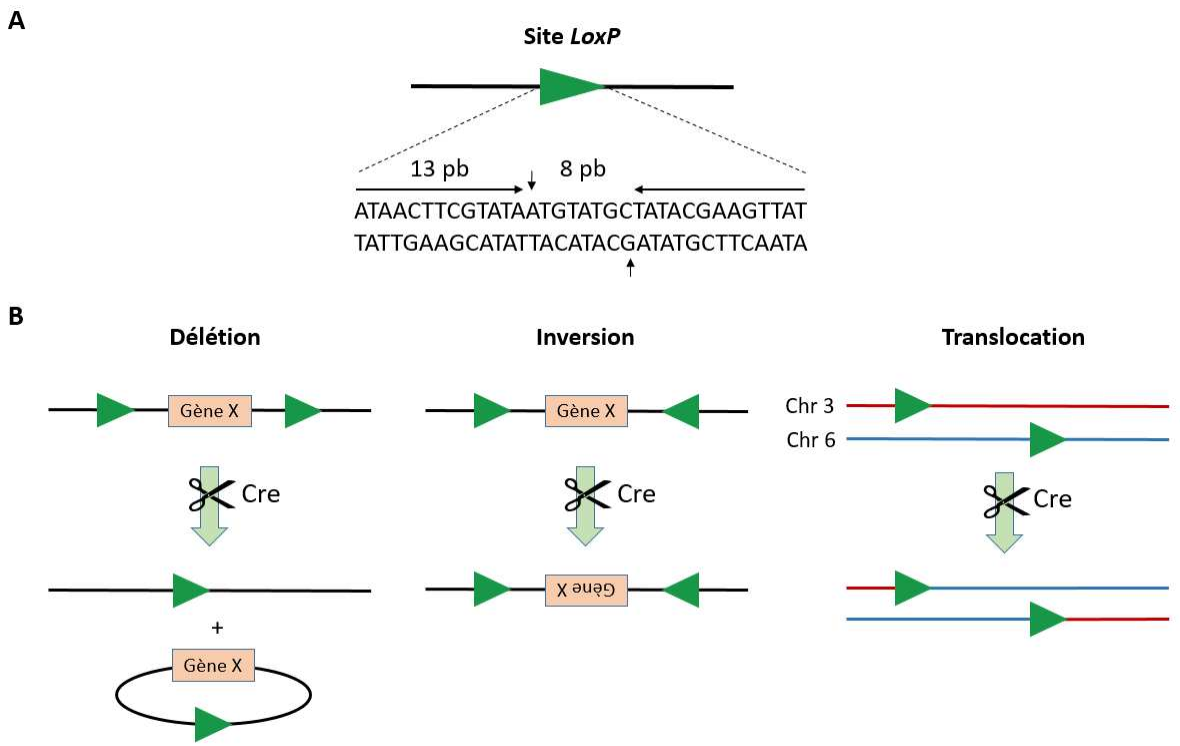


Figure 17 : A) Représentation schématique d'un site *LoxP* sur une séquence d'ADN. Il est composé de deux séquences palindromiques de 13 pb reliées par une séquence intermédiaire de 8 pdb. L'enzyme Cre recombinase est capable de reconnaitre les sites *LoxP* pour y effectuer jusqu'à trois opérations différentes.
B) Représentation schématique des trois types de réarrangements possibles effectués par l'enzyme Cre recombinase.
Délétion : Si deux sites *LoxP* d'une même séquence pointent vers la même direction, la séquence qui les sépare est alors découpée en bout d'ADN circulaire non conservé.
Inversion : Si deux sites *LoxP* d'une même séquence pointent vers une direction opposée, la recombinaison résulte en une inversion de la séquence du gène.
Translocation : Si les deux sites LoxP sont sur deux molécules d'ADN différentes, une translocation s'opère entre les deux sites.

Placer le gène exprimant l'enzyme Cre sous le contrôle d'un promoteur inductible permettrait à travers l'excision du segment d'ADN floxé de spatialement ou temporellement contrôler le déclenchement de mutations somatiques.

Réalisant le potentiel de cet outil, l'équipe de Pierre Chambon a développé un nouveau système en fusionnant le domaine de liaison de ligands des récepteurs œstrogènes (ER) humains à l'enzyme Cre recombinase (Metzger *et al.,* 1995). Ils ont ainsi mis au point une recombinase chimérique dont l'activité en culture cellulaire est dépendante de la présence d'œstrogènes (l'œstradiol) ou d'un antagoniste aux œstrogènes (le tamoxifène). La présence inévitable d'œstradiol endogène chez la souris a poussé cette même équipe à modifier leur construction de sorte à obtenir un système d'expression de gène strictement inductible en présence de tamoxifène (T). Ils ont alors procédé à une nouvelle construction en fusionnant un domaine de liaison de ligands des récepteurs œstrogènes (ER LDB) humains mutés (Gly251 -> Arg,

G521R) à l'enzyme Cre recombinase, ce qui donne naissance à une Cre recombinase tamoxifène-dépendante, Cre-ER^T (figure 18).

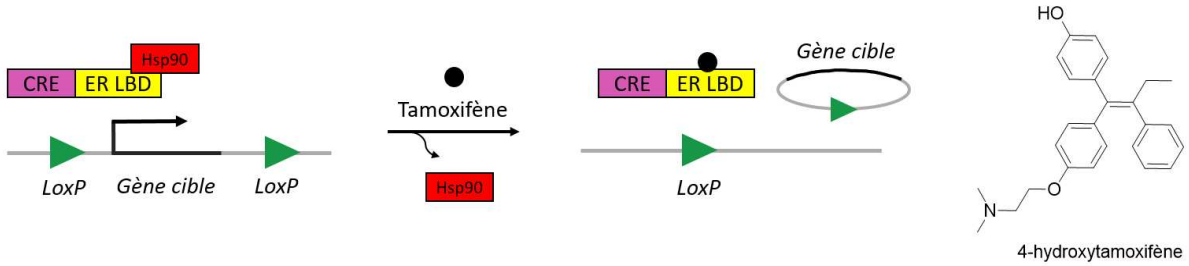


Figure 18 : Représentation schématique du sytème inductible Cre-ER^T activable par un ligand non-stéroïdien 4-hydroxytamoxifène (Htam).

En absence de Htam, le gène cible floxé est transcrit en ARNm correspondant car le facteur de transcription ER LDB est séquestré dans le cytoplasme par la présence d'une protéine Hsp90 empêchant la Cre recombinase d'agir. En présence de Htam, le changement conformationnel résultant de l'attache du ligand au domaine de liaison du récepteur oestrogène permet sa translocation dans le noyau par détachement de la protéine Hsp90 activant la Cre recombinase. Celle-ci va supprimer la séquence du gène cible par délétion ce qui va stopper le processus de transcription de l'ADN cible en ARN messager.

L'équipe d'Andrew McMahon a fourni la première démonstration quant à l'efficacité du système Cre-ER^T pour effectuer des recombinaisons génomiques au sein d'un embryon *in utéro* chez la souris (Danielian *et al.,* 1998). Ils ont pour cela généré deux lignées de souris transgéniques (Figure 19) exprimant dans la première (Souris 1) un transgène « floxé » exprimant à la fois le gène *Wnt1* (intervenant dans le développement du cerveau du fœtus) et le rapporteur ß-galactosidase et dans la seconde (Souris 2) le système inductible Cre-ER^T sous le contrôle d'un promoteur P. Les souris résultantes du croisement des deux précédentes ayant subi une injection d'agoniste 4-hydroxytamoxifène durant leur grossesse montrent une forte activité de *ß*-galactosidase dans leurs embryons, ce qui coïncide avec les motifs d'expression de *Wnt1*. A l'inverse, les souris n'ayant pas reçu d'injection d'agoniste durant leur grossesse présentent des embryons avec une faible activité en ß-galactosidase. Ils ont pu prouver à travers cette étude que l'injection de 4-hydroxytamoxifène dans des souris transgéniques enceintes induisait la recombinaison de l'ADN par l'intermédiaire de la Cre recombinase.

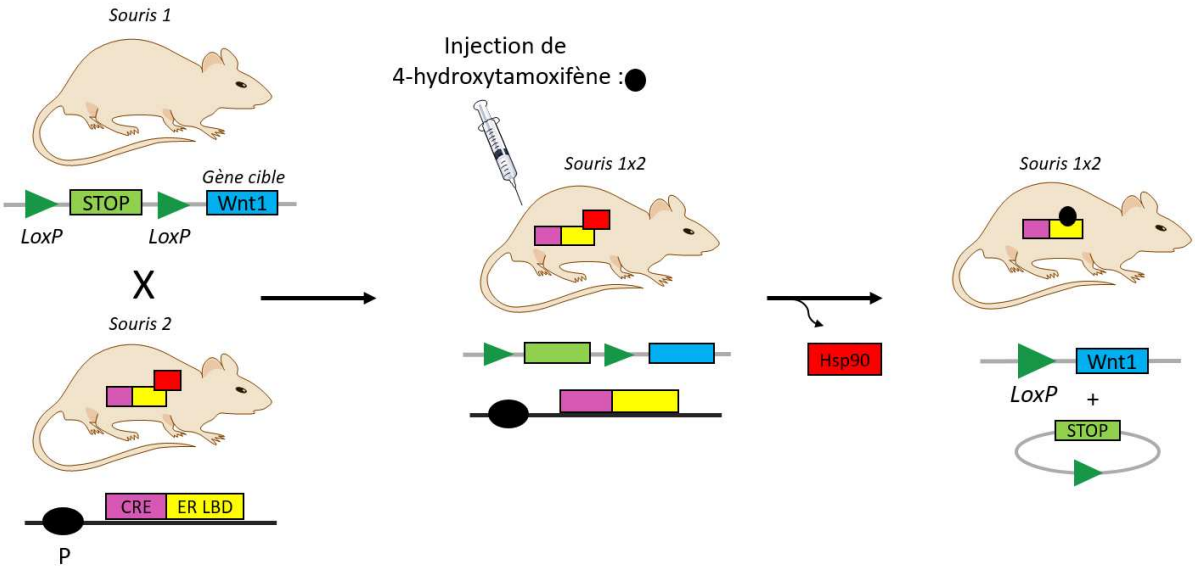


Figure 19 : Recombinaison génomique au sein d'embryons in utéro de souris transgéniques.

En croisant une souris exprimant un codon STOP floxé en amont du gène cible (souris 1) avec une souris exprimant le système Cre-ER^T placée sous le contrôle d'un promoteur P (souris 2), on obtient une lignée de souris transportant tout le matériel nécessaire pour réguler un gène d'intérêt à l'aide du système Cre-ER^T (souris 1x2).
En absence de 4-hydroxytamoxifène, le facteur de transcription ER LDB est séquestré dans le cytoplasme par la présence d'une protéine Hsp90 empêchant la Cre recombinase d'agir. De plus, le codon STOP floxé empêche l'initiation de la transcription de *Wnt1* dans l'embryon de souris.
Après injection de 4-hydroxytamoxifène, le changement conformationnel résultant de l'attache du ligand au domaine de liaison du récepteur oestrogène permet sa translocation dans le noyau par détachement de la protéine Hsp90 activant la Cre recombinase. Celle-ci va supprimer le codon STOP floxé par déletion ré-initialisant le processus de transcription du gène cible *Wnt1* en ARN messager correspondant.

Néanmoins, une faible activité de *ß*-galactosidase subsiste en absence d'agoniste, ce qui montre que le système n'est pas tout à fait hermétique. De plus, l'expression du gène d'intérêt étant dépendante de la diffusion de l'agoniste à travers les cellules, ceci ne permet pas d'étudier les phénomènes impliqués à l'échelle de la cellule unique.

Afin d'apporter la résolution spatiale nécessaire à toute étude souhaitant travailler à l'échelle unique, le système inductible Cre-ER^T a été rendu photo-activable par l'utilisation de groupements protecteurs photo labiles. L'équipe de John Koh a pour la première fois « cagé » le 4-hydroxytamoxifène (Nv-HTam) à l'aide du 4,5-diméthoxy-2-nitrophényléthyl (DMNPE) (Figure 20 A) afin d'évaluer sa capacité à photo-contrôler la recombinaison d'un rapporteur de gène (LacZ) dans des cellules HEK293 (Link *et al.,* 2005). Après 67 h d'incubation, les cellules traitées en présence d'Nv-Htam sans irradiation ne montrent aucune expression significative du rapporteur de gène LacZ tandis qu'une brève irradiation UV montre une expression significative en *ß*-galactosidase au niveau du spot d'irradiation. Néanmoins, l'efficacité de recombinaison semble être bien moins performante qu'attendu ce qui pourrait être expliqué par

la courte demi-vie du système 4-hydroxytamoxifen/Cre-ER^T comparé aux 72 h d'incubation nécessaires pour atteindre une recombinaison efficace.

L'équipe de Ludovic Jullien (Sinha *et al.,* 2010) a en effet démontré que le 4-hydroxytamoxifen avait tendance à s'isomériser et se dégrader sous irradiation UV, ce qui explique en partie la faible efficacité de recombinaison observée dans l'étude précédente. Ils ont alors mis au point la synthèse de deux analogues photo-activables structurellement proches ; ainsi deux 4-hydroxycyclofen « cagés » (Figure 20 B et C) ont permis de photo-contrôler efficacement la recombinaison d'une protéine d'intérêt sans aucune trace de photo-isomérisation en absence d'irradiation.

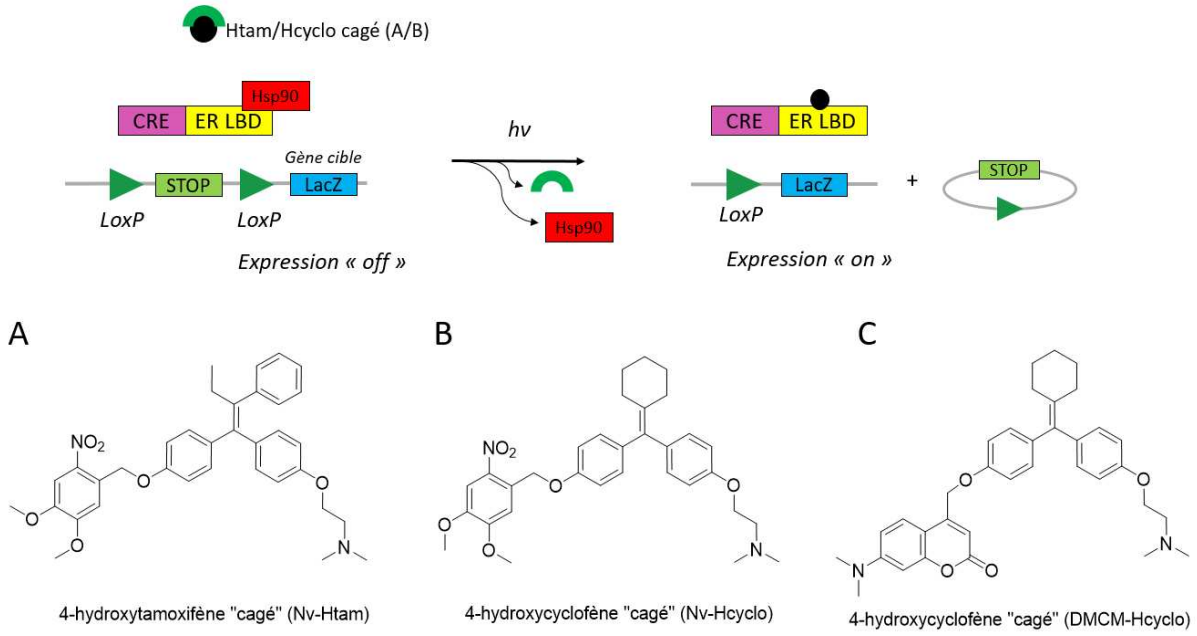


Figure 20 : Représentation schématique du sytème photo-inductible Cre-ER activable par les ligands non-stéroïdien 4-hydroxytamoxifène et 4-hydroxycyclofène selon le concept d' « uncaging ».

En absence de lumière, le gène cible LacZ n'est pas transcrit du fait de la présence en amont d'un codon STOP floxé. Suite à une irradiation lumineuse appropriée, le ligand « cagé » A, B ou C va être libéré selon le concept d' « uncaging » entrainant un changement conformationnel du facteur de transcription ER LDB et permettant sa translocation dans le noyau, lieu ou la Cre recombinase va procéder à la déletion du codon STOP par reconnaissance des sites *LoxP*.
Le processus de transcription du gène cible *Wnt1* en ARN messager peut alors être initié.

Nous allons maintenant aborder un autre système d'expression de gène connu. Il s'agit du système d'expression de gènes inductible à la tétracycline (Tet) que nous avons utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse.

I.2.2.1.3 Le système d'expression de gènes inductible à la tétracycline (Tet).

Le système d'expression de gènes inductible à la tétracycline présente plusieurs avantages que nous allons aborder par la suite, ce qui fait de lui un des systèmes les plus employés en biologie du développement. C'est ce système d'expression de gènes que nous utiliserons dans le cadre de ces travaux de thèse.

Nous allons voir dès à présent comment des molécules initialement utilisées pour leurs propriétés antibiotiques sont devenues d'excellentes cibles pour le développement d'un système d'expression de gènes inductibles.

La famille des tétracyclines est un groupe de molécules aux propriétés antibiotiques à large spectre produites naturellement par diverses espèces de bactéries gram-positives de la famille des *Actinomycètes*. L'histoire de la tétracycline remonte dans les années 40 lorsque les laboratoires Lederle (Duggar, 1948) découvrent une substance active et inconnue contre différentes bactéries et agents pathogènes qu'ils nomment *Aureomycin* (Figure 21). Quelques années plus tard, les laboratoires Pfizer découvrent à leur tour une autre substance active appelée *Terramycin*. Ce n'est qu'en 1953 que leurs structures sont élucidées (Hochstein *et al.,* 1953). Dans la même année, l'équipe de Jean Pilgrim modifie l'*Aureomycin* pour donner naissance au premier exemple d'antibiotique synthétique plus stable appelé tétracycline dont ils donnent le nom à ce groupe d'antibiotique (Conover *et al.,* 1953).

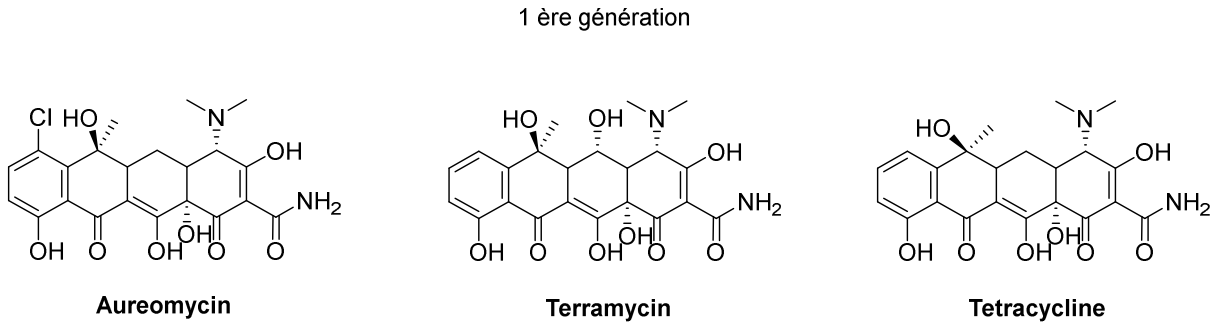


Figure 21 : Structures de Aureomycin, terramycin et de tétracycline qui composent la 1ère génération d'antibiotiques.

La famille des tétracyclines est aujourd'hui représentée par trois générations différentes. La première est composée des trois molécules citées précédemment. La deuxième génération de tétracyclines est composée de toutes les molécules synthétisées entre 1965 et 1972 (Chopra *et al.,* 1992) parmi lesquelles on peut citer la minocycline et la doxycycline (Figure 22). Enfin, la troisième génération de tétracyclines est composée de molécules développées dans les années 90 dont la plus représentée est la tigecycline (Sum *et al.,* 1994) (Figure 22).

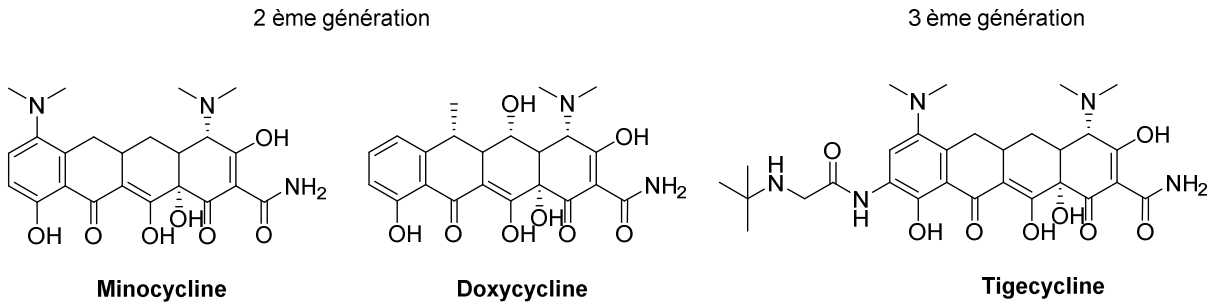


Figure 22 : Structures de la Minocycline, Doxycycline et Tigecycline composant respectivement la 2ème et 3ème génération d'antibiotiques

Toutes ces générations d'antibiotiques possèdent une activité bactériostatique plus ou moins efficace, c'est-à-dire que ces molécules sont capables de modérer le développement des bactéries en agissant de façon réversible sur le processus de synthèse protéique. En effet, il est maintenant bien établi que les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines bactériennes en empêchant l'association de l'aminoacyl-tRNA avec le ribosome bactérien (Chopra and Roberts, 2001).

Grâce à leur propriété antibiotique à large spectre et à leur faible toxicité, les tétracyclines ont été abusivement utilisées en tant qu'agents thérapeutiques chez l'humain ainsi qu'en médecine vétérinaire afin de traiter une grande variété d'infections, ce qui a conduit à l'émergence inévitable des premiers mécanismes de résistance aux tétracyclines. Compte tenu de l'intérêt porté par les chercheurs pour ce groupe d'antibiotiques prometteurs, un effort de compréhension vis-à-vis de ce système de résistance a été fait de sorte à pouvoir le contourner.

Il est communément admis que ce mécanisme a comme mission d'évacuer la tétracycline en dehors du milieu cytosolique préservant ainsi la synthèse protéique bactérienne selon trois processus différents :

- Synthèse d'une protéine à efflux TetA
- Synthèse d'une protéine engagée dans la protection des ribosomes bactériens TetM (Dantley *et al.,* 1998)
- Inactivation enzymatique de la tétracycline (Roberts, 1996)

Dans la suite de cet exposé, je traiterai uniquement du premier mécanisme qui est à la fois le plus représenté chez les bactéries mais également à l'origine du système d'expression de gènes à la tétracycline que nous aborderons par la suite.

Efflux de Tétracycline

Le mécanisme de résistance à la tétracycline est basé sur l'expression d'une protéine appelée TetA. Cette protéine est une pompe à efflux exprimée transitoirement au sein de la membrane bactérienne jouant le rôle d'antiport et exportant l'antibiotique en dehors du cytoplasme en échange de l'entrée d'un proton H^+ (Tamura *et al.,* 2003).

Les bactéries gram (-) n'expriment pas ce transporteur transmembranaire de façon permanente puisqu'il a tendance à perturber le potentiel électrostatique de la membrane. Ainsi, ce mécanisme de résistance est placé sous le contrôle d'une protéine comportant un domaine de liaison à l'ADN : la protéine TetR. En absence de tétracycline, TetR se lie à l'ADN par l'intermédiaire d'un opérateur tetO et réprime l'expression de TetA au sein de la membrane. A l'inverse, dès qu'une concentration suffisante en tétracycline est présente, l'antibiotique ayant une forte affinité pour tetR va s'y lier et le déplacer, permettant au gène codant pour TetA de s'exprimer, ce qui va évacuer la tétracycline en dehors de la cellule (Flèches pointillées Figure 23).

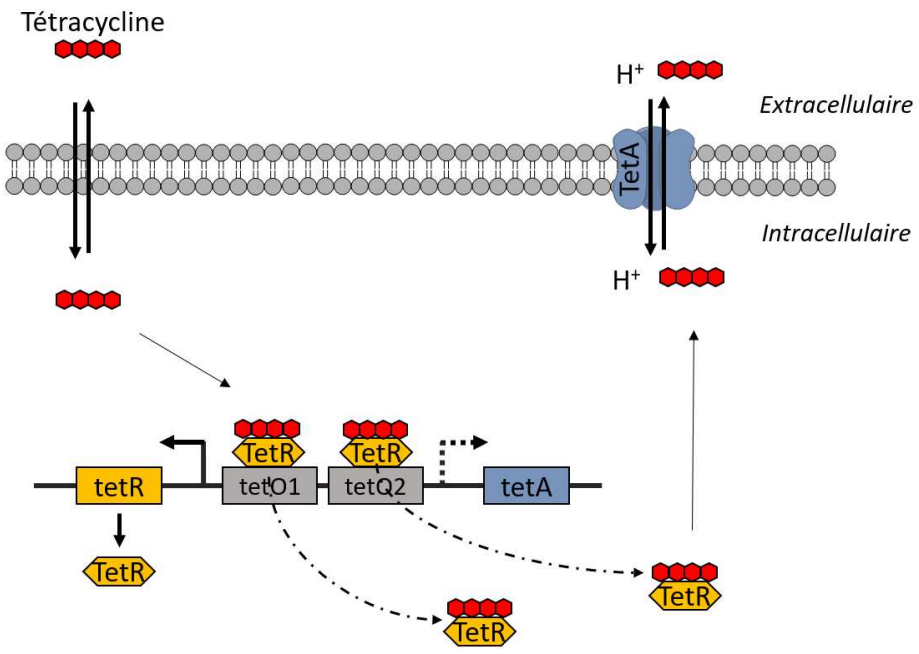


Figure 23 : Représentation du mécanisme de résistance aux tétracyclines chez les organismes procaryotes impliquant une protéine transmembranaire (TetA).

La forte affinité de la protéine TetR vis-à-vis de son promoteur *tet*O combinée à la forte affinité avec laquelle se lie la tétracycline à TetR, ajoutées à l'absence de ces protéines dans le génome eucaryote, ont poussé les biologistes à modifier ce système de résistance bactérien en vue d'en faire un excellent outil de régulation transcriptionnel inductible chez les eucaryotes.

L'équipe de Hermann Bujard et Sabine Frendlieb a mis au point un système d'expression de gènes inductible aux tétracyclines pour des applications *in vitro* et *in vivo* sous deux versions possibles appelées Tet-off ou Tet-on (Gossen and Bujard, 1992).

Le premier système appelé « Tet-off » utilise une protéine trans-activatrice chimérique tTA qui est construite en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine bactérienne tetR avec le domaine de trans-activation de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex (Figure 24 A). En absence de tétracycline ou de l'un de ses analogues, la protéine tTA reconnaît un motif composé de sept répétitions de la séquence opératrice tetO de l'opéron tétracycline placé en amont d'un promoteur minimal « human cytomegalovirus » (hCMV) et elle s'y fixe sous forme de dimère avec une très forte affinité et induit la transcription. En présence de tétracycline, tTA à une meilleure affinité pour l'antibiotique ce qui induit un changement de conformation, libérant l'opérateur tetO et arrêtant la transcription.

Le second système appelé « Tet-on » est similaire au premier à l'exception de la protéine tetR qui a été mutée sur quatre acides aminés ce qui aboutit à un phénotype inversé du répresseur

appelé rtetR qui exprime une protéine trans-activatrice rtTA. Dans cette version, le trans-activateur muté rtTA peut se fixer sur la séquence tetO uniquement en présence de doxycycline, qui est un analogue de tétracycline ayant une meilleure affinité pour rtTA (Figure 24 B).

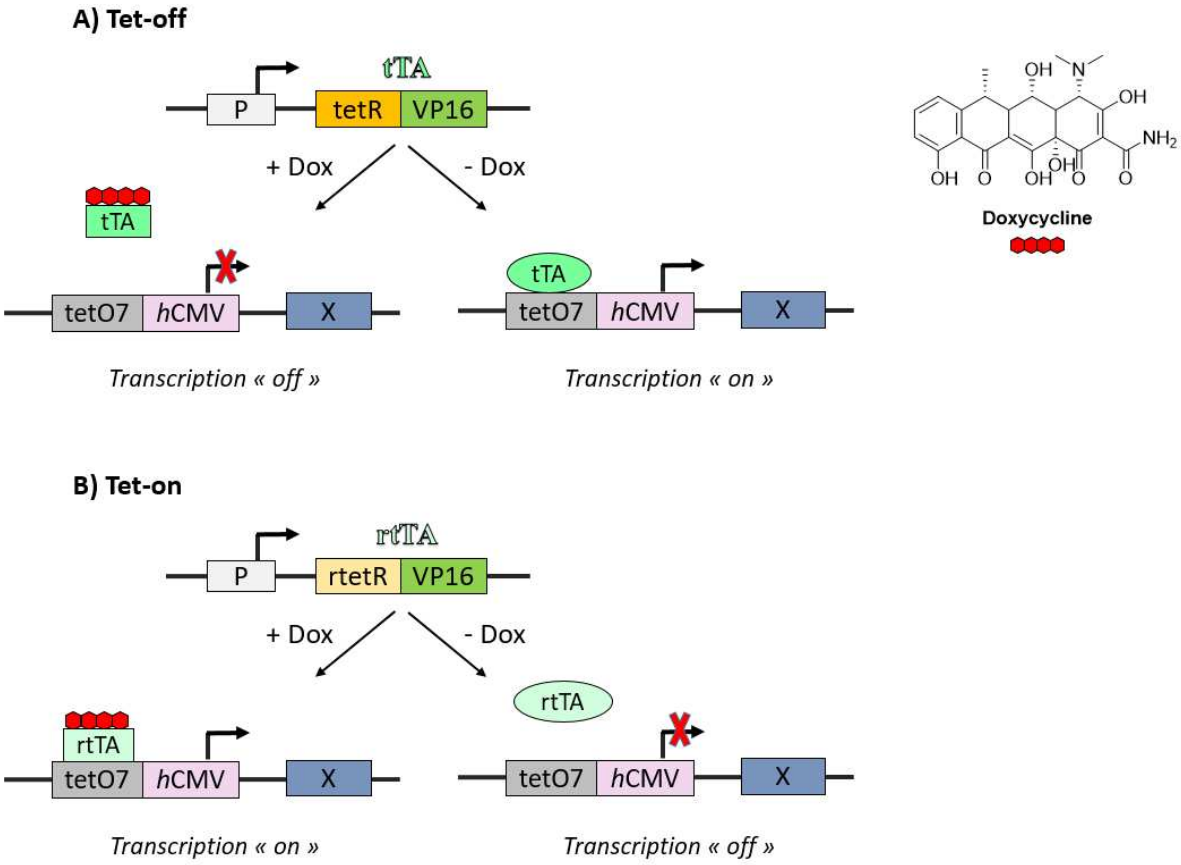


Figure 24 : Système tétracycline on/off régulé par la Doxycycline.

A) Tet-off : La protéine trans-activatrice chimérique tTA est obtenue en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN de tetR avec la protéine trans-activatrice du virus de l'herpès simplex VP16. tTA se lie spécifiquement à l'opérateur tetO7 par reconnaissance, ce qui active l'expression du gène X situé en aval d'un promoteur minimal humain (hCMV). En présence de Doxycycline, la protéine tTA change de conformation, ce qui entraine l'arrêt de l'expression du gène X par perte d'affinité à l'opérateur.
B) Tet-on : La protéine tetR est mutée afin d'obtenir le phénotype inverse (rtetR) de sorte à réguler l'expression du gène X en présence de Doxycycline.

Les versions Tet-off et Tet-on ont été utilisées dans de nombreuses applications *in vitro* et *in vivo* avec des degrés de succès variés, de sorte à contrôler de façon induite l'inhibition ou l'activation de l'expression d'un transgène chez la drosophile (Bieschke *et al.,* 1998), le poisson zèbre (Huang *et al.,* 2005), la grenouille (Ridgway *et al.,* 2000) ou encore la souris (Furth *et al.,* 1994; Kistner *et al.,* 1996). De manière générale, ces exemples démontrent la capacité du système avec laquelle il est possible de temporellement contrôler la transcription au niveau embryonnaire. Afin d'avoir un degré de conditionnalité supplémentaire qui permettrait

d'étudier la fonction des gènes avec plus de précision, le système inductible Tet-off/on a été rendu photo-activable par l'utilisation d'analogues de tétracycline « cagés » aboutissant à un système orthogonal activable par la lumière.

Comme preuve de principe, basé sur le système Tet-on, l'équipe de Sidney Cambridge a généré une lignée de souris transgéniques transportant un rapporteur de bioluminescence (luciférase) dépendant de l'opérateur tetO et exprimant la protéine trans-activatrice rtTA (Cambridge *et al.,* 2009). Ils ont ensuite chimiquement « cagé » la doxycycline qui est, à l'heure actuelle, l'inducteur d'expression de gène le plus puissant vis-à-vis du système tétracycline en utilisant le groupement protecteur DMNPE classiquement utilisé (Figure 25).

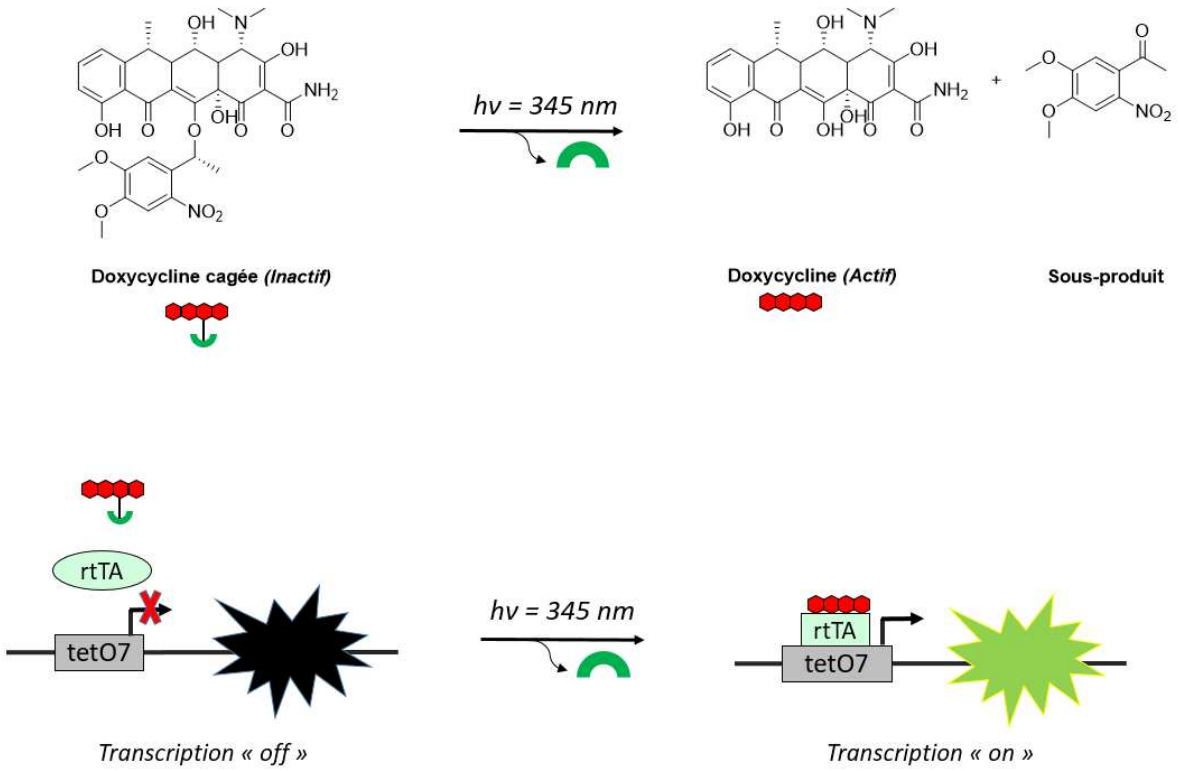


Figure 25 : Système tétracycline on/off régulé par la Doxycycline.

A) Tet-off : La protéine trans-activatrice chimérique tTA est obtenue en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN de tetR avec la protéine trans-activatrice du virus de l'herpès simplex VP16. tTA se lie spécifiquement à l'opérateur tetO7 par reconnaissance, ce qui active l'expression du gène X situé en aval d'un promoteur minimal humain (hCMV). En présence de Doxycycline, la protéine tTA change de conformation, ce qui entraine l'arrêt de l'expression du gène X par perte d'affinité à l'opérateur.
B) Tet-on : La protéine tetR est mutée afin d'obtenir le phénotype inverse (rtetR) de sorte à réguler l'expression du gène X en présence de Doxycycline.

Après avoir chirurgicalement retiré les embryons de l'utérus de ces lignées de souris transgéniques, ils ont photo-contrôlé avec succès l'expression du gène rapporteur de bioluminescence à travers tout l'organisme ou même de manière très localisée en irradiant la zone du ganglion spinal. Ils ont également procédé aux mêmes expérimentations chez le têtard de *Xenopus* transgénique, montrant ainsi la généralité de l'approche dans différents organismes.

Pour conclure, le système d'expression de gènes inductible à la tétracycline est un outil à la fois puissant et prometteur quant à l'investigation de la fonction d'un gène cible. Les groupements protecteurs photo-labiles qui ont été jusqu'à présent sélectionnés pour des études *in vitro* et *in vivo* sont tout à fait satisfaisants pour des études préliminaires. Néanmoins, ils présentent certaines limites en termes d'efficacité d'utilisation pour les études qui se placent à l'échelle de la cellule unique mais également en termes de photo-toxicité où de courtes irradiations sont nécessaires sous peine d'endommager les organismes étudiés. En effet, ces groupements protecteurs photo-labiles sont efficaces dans une gamme de rayonnement ultra-violet très énergétique utilisable en excitation mono-photonique, ce qui ne permet pas d'irradier une cible d'intérêt avec une précision tridimensionnelle. C'est pourquoi l'utilisation de nouveaux groupements protecteurs photo-labiles performants en excitation bi-photonique est primordiale.

I.3. Les groupements protecteurs photo-labiles

I.3.1 Généralités et fonctionnement

Nous venons de voir à travers ces deux premières parties que les groupements protecteurs photo-labiles ont en quelque sorte révolutionné le domaine de la biologie du développement en apportant un degré de conditionnalité supplémentaire à tous les systèmes étudiés afin d'étudier les processus physiologiques engagés. En effet, pour étudier tous ces processus, l'expérimentateur doit être capable de perturber le système biologique en déclenchant un saut de concentration du ligand physiologique suffisamment important avec une précision spatiale et temporelle importante pour imiter le processus physiologique naturel.

Ces groupements protecteurs photo-labiles également appelés « cages » sont des molécules qui possèdent au sein de leurs structures des chromophores capables d'absorber des photons d'énergies E = hν. L'absorption d'une quantité suffisante d'énergie va permettre de promouvoir la molécule vers un état excité à partir duquel plusieurs phénomènes peuvent avoir lieu selon le type de molécule irradiée. Cette quantité d'énergie peut être réémise par l'intermédiaire d'un photon entrainant par exemple un phénomène photo-physique de fluorescence et/ou de phosphorescence, ou bien d'initier une réaction photo-chimique conduisant à un clivage (Figure 6). C'est cette réaction de photo-libération qui nous intéresse tout particulièrement, car à travers celle-ci il est possible de libérer une molécule d'intérêt suite à la rupture du lien covalent qui existait entre le groupement protecteur photo-labile et la molécule d'intérêt.

Suite à une irradiation lumineuse, le passage de la molécule de l'état fondamental vers l'état excité peut être effectué soit par l'absorption d'un photon d'énergie E = hν dans le cadre d'une absorption mono-photonique ou bien par l'absorption simultanée de deux photons d'énergie E = hν/2 dans le cadre d'une absorption bi-photonique (Figure 26). En théorie il est même possible, dans le cadre d'une absorption multi-photonique, d'atteindre des énergies d'irradiation E = hν/n encore plus basses avec des absorptions à trois, quatre et *n* photons.

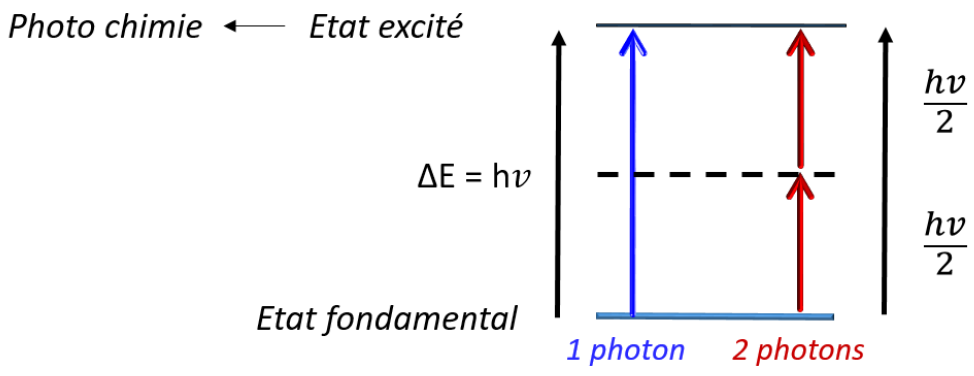


Figure 26 : Représentation du passage d'une molécule de l'état fondamental à l'état excité suite à l'absorption d'un ou deux photons déclenchant le processus de photo-chimie.

I.3.2 Définition d'un groupement protecteur photo-labile idéal

Lorsque l'on souhaite utiliser ou développer la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile, il est important de prendre plusieurs facteurs en compte. Non seulement la synthèse doit être efficace, mais les propriétés photo-chimiques, physico-chimiques et pharmacologiques doivent correspondre avec l'application envisagée. De manière générale, un groupement protecteur photo-labile est considéré comme idéal s'il remplit les caractéristiques suivantes :

- Photochimie : Dans le cas d'une excitation mono-photonique, l'efficacité de photolyse $\varepsilon.\ \Phi$ (ou de photo conversion) qui représente le pourcentage de composé cagé converti en effecteur biologique après irradiation doit être la plus haute possible. Cette efficacité est dépendante de deux grandeurs physiques : le coefficient d'extinction molaire (ε) exprimé en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ qui exprime la proportion de rayons incidents absorbés, et le rendement quantique (ϕ) qui exprime le nombre de molécules engagées dans le processus de photolyse après absorption d'un photon ($\Phi > 0.1$) conduisant à la libération du produit attendu.

  Il est nécessaire que la réaction photo-chimique conduisant à la photo-libération de la molécule d'intérêt soit unique et rapide, mais également que le sous-produit de photolyse soit biologiquement inerte.
- Physico-chimie : Le groupement protecteur photo-labile lié à sa molécule d'intérêt doit être soluble et stable en milieu physiologique pour des applications dédiées à

l'expérimentation *in vivo* afin d'éviter tout phénomène de bruit de fond lié à un processus d'hydrolyse précédant l'irradiation du composé cagé.

- Pharmacologie : L'attache d'un groupement protecteur photo-labile sur une molécule d'intérêt doit, dans la mesure du possible, bloquer au maximum son activité biologique basale pour en étudier pleinement le rôle après photo-libération. En effet, il existe des exemples de molécules cagées qui gardent toujours leurs affinités pour leurs récepteurs comme par exemple l'ATP cagé (Givens *et al.,* 1993).

I.3.3 Historique

Historiquement, l'application première des groupements protecteurs photo-labiles réside dans le rôle de groupement protecteur en chimie de synthèse organique. En effet, les groupements protecteurs photo-labiles tels qu'on les connait aujourd'hui étaient souvent utilisés pour protéger/bloquer les fonctions d'acides aminés qui étaient restaurées après irradiation lumineuse (Pillai, 1980) (Figure 27).

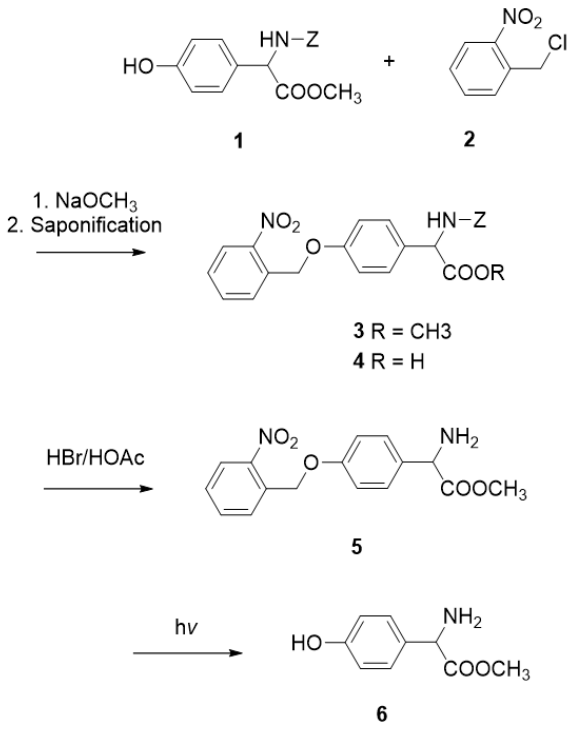


Figure 27 : Exemple d'utilisation du groupement photo-clivable de la famille des 2-nitrobenzyle en chimie de synthèse organique.

Dans cet exemple, l'utilisation d'un groupement protecteur sur la fonction phénol de la tyrosine **1** est nécessaire. En effet, les conditions acides employées pour déprotéger les amines secondaires **3** et **4** du groupe Z pourraient conduire à une réaction secondaire entre le phénol et l'acide acétique formant l'anhydride d'acide correspondant.
L'irradiation de **5** pendant 12 h à 350 nm permet de récupérer la tyrosine **6** déprotégée.

Ils ont petit à petit été utilisés comme outils permettant de photo-réguler différents processus, et nous allons découvrir par la suite les principaux groupements protecteurs photo-labiles rencontrés dans la littérature.

I.3.3.1 Le groupement *o*-Nitrobenzyl (*o*-NB)

Ce n'est que dans la fin des années 70 que les groupements protecteurs photo-labiles *o*-nitrobenzyle commencent à être utilisés comme outils afin de photo-réguler un processus moléculaire cible. Les premières applications de ce principe ont été effectuées par les équipes de (Engels and Schlaeger, 1977; Kaplan *et al.,* 1978) qui ont successivement « cagé » l'adénosine mono-phosphate cyclique (cAMP) et l'adénosine triphosphate (ATP) en utilisant les groupements protecteurs photo labiles de type 2-nitrobenzyle (NB) et 1-(2-nitrophenyl)ethyle (NPE) dont les rendements quantiques respectifs ont été déterminés à ϕ = 0.58 et 0.5. Ils ont ainsi démontré la faisabilité du concept en photo-activant respectivement la protéine kinase cAMP dépendante et la pompe Na/K (Figure 27).

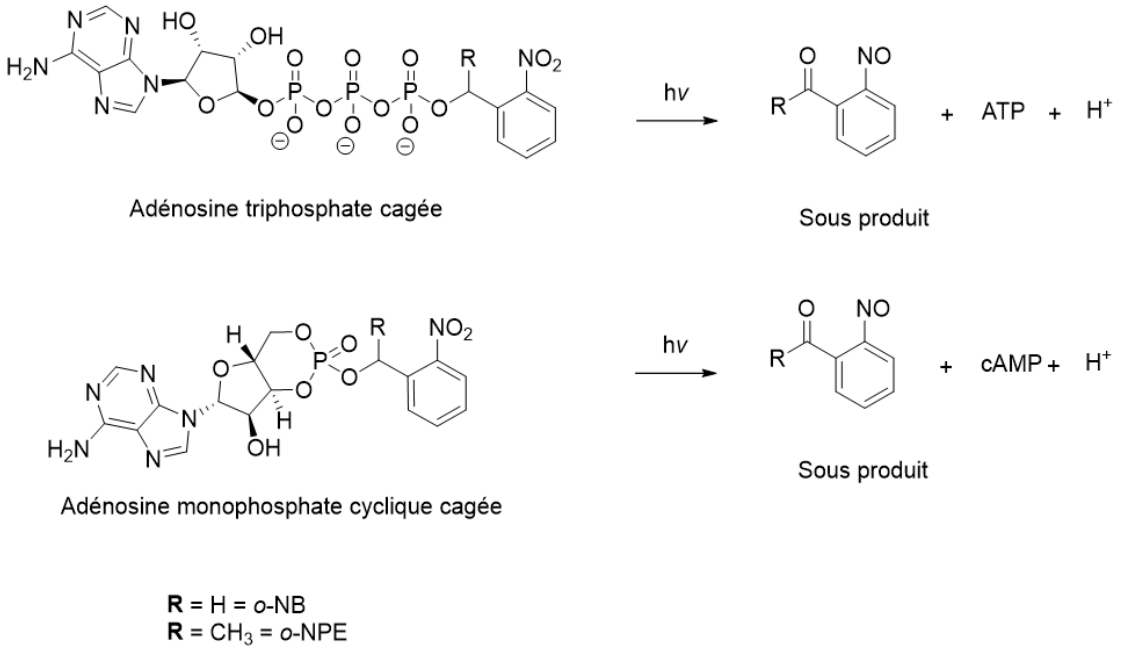


Figure 27 : ATP (haut) et cAMP (bas) cagées à l'aide des groupements protecteurs photo-labiles de la famille des ortho-nitrobenzyl (*o*-NB et *o*-NPE).

Le succès rencontré lors de l'utilisation de ces premiers analogues « cagés » en milieu physiologique a suscité l'intérêt des physiologistes qui ont alors rendu ce concept de composé « cagé » possible pour d'autres grandes variétés de systèmes biologiques. On peut notamment citer l'équipe de D.R Trentham qui a réussi à contrôler les contractions du muscle squelettique lisse de lapin par l'utilisation d'inositol triphosphate (IP_3) (Walker *et al.,* 1987), l'équipe de W.J Snape qui a mis en évidence l'implication de l'adénosine mono-phosphate cyclique (cAMP) dans la relaxation du muscle distal chez le lapin (Willenbucher *et al.,* 1992), l'équipe de D. Thomas et M. Ostap pour ses travaux révélant l'implication de l'ATP dans l'activation de l'actomyosine (Ostap and Thomas, 1991) et enfin l'équipe de Andrew M. MacMillan et Steven Chaulk pour ses travaux effectués respectivement sur l'ARN et l'ADN que nous avons abordés en partie I.2.1 qui conduiront aux futurs développements de systèmes d'études de fonctions de gènes (Chaulk and MacMillan, 1998).

I.3.3.2 Le groupement benzoïne

Les groupements benzoïnes ont des propriétés intéressantes en tant que groupements protecteurs photo-labiles. En effet, ils possèdent à la fois une bande d'absorption autour de 300 nm, des rendements quantiques de photolyse élevés et engendrent un sous-produit de réaction inerte (Corrie and Trentham, 1992).

John Sheehan et Marshall Wilson ont découvert de façon fortuite que l'absorption de lumière par certains dérivés benzoïnes engendrait la formation du produit de type 2-phenylbenzofurane (Sheehan and Wilson, 1964) (Figure 28 A). Ils ont alors mis en évidence qu'après l'absorption de photons, un réarrangement photochimique entrainait la perte du groupement lié en α du carbonyle avec un rendement quantique de $\phi = 0.64$, suggérant ainsi l'utilisation de cette famille de molécules en tant que groupement protecteur photo-labile efficace.

L'équipe de Richard Givens a validé cette hypothèse en photo-libérant du phosphate inorganique de façon quantitative à partir de la structure de benzoïne cagée la moins fonctionnalisée (Givens and Matuszewski, 1984) (Figure 28 B).

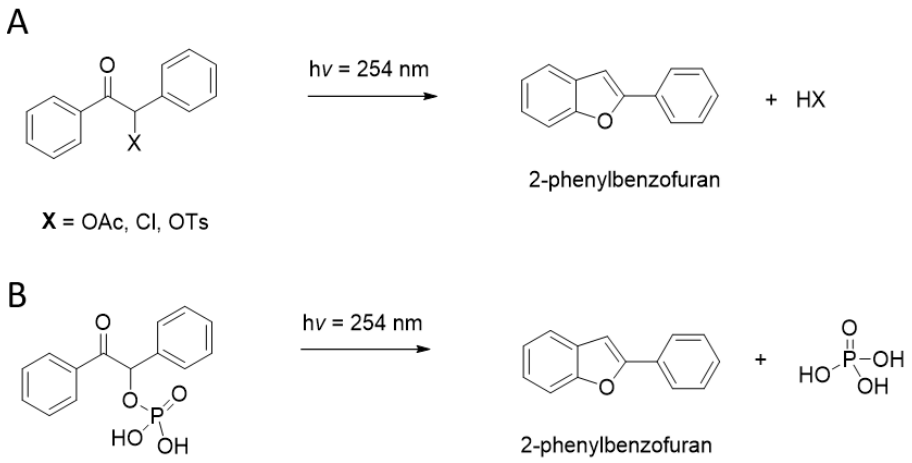


Figure 28 : A) Découverte du mécanisme conduisant à la libération du 2-phenylbenzofuran par réarrangement photochimique depuis la benzoïne. B) Utilisation des benzoïnes en tant que groupements protecteurs photo-labiles dans la libération de phosphate inorganique à 254 nm.

Les groupements protecteurs *p*-hydroxyphenacyle (*p*HP) ont été vus comme de sérieux candidats pour remplacer les dérivés *o*-nitrobenzyle. En effet, il est possible de « cager » n'importe quelle molécule d'intérêt de façon très rapide depuis la *p*-hydroxyacetophenone commerciale. Ce sont des composés qui sont solubles et stables en milieu physiologique pendant plusieurs heures. De plus, le sous-produit de photolyse qu'est l'acide *p*-hydroxyphenylacetique est soluble et non toxique.

Ces dérivés ont logiquement été utilisés pour « cager » de nombreuses molécules bioactives telles que l'ATP (Givens and Park, 1996), le phosphate (Park and Givens, 1997), le glutamate et le GABA (Givens *et al.,* 1997), ainsi que le dipeptide Ala-Ala (Givens *et al.,* 2000). Les rendements quantiques de tous ces exemples varient entre 0.1 et 0.4 (Figure 29). Néanmoins, tous ces exemples nécessitent l'emploi d'une irradiation dans l'ultra-violet.

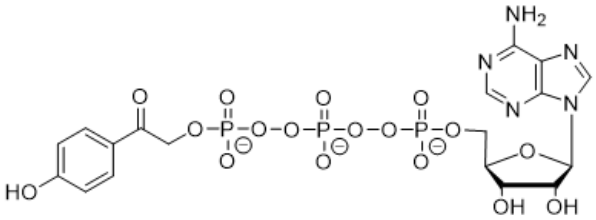
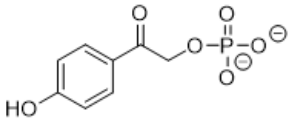
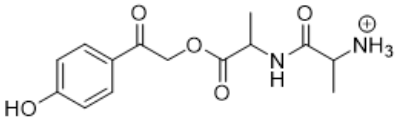
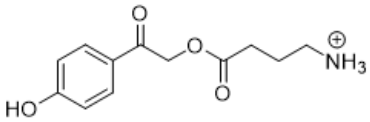
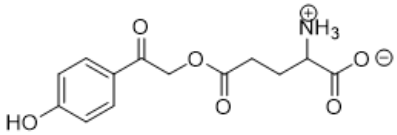
Composés cagés	Substrat	ϕ_{dis}
	ATP	0.37
	Phosphate	0.38
	Ala-Ala	0.26
	GABA	0.35
	Glutamate	0.12

Figure 29 : Rendements quantiques de libération des différents composés cagés de la famille des *p*-hydroxyphenacyl

I.3.3.4 Le groupement coumarinyl

Les dérivés 7-methoxycoumarinyl-4-methyle (MCM) ont été admis en tant que groupements protecteurs photo-labiles pour la première fois suite aux travaux de l'équipe de Richard Givens (Givens and Matuszewski, 1984) mais l'utilisation intensive de ces dérivés de coumarines n'a démarré qu'une dizaine d'années plus tard en procédant à l'irradiation de l'ester de MCM en milieu aqueux afin de photo-libérer l'acide carboxylique protégé ainsi que la coumarine hydroxymethyl (MCM-OH) correspondante (Figure 30).

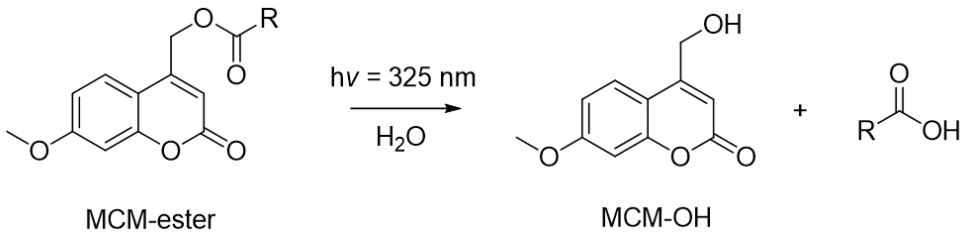


Figure 30 : Photo-clivage des esters de 7-methoxycoumarinyl-4-methyle (MCM) libérant l'acide carboxylique protégé correspondant ainsi que la 4-(hydroxyméthyl)-7-méthoxycoumarine.

Comparés à d'autres familles de groupements protecteurs photo-labiles, ces dérivés de coumarines ne possèdent pas des rendements quantiques très élevés (ϕ = 0.25 pour les meilleures versions). Néanmoins, le coefficient d'extinction molaire élevé combiné à leur rapidité de photolyse font des dérivés coumarines de bons candidats pour l'étude de la photo-libération de biomolécules. C'est pourquoi ils ont été impliqués dans plusieurs travaux concernant la libération d'acides carboxyliques (Schade *et al.,* 1999), de phosphates (Givens and Matuszewski, 1984), de nucléotides cycliques (Furuta and Iwamura, 1998) et enfin de glutamate (Furuta *et al.,* 1999a) (Figure 31).

Composés cagés	Substrat	ϕ_{dis}	ε (325 nm)
	Ac. benzoïque	0.005	13000
	Phosphate	0.05	14000
	cGMP	0.21	13300
	Glutamate	0.02	15000

Figure 31 : Rendements quantiques de libération des différents composés cagés de la famille des 7-methoxycoumarinyl-4-methyle dans un tampon CH_3OH/HEPES 1:1

I.3.3.5 Le groupement nitroindoline

Les dérivés 7-nitroindoline (NI) ont été introduits dans l'histoire de la photochimie par l'équipe de A. Patchornik en synthèse organique en tant que groupements protecteurs d'acides carboxyliques en milieu aprotique (Amit *et al.,* 1976) (Figure 32). Ce n'est que vingt ans plus tard que l'équipe de Papageorgiou (Papageorgiou *et al.,* 1999) remet les dérivés NI au goût du jour en améliorant leurs propriétés photochimiques afin de pouvoir les utiliser comme groupements protecteurs photo-labiles stables en milieu aqueux, spécialement adaptés pour la photo-libération de L-glutamate (Figure 32).

Contrairement aux analogues *o*-NB et coumarine évoqués précédemment, les dérivés nitroindolines présentent un pourcentage d'hydrolyse négligeable en condition physiologique. De plus, le processus photochimique conduisant à la libération de glutamate, de l'ordre de la nanoseconde, est rapide comparé à la cinétique d'activation des récepteurs glutamate (Kerry et al., 1988). Même si les rendements quantiques de ces dérivés sont faibles (ϕ = 0.085), ils

présentent de très faibles activités basales (Canepari *et al.,* 2001), ce qui fait de cette classe de dérivés NI un bon outil pour la compréhension du système nerveux central.

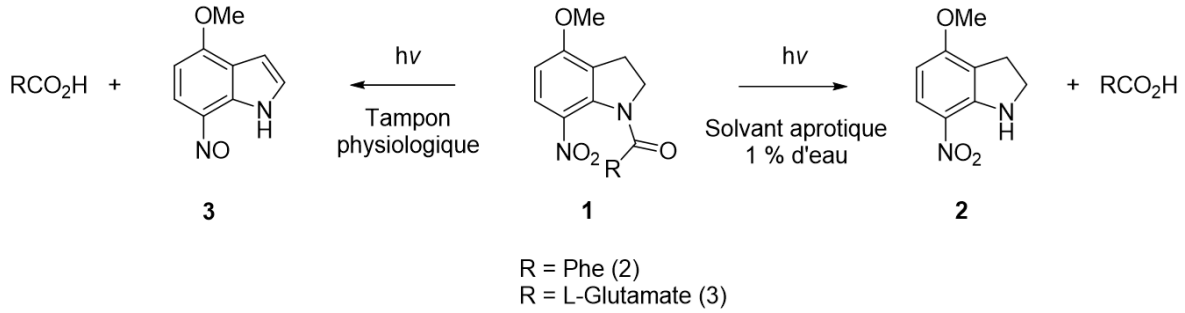


Figure 32 : Différentes voies de photolyse du dérivé NitroIndoline (NI) cagé en fonction du type de milieu utilisé. En milieu aprotique, l'irradiation du dérivé NI forme un sous-produit de photolyse nitroindoline conduisant à la libération de l'acide carboxylique correspondant (voie de droite), tandis qu'en milieu physiologique, l'irradiation du dérivé NI forme un sous produit de photolyse nitrosoindoline conduisant à la libération du L-glutamate (voie de gauche).

Dans tous les exemples abordés concernant la photo-libération contrôlée de nucléotides, de neurotransmetteurs, de protéines, d'ADN, ARNm, ARNi, d'oligonucléotides ou encore de petites molécules inductrices d'expression de gènes, ces différentes équipes ont utilisé des groupements protecteurs photo-labiles sensibles à une excitation mono-photonique nécessitant des rayonnements dans le domaine de l'UV ou du proche visible très énergétiques. L'utilisation de ce type de cages est tout à fait appropriée lorsqu'il s'agit d'étudier *in vitro* ou *ex vivo* les conséquences engendrées sur les voies de signalisation ou encore au niveau fonctionnel d'un organisme d'intérêt.

Néanmoins, lorsqu'il s'agit d'étudier des systèmes *in vivo* qui nécessitent un contrôle spatial et temporel plus élevé (par exemple dans l'étude des connexions inter-neuronales où une précision tridimensionnelle est nécessaire), l'excitation mono-photonique utilisant les groupements protecteurs photo-labiles cités jusqu'ici ne peut plus être considérée comme un outil de choix. D'autre part, la photo-toxicité due à une irradiation utilisant des longueurs d'ondes dans le domaine de l'UV ou du proche visible ne permet pas des études prolongées. Durant les vingt dernières années, un effort considérable a été mené pour mettre au point de nouvelles générations de groupements protecteurs photo-labiles capables d'être utilisés en excitation bi-photonique afin de répondre aux nouvelles exigences de résolution tridimensionnelle et de faible photo-toxicité.

I.3.4 L'Excitation bi-photonique

I.3.4.1 Généralités

Il existe une alternative intéressante quant à la classique excitation mono-photonique. Il s'agit d'utiliser un autre type d'irradiation connu sous la stratégie d « uncaging » à deux photons en utilisant une excitation bi-photonique.

L'absorption bi-photonique fonctionne selon le processus d'optique non linéaire défini par l'équation (1) suivante :

$$P \propto \frac{1}{2}\,\sigma_2\, I^2 \quad (1)$$

Dans cette équation, P représente la probabilité d'exciter une molécule, σ_2 (également appelé δ_a) correspond à l'efficacité avec laquelle la molécule va absorber deux photons et est exprimée en GM (1 GM = 10^{-50} cm^4 s $photon^{-1}$) en l'honneur de Maria Goeppert-Meyer qui a décrit ce phénomène théorique d'optique non linéaire pour la première fois en 1931 (Göppert-Mayer, 1931), et enfin I représente l'intensité lumineuse du laser.

La dépendance quadratique de P par rapport à I nous indique que la probabilité d'exciter une molécule sera la plus élevée à l'endroit où l'intensité lumineuse sera à son maximum ; typiquement au point focal du système optique utilisé pour l'irradiation contrairement à la microscopie confocale classique où l'excitation a lieu sur toute la longueur du trajet optique (Figure 33).

C'est de cette dépendance quadratique que découle la précision tridimensionnelle atteignable par l'absorption à deux photons. Pour atteindre des intensités I capables de fournir assez d'énergie en un seul point, il est nécessaire d'utiliser des lasers spéciaux connus sous le nom de lasers « pulsés », comme par exemple des lasers titane-saphir. Ce type de dispositif est classiquement utilisé pour envoyer de courtes impulsions d'une durée de 100 fs à des fréquences de 80 MHz avec une puissance variant entre 10 et 25 mW.

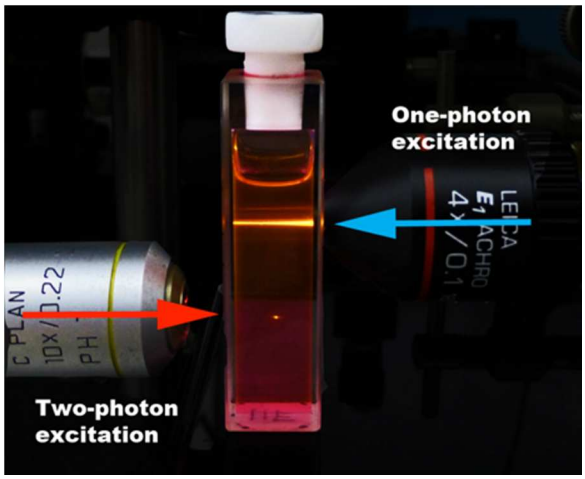


Figure 33 : Dans cet exemple, la solution contenant de la fluoroscéine est irradiée avec un laser à 365 nm (1-Photon) ou un laser à 730 nm (2-Photon). Ce n'est qu'au point focal de l'instrument que l'intensité est suffisamment importante pour déclencher le phénomènre d'optique non linéaire. A l'aide d'une irradiation bi-photonique (2-Photon, laser de gauche) il est possible d'exciter une petite zone de l'échantillon (de l'ordre de quelques femtolitres) avec une résolution tridimensionnelle. En irradiation mono-photonique (1P-Photon, laser de droite), l'échantillon est excité tout le long du trajet optique en formant un double cône d'irradiation.

Comme nous avons pu le voir dans la partie I.3.1 (Figure 26), une molécule peut atteindre un état excité par l'absorption d'un photon d'énergie hν, mais il est également possible, sous certaines conditions, d'exciter la molécule par l'absorption simultanée de deux photons d'énergie $E = \frac{h\nu}{2}$ (2).

Ainsi, passer d'une excitation mono-photonique à une excitation bi-photonique implique une longueur d'onde d'excitation multipliée par deux. Par exemple, si un groupement protecteur photo-labile possède un λ_{max} d'absorption (mono-photonique) de 365 nm, il pourra être photo-activé avec des longueurs d'ondes d'irradiations deux fois plus grandes soit 730 nm, se rapprochant ainsi du rayonnement infrarouge (IR) contrairement aux rayonnements ultraviolets (UV) classiquement utilisés.

Il est important de garder en tête que tous les groupements protecteurs photo-labiles performants en excitation bi-photonique peuvent être utilisés en excitation mono-photonique, mais la réciproque n'est pas vraie. En d'autres termes, tous les groupements protecteurs photo-labiles abordés précédemment dans la partie historique ne peuvent pas forcément être « simplement » utilisés en excitation bi-photonique. Nous aurons l'occasion d'en reparler plus tard en évoquant les caractéristiques minimales nécessaires pour qu'un groupement protecteur lambda soit potentiellement utilisable en excitation bi-photonique.

L'accès aux gammes de rayonnements proches IR présente d'autres avantages non négligeables lorsque l'on souhaite faire des expérimentations *in vivo*.

Tout d'abord, l'utilisation d'un laser proche infrarouge permet de pénétrer plus en profondeur dans les tissus biologiques (jusqu'à plusieurs mm) puisque l'on se situe dans la fenêtre de transparence des tissus (Juzenas *et al.,* 2002) (Figure 34).

Il suffit de tenir sa main vers la lumière du soleil pour s'en rendre compte ; les parties les plus fines deviennent rouges puisqu'elles vont laisser passer préférentiellement les rayons rouges du soleil. En dehors de cette fenêtre optique comprise entre 700 et 1200 nm, la lumière est fortement diffusée et/ou absorbée par les principaux chromophores biologiques tels que l'hémoglobine et la mélanine dans le visible, mais également dans l'infrarouge (> 1200 nm) par l'eau et les lipides, principaux composants de notre organisme.

Enfin, l'utilisation du rayonnement proche infrarouge, moins énergétique comparé au rayonnement UV, va engendrer une photo-toxicité amoindrie sur les tissus ainsi qu'une thermo-toxicité réduite par l'utilisation des lasers pulsés qui envoient des flux discontinus de photons permettant une meilleure dissipation de la chaleur (Helmchen and Denk, 2005).

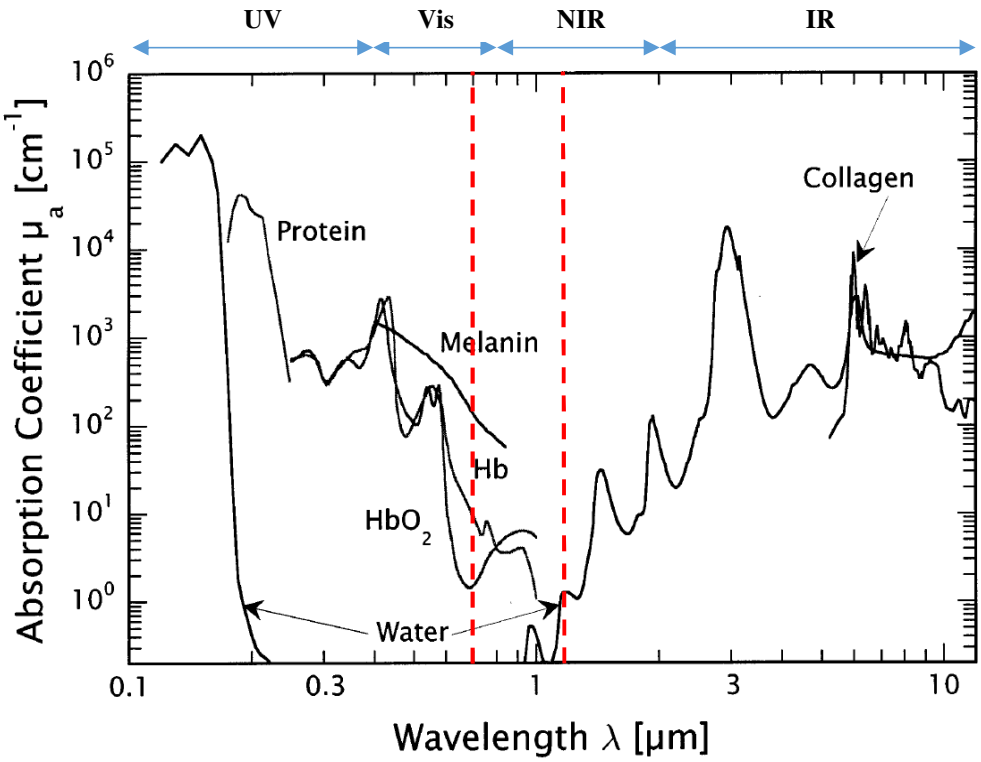


Figure 34 : Spectre d'absorption des principaux constituants des milieux biologiques. La fenêtre de transparence se situe entre 700 et 1200 nm (pointillés rouges).

I.3.4.2 Vers la conception de groupements protecteurs photo-labiles performants en excitation bi-photonique

De la même manière qu'en excitation mono-photonique, il est possible de déterminer la section efficace de photo-libération à deux photons (δ_u) d'une molécule en faisant le produit de sa section efficace d'absorption à deux photons (δ_a ou σ_2) exprimée en GM par le rendement quantique à deux photons (ϕ_u) de la réaction (3) :

$$\delta u = \delta a \, \phi u \qquad (3)$$

Comme énoncé précédemment, tous les groupements protecteurs photo-labiles ne sont pas efficaces en excitation bi-photonique, certains affichant des sections efficaces de photo-libération à deux photons (δ_u) < à 0.1 GM (Corrie *et al.,* 2005) considérés comme inexploitables pour des applications biologiques.

Afin de mettre au point de nouvelles molécules performantes en excitation bi-photonique, de nombreux facteurs structuraux ont été étudiés afin d'influencer la valeur de la section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) (He *et al.,* 2008; Pawlicki *et al.,* 2009). Grâce à ces nombreuses études, il est même possible de prédire, par calcul, ce paramètre (δ_a) avec une précision non négligeable (Dreuw *et al.,* 2012).

Les paramètres principaux responsables d'une augmentation de la section efficace (δ_a) sont la présence d'un système conjugué et coplanaire au sein de la structure ainsi que la présence d'un couple de groupements électro-donneur et/ou d'électro attracteur (Figure 35).

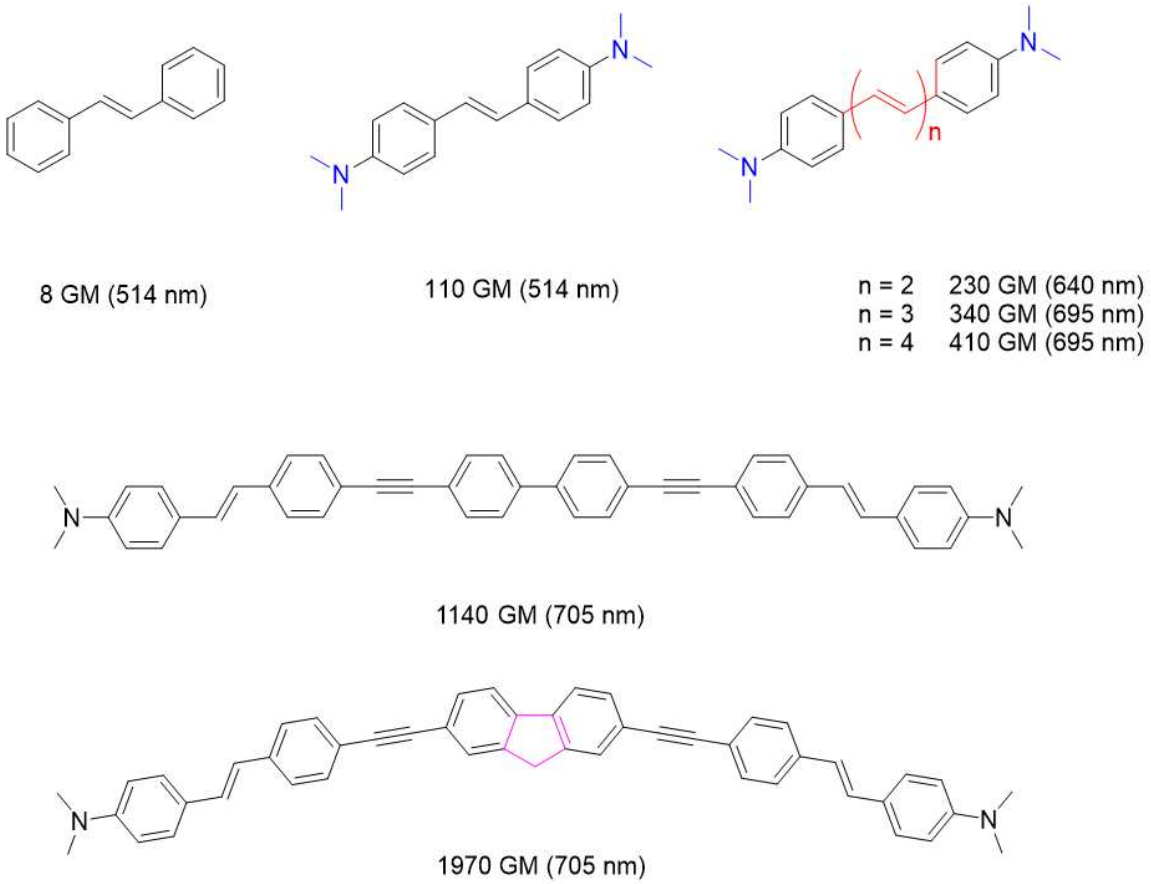


Figure 35 : Augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons (δa) par l'ajout d'un couple d'électro-donneur (bleu), mais également par l'extension du système π-π (rouge) favorisant la circulation des électrons. La rigidification de la structure (rose) permet d'augmenter encore cette section efficace en supprimant la rotation de la liaison entre les deux cycles aromatiques.

La mise en évidence des différents facteurs principaux à l'origine de l'augmentation de ces valeurs de section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) a permis de mettre au point de nombreux exemples de groupements protecteurs photo-labiles sensibles à l'excitation bi-photonique. La plupart d'entre eux proviennent d'améliorations structurales apportées aux groupements initialement utilisés en excitation mono-photonique, comme le montre par exemple cette évolution du groupement de la famille des ortho-nitrophénéthyles (*o*-NPP) (Figure 36).

Les ajouts d'un couple électro-donneur/accepteur, d'une élongation de conjugaison ainsi que d'une rigidification de la structure ont permis de transformer un groupement protecteur inutilisable en excitation bi-photonique (NPP) en une série de groupements protecteurs dont la photo-libération en glutamate et GABA s'est avérée efficace ; l'un d'entre

eux possède à ce jour l'une des meilleures sections efficaces de photo-libération à deux photons (δu = 11 GM) en milieu physiologique (Donato *et al.,* 2012).

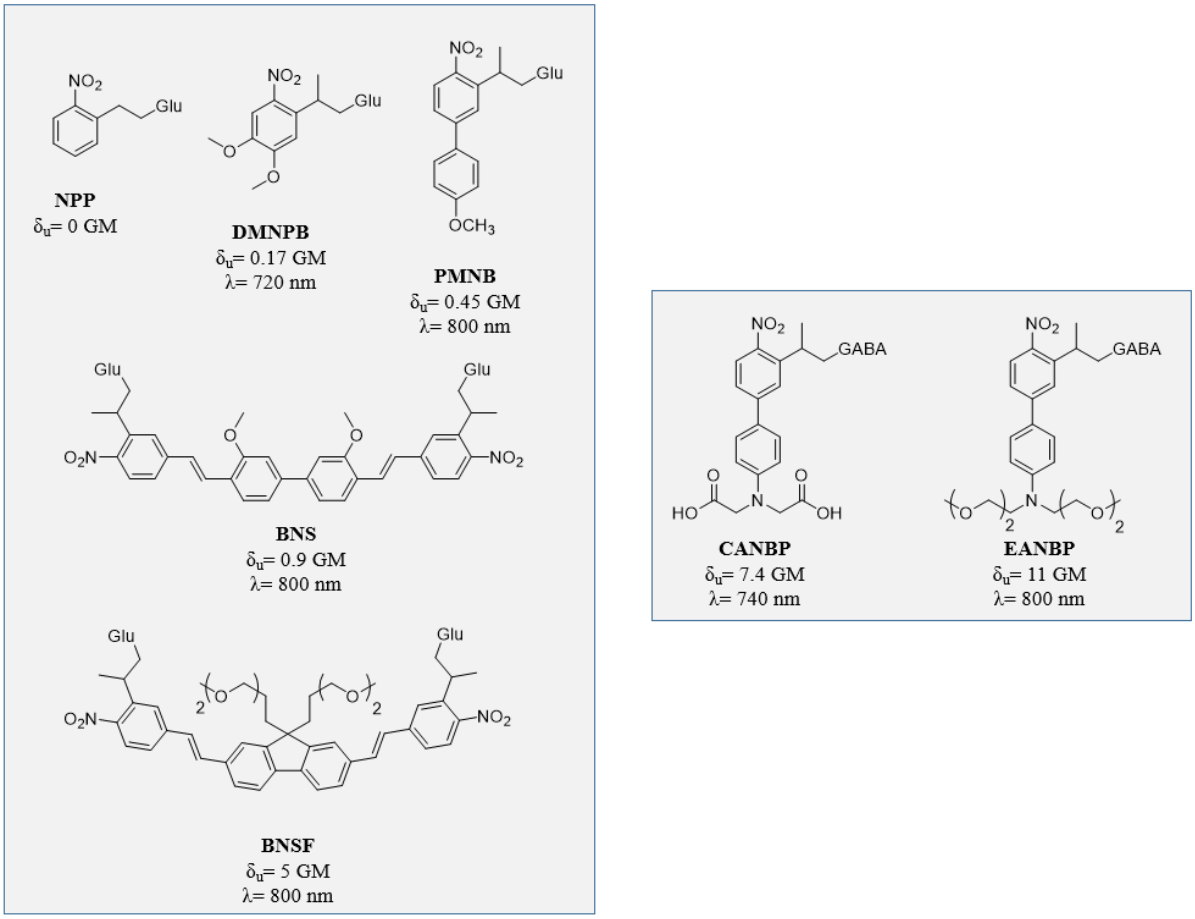


Figure 36 : Evolution structurale depuis le groupement NPP initialement utilisé en excitation mono-photonique pour le relargage de glutamate n'ayant aucune sensibilité à l'excitation bi-photonique jusqu'au groupement BNSF présentant une section efficace de photo-libération à deux photons (δu) de 5 GM (gauche). Evolution depuis le groupement NPP jusqu'aux groupements CANBP et EANBP dans le relargage de l'acide γ-aminobutyrique présentant respectivement une section efficace de photo-libération à deux photons (δu) de 7.4 et 11 GM (droite).

I.4. Projet

Ce projet de recherche nommé LocaGenEx a été rendu possible grâce au financement obtenu auprès de l'agence nationale de la recherche (ANR). L'avancé de ce projet est assurée par la collaboration entre deux partenaires : le Laboratoire de Conception et d'Application de Molécules Bioactives (CAMB) dont je fais partie, ainsi que le département d'anatomie et de biologie cellulaire basé à Heidelberg en Allemagne.

Ce projet a pour but d'étudier la structuration des réseaux neuronaux qui est un phénomène fondamental assurant le bon fonctionnement du cerveau. Afin de comprendre la formation et l'activité de ces réseaux, nous souhaitons développer une méthode qui permette de contrôler, sous l'action de la lumière et *in vivo*, l'expression de gènes ciblés impliqués dans ce phénomène à l'échelle de la cellule neuronale individuelle.

L'objectif final de ce projet réside dans la photo-régulation de l'expression du gène Kir2.1 impliqué dans le « silencing » de l'activité électrique des neurones par l'intermédiaire de canaux sélectifs aux cations potassium. Ainsi il sera possible de faire des études de gène/fonction quant à son influence sur l'activité des réseaux neuronaux.

In fine, la photorégulation de l'expression des gènes *in vivo* se révélera être un outil très puissant pour la recherche biologique en général et pour la neurobiologie et la biologie du développement en particulier.

CHAPITRE II

Vers la synthèse totale de dérivés tétracyclines photo-activables

II.1 Stratégie

Afin de photo-réguler l'expression des gènes *in vivo* avec un contrôle spatio-temporel élevé, la stratégie que nous avons retenue consiste à combiner le système d'expression de gènes inductible par la tétracycline à des analogues photo-activables de tétracyclines sensibles à l'excitation bi-photonique.

En effet, nous avons vu dans l'introduction que la photo-activation de l'expression d'un gène induit par la tétracycline avait été démontrée avec succès *in vitro* (Cambridge *et al.,* 2006) en utilisant des groupements protecteurs photo-labiles sensibles à l'excitation mono-photonique (DMNPE) dans l'UV ou dans le proche visible.

Cependant, les applications *in vivo* étant expérimentalement beaucoup plus contraignantes, il est donc essentiel d'optimiser ce système en utilisant des groupements protecteurs photo-labiles plus adaptés.

Enfin, la stratégie de synthèse employée ne permet pas de coupler un groupement protecteur photo-labile de façon sélective au vu du nombre important de fonctions réactives sur la doxycycline (Figure 37 en rouge), ce qui conduit à des bruts réactionnels très difficiles à purifier et dont les spectres RMN sont compliqués à interpréter. Cette complexité induit une chute drastique des rendements de réactions et implique l'utilisation de méthodes d'analyses très fines afin de caractériser avec précision sur quelle position le groupement protecteur est fixé.

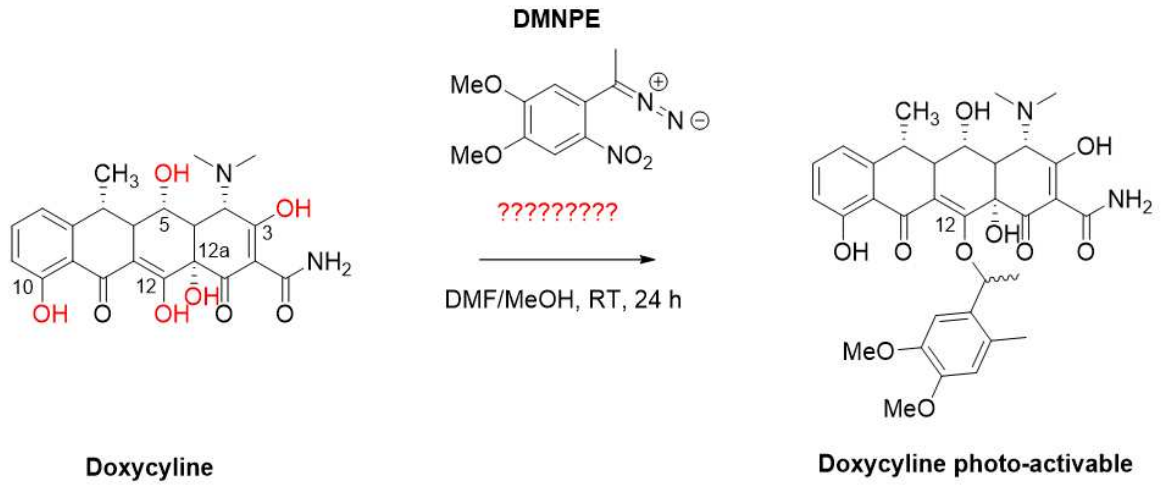


Figure 37 : Synthèse non sélective de la doxycycline cagée en position 12 obtenue par l'équipe de Cambridge et al. sans avoir recours à des groupements protecteurs. Chaque fonction (rouge) peut intervenir dans la réaction de couplage donnant plusieurs isomères structuraux.

Afin d'éviter les problèmes de synthèse rencontrés par l'équipe de Cürten (Cambridge *et al.,* 2006), nous avons démarré ce projet avec l'ambition de développer la synthèse d'analogues de tétracyclines photo-activables efficace et sélective. Pour cela, nous avons basé notre stratégie sur une approche de synthèse totale afin de construire des dérivés d'analogues de tétracycline sélectivement protégés (Figure 38) en s'appuyant sur les travaux effectués par le groupe de Myers (Brubaker and Myers, 2007; Charest *et al.,* 2005; Sun *et al.,* 2008). Face à la recrudescence des mécanismes de résistance aux antibiotiques tétracyclines, ce groupe a mis au point une synthèse multi-étapes donnant accès à plusieurs nouvelles structures d'antibiotiques basées sur l'utilisation d'une énone (AB) et d'un dérivé de 6-methoxybenzoate (D), appelés aujourd'hui précurseurs de Myers.

Ainsi l'utilisation de cette stratégie aboutirait à trois analogues de doxycycline où les positions 3, 10 et 12 obtenues par déprotections sélectives pourraient être respectivement couplées à un groupement protecteur photo-labile afin d'étudier leur efficacité sur l'induction d'expression de gènes.

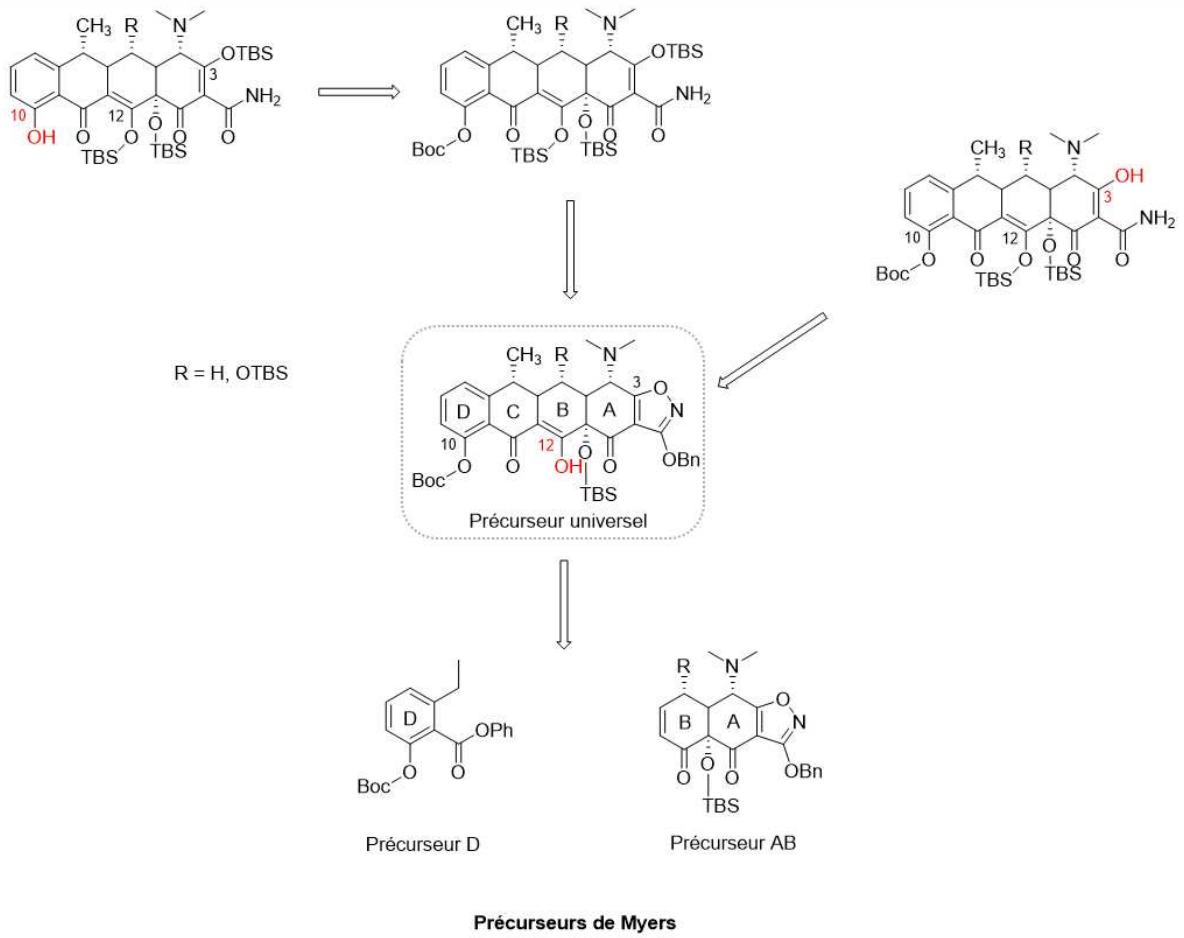


Figure 38 : Rétrosynthèse de l'analogue de tétracycline protégé universel (milieu) donnant accès à la position 12 à partir des précurseurs de Myers. Depuis cet intermédiaire, les positions 3 et 10 peuvent être obtenues par déprotections sélectives des groupements protecteurs TBS et Boc en vu d'un couplage avec un groupement protecteur photo-labile.

Pour mémoire, dans le système d'expression de gène que nous allons utiliser, c'est l'interaction entre la tétracycline et la protéine rTetA qui est à l'origine de l'induction du système (Figure 25). En empêchant cette interaction par ajout d'un groupement protecteur photo-labile encombrant, on devrait être en mesure de masquer la fonctionnalité du système.

Des études relation structure-activité (Orth *et al.,* 2000) ont été entreprises sur le modèle de résistance bactérienne abordé en introduction à partir de structures cristallographiques de la protéine TetR piégée avec son inducteur tétracycline (Tc) en présence de magnésium (Figure 39). Ces études montrent que lorsque le complexe TetR-$[MgTc]^+$ est formé, plusieurs interactions indispensables entre les acides aminés présents dans la poche hydrophobe de la protéine TetR et la tétracycline ont lieu (Figure 39 B). Parmi toutes ces interactions, celles formées entre les acides aminés Glu147, Thr103 et His100 et le système dicéto-phénolique O11-O12 de la tétracycline (Figure 39 A) semblent être primordiales.

Appliquées au système d'expression de gène Tet-on, ces différentes interactions engendrent des mouvements pendulaires dans les hélices α permettant au complexe rTetA-$[MgTc]^+$ de se lier au domaine de liaison de l'ADN (tetO) et d'initier la transcription du gène d'intérêt (Figure 39 C).

Ainsi, en proposant trois analogues de tétracycline « cagés » sur différentes positions, nous pourrions déterminer de manière expérimentale quelle position serait la plus efficace pour empêcher le complexe rTetA-$[MgTc]^+$ de se lier au domaine de liaison de l'ADN avant d'effectuer l'expérience d'irradiation conduisant à la photo-libération de la tétracycline.

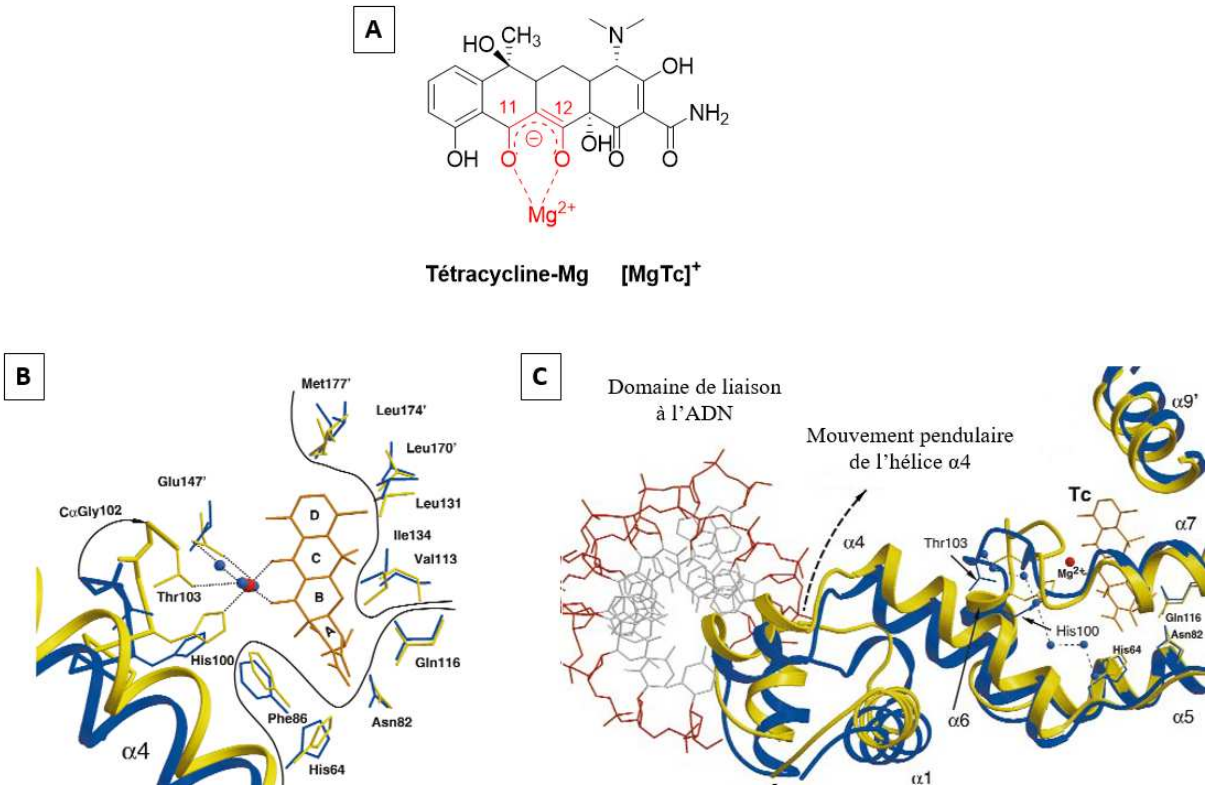


Figure 39 : A) Stucture chimique du complexe Tétracycline-Mg^{2+} formé en condition physiologique par chélation du magnésium par le système dicéto-phénolique O11-O12 de la tétracycline.
B) Structure cristallographique mettant en avant les différentes interactions entre les acides aminés contenus dans la poche hydrophobe de la protéine TetR et la tétracycline nécessaire pour induire l'expression de la protéine TetA.
C) Structure cristallographique mettant en avant le mouvement pendulaire des hélices α (jaune) déclenché par l'interaction TetR-[MgTc]+ comparé à la disposition de ces hélices en absence de tétracycline (bleu). Le mouvement pendulaire des hélices α4 déplace le domaine de liaison à l'ADN de l'ordre de 5 Å qui ne peut alors plus se lier sur l'opérateur tetO, démarrant la transcription de TetA.

II.2 Synthèse totale de dérivés tétracyclines

II.2.1 Synthèse du précurseur énone AB

L'amine (S)-allylique **8** a été synthétisée en 7 étapes avec un rendement global de 2% (Figure 40). En partant de l'acétylènecarboxylate de diméthyle **1** et de la N-hydroxyurée commerciale, on obtient par cycloaddition [2+3] intermoléculaire l'isoxazole **2** correspondant. Ce dernier, par substitution nucléophile en milieu basique sur le bromure de benzyle, permet d'obtenir l'isoxazole protégé **3** dont la fonction ester est réduite en fonction aldéhyde par l'action d'un équivalent strict de « Di-*iso*butyl Aluminium Hydride » (DIBAL-H) à -78 °C pour donner **4**. L'addition nucléophile du bromure de vinyl magnésium sur l'aldéhyde **4** permet d'obtenir un mélange racémique des énantiomères (R) et (S) d'alcool allylique **5** correspondant. Comme nous pouvons le voir sur le schéma rétro-synthétique (Figure 38), la fonction diméthyl amine de l'énone AB est portée par un carbone stéréogène de configuration (S).

Le contrôle stéréochimique de ce centre asymétrique est capital. Par exemple, la simple épimérisation de ce centre (S) -> (R) entraine une perte d'affinité avec la protéine TetR de l'ordre de 300 fois et une perte d'induction de l'ordre de 80 fois sur le modèle bactérien. Pire encore, la suppression de cette position diméthyl amine entraine une perte totale d'activité de la tétracycline (Sum *et al.,* 1994).

Par conséquent, il est primordial de conserver cette stéréochimie si nous voulons préserver l'activité inductrice de la tétracycline vis-à-vis du système Tet-On.

Le mélange d'énantiomère d'alcool allylique **5** étant très difficile à séparer, l'utilisation d'une enzyme (lipase) très utilisée dans la synthèse de synthons énantiomériquement purs, associée à l'acétate de vinyl, va permettre de protéger stéréo-sélectivement l'alcool allylique en configuration (R) pour donner **6** qui est cette fois-ci séparable de la molécule **5** par purification à l'aide d'une chromatographie sur colonne de silice.

Afin de ne pas perdre de matière, l'alcool allylique **5** de configuration (S) non protégé par l'enzyme a fait l'objet d'une inversion de Walden par l'utilisation d'une réaction de Mitsunobu permettant de récupérer **6'** dans la configuration (R) souhaitée. Les deux esters allyliques (R) protégés sont ensuite réduits en milieu basique en utilisant du carbonate de potassium. L'alcool allylique **7** énantiomériquement pur (R) est ainsi obtenu.

Une nouvelle inversion de Walden est effectuée en utilisant de la diméthylamine afin d'obtenir l'amine (S)-allylique **8** souhaitée.

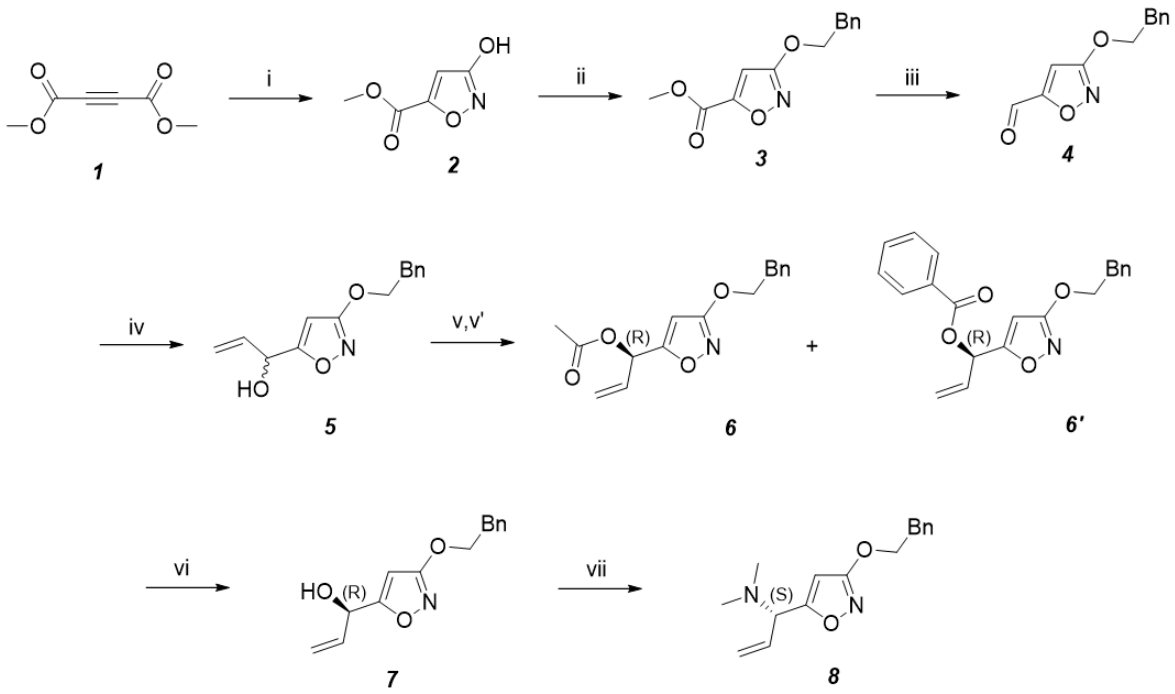


Figure 40 : Synthèse du (S)-N,N-dimethyl-1-(3-phenethoxyisoxazol-5-yl)prop-2-en-1-amine ***8***

(i) Hydroxyurée, CH_3OH, t.a, 4h, 40%, (ii) Bromure de benzyl, K_2CO_3, acétone, 70 °C, 4 h, 53 %, (iii) DIBAL-H, CH_2Cl_2, - 78 °C, 1h, 80%, (iv) Bromure de vinyle magnésium, THF, - 78 °C, 40 min, 99%, (v) Acétate de vinyle, Lipase AK, hexane, t.a, 92 h, 42%, (v') (a) Acide benzoïque, PPh_3, DIAD, THF, 0 °C à t.a, 12 h, 73%, (vi) K_2CO_3, CH_3OH, t.a, 30 min, 70%, (vii) Diméthylamine, chlorure de méthanesulfonyle, DIPEA, CH_2Cl_2, - 30 °C, 1h30, 44%

Le couplage par lithiation du cycle isoxazole de l'amine (S)-allylique **8'** en présence de *n*-butyllithium à -100 °C avec le 3-méthoxyfurfural n'a jamais permis d'obtenir le mélange épimérique d'adduits carbinol secondaires **9** souhaité (Figure 41) comme il est décrit dans la littérature (Brubaker and Myers, 2007). Plusieurs tentatives ont été effectuées en modifiant les conditions de réactions suivantes : variations de températures, temps de réactions différents, variations dans la vitesse d'ajout du *n*-butyllithium ou du 3-méthoxyfurfural et utilisation de différents solvants. Toutes ces tentatives conduisent chaque fois à une dégradation quasiment totale du composé **8** dont les bruts de réactions étaient systématiquement ininterprétables par RMN.

Après cinq mois passés sur le développement de ces huit étapes, nous avons pris la décision d'arrêter cette stratégie de synthèse totale. En effet, le faible rendement global de ces sept premières étapes associé aux nombres d'étapes complexes restantes nous a paru être une stratégie beaucoup trop chronophage pour obtenir le précurseur sélectivement protégé « universel » souhaité ; d'autant plus que les méthodes de couplages par réaction de Mitsunobu entre la tétracycline protégée et le groupement protecteur photo-labile (EANBP) performant en excitation bi-photonique restaient à explorer. C'est pourquoi nous avons opté pour une nouvelle stratégie de synthèse que nous allons aborder dans le chapitre suivant.

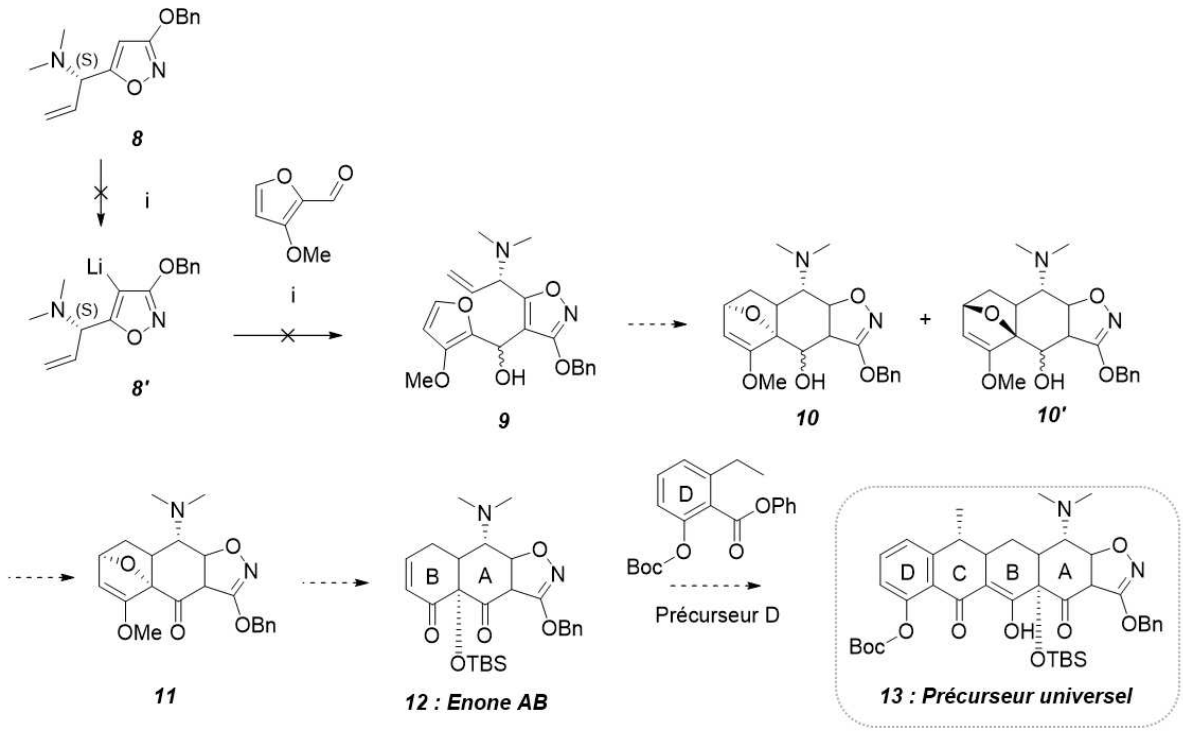


Figure 41 : Synthèse prévue du précurseur tétracycline universel ***13***.

(i) 3-methoxyfurfural, *n*-BuLi, THF, - 100 °C, 3h, 0 %.

CHAPITRE III

Hémi-synthèse de dérivés tétracyclines photo-activables

III.1 Stratégie

III.1.1 Une fonction plus réactive que les autres : la fonction amine

Afin d'obtenir des analogues de tétracyclines photo-activables de façon efficace et plus rapide que par une approche synthétique complexe, nous avons réaxé notre stratégie vers une approche hémi-synthétique en démarrant les manipulations à partir de la doxycycline hyclate commerciale ($C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 0.5H_2O \cdot 0.5C_2H_6O$).

Comme énoncé auparavant, la doxycycline est une molécule naturelle complexe et poly-fonctionnalisée (Figure 37) et il est très difficile de coupler sélectivement un groupement protecteur photo-labile sur une fonction précise. Par conséquent, notre nouvelle stratégie consiste à introduire une nouvelle fonction chimique dont le caractère nucléophile devait être plus marqué que les autres fonctions naturellement portées par la doxycycline, afin de favoriser un couplage sélectif sur la nouvelle fonction insérée. Notre choix s'est porté sur les fonctions amines qui présentent, via le doublet non liant porté par l'atome d'azote, des propriétés nucléophiles plus fortes que les fonctions phénols et alcools (Figure 42). Hormis la sélectivité accrue, l'utilisation de fonctions amines comme point d'accroche présente un autre avantage non négligeable : la stabilité du lien formé avec le groupement protecteur photo-labile (Figure 42). En effet, nous avons prévu de faire réagir ces amines avec des fonctions chloroformiates (également appelées chlorocarbonates) pour former des liens carbamates robustes en milieu physiologique vis-à-vis des processus d'hydrolyses. Ainsi, l'activité basale classiquement observée due au processus d'hydrolyse des liens carbonates devrait être évitée.

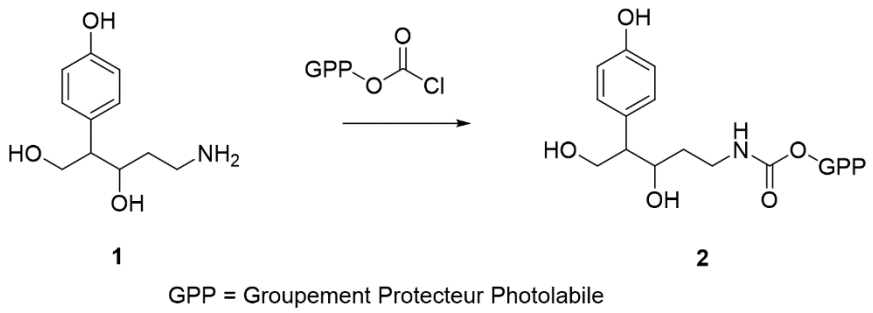


Figure 42 : Principe général de réactivité entre différentes fonctions chimiques. Dans ce cas, la fonction amine portée par **1** étant la plus nucléophile, une seule réaction sélective majoritaire se produira avec la fonction chloroformiate électrophile du groupement protecteur photo-labile pour donner **2**.

III.1.2 Sur qu'elle position doit être insérée la fonction amine ?

Nous avons vu dans la section Stratégie II.1 que le modèle structural obtenu grâce aux structures cristallographiques a permis de mettre en évidence le mode de liaison du complexe $[MgTc]^+$ avec la protéine TetR. Ce modèle nous permet de prédire qu'elle(s) région(s) de la tétracycline peut ou peuvent être modifiée(s) sans altérer sa capacité d'interagir avec la protéine TetR ce qui pourrait perturber son activité biologique.

Si l'on regarde avec précision le repliement de la protéine TetR sur la tétracycline, on note qu'il subsiste une région ouverte à l'entrée du tunnel autour de la position 9 de l'inducteur (Figure 43).

A partir de ces observations, nous avons décidé de synthétiser deux analogues de tétracyclines modifiées en position 9 ; le premier comportant l'ajout d'une fonction amine simple et le second comportant un bras espaceur aminé plus long afin de tester ces analogues vis-à-vis du système d'expression de gènes à la tétracycline et vérifier s'ils possèdent toujours une activité biologique après modification chimique.

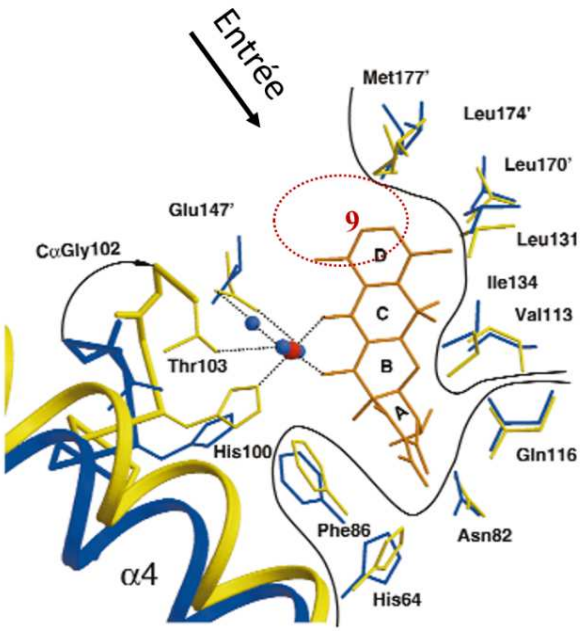


Figure 43 : Les interactions entre la tétracycline et la protéine TetR montrent qu'une modification en position 9 ne devrait pas interférer avec le repliement de la protéine et donc ne pas faire perdre l'activité biologique de la molécule.

III.2 Hémi-synthèses de dérivés tétracyclines modifiées en position 9

III.2.1 Synthèse du dérivé 9-amino-doxycycline

Le dérivé 9-amino-doxycyline a été obtenu en deux étapes avec un rendement global de 93 % (Figure 41). En démarrant la synthèse avec la doxycycline hyclate commerciale **1**, le dérivé 9-nitro-doxycycline **2** est obtenu par nitration en position 9 en utilisant un mélange d'acide nitrique et sulfurique concentré à 97 %.

Il est important de noter que cette réaction de nitration aromatique est décrite dans la littérature comme aboutissant à un mélange de régio-isomères 1:7 respectivement sur les positions 7 et 9 en utilisant un mélange d'acide sulfurique/ nitrate de potassium (Barden *et al.,* 1994). En effet, la fonction phénol agissant comme un groupement ortho et para-activateur, nous nous attendons à obtenir un mélange de régio-isomères ; le régio-isomère 7 étant toutefois moins favorisé à cause de la gêne stérique engendrée par le groupement méthyl en position 6 (Boothe *et al.,* 1960).

Etonnamment, l'utilisation d'acide nitrique concentré ajouté goutte à goutte à la place du nitrate de potassium permet de faire une nitration régio-sélective en position 9 confirmée par l'interprétation du chromatogramme HPLC et les spectres RMN.

Le groupement nitro en position **2** a ensuite été sélectivement réduit en groupement amino avec du dihydrogène en présence de palladium sur charbon pour donner le premier analogue 9-amino-doxycycline **3**.

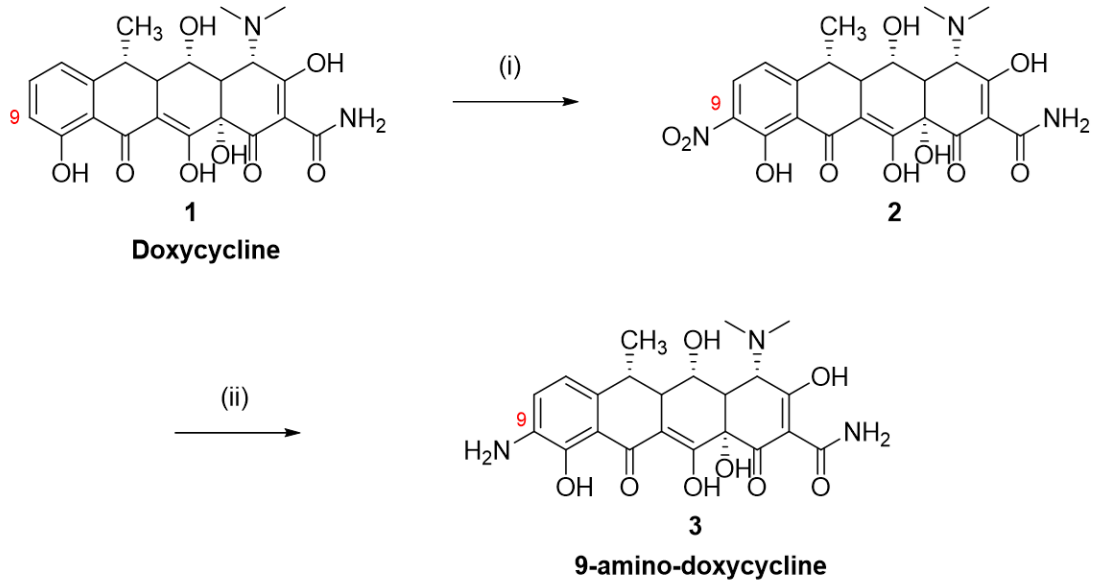


Figure 41 : Synthèse du dérivé 9-amino-doxycycline ***3***.

(i) HNO_3, H_2SO_4, 0 °C à t.a, 1h, 97 %, (ii) H_2/Pd/C, CH_3OH, t.a, 6H, 96 %.

III.2.2 Synthèse du dérivé 9-glycylamido-doxycycline

Le dérivé 9-glycylamido-doxycyline **5** a été obtenu en deux étapes depuis le dérivé **3** avec un rendement global de 76 % (Figure 42). La préparation de l'anhydride d'acide symétrique à partir de l'acide aminé *N*-Boc-glycine protégé en présence de *N*,*N*'-diisopropylcarbodiimide (DIC) a permis l'acylation sélective de la fonction amino du dérivé **3** pour obtenir la molécule **4**. La déprotection du groupement Boc par l'acide trifluoroacétique a permis d'obtenir le deuxième analogue 9-glycylamideo-doxycycline **5** souhaité.

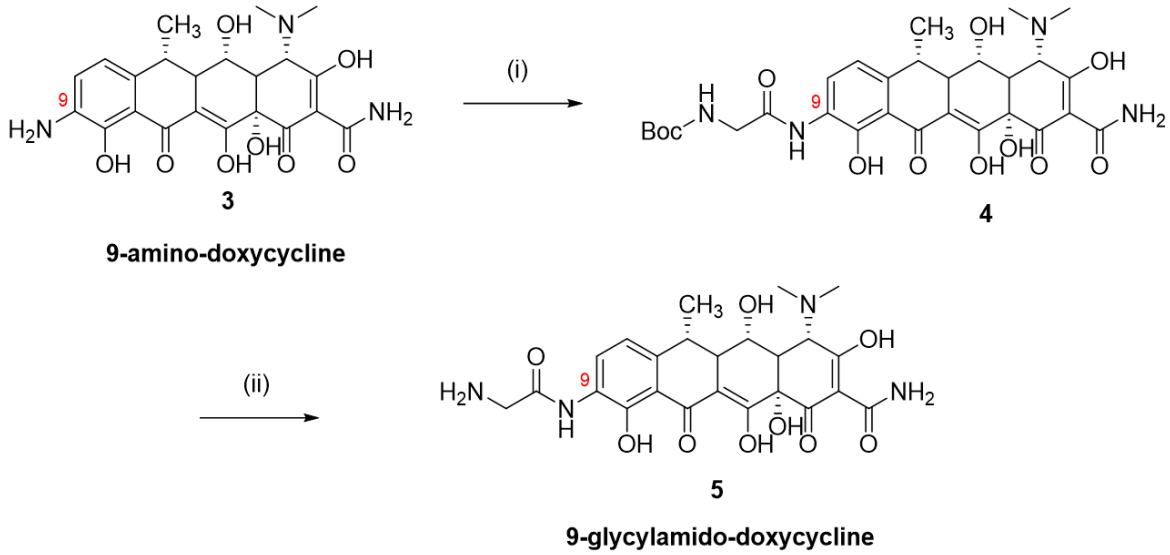


Figure 42 : Synthèse du dérivé 9-glycylamido-doxycycline **5**.

(i) *N*-Boc-glycine, DIC, CH_2Cl_2, DMF, t.a, 2 h, 90 %, (ii) TFA, t.a, 1 h, 85 %

III.2.3 Applications biologiques *in vitro* des deux analogues de doxycycline 3 et 5

Suite à l'obtention des deux analogues de doxycycline **3** et **5** modifiés en position 9 nous avons, dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Docteur Sidney Cambridge, envoyé ces molécules pour tester leurs activités biologiques vis-à-vis du système d'expression de gènes inductible à la tétracycline après modification chimique.

Pour cela, des tests *in vitro* ont été effectués sur des cellules neuronales d'hippocampe de rat ayant intégrées au préalable deux plasmides (DriverTET et ResponderTET) par l'intermédiaire d'un vecteur de transfert de gènes de type virus adéno-associé (AAV) dont le principe général est représenté en figure 43.

En absence de doxycycline ou d'analogues de doxycycline (Figure 43 A), la protéine rtTA n'est pas capable de reconnaître sa séquence promotrice (Tet promoter). Dans ce cas-là, on observe par microscopie confocale uniquement l'expression de la protéine fluorescente rouge qui est un rapporteur de fluorescence permettant de contrôler que le plasmide DriverTET exprimant le système Tet-on a bien été intégré par les cellules.

En revanche, lorsque de la doxycycline (ou un de ses dérivés) est injectée et que la molécule possède une activité vis-à-vis du système d'expression de gène Tet-on (Figure 43 B), l'inducteur va rentrer dans la poche hydrophobe de la protéine rtTA dont le complexe formé va

pouvoir se lier à son tour au promoteur Tet. Le second plasmide (ResponderTET) qui a été intégré en amont de l'expérience par les cellules neuronales contenait un transgène dépendant de la protéine rtTA exprimant une protéine fluorescente verte (GFP) indiquant que la molécule testée présente bien des propriétés inductrices vis-à-vis du système d'expression de gène Tet-on. Il suffit alors par microscopie confocale de visualiser cette fluorescence verte pour le confirmer (Figure 44A).

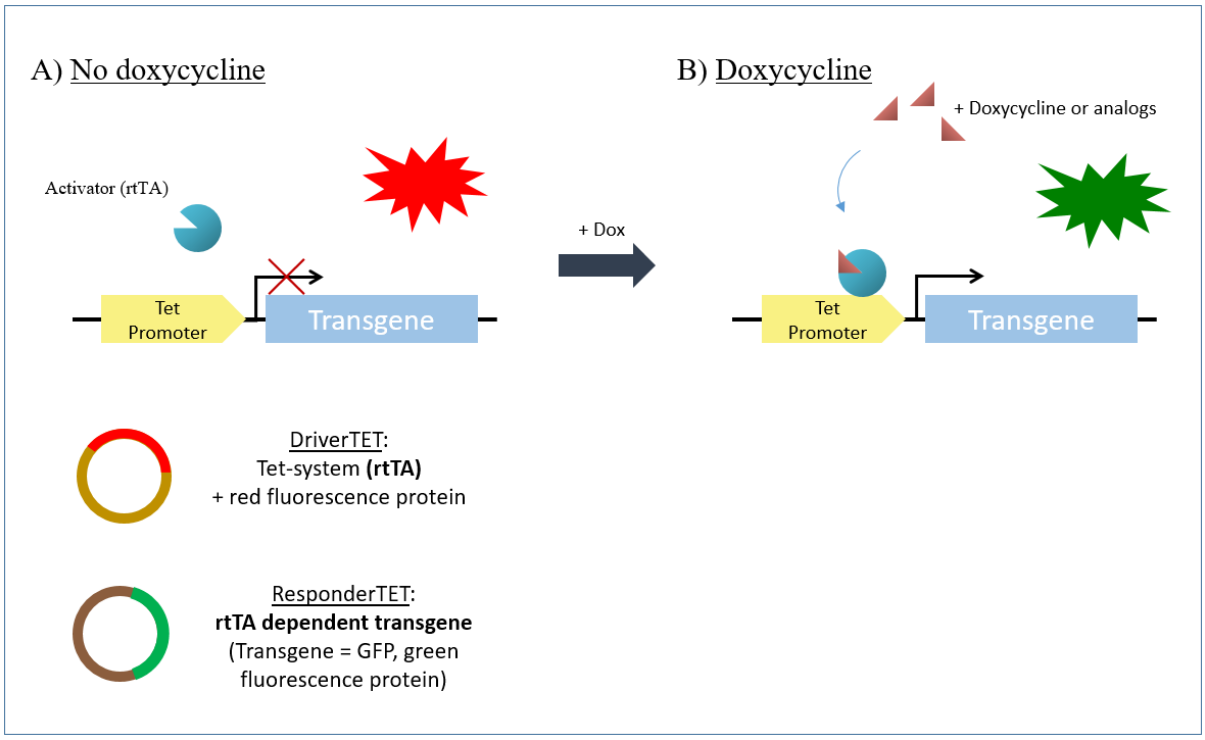


Figure 43 : Principe général du système d'expression de gène Tet-on ayant été intégré dans une lignée de cellules neuronales par l'intermédiaire de deux plasmides DriverTET et Reponder TET.

Résultats :

Après avoir injecté nos deux analogues de doxycyclines **3** et **5** dans les cultures cellulaires neuronales à différentes concentrations, nous avons attendu 24 h, ce qui est habituellement le temps nécessaire pour avoir une expression en GFP totale pour le système inductible Tet-on.

Nous avons ensuite, par microscopie confocale, observé (Figure 44A) et procédé à la quantification du signal de fluorescence verte (Figure 44B) de ces cultures cellulaires afin de vérifier si les deux analogues de doxycyclines testés possèdent toujours une activité vis-à-vis du système d'expression de gène Tet-On après modification chimique en position 9. Les résultats sont présentés ci-dessous.

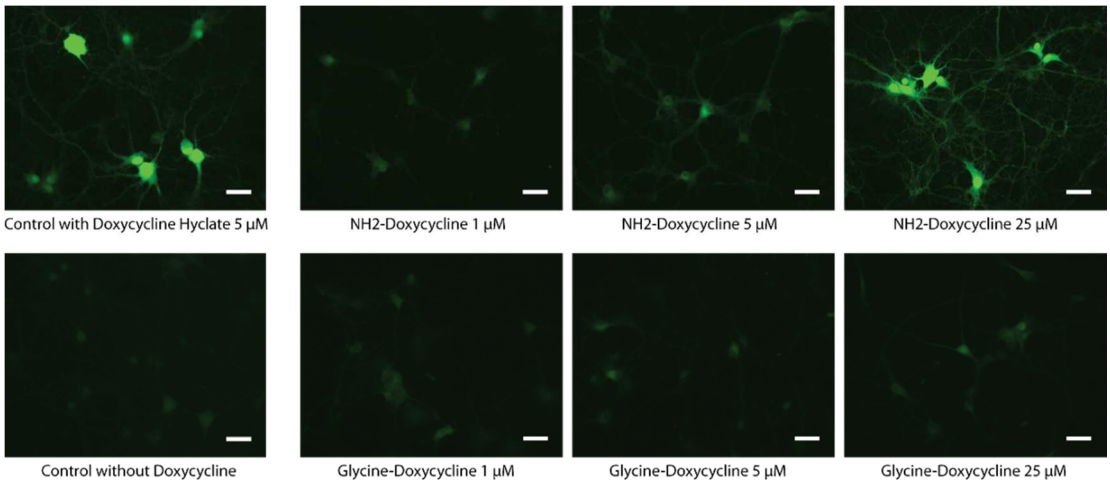
Une expérience contrôle a été réalisée en absence et en présence de doxycycline hyclate commerciale à une concentration de 5 μM, généralement suffisante pour avoir une induction totale du système d'expression de gènes (Figure 44 A, contrôle).

On constate, d'après les images obtenues par microscopie confocale, que l'analogue de doxycycline **3** (images du haut) permet d'exprimer de façon partielle la protéine de fluorescence verte à partir de 5 μM et l'exprime pleinement à partir de 25 μM. Nous voyons, d'après les histogrammes de la Figure 44B, qu'une concentration d'analogue de doxycycline **3** (NH_2-Dox) à 25 μM permet d'induire le système d'expression de gène Tet-on de façon équivalente à une concentration de 5 μM de doxycycline hyclate commerciale (Ctrl Dox). Ces résultats positifs nous indiquent que l'analogue de doxycycline **3** modifié en position 9 possède toujours des propriétés en tant qu'inducteur vis-à-vis du système Tet-On.

A l'inverse, aucune expression de GFP n'a pu être observée par microscopie pour le second analogue de doxycycline **5** (images du bas) même en augmentant les concentrations de ce dernier jusqu'à 125 μM (données non présentées). En effet, comme nous pouvons le voir sur l'histogramme, les hauteurs de barres du second analogue **5** (Gly-Dox) sont équivalentes au contrôle négatif (Ctrl no Dox) laissant penser que ce deuxième analogue ne se lie pas à la protéine rtTA et n'induit pas l'expression de la protéine de fluorescence verte.
Au vu de la faible variation structurale existante entre les deux analogues **3** et **5** il est peu probable que ce deuxième analogue ne soit pas actif vis-à-vis de ce système d'expression de gène.

Les propriétés physico-chimiques de l'analogue de doxycycline **5** sont telles que nous pensons que l'état de protonation en solution tamponnée de ce dernier à pH 7.2 l'empêcherait de traverser les membranes des cellules neuronales. Nous pourrons éventuellement confirmer cette hypothèse lorsque nous procéderons au couplage de cet analogue avec un groupement protecteur photo-labile où la protonation de l'amine n'existera plus et pourrait alors rentrer dans les cellules.

A



B

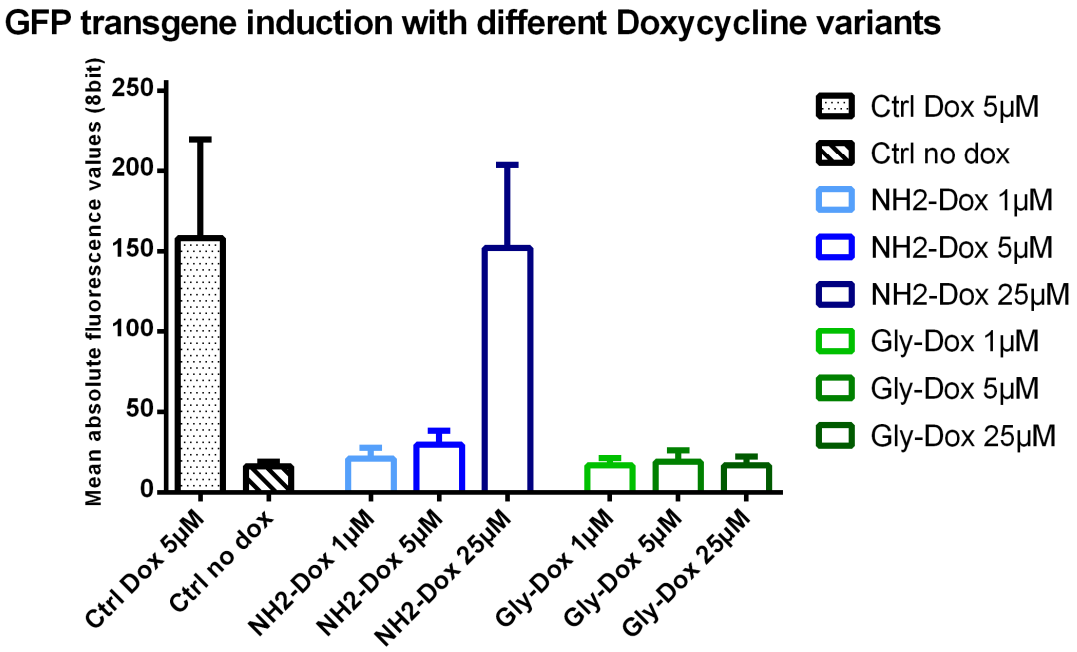


Figure 44 : A) Images obtenues par microscopie confocale montrant l'évolution de l'expression de fluorescence verte en fonction de la concentration après 24 h d'incubation respective des analogues de doxycycline **3** (images du haut) et **5** (images du bas) en comparaison à une concentration contrôle de doxycycline hyclate.

B) Histogrammes obtenus par quantification du signal de fluorescence enregistré après 24 h d'incubation des deux analogues à tester en comparaison avec la doxycycline hyclate contrôle.

III.3 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables EANBP

III.3.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile (EANBP)

Après avoir confirmé qu'au moins un des deux analogues, et plus particulièrement l'analogue 9-amino-doxycyline, possède toujours une activité biologique vis-à-vis du système tétracycline, nous nous sommes penchés sur l'étape de couplage entre le dérivé doxycycline et le groupement protecteur photo-labile. Afin de répondre au cahier des charges imposé par les exigences des expérimentations *in vivo* de ce projet en termes de solubilité et de contrôle spatio-temporel, nous avons décidé d'utiliser le groupement protecteur photo-labile 2-(4'-(bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol (EANBP) sensible à l'excitation bi-photonique. Cette cage a été développée au sein du laboratoire et utilisée pour la libération rapide, efficace et spatialement contrôlée d'acide γ-aminobutyrique (GABA) dans des tranches de cerveau de rat (Donato *et al.,* 2012) avec une section efficace de photo-libération à deux photons (δ_u) en milieu aqueux de 11 GM à 800 nm.

La synthèse de l'EANBP a été réalisée en cinq étapes avec un rendement global de 40% (Figure 45). A partir du nitrobenzène **6**, le synthon **7** est obtenu via une substitution nucléophile indirecte (Makosza, 2010) en position ortho par l'énolate de tert-butylchloroacetate. Le synthon **7** est ensuite méthylé en α de l'ester *tertio*-butylique puis immédiatement réduit pour donner l'alcool correspondant **8**. En parallèle, le synthon **10** est préparé par iodation sélective en position *para* du N,N-bis((2-methoxyethoxy)ethyl)aniline **9**. L'ester boronique **11** est obtenu par borylation pallado-catalysée de **10**. Enfin, on obtient le groupement protecteur photo-labile **12** par couplage de Suzuki entre les synthons **8** et **11** en utilisant un chauffage micro-ondes.

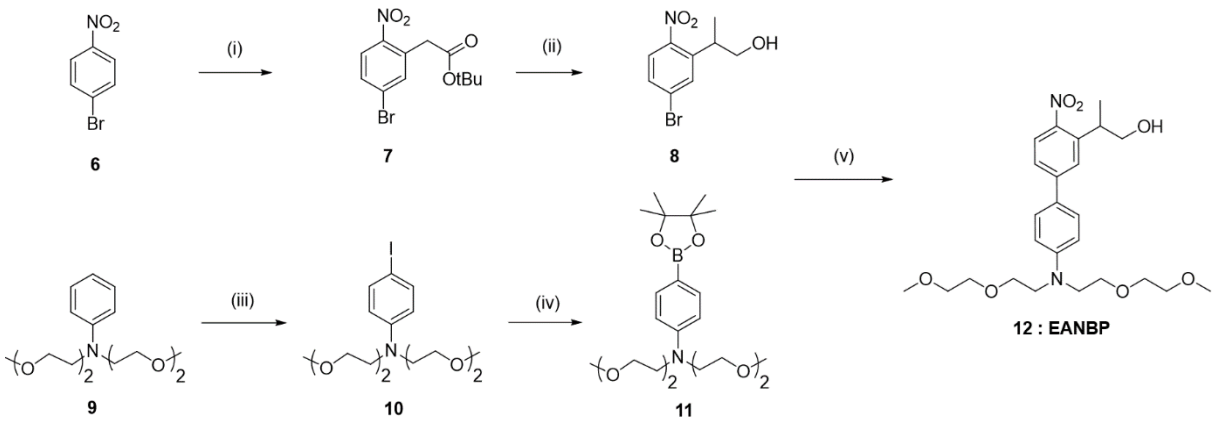


Figure 45 : Synthèse du groupement protecteur photo-labile performant en excitation bi-photonique EANBP.

(i) *t*BuOK, chloroacétate de *tert*-butyle, DMF, t.a, 2 h, 96 % (ii) a) NaH, CH_3I, THF, t.a, 5 h, b) DIBAL-H, THF, t.a, 3 h, 83 %, (iii) I_2, dioxane/pyridine, 2 h, 0 °C à t.a, 95 %, (iv) bis(pinacolato)diboron, KOAc, [$PdCl_2$(dppf)], DMSO, 80°C, 15 h, 75 %, (v) K_2CO_3, Bu_4NBr, $Pd(OAc)_2$, EtOH/H_2O (2:1), micro-ondes, 150 °C, 10 min, 70 %.

III.3.2 Méthodes de couplages

III.3.2.1 La fonction chloroformiate comme agent de couplage

Afin de mettre au point les conditions de couplage entre le groupement protecteur photo-labile **12** et les analogues de doxycycline aminés **3** et **5**, nous nous sommes inspirés de la chimie des chloroformiates. Ces esters dérivés de l'acide chloroformique sont énormément employés, par exemple, pour la synthèse d'acides aminés et de peptides photo-activables par le biais de lien carbamate (Chen *et al.,* 2012; Frutos *et al.,* 2010; Taniguchi *et al.,* 2006). (Figure 46). Ce type de lien est tout à fait adapté à notre cahier des charges car nous souhaitons avoir des molécules stables dans le temps en milieu physiologique.

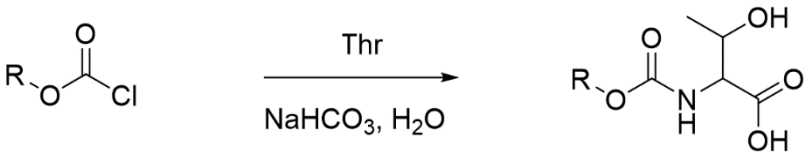


Figure 46 : Exemple de lien carbamate obtenu par le couplage d'une fonction chloroformiate avec l'acide aminé thréonine en milieu aqueux.

Nous avons donc appliqué cette stratégie de couplage (Figure 47) sur nos composés en partant du groupement protecteur photo-labile **12.** En présence de triphosgène dans le THF anhydre, il est possible d'obtenir le dérivé chloroformiate **13** souhaité. Toutefois, ce type de

fonction étant très réactif, il est important de travailler dans des conditions particulièrement anhydres, sans quoi, la fonction chloroformiate formée pourrait être rapidement hydrolysée.

Pour cette même raison, aucune purification ne peut être effectuée et un lavage rigoureux du brut réactionnel **13** au toluène anhydre est nécessaire en effectuant plusieurs cycles d'évaporation avant de procéder au couplage avec les dérivés de doxycyclines **3** et **5**. En effet, lors de la formation du dérivé chloroformiate **13**, deux équivalents de phosgène ainsi qu'un équivalent d'acide chlorhydrique sont formés. L'état de protonation de la fonction amine peut alors être modifié dans l'étape suivante, qui sous forme de cation ne peut plus réagir avec le chloroformiate **13**.

Après s'être assuré de contrôler correctement l'état de protonation des deux dérivés aminés dans une solution aqueuse tamponnée, les deux premiers analogues de doxycycline **14** et **15** ont été obtenus avec succès. Néanmoins, les rendements de ces deux couplages n'excèdent pas 40 % en raison de la compétition qui subsiste entre la formation du produit de couplage souhaité et l'hydrolyse du chloroformiate **13** provenant du tampon aqueux utilisé indispensable à la solubilisation des dérivés amino-doxycycline.

Enfin, la purification finale par HPLC de ces deux dérivés photo-activables est très complexe car les temps de rétentions (t_R) du produit d'hydrolyse conduisant à nouveau à l'EANBP **12** (t_R = 19 min) ainsi que les produits de couplage (t_R = 19.2 min) sont extrêmement proches.

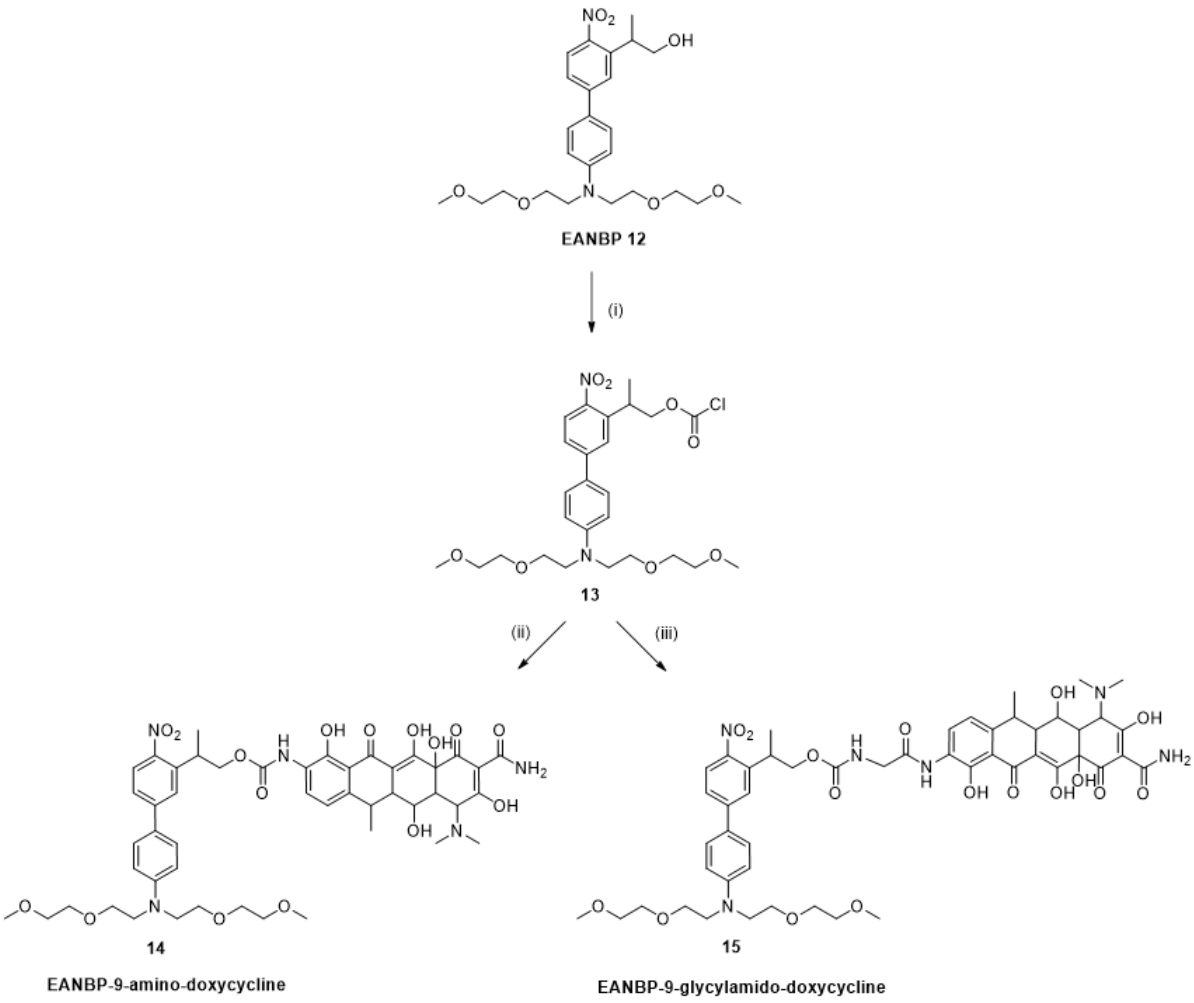


Figure 47 : Synthèse des deux dérivés photo-activables **14** et **15** en utilisant la fonction chloroformiate comme précurseur de lien carbamate.

(i) Tri-phosgène, DIPEA, THF, t.a, 3 h, (ii) 9-amino-doxycycline **3**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 2 h, 40 %, (iii) 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 2 h, 50 %.

III.3.2.2 Les carbonates de *N*,*N*-disuccinimidyle comme agents de couplage

Afin de remédier aux pertes de produit dues à l'hydrolyse, nous avons décidé d'explorer une nouvelle méthode de couplage faisant appel aux carbonates de *N*,*N*-disuccinimydyle moins assujettis au phénomène d'hydrolyse par rapport aux fonctions chloroformiates. Ces carbonates sont utilisés en chimie organique comme agents activateurs d'alcools dont le carbonate correspondant peut réagir à son tour avec une fonction amine (Figure 48).

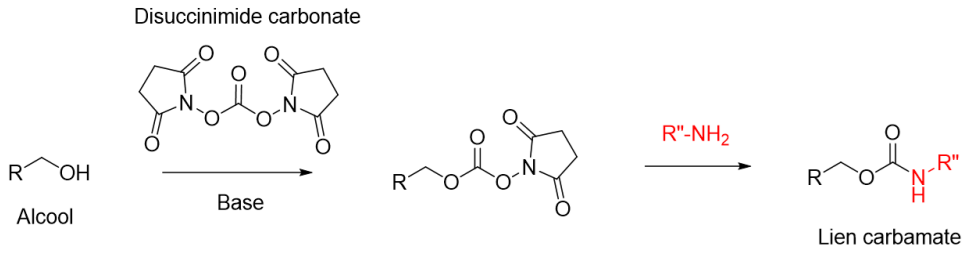


Figure 48 : Stratégie de couplage utilisant des carbonates de *N*,*N*-disuccinimydyle permettant d'obtenir des liens carbamates à partir de fonction d'alcool.

La réaction entre le carbonate de disuccinimidine et la fonction alcool du groupement protecteur photo-labile l'EANBP **12** a permis d'obtenir le carbonate de *N*-succinimydyle activé **16** (Figure 49). Malheureusement, aucun des deux produits de couplage n'a pu être obtenu en utilisant cette stratégie : l'analyse du profil HPLC indiquant uniquement la présence de produit de départ **16** ainsi que l'apparition progressive de son produit d'hydrolyse au cours du temps. L'analyse par LC-MS indique toutefois la présence de quelques traces du produit voulu, laissant penser à un manque de réactivité entre le carbonate activé et les dérivés amino-doxycycline dont le produit d'hydrolyse est cinétiquement favorisé. Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé pour tenter de passer la barrière énergétique empêchant le couplage de s'effectuer, conduisant cette fois-ci à la dégradation du dérivé amino-doxycycline ainsi qu'à l'accélération du produit d'hydrolyse.

Face aux difficultés rencontrées, nous nous sommes provisoirement contentés d'effectuer les tests physico-chimiques à partir des deux dérivés amino-doxycycline **14** et **15** obtenus par la première méthode de couplage, tout en sachant que ces conditions devront être optimisées par la suite.

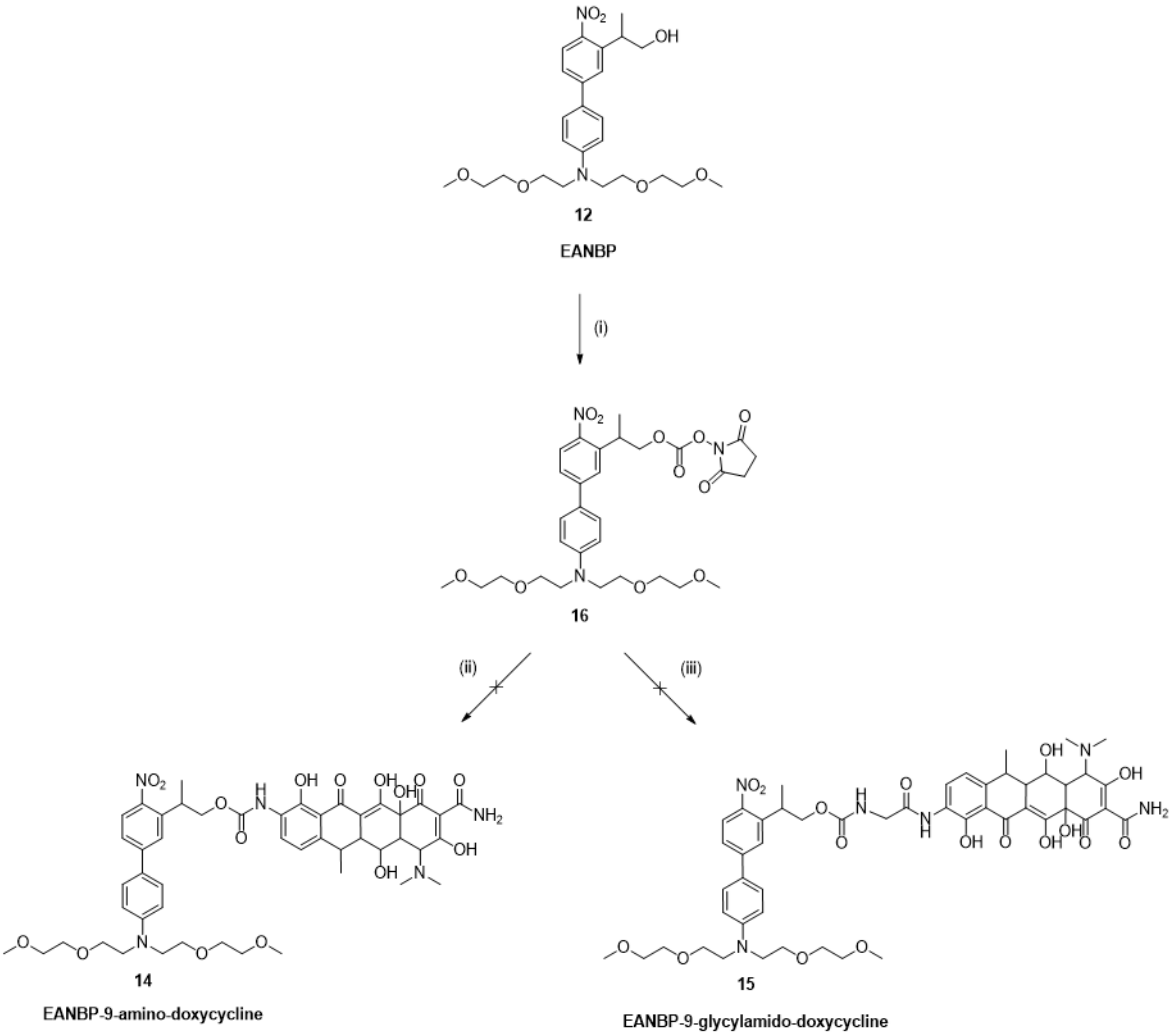


Figure 49 : Synthèse des deux dérivés photo-activables **14** et **15** en utilisant la stratégie de couplage avec des carbonates de *N*,*N*-disuccinimydyle (DSC).

(i) *N*,*N*-disuccinimydyl carbonate, Et_3N, CH_3CN, t.a, 16 h, 89 %, (ii) 9-amino-doxycycline **3**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 16 h, 0 %, (iii) 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 16 h, 0 %.

III.3.3 Propriétés physico-chimiques

III.3.3.1 Stabilité

Pour photo-réguler l'expression d'un gène de façon efficace et en étudier les conséquences sur l'objet d'étude en question, il est primordial que la molécule cagée soit totalement inefficace en absence de lumière mais également stable en milieu physiologique vis-à-vis du processus d'hydrolyse. En effet, de nombreuses études citées en introduction utilisent des liens covalents carbonates pour fixer leurs groupements protecteurs photo-labiles, ce qui

entraine l'apparition d'activités basales résiduelles néfastes après seulement quelques heures en absence de lumière.

Nous avons alors fait le choix de lier de façon covalente nos biomolécules avec le groupement protecteur photo-labile par l'intermédiaire d'une fonction carbamate pour éviter cette réaction d'hydrolyse secondaire.

Afin de contrôler leurs stabilités dans le temps, l'EANBP-9-amino-doxycycline **14** et l'EANBP-9-glycylamido-doxycycline **15** ont été respectivement dissous dans une solution tamponnée contenant un mélange d'acétonitrile et de PBS 1x à pH 7.2 dans des proportions 1:1. La solution a été analysée par HPLC à t = 0 min puis stockée à l'abri de la lumière pendant 24 h. Une nouvelle injection HPLC a été effectuée, montrant qu'à t = 24 h aucun autre pic n'apparait, ce qui confirme la stabilité du lien carbamate en solution aqueuse pendant au moins 24 h.

III.3.3.2 Solubilité

A terme, ces molécules ont pour objectif d'être directement utilisées *in vivo* pour la régulation de l'expression d'un transgène d'intérêt. Par conséquent, la solubilité de ces composés est un facteur important pour la pertinence de leurs utilisations.
Les solubilités de **14** et **15** ont été déterminées à partir d'une solution stock préparée dans l'acétonitrile puis diluée à l'aide d'une solution tampon PBS 1x. Lors de la dilution, un précipité apparait. Après centrifugation, le surnagent est analysé par HPLC et la concentration est comparée à une solution de référence de concentration connue. Ces deux dérivés amino-doxycycline présentent des solubilités similaires de l'ordre de 3 mM.

III.3.3.3 Photochimie

III.3.3.3.1 Photolyse à 1 photon

Les expériences de photochimie ont été effectuées de la même manière pour les deux dérivés aminés cagés **14** et **15** ; à savoir : préparation d'une solution fille par dilutions successives depuis une solution stock préparée dans l'acétonitrile à l'aide d'un tampon PBS 1x jusqu'à une concentration finale de 25 μM contenant moins d'un pourcent d'acétonitrile. La cuve contenant la solution a ensuite été irradiée à l'aide d'une LED à 405 nm pendant 15 min dont l'équation bilan qui conduit à la libération des dérivés amino doxycyclines par β-

élimination est représentée ci-dessous (Figure 50) d'après la littérature (Klán *et al.,* 2013; Walbert *et al.,* 2001; Wöll *et al.,* 2008).

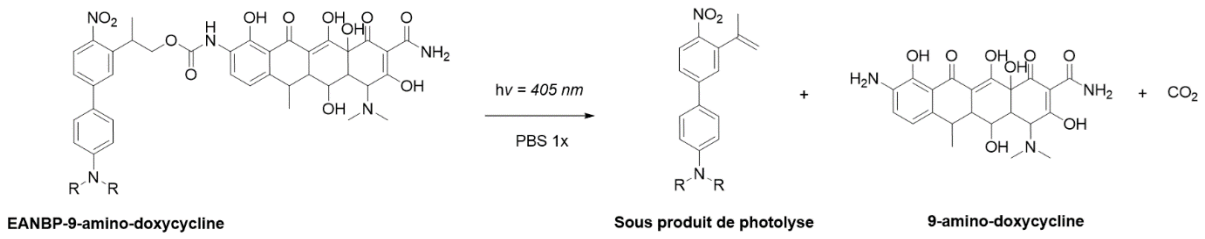


Figure 50 : Réaction de photolyse conduisant à la libération d'un sous-produit ainsi qu'au 9-amino-doxycycline après irradiation à 405 nm d'une solution contenant l'EANBP-9-amino-doxycycline **14**.

Après chaque irradiation d'une minute, un spectre d'absorption UV-Visible de la solution est enregistré afin de suivre l'évolution de la réaction de photolyse au cours du temps. Le profil d'irradiation est représenté ci-dessous (Figure 51). La courbe d'évolution de l'absorbance au cours du temps de l'analogue **14** présente des points isobestiques à 275, 340 et 450 nm, ce qui indique que la réaction photochimique est unique. La diminution du maximum d'absorbance à 375 nm (λ_{max} du produit couplé) traduit bien sa disparition au cours du temps au profit de l'apparition d'un produit de sous photolyse avec des absorbances λ_{max} voisines de 325 et 500 nm.

De plus, cette courbe semble cohérente avec la formation du produit de photolyse en comparaison avec les expérimentations effectuées au sein du laboratoire sur la photo-libération du 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-Acridinone (DDAO, fluorophore), de GABA et de phosphate inorganique qui utilisent également des groupements protecteurs photo-labiles de la famille des *o*-nitrophénéthyle (*o*-NPP) (Donato *et al.,* 2012; Herbivo *et al.,* 2013; Warther *et al.,* 2010). Afin de confirmer la photo-libération de la 9-amino-doxycycline, nous avons injecté en HPLC une concentration connue de la solution irradiée afin de doser précisément le pourcentage relargué à l'aide d'une courbe étalon.

Contre toute attente, nous n'avons pas été en mesure de relarguer plus de 10 % du dérivé 9-amino-doxycycline alors que les taux de relargage concernant le DDAO, le GABA et le phosphate inorganique atteignent habituellement les 90 %.

En ce qui concerne l'analogue **15**, le profil d'irradiation enregistré au cours du temps présente une signature étrange. En effet, la longueur d'onde λ_{max} du composé à t = 0 est de 300 nm alors qu'elle devrait être de 375 nm (λ_{max} du produit couplé). On observe également un déplacement du point isobestique vers 360 nm alors qu'il est habituellement observé aux

alentours de 340 nm. Ces résultats semblent indiquer que l'EANBP-9-glycycl-amido-doxycyline **15** s'auto-organise immédiatement en présence d'un solvant aqueux dont les interactions à l'origine de cette organisation sont responsables du déplacement des longueurs d'ondes observées. Nous reviendrons sur cette auto-organisation dans la partie hypothèse en partie III.3.3.3.3.

Nous avons également injecté en HPLC une concentration connue de la solution irradiée afin de voir si de la 9-glycyl-amido-doxycycline avait été photo-libérée. Cette fois, aucune trace de libération n'a pu être observée.

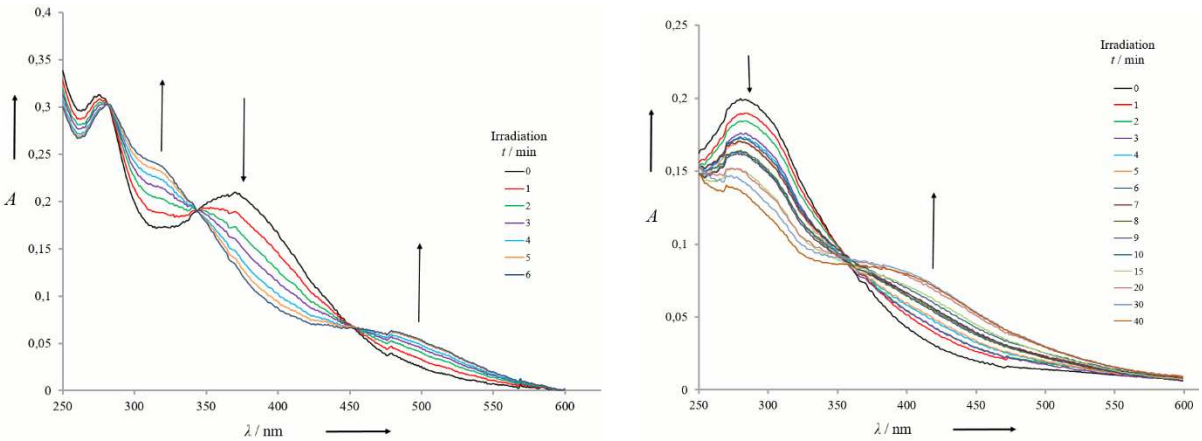


Figure 51 : Profils d'irradiations de **14** (gauche) et **15** (droite) au cours du temps obtenus après irradiation d'une solution de 25 μM à 405 nm.

III.3.3.3.2 Etudes mécanistiques de la réaction photochimique des *o*-nitrophénéthyles (o-NPP)

Afin d'émettre des hypothèses concernant le non relargage de la molécule d'intérêt, il est nécessaire d'explorer le mécanisme photochimique des dérivés *o*-nitrophénéthyle (*o*-NPP) pour comprendre comment le processus de photo-libération fonctionne (Walbert *et al.,* 2001).

En effet, il existe dans la littérature pour les dérivés *o*-nitrophénéthyle deux voies photochimiques possibles dont la β-élimination est communément admise comme étant la voie majoritaire conduisant à la photo-libération attendue en milieu aqueux. Cependant, il existe une seconde voie minoritaire impliquant cette fois la formation d'un dérivé nitroso qui ne conduit pas à la photo-libération du produit attendu. Voyons ensemble le fonctionnement de ces deux voies photochimiques :

Lors d'une irradiation, le groupement NPP engagé dans le mécanisme de photo-clivage va absorber une quantité d'énergie lui permettant de passer de l'état fondamental à l'état excité ; état à partir duquel le transfert d'un hydrogène *α-exo*-cyclique vers le groupement nitro va être rendu possible par une réaction sigmatropique [1-5] qui conduit à la formation réversible de la forme *aci*-nitro (Figure 50). En pratique cette forme ne retourne jamais vers la forme de départ étant donné que les étapes suivantes sont cinétiquement favorisées.

L'équilibre acido-basique de la forme *aci*-nitro va être déterminant quant au choix de la voie photochimique empruntée.

En effet, cette étude montre qu'en milieu aqueux, la faible basicité de l'eau suffit à déprotoner la forme aci-nitro pour donner une nouvelle forme anionique aci-nitro, directement impliquée dans la libération d'une molécule couplée par réaction de *ß*-élimination (Figure 52, voie A).

A l'inverse, cette étude montre également qu'à partir d'une solution contenant une concentration en acide chlorhydrique de l'ordre du milimolaire, l'équilibre acido-basique est complétement déplacé vers la forme *aci*-nitro, ce qui favorise la formation d'un intermédiaire cyclique puis la formation du dérivé *o*-nitroso (Figure 52, voie B).

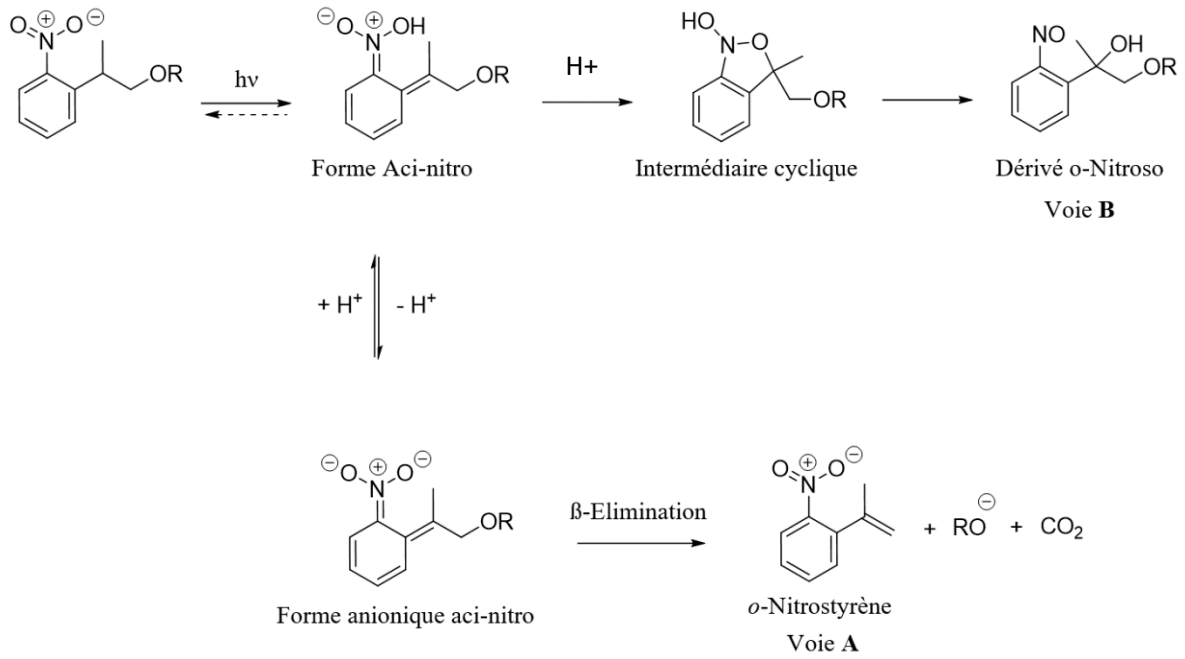


Figure 52 : Mécanisme de photo-libération postulé pour les dérivés *o*-nitrophénéthyle (NPP).

La voie **A** conduit à la photo-libération d'une molécule d'intérêt selon un mécanisme de *ß*-élimination en milieu « basique ».
La voie **B** conduit à la formation d'un dérivé o-nitroso en milieu « acide » ne permettant pas la photo-libération d'une molécule d'intérêt.

Toutes les études mécanistiques qui ont pu être effectuées sur les dérivés *o*-nitrophénéthyle (Hasan *et al.,* 1997; Walbert *et al.,* 2001; Wöll *et al.,* 2008) se rejoignent sur la même conclusion. Les voies photochimiques existantes concernant ces dérivés sont gouvernées par les propriétés acido-basiques propres au milieu réactionnel utilisé.

III.3.3.3.3 Hypothèse

D'après les études précédentes, le faible taux de relargage (10 %) pourrait être dû à une compétition entre les deux mécanismes photochimiques dont la voie B serait majoritairement favorisée. Le profil d'irradiation enregistré (Figure 51) correspondrait alors à la formation du dérivé *o*-nitroso, ce qui explique pourquoi le dérivé 9-amino-doxycycline n'a pas été relargué. Les dérivés nitroso étant des composés relativement instables, il est néanmoins très difficile de les isoler et donc de les caractériser afin de confirmer cette hypothèse.

Fait surprenant, nous venons de voir que pour former ce dérivé *o*-nitroso, le milieu réactionnel devait être riche en protons afin de déplacer l'équilibre acido-basique vers la forme acide. Or nous avons effectué nos expériences d'irradiations en présence d'un tampon PBS 1x dont la concentration est suffisamment importante pour empêcher toute variation de pH due aux molécules initialement présentes ou libérées au cours de la réaction photochimique.
Par conséquent, nous sommes devant un cas photochimique qui n'a encore jusque-là jamais été rencontré dans la littérature.

D'après des résultats obtenus au laboratoire n'ayant pas fait l'objet de publication, nous pensons que l'équilibre acido-basique n'est pas la seule propriété physico-chimique capable de déterminer la voie photochimique empruntée chez les dérivés *o*-nitrophénéthyle.
En effet, nous avons récemment utilisé ces dérivés dans des projets annexes résumés ci-dessous, présentant des résultats similaires nous confortant ainsi dans cette idée.

Dans ses travaux de thèse, le Dr. Sébastien Piant a nanostructuré plusieurs groupements protecteurs photo-labiles de la famille des *o*-nitrophénéthyle (DPENB) afin d'effectuer des sauts de concentrations importants par la photo-libération simultanée de molécules d'intérêts (Figure 53). Malheureusement, le processus photochimique conduisant à la photo-libération par *ß*-élimination attendu n'a pas été additif.

Autre fait marquant, dans le cadre de son master II, un étudiant n'a pas été non-plus en mesure de photo-libérer de façon satisfaisante le tamoxifen (molécule inductrice d'expression de gène vis-à-vis du système Cre-Lox) (Figure 53).

Les différents résultats obtenus au laboratoire utilisant ces dérivés *o*-nitrophénéthyle ont été regroupés en Figure 53. Si l'on fait le bilan de ces dix dernière années, l'utilisation de ces dérivés pour la libération de glutamate, de GABA et de phosphate (Figure 53, encadré vert) a été un franc succès avec des rendements de libérations presque quantitatifs. On constate également qu'il s'agit de « petites molécules » chargées en milieu physiologique.

A l'inverse, les trois projets faisant intervenir de plus « grosses molécules » (nanostructuration de « cage », tamox et doxycycline) ont rencontré des problèmes pour la photo-libération de ces effecteurs ((Figure 53, encadré rouge).

D'après ces résultats expérimentaux, nous pensons que la structure de ces molécules favorise la formation d'un environnement hydrophobe en milieux aqueux par la formation d'interactions de type π-π stacking entre les différents blocs aromatiques.

Cette hypothèse est en accord avec les déplacements du maximum d'absorbance observés pour les dérivés EANBP-9-amino-doxycycline **14** à 375 nm et EANBP-9-glycyl-amido-doxycycline **15** à 300 nm (Figure 51) alors que les maximums d'absorbance habituellement observés pour les composés cagés GABA, glutamate et phosphate étaient de 397 nm.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué les mêmes tests photochimiques en utilisant un mélange de solvant eau/acétonitrile dont nous avons diminué la proportion en eau à chaque expérience. Nous avons observé que plus la proportion en acétonitrile était importante, moins les interactions hydrophobes sont présentes et plus le rendement de libération augmente. A noter que les maximums d'absorbances à 397 nm habituellement observés sont également restaurés.

Toutes ces évidences nous confortent dans l'hypothèse qu'en plus de l'équilibre acido-basique, les interactions hydrophobes solvants-dépendantes joueraient également un rôle déterminant dans les voies photochimiques empruntées chez les dérivés *o*-nitrophénéthyle ; ce qui explique à la fois le faible rendement de libération et l'absence de rendement de libération obtenus respectivement pour les dérivés EANBP-9-amino-doxycycline **14** et EANBP-9-glycylamido-doxycycline **15**.

Le projet ayant comme but de photoréguler l'expression d'un gène *in vivo*, l'utilisation de solvant organique tel que l'acétonitrile ne peut être une solution viable et nécessite donc une nouvelle stratégie afin de contourner les problèmes photochimiques rencontrés.

Bien que l'utilisation de ce groupement protecteur photo-labile EANBP performant en excitation bi-photonique semblait parfaitement adapté pour ce projet, ces résultats décevants nous ont contraints à explorer d'autres groupements protecteurs photo-labiles dont le mécanisme photochimique connu emprunte cette fois-ci une seule voie conduisant à la libération de la molécule d'intérêt.

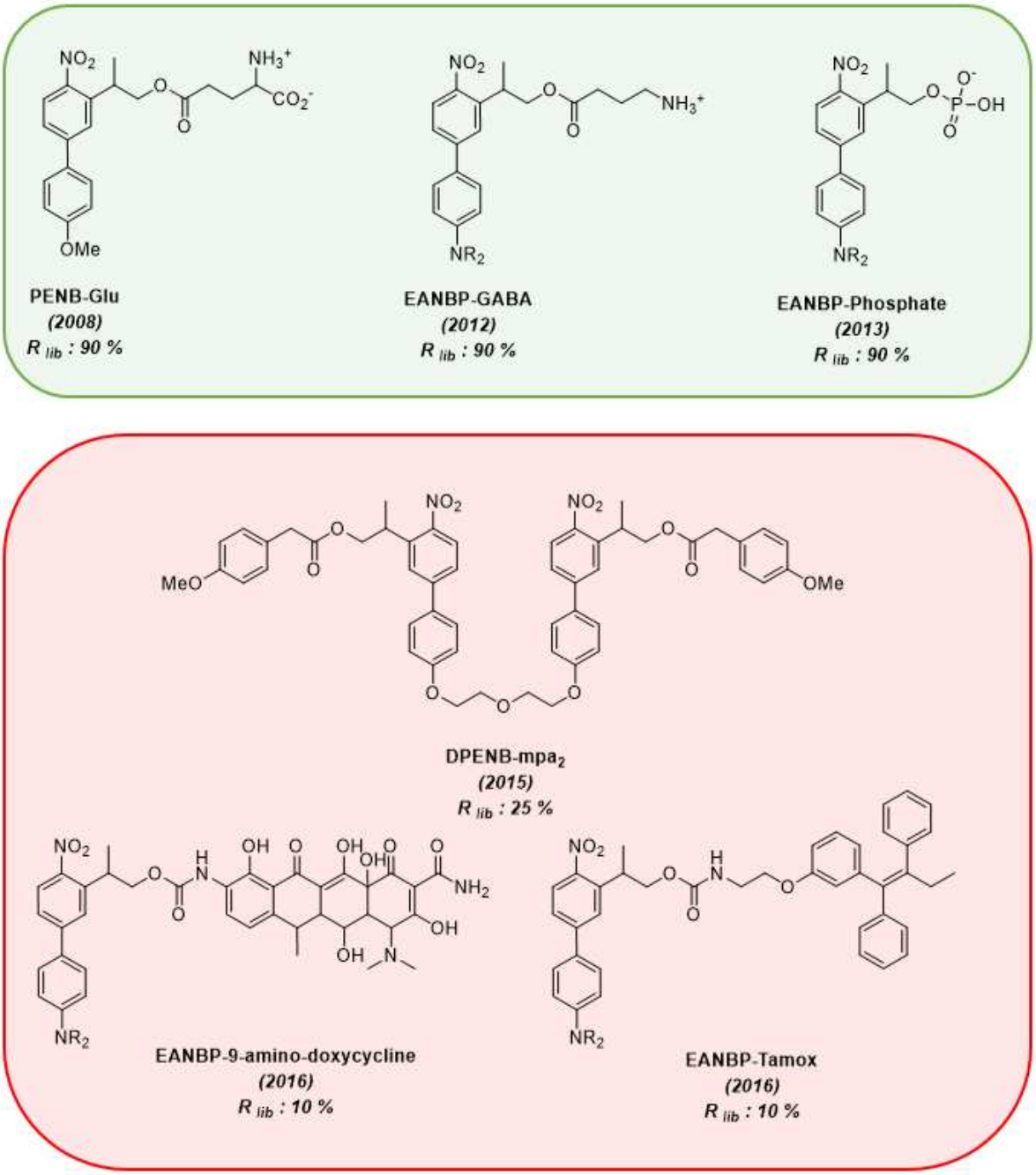


Figure 53 : Résumés des différents résultats obtenus au laboratoire utilisant des dérivés *o*-nitrophénéthyle pour la photo-libération d'effecteurs.

L'encadré vert regroupe les exemples dont la photolyse a permis par *β*-élimination d'obtenir des rendements de libérations honorables. A l'inverse l'encadré rouge regroupe les exemples dont la photolyse a emprunté une seconde voie mécanistique entrainant la photo-libération de l'effecteur de façon largement minoritaire.

III.4 Alternative aux groupements protecteurs photo-labiles *o*-NPP

Afin de répondre au cahier des charges imposé par le projet, nous devions trouver une nouvelle famille de groupements protecteurs photo-labiles répondant à la fois aux critères de solubilité en milieu aqueux, d'efficacité en excitation bi-photonique et surtout d'efficacité de relargage, c'est-à-dire à une photolyse qui conduit bien à la photo-libération de la biomolécule.

Nous nous sommes alors penchés vers la famille des groupements protecteurs photo-labiles de type coumarinique largement utilisée durant ces dernières décennies pour les deux raisons suivantes : 1) certains dérivés coumarines sont sensibles à l'excitation bi-photonique et 2) Les dérivés coumarines ont un seul mécanisme photochimique connu à ce jour conduisant à une photo-libération efficace.

III.4.1 Les dérivés coumarines sensibles à l'excitation bi-photonique

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'utilisation des coumarines, et plus précisément des structures coumarin-4-ylméthyle (MCM), a débuté dans les années 90 pour la libération de petites molécules (phosphates, carboxylates, amines, alcools, phénols). Les caractéristiques attrayantes des coumarines en termes de coefficient d'extinction molaire élevé et de rapidité de photo-libération combinés à leurs stabilités et à leurs propriétés de fluorescence ont très vite intéressé les scientifiques.

De nombreuses études ont alors vu le jour afin d'apporter des modifications structurales pour tenter de modifier les propriétés spectroscopiques et photochimiques de ces dérivés. Certaines d'entre elles ont notamment permis de mettre au point la première génération de coumarines performantes en excitation bi-photonique par l'intermédiaire du 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyle (Bhc) (Figure 54 A) qui présente une section efficace de photo-libération à deux photons à 740 nm (δ_u) = 1 GM pour la libération de glutamate (Furuta *et al.,* 1999b). Néanmoins, cette série souffre cruellement de solubilité dans l'eau.

Une « seconde » génération de coumarines plus solubles a vu le jour grâce à l'ajout d'un groupement électro-donneur aminé en position 7 (Figure 54 B) aboutissant au 7-*N*,*N*-diéthylamino-coumarin-4-yle (DEACM). Cette modification a permis de déplacer considérablement le maximum d'absorbance de ces dérivés vers le rouge, ce qui donne accès à

de nouveaux maximums autour de 400 nm, plus adaptés à des expérimentations *in vivo* (Shembekar *et al.,* 2005). Les performances en excitation bi-photonique de ce dérivé DEACM ont également été étudiées dans l'eau et présentent par exemple une section efficace de photo-libération à deux photons à 800 nm (δ_u) = 0.12 GM pour la libération *p*-méthoxybenzyle (Bao *et al.,* 2012).

Ces valeurs de sections efficaces de photo-libération à deux photons sont suffisamment élevées pour étudier des systèmes biologiques d'intérêt.

Plus récemment, l'équipe d'Ellis-Davies a mis au point la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile basée sur la seconde génération de coumarines DEACM, appelé DEAC450 (Figure 54 C). Grâce à l'extension du système π conjugué en position 3, ce nouveau groupement protecteur présente un déplacement vers le rouge encore plus conséquent, puisque son maximum d'absorbance λ_{max} est de 450 nm. Les performances en excitation bi-photonique de ce dérivé DEAC450 ont également été étudiées et présentent une section efficace de photo-libération à deux photons à 900 nm (δ_u) = 0.5 GM pour la libération de glutamate (Olson et al., 2013), faisant de ce dérivé coumarine un excellent outil pour les expérimentations *in vivo*.

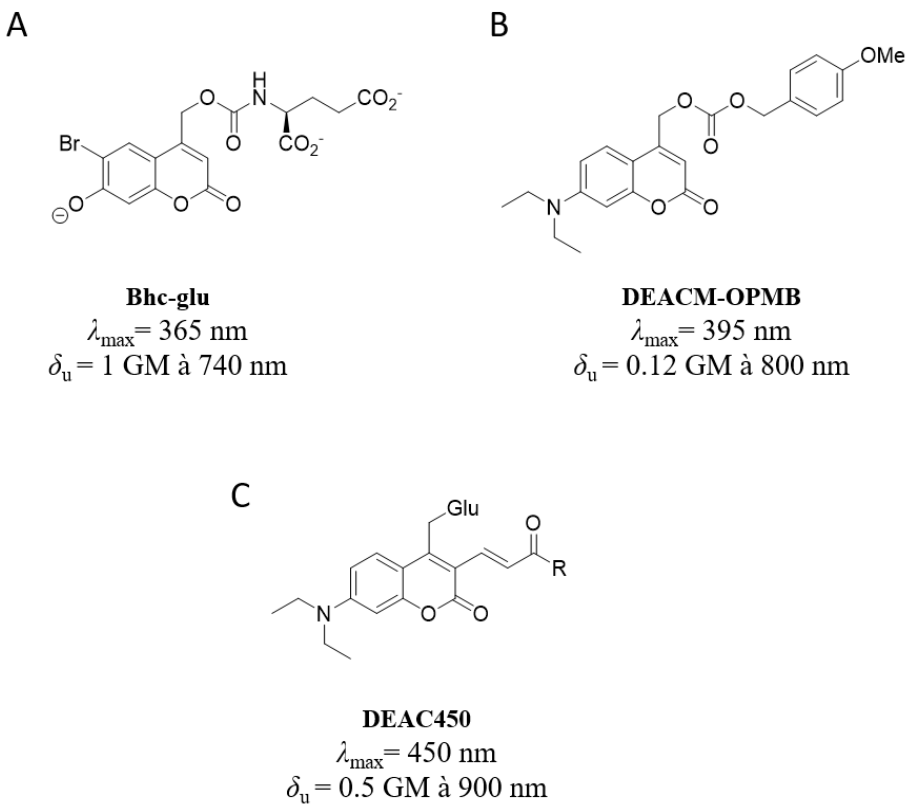


Figure 54 : Structures de deux dérivés coumarines utilisés en excitation bi-photonique

A) Historiquement, le Bhc est le premier dérivé coumarine à avoir été utilisé pour libérer une molécule en excitation bi-photonique à 740 nm. B) L'ajout d'un groupement électrodonneur amine a permis d'obtenir un « shift » des longueurs d'ondes vers le *proche* infrarouge plus approprié pour des utilisations *in vivo*.

III.4.2 Mécanisme photochimique des dérivés coumarines

L'autre intérêt d'utiliser des dérivés coumariniques réside dans leur mécanisme photochimique unique. En effet, même si le phénomène de π stacking observé pour nos dérivés *o*-NPP venait à se reproduire ici, le fait d'avoir un seul mécanisme de photolyse devrait forcer la réaction de photo-libération à s'effectuer. Des études mécanistiques effectuées par différentes équipes (Lin and Lawrence, 2002; Schmidt *et al.,* 2007) ont pu montrer qu'après absorption d'un photon les dérivés coumarines se relaxent depuis l'état excité singulet vers l'état fondamental en émettant de la fluorescence, ainsi qu'en effectuant un clivage hétérolytique très rapide entre la liaison C-O (Figure 55). La paire d'ions formée entre le cation coumarinylmethyl et l'anion correspondant à la base conjuguée du groupe partant est l'intermédiaire clé de ce mécanisme photochimique. Le cation va immédiatement réagir avec le solvant, ou dans de rares

cas avec un nucléophile *in situ,* pour régénérer un produit stable. Le groupe partant, quant à lui, va retrouver sa fonction libre par décarboxylation.

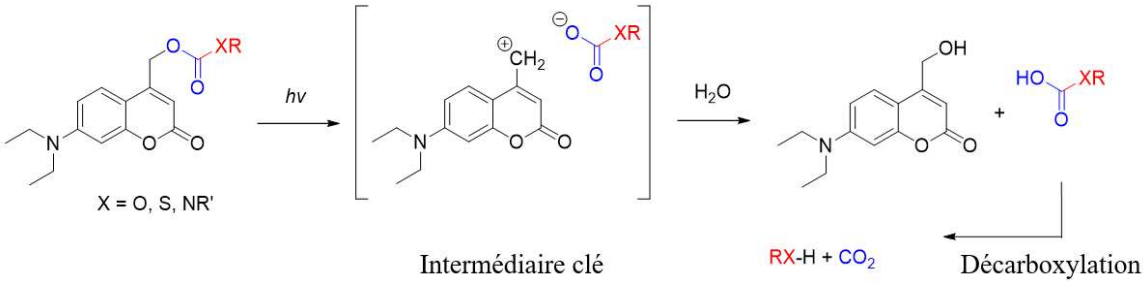


Figure 55 : Mécanisme photochimique unique des dérivés 7-N,N-diethylamino-coumarin-4-yl (DEACM) faisant intervenir un intermédiaire clé composé d'une paire d'ions suite à la coupure hétérolytique de la liaison covalente C-O.

CHAPITRE IV

Synthèse d’un nouveau groupement protecteur photo-labile de la famille des coumarines

IV.1 Stratégie

Nous venons de voir que les coumarines de seconde génération, et plus particulièrement le dérivé 7-*N*,*N*-diethylamino-coumarin-4-yl (DEACM), grâce à leur sensibilité à l'excitation bi-photonique ainsi qu'à un mécanisme photochimique unique étaient une alternative intéressante en tant que groupement protecteur photo-labile pour la photo-régulation de l'expression d'un gène *in vivo*.

La solubilité finale des composés « cagés » en milieu aqueux étant un point important, nous avons fait le choix de modifier la structure de ces dérivés DEACM afin d'introduire une chaîne oligoéthylène glycol (OEG) en position benzylique par réaction de cyclo-addition catalysée au cuivre (CuAAC) (Sharpless *et al.,* 2002) (chimie « click ») selon le schéma rétrosynthétique présenté en Figure 56. L'ajout de cette chaine OEG devrait fournir un nouveau groupement protecteur photo-labile présentant une solubilité dans l'eau satisfaisante.

De plus, l'ajout de ce groupement OEG en position benzylique devrait augmenter le rendement quantique (ϕ_u) de cette série en accord avec ce qui a pu être observé par l'équipe de Aranzazu del Campo par l'ajout d'un substituant méthyle ayant un effet électronique inductif donneur (Weis *et al.,* 2012).

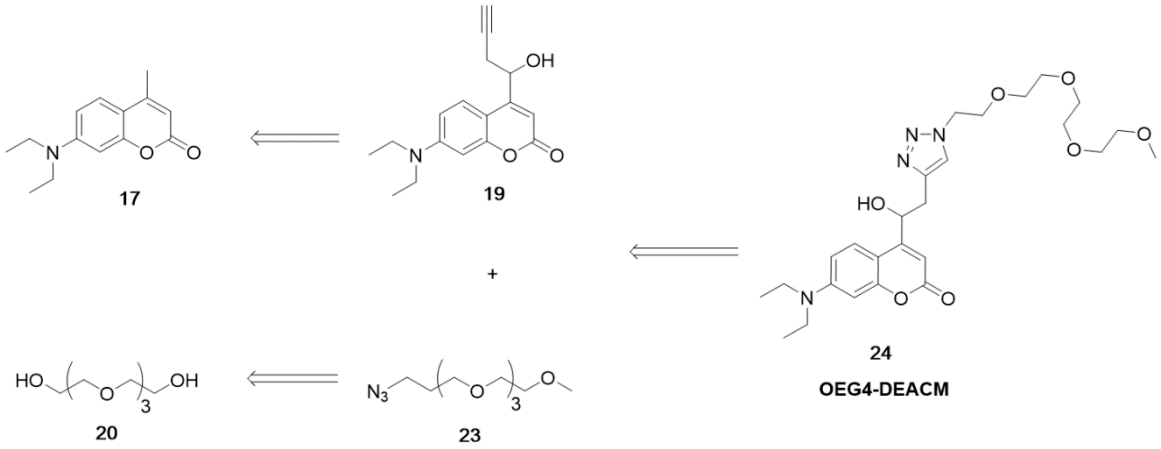


Figure 56 : Schéma rétrosynthétique de la formation du dérivé soluble OEG4-DEACM **24**

IV.2 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables OEG4-DEACM

IV.2.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile OEG4-DEACM

La synthèse du dérivé OEG4-DEACM **24** a été effectuée en six étapes avec un rendement global de 13 % selon le schéma réactionnel exposé dans la Figure 57.

Depuis la 7-diethylamino-4-methylcoumarine **17** commerciale, l'aldéhyde **18** correspondant est obtenu par oxydation en présence de dioxyde de sélénium dans le xylène. La « réduction » de l'aldéhyde a été effectuée pour la première fois par addition nucléophile d'une solution de magnésien propargylique fraîchement préparée pour obtenir l'alcyne 7-diethylamino-4-hydroxymethylcoumarine **19** correspondant. Néanmoins, ce magnésien étant très compliqué à préparer selon les méthodes d'activation classiques au diiode en chauffant, les rendements de cette étape étaient très bas. Nous avons alors exploré cette même étape en réduisant cette fois l'aldéhyde par la préparation d'une solution dipropargyl zinc selon la méthode décrite par l'équipe d'Alexander Heckel (Seyfried *et al.,* 2017) qui a permis d'obtenir le premier précurseur alcyne **19** pour la chimie « click » avec de très bons rendements.

Nous avons préparé en parallèle la chaîne azido oligoéthylène glycol **23** en trois étapes avec un rendement de 38 %. Le méthoxy-tétraéthylène glycol **21** a été obtenu par substitution nucléophile du tétraéthylène glycol commercial **20** sur l'iodure de méthyle en milieu basique. La fonction alcool restante a été activée par l'ajout d'un bon groupe partant de type tosyle afin d'obtenir **22** qui est immédiatement substitué par l'azoture de sodium donnant accès au deuxième précurseur **23**.

Enfin, la réaction de cyclo-addition catalysée au cuivre (CuAAC) (Chassaing *et al.,* 2016) entre les précurseurs alcyne **19** et azido **23** a permis d'obtenir le dérivé OEG4-DEACM **24** souhaité.

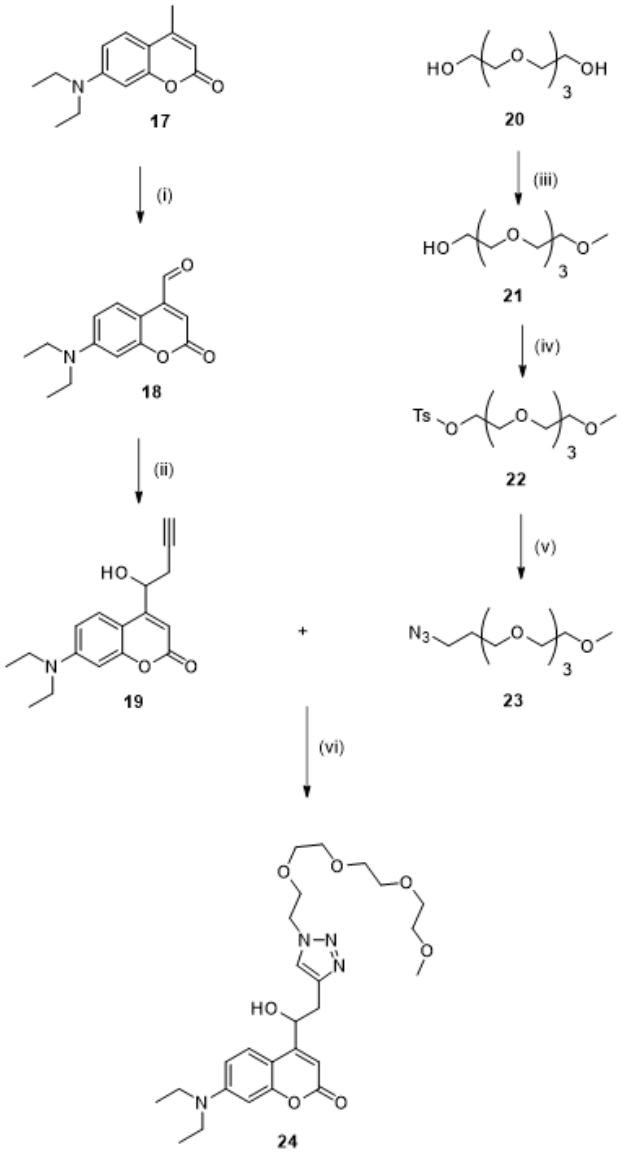


Figure 57 : Synthèse du nouveau groupement protecteur photo-labile OEG4-DEACM **24**.

(i) SeO_2, *o*/*p*-Xylène, 150 °C, 16 h, 47 % (ii) a) bromure de propargyle, Zinc, THF, 0 °C, 1 h, b) **18**, 0 °C à t.a, THF, 1 h, 85 %, (iii) NaH, CH_3I, DMF, t.a, 12 h, 50 %, (iv) *p*-TsCl, NaOH, THF/H_2O, 0 °C, 1 h, 80 %, (v) NaN_3, EtOH, 0 °C, 1 h, 95 %, (vi) $CuSO_4$, ac. ascorbique, *L*-proline, DMF/*t*-BuOH/H_2O, 60 °C, 24 h, 85 %.

IV.2.2 Méthode de couplage

IV.2.2.1 La fonction chloroformiate comme agent de couplage

Après obtention du nouveau groupement protecteur photo-labile DEACM dans sa version soluble **24** par purification HPLC, nous avons décidé d'utiliser la méthode de couplage décrite précédemment pour les dérivés *o*-nitrophénéthyles par l'intermédiaire de la fonction chloroformiate selon le schéma réactionnel en Figure 58.

Etonnamment, malgré l'utilisation à l'identique des conditions réactionnelles ayant permis de synthétiser les dérivés photo-activables en série *o*-nitrophénéthyles, les nouveaux dérivés photo-activables **26** et **27** en série coumarine n'ont pu être obtenus. Après préparation

de la fonction chloroformiate **25** en présence de triphosgène, la réaction d'addition des deux analogues de doxycyclines aminées **3** et **5** sont respectivement suivis par HPLC. On ne constate aucune disparition des produits de départ correspondant aux analogues de doxycyclines alors que le chloroformiate **25** est quant à lui consommé pour former un nouveau composé ne correspondant pas au produit d'hydrolyse. En effet, d'après le chromatogramme HPLC, le nouveau composé que nous allons appeler **25'** a un temps de rétention différent de **24** (produit d'hydrolyse) et possède une signature UV qui a subi un décalage bathochrome : (λ_{max} (**24**) = 389 nm / λ_{max} (**25'**) = 395 nm), mais il semble être tout de même structurellement très proche.

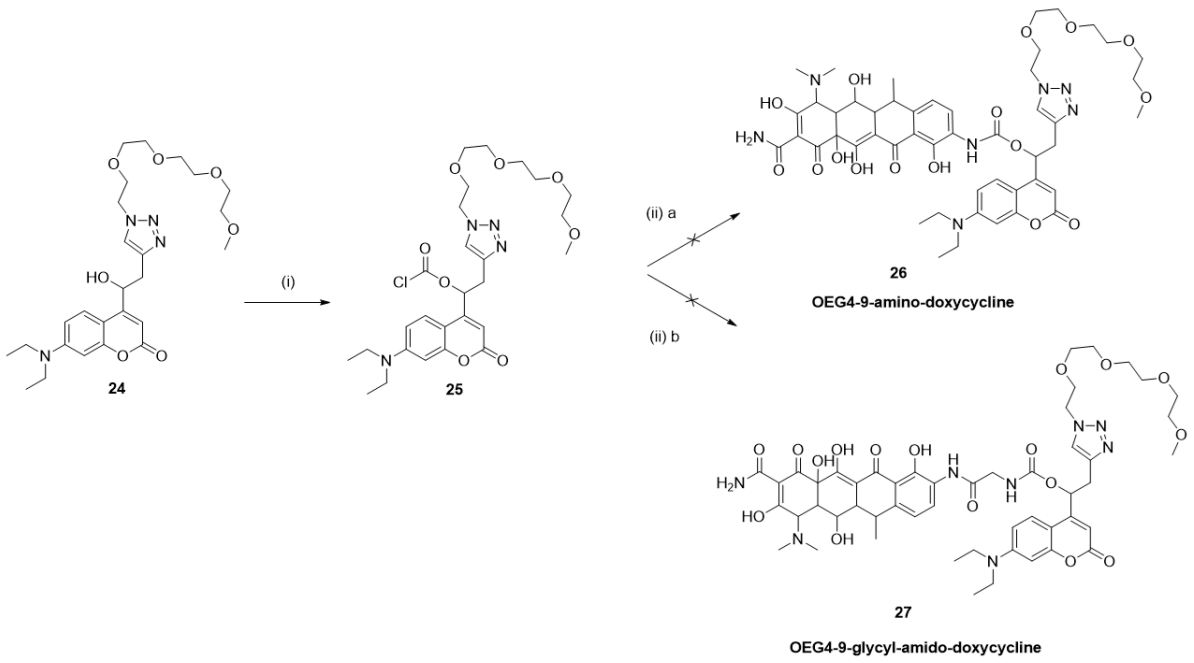


Figure 58 : Synthèse des deux dérivés photo-activables **26** et **67** en utilisant la fonction chloroformiate comme précurseur de lien carbamate.

(i) Tri-phosgène, DIPEA, THF, t.a, 3 h, (ii) 9-amino-doxycycline **3**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 2 h, 0 %, (iii) 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 2 h, 0 %.

Afin de comprendre le mécanisme à l'origine de la formation de ce composé inconnu **25'**, le produit formé a été purifié par HPLC puis analysé par RMN et LC-MS.

D'après la comparaison RMN entre le produit de départ **24** (Figure 57 A, RMN du haut) et le brut réactionnel de la réaction de couplage (Figure 59 B, RMN du bas), on s'aperçoit que deux populations de protons se sont déplacées vers des champs faibles.

Le déplacement chimique du proton H_C en α de l'alcool (A) est légèrement déblindé sur le spectre RMN du brut. De plus, les protons H_A et H_B ont quant à eux disparu pour se confondre

avec la signature du déplacement chimique du groupement oligoéthylène glycol compris entre [3 – 4] ppm. D'après ces déplacements caractéristiques, nous avons conclu que le nouveau composé **25'** ne portait plus de fonction alcool.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse du brut réactionnel ont quant à eux indiqué la présence d'un nouveau composé d'une masse molaire de 536 g.mol^{-1} (à noter que le groupement protecteur photo-labile OEG4-DEACM **24** a une masse molaire de 518 g.mol^{-1}). En partant du principe que la fonction alcool n'est plus présente comme le sous-entend la RMN, nous cherchions alors une nouvelle structure avec une différence de masse molaire de : 536-501 (518 – OH) = 35 g.mol^{-1}, ce qui correspond à la masse isotopique d'un atome de chlore. La substitution de la fonction alcool par cet atome de chlore explique pourquoi aucun des produits de couplage n'a pu être observé.

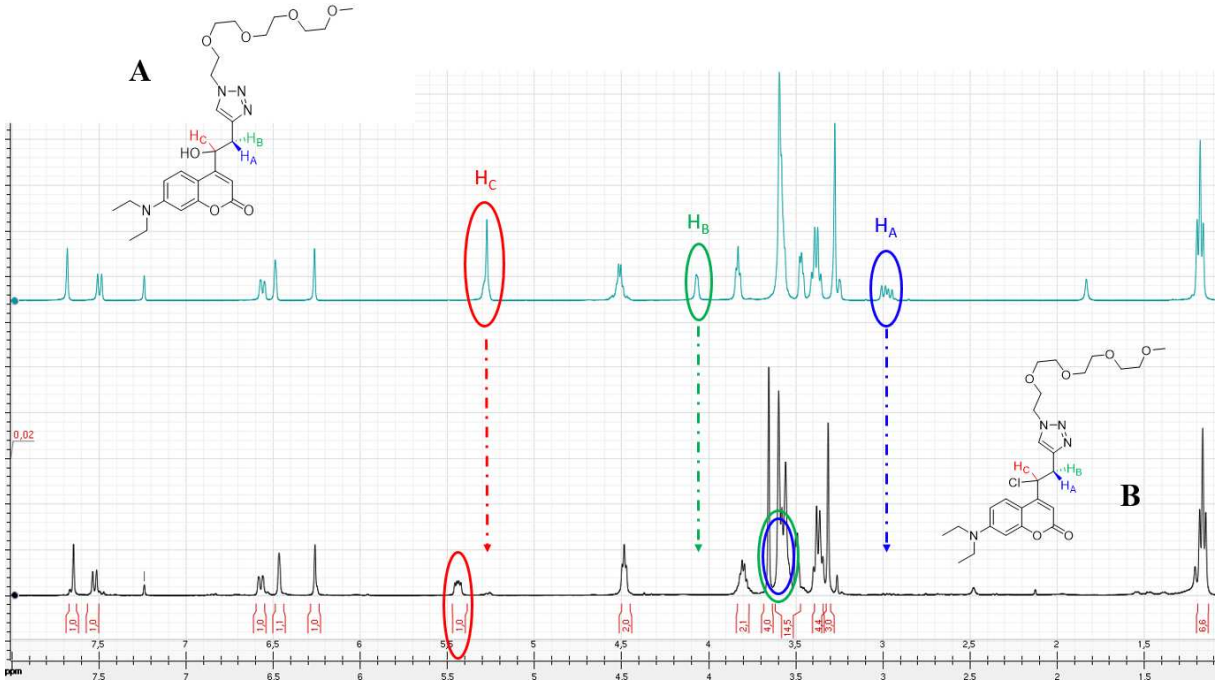


Figure 59 : A) Spectre RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ du groupement photosensible OEG4-DEACM **24**.
B) Spectre RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ du brut réactionnel après extraction de la réaction de couplage entre **24** et les dérivés amino doxycyclines **3** et **5**.
Les déplacements chimiques des protons caractéristiques H_A, H_B et H_C montrent que la fonction alcool initiale a été substituée par un atome de chlore.

En accord avec les précédents couplages effectués en série *o*-nitrophényléthyle, nous n'avons pas isolé le produit **25** au vu de l'instabilité de sa fonction chloroformiate. Etant donné que les précédents couplages n'ont jamais posé problème, nous pensions que la formation du dérivé chloré **25'** se produisait lors de l'ajout des analogues de doxycycline **3** et **5**.

Lors d'une seconde expérimentation, il s'est avéré, par suivi HPLC, que le produit indésirable **25'** était déjà présent dans la première étape lors de la formation de la fonction chloroformiate **25**.

IV.2.2.2 Mécanisme parasite

IV.2.2.2.1 Proposition d'un mécanisme

Suite à ces observations expérimentales, nous nous sommes demandé comment une fonction alcool pouvait être substituée par un atome de chlore (Figure 60), étant donné que cette substitution n'avait encore jamais été observée lors de la formation des fonctions chloroformiate précédentes sur des dérivés *o*-nitrophénéthyles.

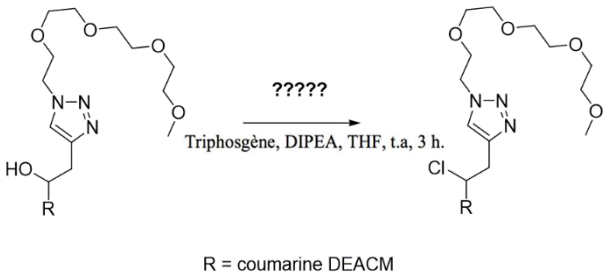


Figure 60 : Réaction parasite observée lors de l'utilisation des conditions réactionnelles pour l'obtention de la fonction chloroformiate, qui conduit à la substitution d'une fonction alcool par un atome de chlore.

En réalité, il ne s'agit pas d'une substitution nucléophile directe de la fonction alcool par l'atome de chlore. En effet, la fonction alcool n'est dans ce cas pas un assez bon groupe partant pour être assujettie à ce type de mécanisme puisque nous sommes en milieu basique.

D'après les différentes expérimentations effectuées, nous avons de fortes raisons de penser que la fonction triazole joue un rôle prédominant dans ce mécanisme parasite, proposé en Figure 61.

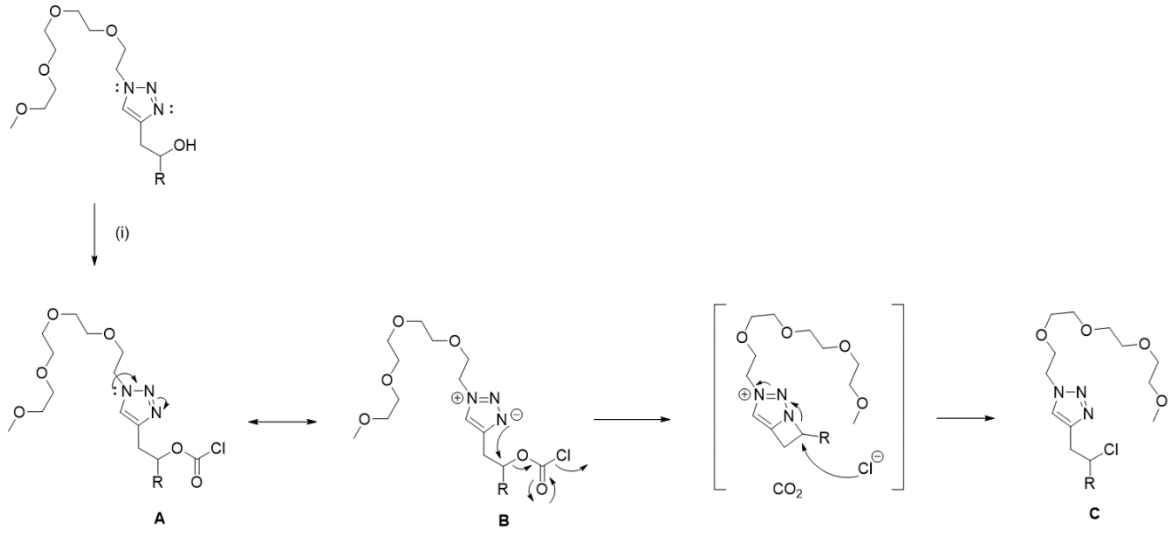


Figure 61 : Mécanisme proposé mettant en évidence l'élimination de la fonction chloroformiate par assistance de la fonction triazole puis addition de l'anion chlorure libéré lors de l'élimination.

(i) Triphosgène, DIPEA, THF, t.a, 3 h.

La première étape de ce mécanisme supposé consisterait à former la fonction chloroformiate comme attendu à l'aide de triphosgène en milieu basique. Cette fonction chloroformiate est à la fois un bon électrophile, mais peut également jouer le rôle de groupe partant. Ainsi, en partant du doublet porté par l'atome azote sp^3 du cycle triazole (Figure 61 (A)), il est possible d'écrire une forme limite où la nouvelle densité électronique portée par l'atome d'azote sp^3 (Figure 61 (B)) est à l'origine du départ de la fonction chloroformiate dont la libération d'une molécule de CO_2 serait la force motrice de cette étape. L'intermédiaire cyclique à quatre chaînons formé étant instable, l'anion chlorure libéré lors de l'élimination de la fonction chloroformiate procéderait à une ouverture du cycle par addition nucléophile donnant accès au produit **25'** obtenu expérimentalement (Figure 61 (C)).

IV.2.2.2.2 Alternative par inversion de la position des substituants du cycle triazole

Dans un projet annexe réalisé par le Dr. Alexandre Specht sur la fonctionnalisation de dérivé de type *o*-NB par chimie « click », il a été montré de façon fortuite qu'aucune chloration n'avait pu être caractérisée lors de la réaction de couplage faisant intervenir la stratégie des fonctions chloroformiates dans ce cas précis.

En analysant plus attentivement les deux projets, nous nous sommes rendu compte que la réaction de chimie « click » précédant la réaction de couplage de ce projet annexe était faite de sorte que nous obtenions un cycle triazole « inversé » par rapport au projet principal présenté ci-dessous en Figure 62 A.

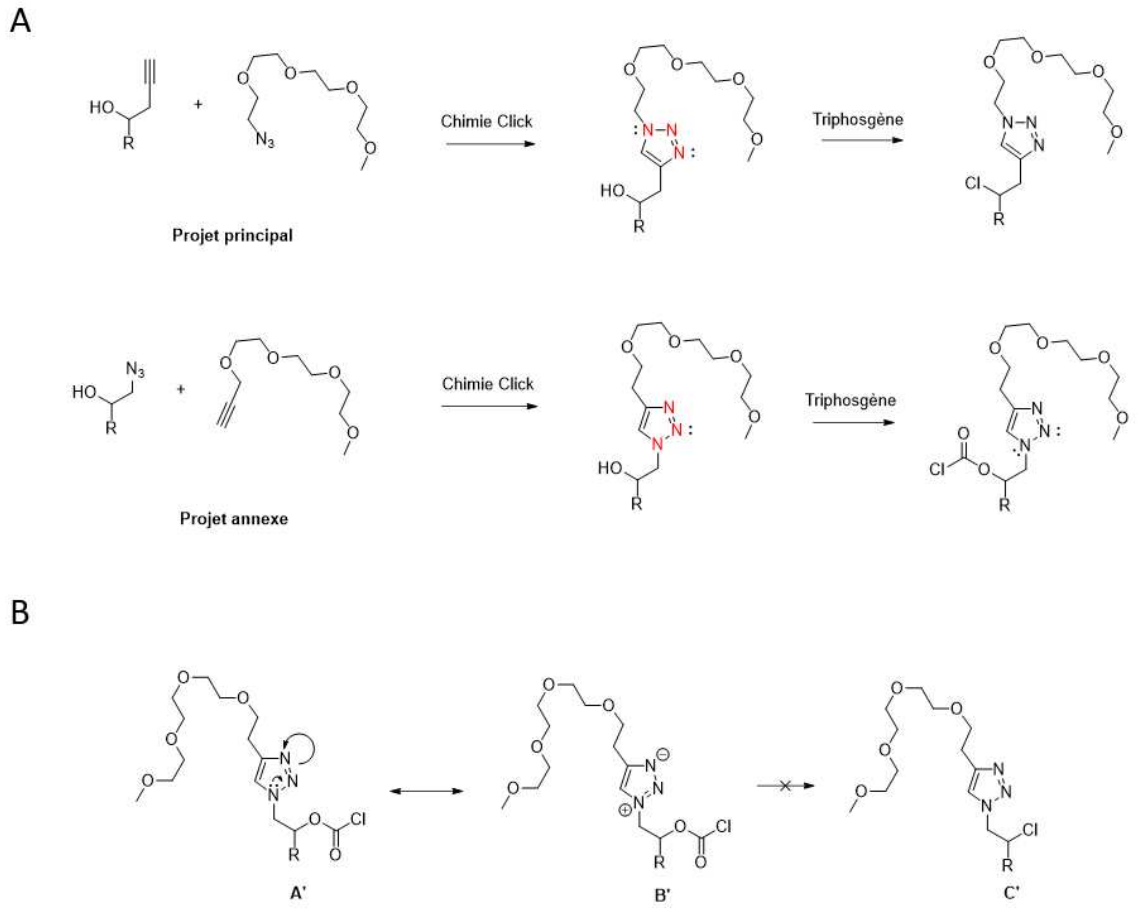


Figure 62 : A) Deux voies synthétiques différentes mettant en jeu une réaction de chimie « click » qui permet d'obtenir les deux cycles triazoles dont l'isomère de structure du projet principal ne permet pas d'obtenir la fonction chloroformiate.

B) La forme limite qui conduit à B' montre pour des raisons orbitalaires qu'il n'est pas possible d'effectuer une addition-élimination de la fonction chloroformiate comme cela était le cas dans le projet principal (Figure 61). Par conséquent, la formation du dérivé chloré n'a pas été observée puisque l'intermédiaire cycle tendu à quatre chaînons n'existe plus dans ce cas précis.

D'après ces observations expérimentales, nous pensons que l'élimination de la fonction chloroformiate n'est pas réalisable dans le projet annexe. En effet, lorsque l'on écrit la forme limite de cette structure, on s'aperçoit que les orbitales moléculaires contenant la nouvelle densité électronique portée par l'atome d'azote sp^3 du cycle triazole (Figure 62 B, (B')) ne permettent pas d'effectuer une addition-élimination à l'origine du cycle tendu à quatre chaînons observé dans le projet principal. Ainsi, la formation de la structure chlorée (Figure 62 B, (C')) n'a jamais été observée, ce qui permet d'effectuer la réaction de couplage sans réaction secondaire.

Nous avons alors décidé de revoir le schéma réactionnel du projet principal afin d'obtenir le cycle triazole dans le même sens que le projet annexe, de sorte à ne pas favoriser l'élimination de notre intermédiaire chloroformiate servant de lien pour le couplage selon le schéma rétrosynthétique présenté en Figure 63.

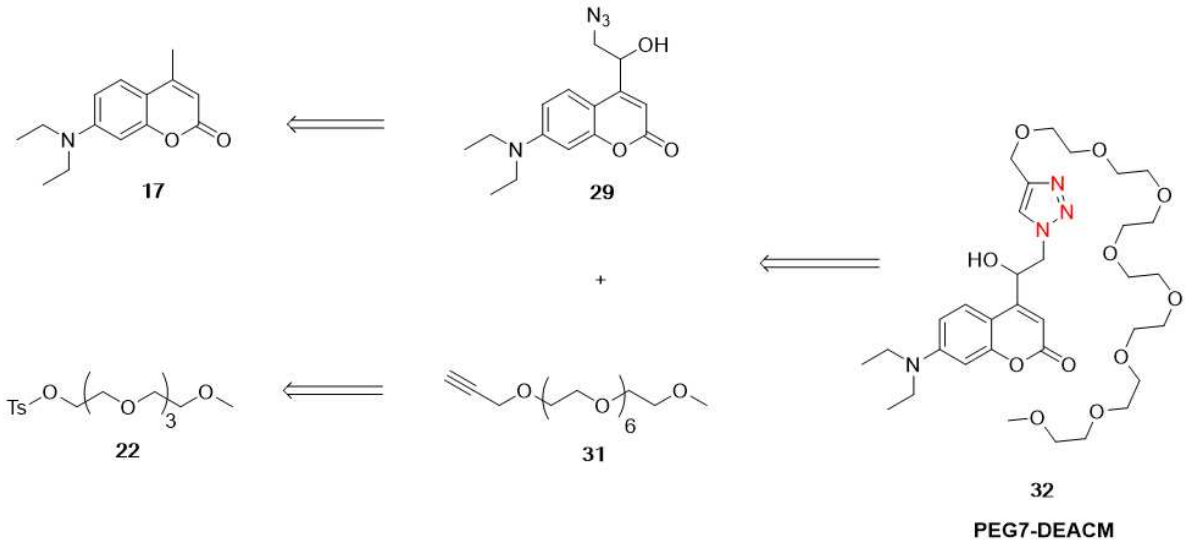


Figure 63 : Schéma rétrosynthétique envisagé pour la formation du nouveau dérivé soluble PEG7-DEACM **32** dont le cycle triazole a été inversé afin d'éviter l'élimination de la fonction chloroformiate.

IV.3 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables PEG7-DEACM

IV.3.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile PEG7-DEACM

La synthèse du dérivé PEG7-DEACM **32** a été effectuée en huit étapes avec un rendement global de 3 % selon le schéma réactionnel représenté en Figure 64. Les étapes menant à **18** et **22** ne sont pas représentées car elles sont identiques au mode opératoire utilisé lors de la synthèse du dérivé OEG4-DEACM **24**.

En démarrant la synthèse depuis la 7-diethylamino-4-aldehyde-methylcoumarine **18** obtenue lors de la synthèse précédente, l'époxyde **28** a été synthétisé à l'aide d'un ylure de sulfonium généré *in situ* depuis le sel de sulfonium correspondant en milieu basique. L'ouverture stéréosélective de l'époxyde a été effectuée en présence d'azoture de sodium catalysée par du chlorure d'ammonium pour donner l'azido-alcool secondaire **29** dont la caractérisation par RMN montre bien la stéréosélectivité de la manipulation.

Nous avons préparé en parallèle l'alcyne pégylé **31** en cinq étapes avec un rendement global de 13 %. Le méthoxy heptaéthylène glycol **30** a été obtenu par substitution nucléophile en milieu basique du triéthylène glycol sur le groupement tosyle du composé **22**. L'alcyne **31** a été quant à lui obtenu par substitution nucléophile en milieu basique du méthoxy heptaéthylène glycol **30** sur le bromure de propargyle.

Enfin, la réaction de cyclo-addition catalysée au cuivre (CuAAC) (Chassaing *et al.*, 2016) entre les précurseurs alcyne **31** et azido **29** a permis d'obtenir le dérivé PEG7-DEACM **32** souhaité.

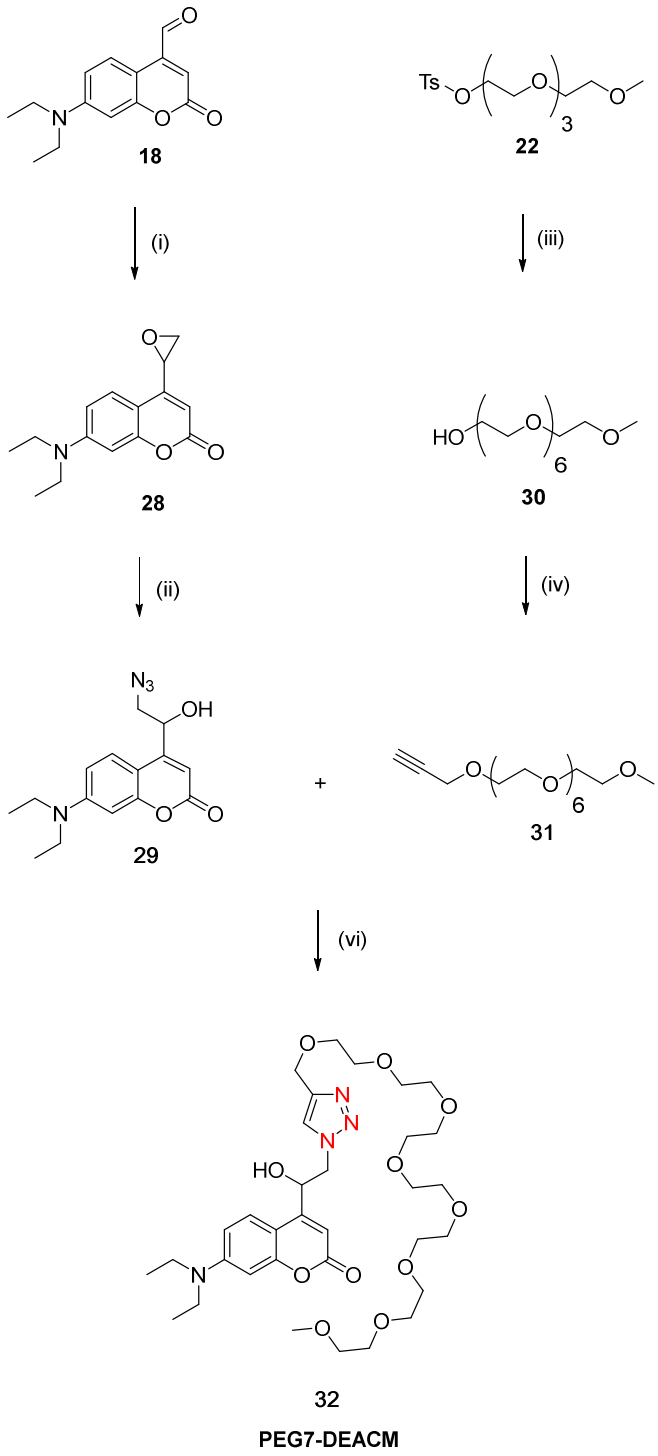


Figure 64 : Synthèse du nouveau groupement protecteur photo-labile PEG7-DEACM **32**.

(i) Ylure de sulfonium, Cs_2CO_3, THF, 60 °C, 2 h, 67 %, (ii) NaN_3, NH_4Cl, EtOH, H_2O, 80 °C, 16 h, 47 %, (iii) triéthylène glycol, NaOH, THF/H_2O, t.a, 1 h, 49 %, (iv) Bromure de propargyl, NaH, THF, t.a, 12 h, 68 %, (v) $CuSO_4$, ac. ascorbique, *L*-proline, DMF/*t*-BuOH/H_2O, 60 °C, 24 h, 60 %.

IV.3.2 Méthode de couplage avec les dérivés amino-doxycyclines

Dès que la synthèse du groupement protecteur photo-labile PEG7-DEACM **32** au cycle triazole inversé a été achevée, l'étape de couplage classique utilisant la fonction chloroformiate a été testée afin de vérifier si le mécanisme d'élimination assisté par le cycle triazole avait toujours lieu (Figure 65).

Depuis le PEG7-DEACM **32** en présence de triphosgène en milieu basique, le dérivé chloroformiate **33** a cette fois-ci été synthétisé d'après le profil UV obtenu par suivi HPLC. En effet, le nouveau pic formé ne coïncide plus avec le pic observé lors du mécanisme secondaire évoqué précédemment. Néanmoins nous n'avons pas essayé de l'isoler et de le caractériser en raison de l'instabilité de la fonction chloroformiate. Seul un lavage rigoureux du brut réactionnel au toluène anhydre suivi d'une évaporation est effectué.

En accord avec la formation du dérivé chloroformiate **33**, la réaction de couplage avec les analogues de doxycyclines **3** et **5** a été effectuée selon le mode opératoire développé pour le couplage de la série *o*-nitrophénéthyle (Figure 65 (ii)).
Le produit de couplage **34** a été obtenu avec un rendement acceptable de 50 % (les 50 % restants correspondent au produit d'hydrolyse de la fonction chloroformiate).

Etonnamment, la réaction de couplage permettant d'obtenir le dérivé **35** n'a quant à elle pas fonctionné malgré plusieurs tentatives et l'utilisation stricte du même mode opératoire. Malgré tout, l'inversion du cycle triazole semblait être la bonne solution étant donné que la substitution du chloroformiate par un chlore n'a plus été observée.

Avant de mettre au point un mode opératoire fiable pour préparer le dérivé glycine, nous avons alors fait le choix d'explorer au plus vite les propriétés physico-chimiques du produit de couplage **34** pour valider la faisabilité de la stratégie employant les dérivés 7-*N*,*N*-diéthylamino-coumarin-4-yl (DEACM) comme groupements protecteurs photo-labiles afin d'obtenir des réactions de photolyse conduisant à la libération du composé d'intérêt.

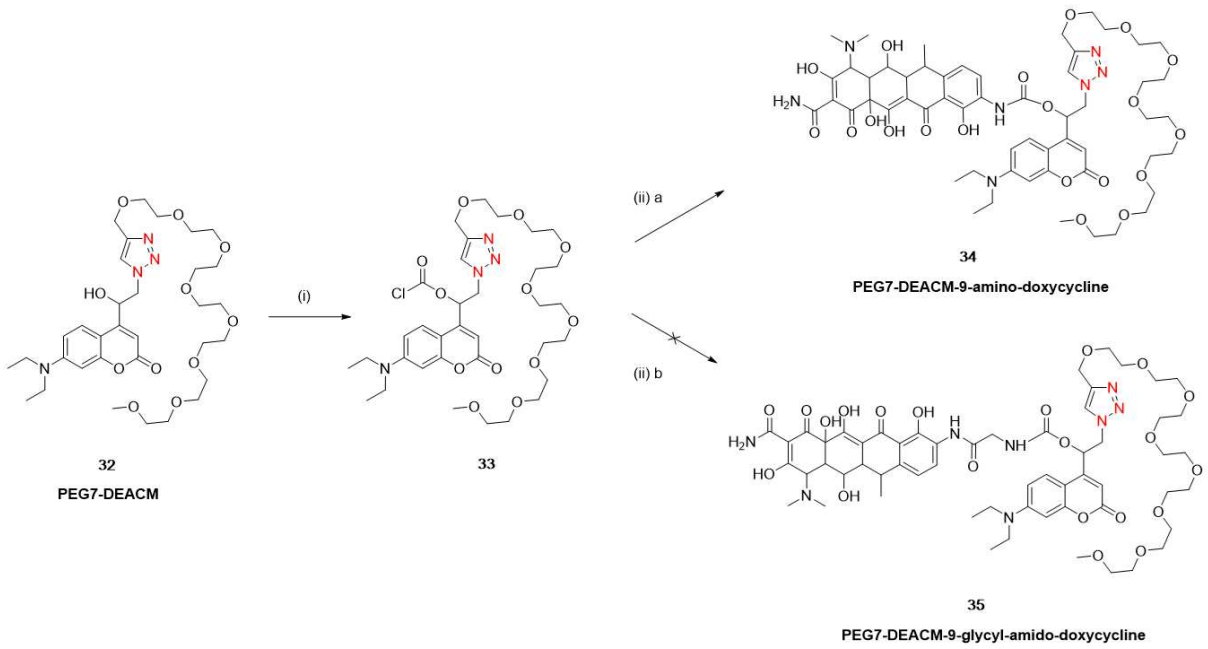


Figure 65 : Synthèse des deux dérivés photo-activables PEG7-DEACM **34** et **35** en utilisant la fonction chloroformiate comme précurseur de lien carbamate.

(i) Triphosgène, DIPEA, THF, t.a, 3 h, (ii) 9-amino-doxycycline **3**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 2 h, 50 %, (iii) 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, $NaHCO_3$, dioxane/H_2O, t.a, 2 h, 0 %.

IV.3.3 Propriétés physico-chimiques du dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline 34

IV.3.3.1 Photolyse à un photon

Méthode :

Les expérimentations photochimiques ont été réalisées selon le même mode opératoire employé pour la photolyse des dérivés *o*-nitrophénétyles. Une solution mère dans l'acétonitrile de concentration égale à 10 mM a été préparée dans un premier temps, puis plusieurs dilutions successives ont été réalisées avec un tampon PBS 1x afin d'obtenir une concentration finale $[C]_f$ = 60 μM contenant moins d'un pourcent d'acétonitrile. La cuve contenant la solution a ensuite été irradiée à l'aide d'une LED à 405 nm pendant 15 min, dont le mécanisme photochimique unique des dérivés coumarines conduisant à la libération des dérivés amino-doxycyclines attendus est représenté ci-dessous (Figure 66) en accord avec le mécanisme photochimique étudié précédemment (Figure 55).

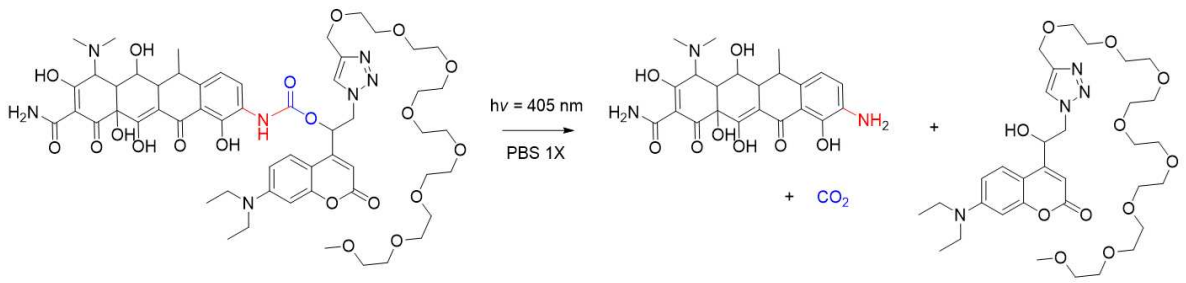


Figure 66 : Réaction photochimique unique des dérivés coumarines attendue conduisant à la photolyse de l'analogue 9-amino-doxycycline suite au clivage hétérolytique de la liaison C-N.

Lors de l'irradiation, un spectre d'absorbtion UV-visible est enregistré chaque minute afin de suivre l'évolution de la réaction de photolyse au cours du temps. En parallèle, quelques microlitres de la solution irradiée sont prélevés et injectés en HPLC pour quantifier à l'aide d'une courbe étalon la proportion d'analogues 9-amino-doxycycline libérés.

La courbe d'évolution du spectre d'absorption UV-Vis au cours du temps représentée ci-dessous (Figure 67 A) nous montre que la réaction de photolyse semble ne conduire qu'à un seul produit de photolyse par l'obtention de points isobestiques à 340 et 440 nm. La diminution du maximum d'absorbance à 395 nm (λ_{max} du produit couplé) est représentative de sa disparation au cours du temps. A l'inverse, le maintien d'absorbance à 350 nm est la signature caractéristique de la présence de l'analogue 9-amino-doxycycline.

Afin de confirmer ces profils d'irradiation encourageants, nous avons effectué des injections HPLC correspondant à chaque minute de solution irradiée afin de confirmer la photo-libération de l'analogue 9-amino-doxycycline. D'après la comparaison de ces profils HPLC (Figure 67 B) à t = 0 et après cinq minutes d'irradiation (t = 5), on observe bien la disparition du pic correspondant au produit couplé **34** au temps de rétention t_R = 17.8 min au profit de l'apparition d'un pic au temps de rétention t_R = 8.3 min qui correspond à l'analogue 9-amino-doxycycline **3**. Le pic présent à 17.8 min après 5 min d'irradiation correspond au produit de photolyse secondaire qui n'est autre que la « cage » restaurée par attaque du solvant (molécule d'eau) sur le cation intermédiaire formé lors de la coupure hétérolytique (Figure 55).

Nous avons donc ici la confirmation que la réaction photochimique des dérivés coumarines conduit bien à la photolyse attendue du fait de son mécanisme de libération unique malgré de potentielles interactions hydrophobes entre la cage et l'effecteur biologique.

Néanmoins, nous pouvons noter sur le profil du t_0 (Figure 67 B) la présence intrigante d'un faible pic au temps de rétention t_R = 10.9 min non identifié ayant une longueur d'onde λ_{max}

à 338 nm. Etant donné qu'une purification HPLC avait été effectuée en amont, il n'y avait aucune raison de trouver une impureté dans ce lot. De plus, nous avons constaté que ce pic inconnu avait tendance à augmenter au cours de l'irradiation comme nous pouvons le voir sur profil HPLC à 5 min d'irradiation. Nous avons considéré ce pic comme étant un produit de dégradation jusque-là encore jamais observé et nous avons procédé au test de stabilité dans le temps avant d'entreprendre quoi que ce soit concernant la caractérisation de ce pic.

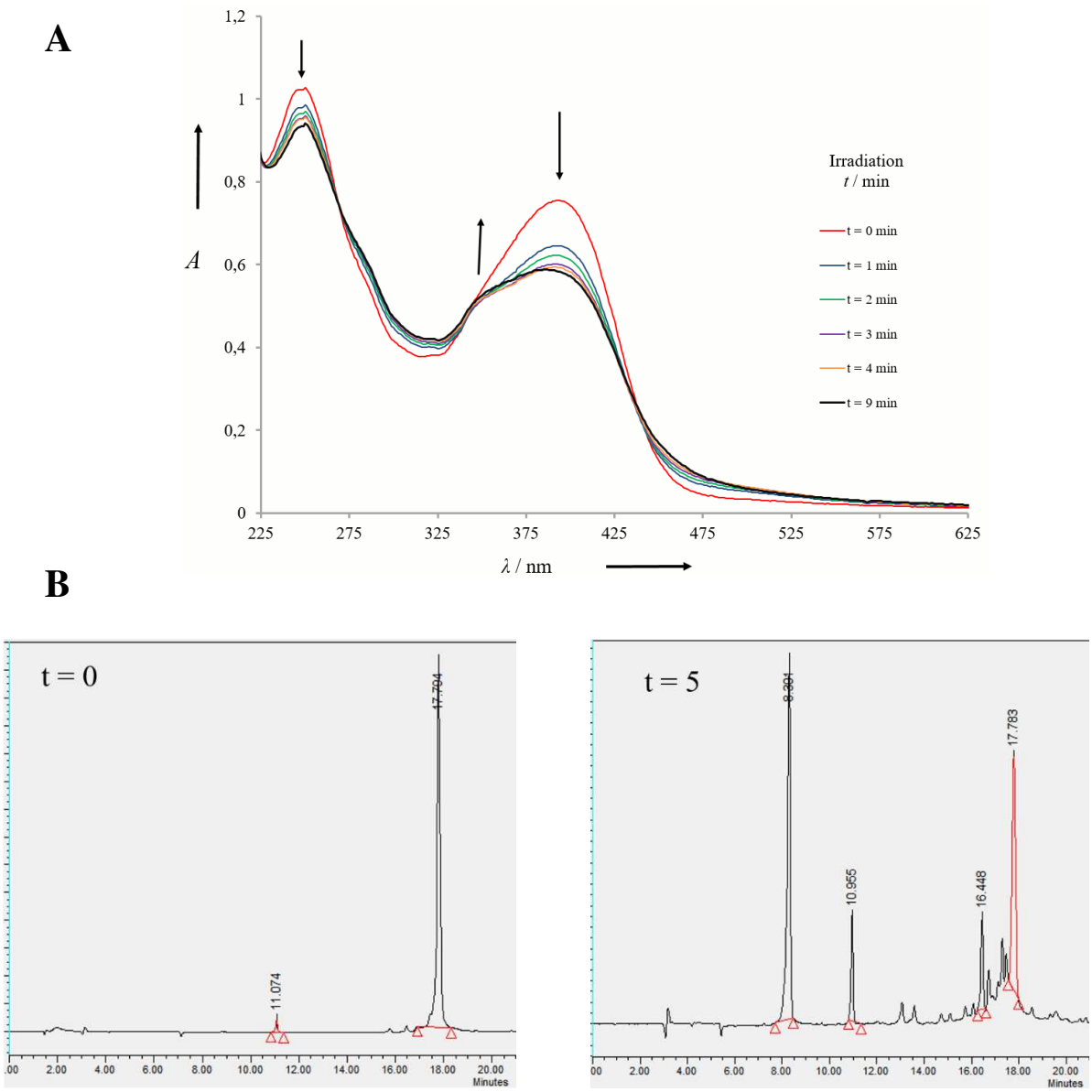


Figure 67 : A) Profils d'irradiations de **34** obtenus au cours du temps après irradiation d'une solution de 60 µM à 405 nm et à pH 7.4.
B) Profils HPLC obtenus après injections respectives de 100 µL d'une solution non irradiée (t = 0) et d'une solution irradiée (t = 5) de même concentration (60 µM).

IV.3.3.2 Stabilité

Suite aux tests photochimiques encourageants, nous avons alors procédé au test de stabilité dans le temps comme nous l'avions fait pour la série *o*-nitrophényléthyle. Pour cela, la solution à 60 μM dans le PBS 1x contenant le dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline **34** ayant servi à faire le t = 0 a été placée dans le noir pendant 24 h afin de vérifier la robustesse du lien carbamate face au processus d'hydrolyse dans des conditions mimant le pH d'une solution physiologique.

Une injection HPLC de la solution après 24 h de stockage a été effectuée et elle a, contre toute attente, montré la diminution du pic correspondant au dérivé couplé (t_R = 17.4 min) à hauteur de 70 % (Figure 68) au profit de l'apparition du même pic inconnu observé lors des expériences d'irradiations (t_R = 10.9 min).

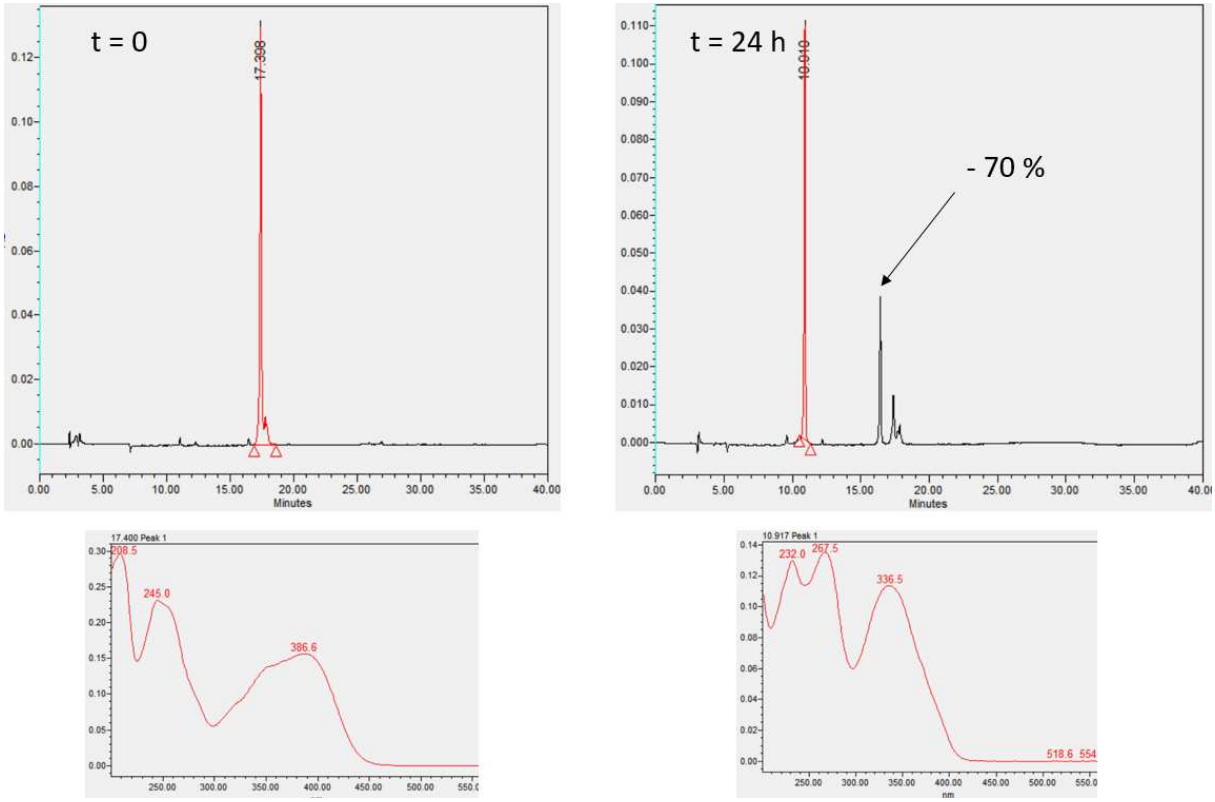


Figure 68 : Profils HPLC obtenus après injection d'une solution contenant le produit couplé à t = 0 et à 24 h pour contrôler la stabilité du composé en milieu physiologique à l'abri de la lumière. L'intégration des pics (en bas) associé à leurs spectres HPLC montre leurs signatures UV-visbiles respectives. On constate que le produit qui se forme au cours du temps à t = 11 min a un spectre d'absorbance ressemblant fortement à celui de la doxycycline.

Ces résultats préliminaires laissaient alors supposer un processus d'hydrolyse évident du lien carbamate puisque la proportion en produit couplé avait disparu en milieu aqueux. Néanmoins cette conclusion n'était pas satisfaisante sur trois points distincts :

- Les liens carbamates sont connus pour être robustes vis-à-vis des processus d'hydrolyse
- Cette « hydrolyse » n'a pas eu lieu lors du test de stabilité de l'EANBP-9-amino-doxycyline **14**
- Si « hydrolyse » il doit y avoir, le produit correspondant libéré devrait être le 9-amino-doxycycline **3**, or le temps de rétention ainsi que le λ_{max} ne coïncident pas dans ce cas.

Toutefois, les similitudes observées entre les spectres d'absorptions du 9-amino-doxycycline et du pic inconnu ainsi que pour longueurs d'ondes λ_{max} respectives de 345 et 338 nm, combinées aux temps de rétention extrêmement proches, nous ont amené à émettre l'hypothèse d'une réaction intramoléculaire entre la fonction phénolate et le carbonyl formant le lien carbamate (Figure 69).

En effet, la faible basicité du tampon PBS 1x à pH 7.4 est suffisante pour avoir une petite proportion d'anions phénolates dans la solution. Par conséquent, cette espèce chargée négativement peut, par ses propriétés nucléophiles, éliminer le groupement protecteur photo-labile PEG7-DEACM par simple addition/élimination sur le carbonyle formant le lien carbamate. Ce mécanisme intramoléculaire serait d'autant plus favorisé que le produit résultant serait un dérivé lactame cyclique à cinq chainons accentuant l'aromaticité du composé final expliquant le changement du temps de rétention ainsi que les longueurs d'ondes observées.

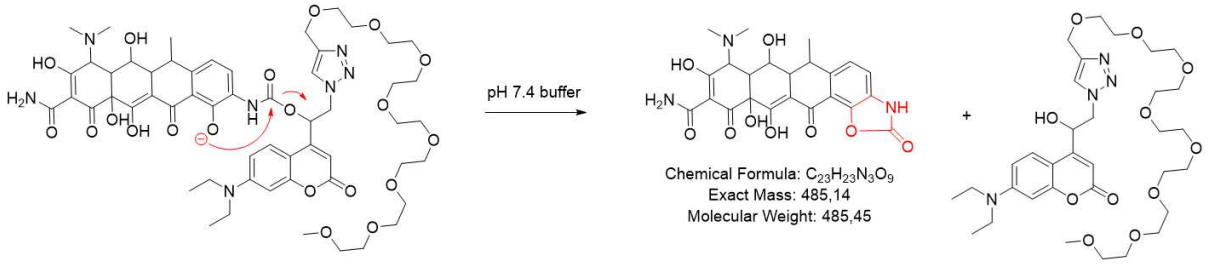


Figure 69 : Mécanisme intramoléculaire proposé permettant d'expliquer l'apparition du pic inconnu dont les propriétés physico-chimiques sont extrêmement proches du dérivé 9-amino-doxycycline **3**.

Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons fait analyser l'échantillon ayant servi à faire ce test de stabilité par spectroscopie de masse à l'ionisation chimique négative. Nous recherchions alors une nouvelle masse molaire de 485.14 g.mol^{-1} qui a été confirmée par l'obtention du $[M-H]^+$ représenté en Figure 70.

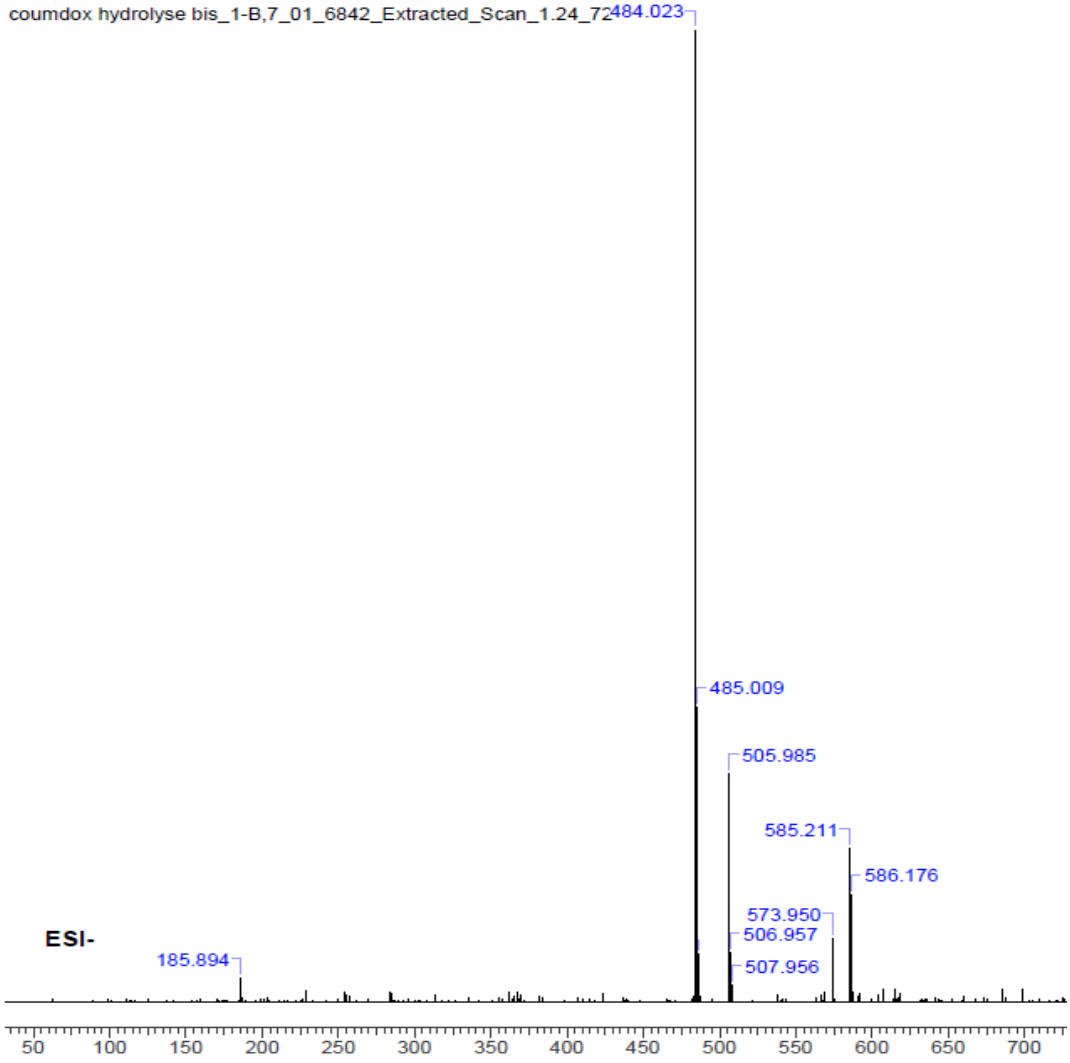


Figure 70 : Spectre de masse de la solution utilisée pour faire le test de stabilité en tampon physiologique. m/z calculé pour la molécule inconnue : 485.14.

En parallèle nous avons également procédé à des tests de stabilité dans une solution tampon acétate à pH = 4.7. En effet, à ce pH la forme phénolate est négligeable et nous avons montré qu'après 168 h la solution contenant le produit couplé était toujours intacte contrairement à la réaction intramoléculaire rapide qui s'effectue à pH physiologique après quelques minutes seulement.

Pour conclure sur ce dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline, nous venons de montrer que l'utilisation des dérivés coumarines DEACM comme groupements protecteurs photo-labiles était une solution payante afin de contourner le problème de relargage rencontré précédemment avec les dérivés *o*-nitrophényléthyles du fait de leur mécanisme photochimique unique.

Néanmoins, les propriétés physico-chimiques de la 9-amino-doxycycline en milieu physiologique sont telles qu'un mécanisme intramoléculaire à l'origine de la libération d'un nouveau dérivé de type doxycycline lactame peut être problématique. En effet, nous ne connaissons pas, à l'heure actuelle, les éventuelles propriétés inductrices que pourrait avoir ce nouveau « sous-produit » intramoléculaire vis-à-vis du système d'expression de gène Tet-on.

Comme nous l'avons mentionné en partie III.1.2, les structures cristallographiques montrent que toute modification apportée en position 9 peut être envisagée à condition qu'elle ne soit pas trop « imposante », auquel cas l'activité inductrice de ces dérivés tétracyclines serait fortement compromise. Un cycle lactame à cinq chaînons pourrait tout à fait rentrer dans la poche hydrophobique et toujours interagir avec la protéine TetR. Ceci remettrait alors en question l'utilisation de ce dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline comme inducteur photo-activable pour l'étude de processus biologiques chez l'animal du fait de l'activité basale engendrée par la réaction intramoléculaire.

A l'inverse, cet analogue pourrait ne plus avoir aucune affinité avec la protéine TetR et ne plus être considéré comme inducteur vis-à-vis du système d'expression de gène Tet-on.

Afin de vérifier toutes ces hypothèses, un mode opératoire a été imaginé afin de synthétiser chimiquement cet analogue de doxycycline lactame (Figure 71) afin de le tester *in vitro* dans le cadre de notre collaboration sur des cellules neuronales exprimant le système Tet-on.

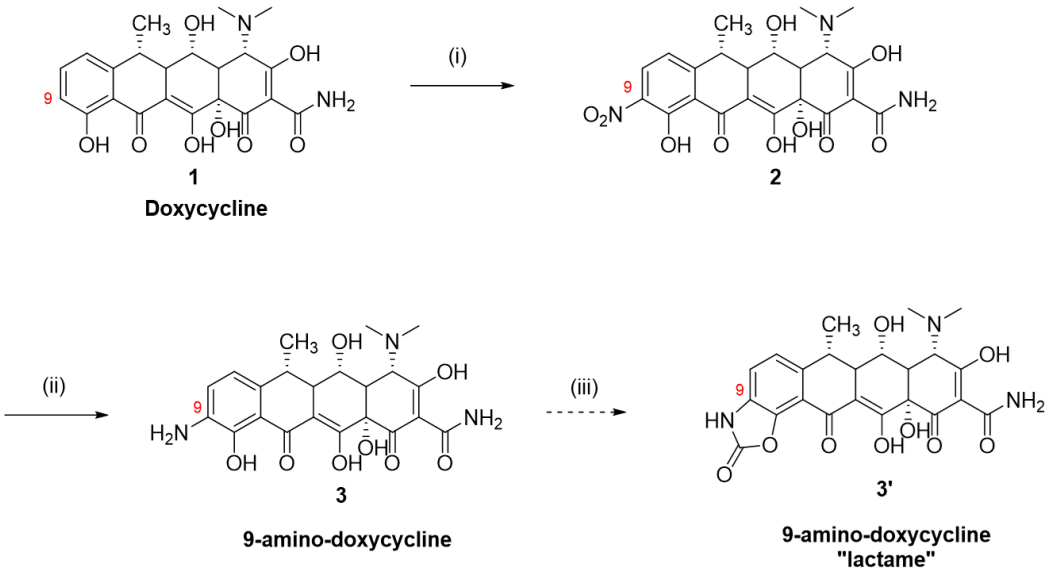


Figure 71 : Stratégie de synthèse envisagée afin d'obtenir l'analogue 9-amino-doxycycline lactame **3'** pour vérifier sa capacité éventuelle d'inducteur d'expression de gène sur le système tet-on.

(i) HNO_3, H_2SO_4, 0 °C à t.a, 1h, 97 %, (ii) H_2/Pd/C, CH_3OH, t.a, 6H, 96 %, (iii) Triphosgène, Et_3N, DMF, t.a, 12 h.

Enfin le dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline est actuellement en cours d'étude *ex vivo* afin d'étudier son comportement.

IV.3.3.3 Alternative

En attendant les premiers résultats biologiques et en raison des multiples incertitudes existantes autour de ce dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline, nous nous sommes concentrés sur la mise au point de la réaction de couplage qui n'avait pas fonctionné entre le nouveau groupement protecteur photo-labile PEG7-DEACM et l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline (Figure 65 (iib)).

En effet, si la formation du dérivé doxycycline lactame à cinq chaînons comme nous venons de le voir est un processus cinétiquement favorisé, les constantes de cinétique relatives pour la formation d'un dérivé similaire à huit chainons sont largement défavorables.

C'est pourquoi la mise au point de cette réaction de couplage utilisant le 9-glycyl-amido-doxycycline est primordiale, afin de pouvoir confirmer que la réaction intramoléculaire conduisant à des produits cycliques à huit chainons représentés ci-dessous en Figure 70 n'a pas lieu.

Ce nouveau dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** constituerait alors une alternative de choix par rapport au dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline comme inducteur photo-activable pour l'étude de processus biologiques chez l'animal.

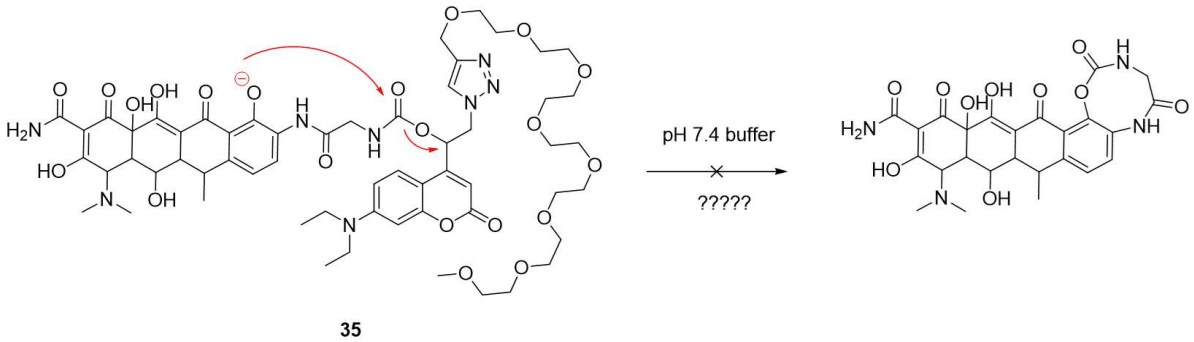


Figure 72 : Mécanisme intramoléculaire conduisant à la formation d'un produit cyclique à huit chainons en condition faiblement basique.

IV.3.4 Mise au point d'une nouvelle méthode de couplage pour le dérivé 9-glycyl-amido-doxycycline

Du fait de la plus grande disponibilité du doublet porté par l'atome d'azote, la basicité et donc la nucléophilie des amines aliphatiques **5** est plus grande que celle des amines aromatiques **3** comme le montrent ces structures mésomères (Figure 73).

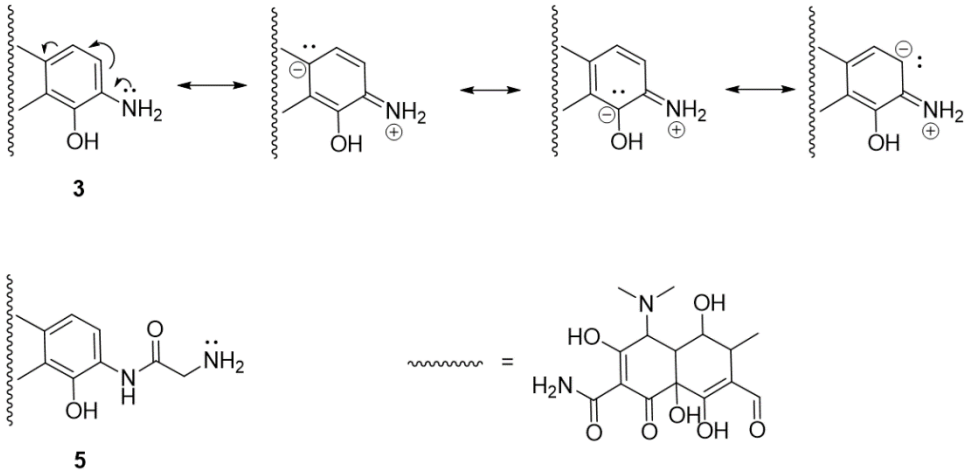


Figure 73 : Nucléophilie amine aromatique / amine aliphatique

Nous devrions par conséquent rencontrer moins de difficultés concernant le couplage du dérivé 9-glycyl-amido-doxycycline **5** par rapport à celui du dérivé 9-amino-doxycycline **3** en utilisant les chloroformiates comme fonctions électrophiles.

Néanmoins l'expérimentation semble nous montrer le contraire puisqu'il n'a pas été possible d'effectuer le moindre pourcentage de couplage concernant l'analogue **5**.

Par conséquent, l'explication rationnelle de cette absence de réactivité proviendrait de l'état de protonation de l'amine au moment où nous procédons au couplage.

D'après la Figure 74, on constate que dans le cas de l'analogue 9-amino-doxycycline **3**, l'acide conjugué obtenu est l'équivalent d'un sel de pyridinium avec un pKa d'environ 4.6 dont l'équilibre est fortement déplacé vers la forme non-protonée. Ainsi l'utilisation d'une base faible suffit amplement à s'assurer que l'amine aromatique reste sous sa forme la plus nucléophile, bien qu'elle soit conjuguée avec le reste de la structure.

En ce qui concerne l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, l'acide conjugué obtenu est un sel d'ammonium quaternaire avec un pKa autour de 10. Contrairement au cas précédant, il s'agit ici d'un équilibre entre les formes non-protonée et protonée.

Par conséquent, l'utilisation d'une base plus forte ainsi qu'un nombre d'équivalents appropriés seront nécessaires afin de contrôler correctement l'équilibre vers la forme déprotonée.

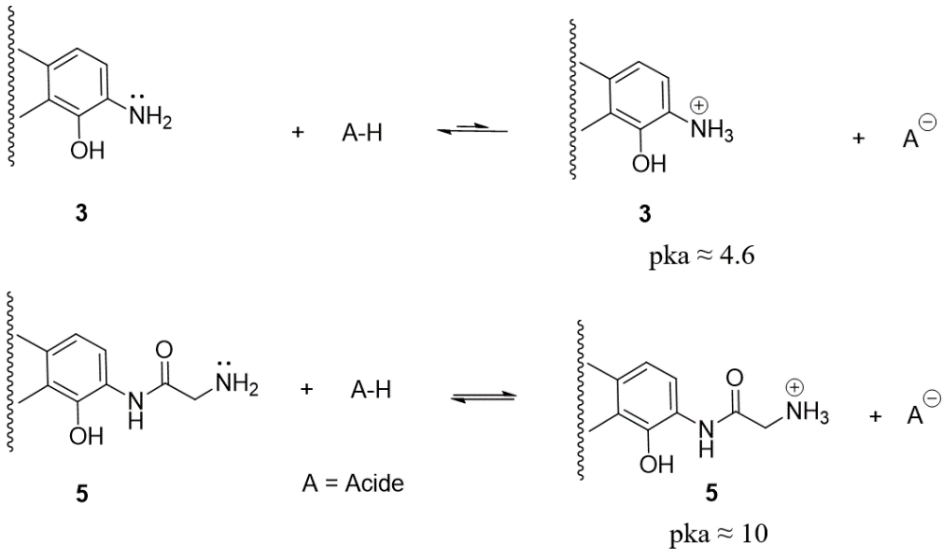


Figure 74 : Etat de protonation des analogues **3** et **5** en présence d'un acide.

En considérant l'équation-bilan reflétant les conditions de formation de la fonction chloroformiate utilisées suivante : R-OH + $CCl_3OCO_2CCl_3$ + → R-OCOCl + 2 $COCl_2$ + HCl, on constate que deux équivalents de phosgènes ainsi qu'un équivalent d'acide chlorhydrique sont formés lors de la formation du chloroformiate. En partant du principe que chaque équivalent de phosgène est susceptible d'être hydrolysé, jusqu'à quatre autres équivalents d'acides chlorhydriques peuvent être formés.

L'amine aliphatique **5** semble donc être plus sensible au changement de pH et donc plus facilement protonée que l'amine aromatique **3.**

IV.3.4.1 Optimisation du couplage utilisant la fonction chloroformiate

Les effets du pH, du solvant et de la température sur le rendement de couplage d'un chloroformiate sur le dérivé 9-glycycl-amido-doxycycline ont été explorés en se basant sur une approche méthodologique. Nous avons fait varier plusieurs facteurs tels que les types de bases, de solvants, les nombres d'équivalents et enfin la température.

Pour éviter de « gaspiller » de la « cage » PEG7-DEACM, nous avons également fait des tests en parallèle sur le dérivé chloroformiate de 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle (NVOC-Cl), largement utilisé dans les stratégies de couplages (Chen *et al.,* 2012; Frutos *et al.,* 2010; Taniguchi *et al.,* 2006).

L'ensemble des résultats a été regroupé dans le tableau 1.

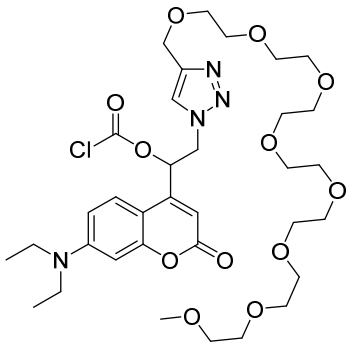
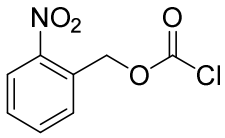
Cages	Bases	Solvants	9-glycyl-amido-dox	Exp N°
	$NaHCO_3$ 1 equiv	H_2O/Dioxane	1 equiv.	1
	$NaHCO_3$ + Δ	H_2O/Dioxane	1 equiv.	2
	K_2CO_3 2.5 equiv	H_2O/Dioxane	1 equiv.	3
	K_2CO_3 5 equiv	H_2O/Dioxane	2 equiv	4
	K_2CO_3/DIPEA	H_2O/THF	1 equiv.	5
	DIPEA	DMF	1 equiv.	6
	NaOH (1 M)	H_2O/THF	1 equiv.	7
	$NaHCO_3$	H_2O/Dioxane	1 equiv.	8
	K_2CO_3 (1 M)	H_2O/Dioxane	1 equiv.	9
	NaOH (1 M)	H_2O/THF	1 equiv.	10

Tableau 1 : Etude méthodologique afin de mettre au point les conditions de couplages efficaces entre les cages PEG7-DEACM et NVOC-Cl et l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline. Les expériences soulignées en rouges indiquent qu'aucun produit de couplage n'a été obtenu. Seule l'expérience 9 (soulignée en vert) a permis d'obtenir le produit couplé escompté.

Dix conditions réactionnelles ont été réalisées deux fois chacune afin d'éviter toute mauvaise interprétation éventuelle. Parmi toutes ces expériences, nous pouvons voir qu'une seule a permis d'obtenir le produit de couplage, il s'agit de l'expérience numéro 10 (soulignée en vert) utilisant une solution en NaOH de concentration 1 M contenant du THF en co-solvant. Etant donné que l'unique résultat positif a été obtenu sur le NVOC-Cl, les mêmes conditions réactionnelles ont été réutilisées sur le dérivé PEG7-DEACM. Encore une fois, le produit de couplage n'a pu être obtenu.

Pour l'ensemble de ces résultats négatifs, nous récupérions exclusivement du produit d'hydrolyse en fin de réaction, excepté pour l'expérience n ° 2 où un chauffage à 40 ° C pendant 12 h a dégradé l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline **5**.

En conclusion, l'utilisation de ces différentes conditions à pH contrôlé nous montre qu'il ne s'agit probablement pas d'un problème de réactivité de la fonction amine puisque celle-ci est sous sa forme non protonée. Ces résultats suggèrent donc que dans ce cas précis, la cinétique

d'hydrolyse de la fonction chloroformiate est bien plus rapide que la formation du produit de couplage.

Etant dans une impasse, nous avons décidé d'abandonner l'utilisation des fonctions chloroformiates comme agents de couplage pour la formation de lien carbamate au vu de leur cinétique d'hydrolyse trop rapide ne permettant pas d'optimiser cette réaction.

IV.3.4.2 Utilisation des carbonates de bis-nitrophénol

Comme alternative aux fonctions chloroformiates, nous avons décidé d'explorer les carbonates de bis-nitrophénol pour l'obtention de lien carbamate selon le schéma réactionnel décrit en Figure 75. La réaction entre la fonction alcool du groupement protecteur photo-labile (R-OH) et le carbonate de bis-nitrophénol permet d'obtenir le carbonate activé (intermédiaire carbonate) correspondant qui, en présence d'une fonction amine, va former un lien carbamate grâce au départ du bon groupe partant de type nitrophénolate.

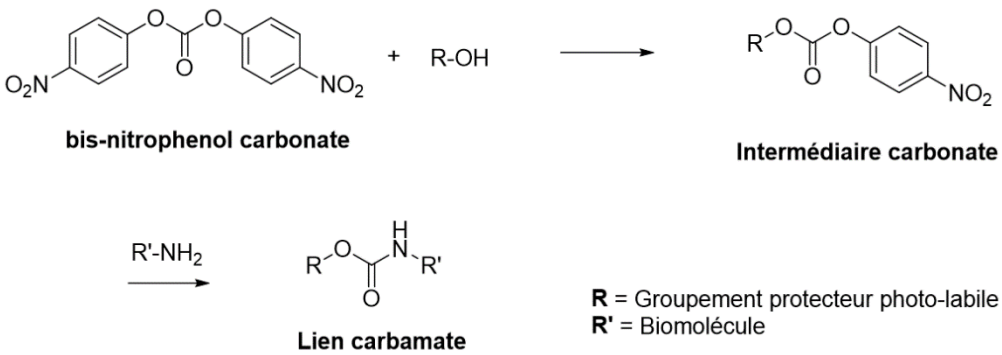


Figure 75 : La fonction bis-nitrophénol carbonate comme précurseur de lien carbamate.

Nous avons porté un grand intérêt pour ces fonctions carbonates bis-nitrophénol en raison de leur résistance remarquable vis-à-vis du processus d'hydrolyse. En effet, plusieurs études de cinétiques d'hydrolyses ont été effectuées sur ces dérivés. Diane McMahon et Thomas Fife ont par exemple montré que les constantes de vitesse d'hydrolyse des carbonates de bis-nitrophénol étaient bien plus faibles que celles obtenues pour le dérivé nitrophénol chloroformiate, tout en restant de très bons groupes partants pour des réactions de couplage (Fife and McMahon, 1970). Ceci nous permettrait d'effectuer des couplages en évitant au

maximum de former le produit d'hydrolyse comme nous avions l'habitude de l'observer jusqu'à maintenant avec les chloroformiates.

Enfin, plusieurs travaux ont récemment eu recours aux carbonates de bis-nitrophénol pour former des liaisons carbamates à partir d'amines dont les structures sont complexes, comme par exemple la doxorubicine qui est une molécule polycyclique hautement fonctionnalisée (Chen *et al.,* 2016; Dcona *et al.,* 2012; Zimmermann *et al.,* 2014). De plus, l'utilisation de la DMF comme solvant semble tout à fait adaptée pour les réactions de couplage faisant intervenir ces carbonates de bis-nitrophénol.

IV.3.4.3 Synthèse du dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline 35 par l'intermédiaire des carbonates de bis-nitrophénol

A partir du nitrophénol commercial **36,** en présence de triphosgène et en milieu basique, le carbonate bis-nitrophénol **37** est obtenu avec un très bon rendement. Par addition-élimination de la fonction phénol du dérivé PEG7-DEACM **32** sur le carbonate de bis-nitrophénol **37** en milieu basique dans la DMF, le nouveau carbonate correspondant **38** est ainsi obtenu. L'étape de couplage en milieu basique entre l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline **5** et le carbonate activé **38** en proportion équimolaire a enfin permis d'obtenir le nouvel analogue de doxycycline photo-activable **35** (Figure 76).

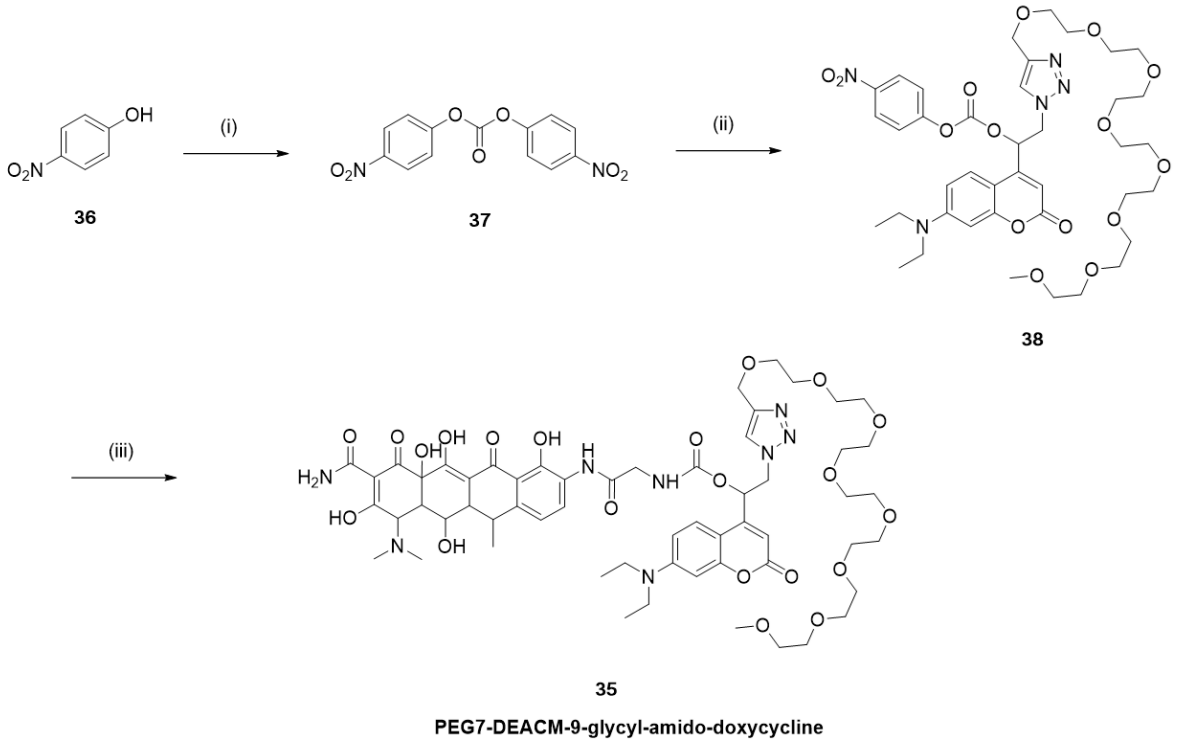


Figure 76 : Nouvelle stratégie de synthèse utilisant le carbonate de bis-nitrophénol **37** pour préparer le carbonate de PEG7-DEACM activé **38** correspondant afin d'effectuer l'étape de couplage avec l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline.

(i) Triphosgène, DIPEA, THF/CH_2Cl_2, t.a, 30 min, (ii) PEG7-DEACM **32**, Et_3N, DMF, t.a, 1h30, 70 % (iii) 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, Et_3N, DMF, t.a, 2 h, 80 %

Dans cette nouvelle stratégie, contrairement à celle employant les chloroformiates, chaque étape qui précède le couplage final peut être purifiée par chromatographie sur colonne de silice. Ainsi, nous pouvons effectuer l'étape de couplage final avec le carbonate activé **38** dans les meilleures conditions possibles, sans la présence de réactifs provenant des étapes précédentes.

L'autre grand point positif de cette nouvelle stratégie réside dans le choix du solvant. En effet, l'utilisation de la DMF nous permet de faire ce couplage dans des conditions anhydres préservant ainsi la formation du produit d'hydrolyse qui était probablement la cause des multiples échecs observés par une cinétique d'hydrolyse plus rapide que l'addition de l'amine.

IV.3.5 Propriétés physico-chimiques du dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35**

IV.3.5.1 Stabilité en milieu physiologique

Pour rappel, en effectuant les tests de stabilité du dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline **34** dans un tampon physiologique, nous avions mis en évidence la disparition au cours du temps de notre composé à hauteur de 50 % après 24 h au profit de l'apparition d'un nouvel analogue de doxycycline lactame à cinq chainons par l'intermédiaire d'un mécanisme intramoléculaire (Figure 66).

Nous avions alors avancé l'hypothèse qu'un tel mécanisme intramoléculaire ne devrait plus être observé en utilisant le dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** puisque celui-ci formerait un analogue de doxycycline à huit chaînons thermodynamiquement défavorable.

Avant même d'effectuer les expériences photochimiques, nous avons alors procédé au test de stabilité au cours du temps en milieu physiologique à partir d'une solution de concentration [C] = 25 µM dont la comparaison effectuée par injection HPLC entre le t = 0 et t = 24 h est représentée ci-dessous (Figure 77 A).

On remarque qu'après 24 h aucun nouveau pic n'est apparu sur le chromatogramme HPLC. Ceci confirme donc deux choses :

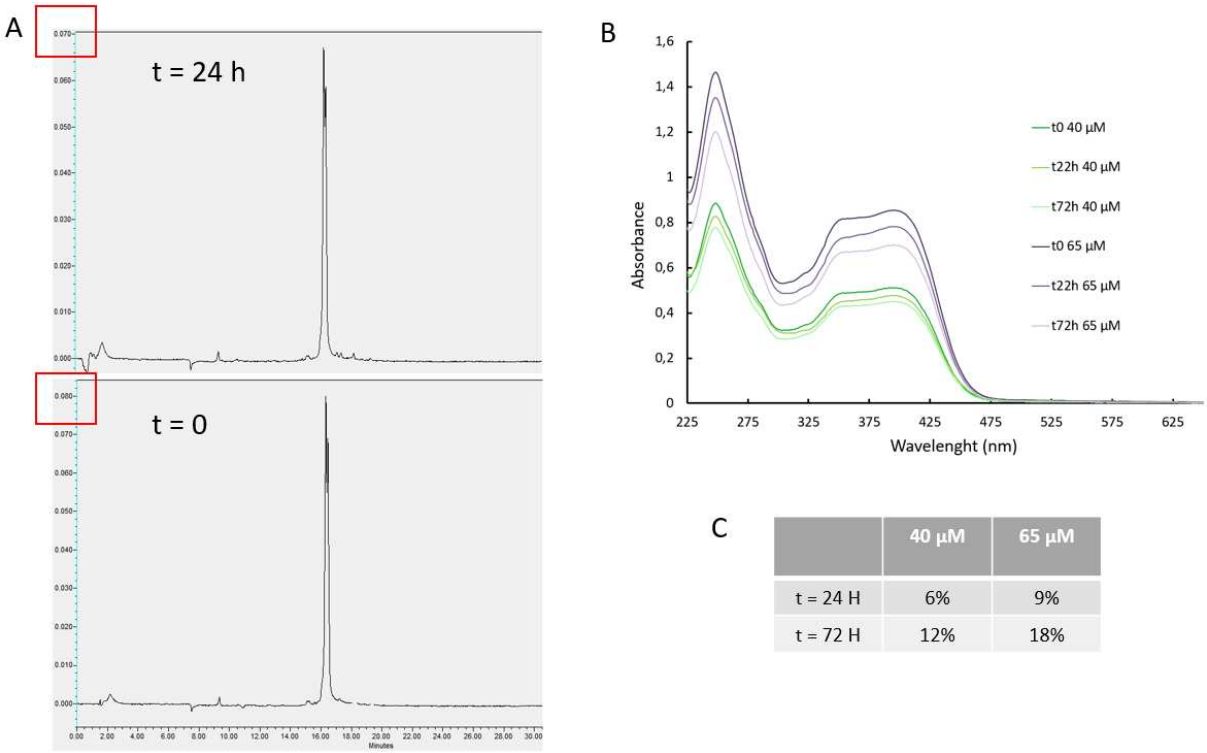
- Le dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline est stable vis-à-vis du processus d'hydrolyse
- Le mécanisme intramoléculaire n'est pas favorisé pour ce dérivé.

Nous pouvons également tirer une autre information de ce chromatogramme HPLC. En effet, après avoir injecté le même volume entre les deux mesures, on constate que le maximum d'absorbance a légèrement chuté.

Afin de confirmer ces données, deux solutions distinctes de concentrations 40 μM et 65 μM ont été préparées dans une solution aqueuse et stockées à l'abri de la lumière. Des spectres d'absorbance ont ensuite été respectivement enregistrés pour les deux solutions à t = 0, 22 h et 72 h (Figure 77 B).

Ces spectres confirment bien ce qui avait été observé par HPLC, à savoir une baisse non négligeable de l'absorbance maximum au cours du temps dont le pourcentage de perte

d'absorbance semblerait lié à la concentration de la solution, signe d'auto-organisation dans le solvant aqueux (Figure 77 C). Le phénomène semble non linéaire et a tendance à se stabiliser au cours du temps puisqu'on observe par exemple, pour la concentration de 40 μM, une diminution nette dans les premières 24 h de l'ordre de 6 % puis une nouvelle baisse de 6 % après 48 h supplémentaires.



	40 µM	65 µM
t = 24 H	6%	9%
t = 72 H	12%	18%

Figure 77 : A) Comparaison des chromatogrammes HPLC obtenus après injection d'un volume égal à une concentration donnée à t = 0 puis à t = 24 h.
B) Mesure des spectres d'absorbance des deux solutions au cours du temps.
C) Tableau résumant les pourcentages d'absorbance perdus au cours du temps par rapport au t = 0.

Malgré ce phénomène de perte d'absorbance au cours du temps, le fait qu'aucun produit d'hydrolyse ne puisse être observé combiné aux concentrations restantes après 72 h fait toujours de cette molécule une candidate potentiellement efficace comme inducteur photo-activable pour l'étude de processus biologiques chez l'animal.

IV.3.5.2 Photolyse à un photon

Les expériences photochimiques ont été réalisées en suivant rigoureusement la méthode développée en partie IV.3.3.1 pour le dérivé PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline **34**. La réaction de photolyse attendue est représentée en Figure 78.

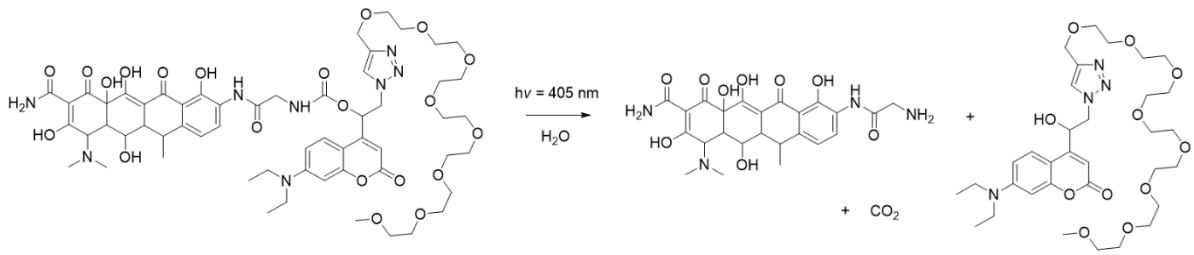


Figure 78 : Réaction photochimique unique des dérivés coumarines attendue conduisant à la photolyse de l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline suite au clivage hétérolytique de la liaison C-N.

La courbe d'évolution de l'absorbance au cours du temps représentée en Figure 76 A est en accord avec le profil obtenu pour l'analogue **34** précédent. En effet nous observons une diminution du maximum d'absorbance à 395 nm (λ_{max} du produit couplé) qui est représentative de sa disparation au cours du temps. A l'inverse, le maintien d'absorbance à 350 nm est la signature caractéristique de la présence de l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline. De plus, la présence de deux points isobestiques à 285 et 440 nm montre que la réaction photolytique est unique.

Afin de confirmer ces profils d'irradiation, nous avons effectué des injections HPLC correspondant à chaque minute de solution irradiée afin de confirmer la photo-libération de l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline dont les profils t = 0, 1, 5 et 10 min sont représentés en Figure 79 B.

On constate que le pic à t = 16.5 min correspondant au produit couplé **35** disparaît au fil de l'irradiation au profit de l'apparition du pic caractéristique de l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline à t = 9.5 min. La photolyse est terminée après 10 min avec un rendement de libération R_{lib} proche de 100 %.

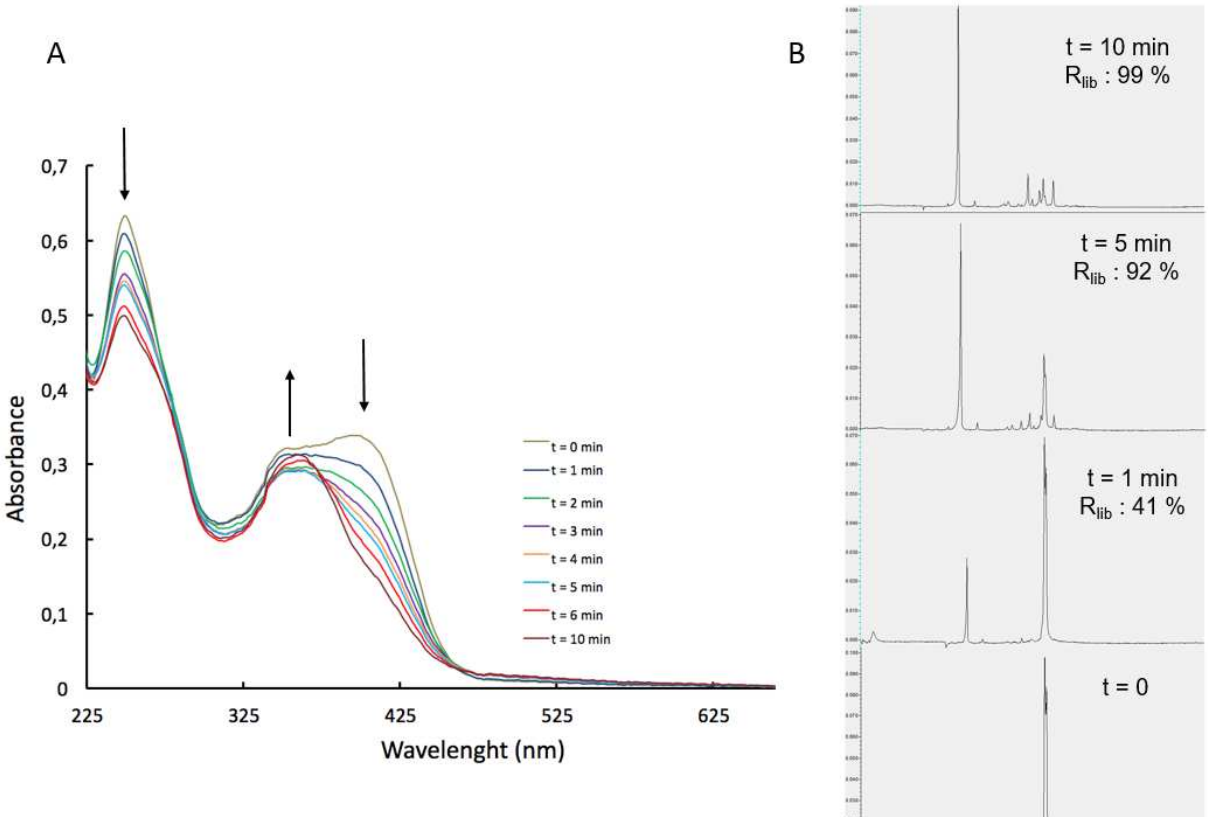


Figure 79 : A) Spectre d'absorption UV-visible de **35** obtenus au cours du temps après irradiation d'une solution de 25 μM à 405 nm et à pH 7.
B) Profils HPLC obtenus après injection de 100 μL d'une solution non irradiée (t = 0) puis successivement d'une solution irradiée à t = 1, 5 et 10 min. Après 10 min d'irradiation la photolyse est terminée et quantitative (99 % de 9-glycyl-amido-doxycycline relargué).

IV.3.5.3 Dosage de la 9-glycyl-amido-doxycycline relarguée

IV.3.5.3.1 Méthode

Afin de quantifier la quantité réelle d'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline relargué au cours du temps, il est nécessaire de procéder à un dosage par HPLC dont la mesure de l'aire du pic formé au cours du temps est corrélée avec une courbe étalon établie au préalable (Figure 80).

Cette courbe étalon a été obtenue en injectant successivement en HPLC 100 μL de cinq concentrations différentes (22, 50, 75, 100 et 125 μM) dont l'aire de chacune exprimée en μV*sec correspond à un point sur la courbe.

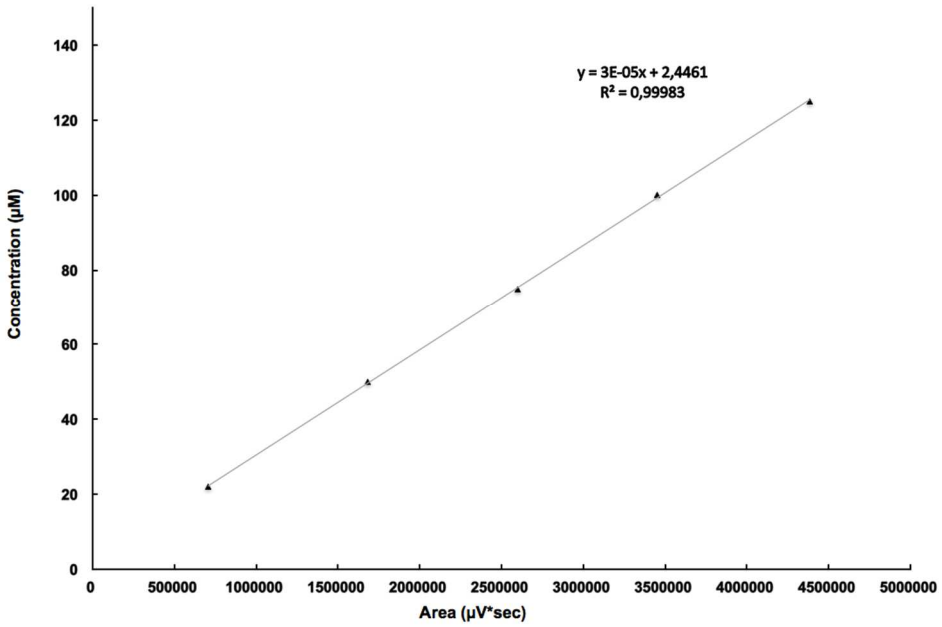


Figure 80 : Courbe étalon de l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline déterminée à cinq concentrations différentes. Chaque concentration a été injectée deux fois pour ajouter de la fiabilité à la courbe.

Après l'obtention des cinq points, l'équation exprimant l'aire du pic en fonction de la concentration peut être déterminée :

$$y = 3.10^{-5}x + 2.4461$$

Grâce à cette courbe il est alors possible de doser le pourcentage relargué à n'importe quel moment de la photolyse. Par exemple, après injection sur HPLC de la cuve contenant la solution à 22 μM ayant été irradiée 10 min, l'aire obtenue par intégration du pic correspond à x = 642 000 μV*sec, ce qui donne d'après l'équation y = 21.7 μM soit 99 % de 9-glycyl-amido-doxycycline libérés après 10 min de photolyse.

IV.3.5.4 Détermination du rendement quantique de photolyse à un photon (Φ_u)

Pour évaluer l'efficacité d'un groupement protecteur photo-labile, il est également important de déterminer son efficacité de photolyse qui est représentée par le produit : ε. Φ_u. Le coefficient d'extinction molaire (ε) ayant été déterminé précédemment, il ne reste plus qu'à déterminer le rendement quantique (Φ_u) exprimant le nombre de molécules photolysées par rapport au nombre de photons absorbés.

Méthode :

La façon la plus simple et la plus rapide pour déterminer un rendement quantique (Φ_u) consiste à comparer la molécule d'intérêt avec une autre molécule de référence dont le rendement quantique a déjà été déterminé et est connu pour une longueur d'onde précise.

La référence que nous avons utilisée pour déterminer le rendement quantique du dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** est le DEACM-Glycine **40** caractérisé par (Shembekar *et al.,* 2007) que nous avons synthétisé en 3 étapes (Figure 77).

Depuis la 7-diethylamino-4-methylcoumarine **17** commerciale, l'aldéhyde **18** correspondant est obtenu par oxydation en présence de dioxyde de sélénium dans le xylène. La réduction de l'aldéhyde a été effectuée en présence de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) pour obtenir l'alcool primaire **39** correspondant. Enfin, la référence finale DEACM-Glycine **40** a été obtenue en deux temps en préparant l'anhydride d'acide symétrique à partir de l'acide aminé N-Boc-glycine protégé en présence de DIC suivi de la déprotection du groupement Boc par l'acide trifluoroacétique.

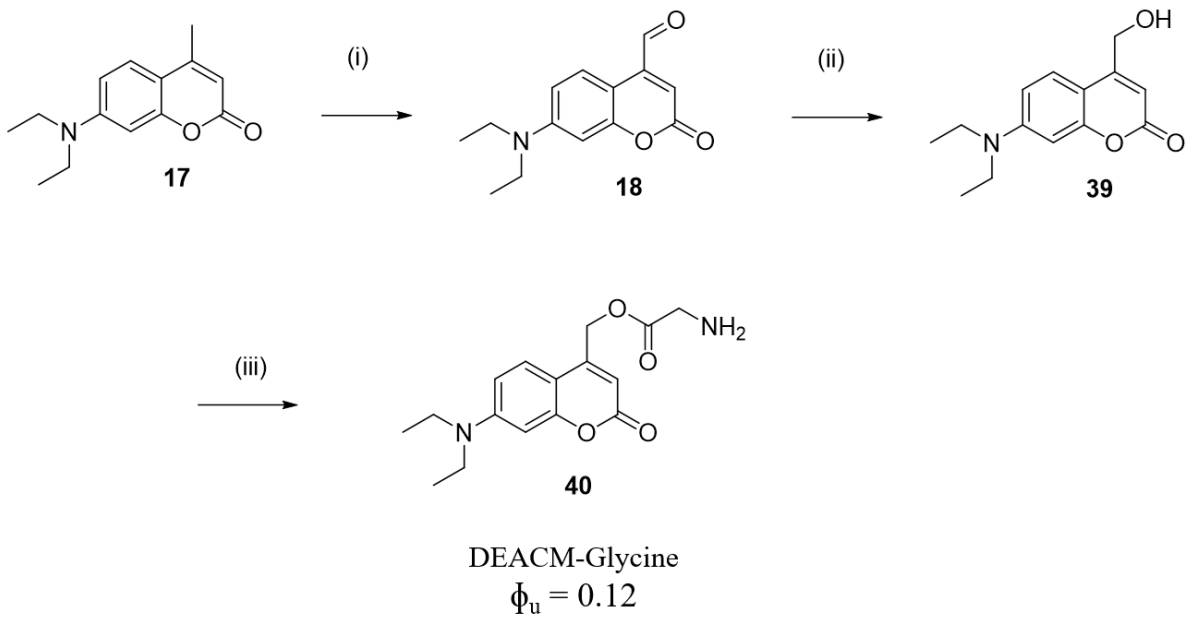


Figure 81 : Synthèse de la référence DEACM-Glycine **40** pour la détermination du rendement quantique ϕ_u).

(i) SeO_2, Xylène, 150 °C, 16 h, 47 % (ii) $NaBH_4$, THF/CH_3OH, t.a, 5 h, 60 %, (iii) a) Boc-glycine, DMAP, DIC, CH_2Cl_2, t.a, 30 min, 91 % b) TFA, CH_2Cl_2, t.a, 12h, 80 %

Deux solutions de PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** et DEACM-Glycine **40** sont préparées de sorte à obtenir des absorbances identiques à 405 nm. Une cuve contenant les deux molécules est alors préparée volume à volume puis injectée sur HPLC afin de mesurer l'aire des deux pics à t = 0.

Par la suite, la cuve contenant les deux molécules est irradiée pendant 30 s à 405 nm puis la solution est à nouveau injectée en HPLC afin de mesurer les nouvelles aires de chacun des pics.

En comparant l'évolution respective de leurs aires entre t = 0 et t = 30 s, nous avons pu déterminer un rendement quantique de photolyse à un photon Φ_u de 0.21 à 405 nm. Il est important de noter que la valeur de ce rendement quantique est 40 % plus élevée par rapport à ce qui est classiquement observé pour les dérivés coumarines DEACM.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par l'équipe d'Arancha del Campo qui a montré que l'introduction d'une fonction donneur d'électron sur le carbone où la coupure hétérolytique a lieu lors de la réaction de photolyse (Figure 55) permet de stabiliser l'intermédiaire carBocationique et d'accélérer le rendement du processus photochimique (Weis *et al.,* 2012).

Pour conclure, le rendement quantique de photolyse élevé ainsi que le coefficient d'extinction molaire important ($\varepsilon.\ \Phi_u = 2700\ M^{-1}cm^{-1}$) combinés avec l'efficacité remarquable de libération de l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline font du dérivé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** un excellent candidat pour la photolyse à 400 nm à pH neutre.

De plus, en se référant à la section efficace d'absorption à deux photons déterminée pour le chromophore DEACM de 18 GM à 740 nm (Hagen et al., 2008), nous pouvons estimer que la section efficace de photo-libération ($\delta_a\phi_u$) de notre composé PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline **35** est d'environ 3.8 GM à 740 nm, ce qui est à notre connaissance la valeur la plus élevée d'efficacité à deux photons pour les dérivés coumariniques DEACM.

CHAPITRE V

Vers la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile soluble de la famille des *o*-nitrobenzyles efficace en excitation bi-photonique

V.1 Etat de l'art

A travers les chapitres III et IV, nous venons d'explorer deux grandes familles de groupements protecteurs photo-labiles, les *o*-nitrophénétyles (en particulier l'EANBP) ainsi que les coumarines (version soluble des dérivés DEACM).

Lorsque nous faisons le bilan de ces deux chapitres, nous avions avec l'EANBP un groupement protecteur photo-labile performant en excitation bi-photonique prometteur en vue des expérimentations animales *in vivo*. Néanmoins la présence de deux voies photochimiques concernant cette famille de groupements protecteurs photo-labiles nous a été préjudiciable puisque seul le mécanisme ne conduisant pas à la photo-libération de la molécule d'intérêt a pu être expérimentalement observé, vraisemblablement en raison des propriétés physico-chimiques de la série EANBP-9-amino/-9-glycycl-amino-doxycycline.

En explorant la famille des coumarines qui sont connues pour n'avoir qu'un seul mécanisme photochimique possible, nous avons réussi à mettre au point la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile soluble dont la photolyse conduit bien à la libération des analogues de doxycycline aminés avec des rendements de photolyse à un photon honorables. De plus, nous avons également pu mettre au point une nouvelle méthode de couplage efficace et adaptée impliquant les carbonates de bis-nitrophénol. Bien que les dérivés coumarines DEACM soient utilisables en excitation bi-photonique, leurs valeurs de sections efficaces de photo-libération à deux photons (δ_u) ne sont pas très élevées comme nous l'avions mentionné précédemment à travers l'étude de (Bao *et al.,* 2012), autour de 0.12 GM à 800 nm. Pour rappel, il est communément admis qu'un groupement protecteur photo-labile est « exploitable » pour des applications biologiques avec une excitation bi-photonique à partir d'une valeur supérieure à 0.1 GM (Corrie *et al.,* 2005).

Nous avons alors cherché à combiner les enseignements acquis lors de l'exploration de ces deux familles de « cages » afin de proposer un nouveau groupement protecteur photo-labile n'ayant à la fois qu'un seul mécanisme photochimique possible et une performance en excitation bi-photonique remarquable.

En accord avec les avancées récentes présentes dans la littérature, nous nous sommes arrêtés sur les nouvelles générations de calcium « cagés » dérivés de l'EGTA (« Egtazic acid », agent chélatant de cations) en utilisant la famille des *ortho*-nitrobenzyles (*o*-NB) (Figure 82) pour deux raisons :

1) Cette famille des *o*-nitrobenzyles qui a été historiquement beaucoup employée pour la libération de molécules à un photon a fait l'objet d'un regain d'intérêt par l'intermédiaire d'un design efficace permettant d'obtenir des propriétés d'absorption à deux photons dans le proche infrarouge très intéressantes (Agarwal *et al.,* 2016; Jakkampudi *et al.,* 2016).

En effet, comme en témoignent ces deux travaux très récents, les deux équipes ont montré qu'elles étaient capables de photo-libérer du calcium *in vitro* et *ex-vivo* par l'intermédiaire d'une excitation bi-photonique affichant des valeurs respectives égales à 21 et 80 GM dans le DMSO (Figure 78).

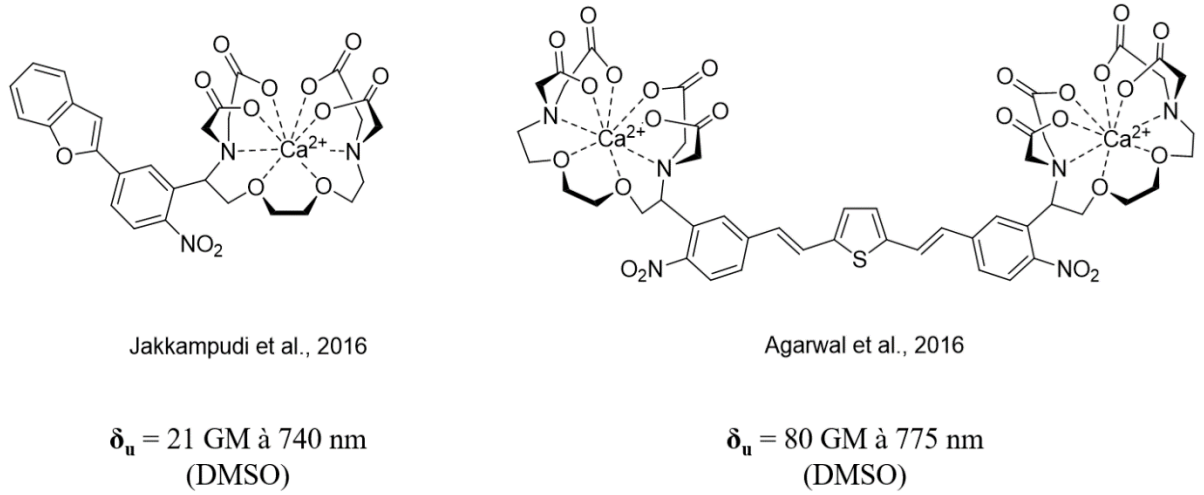


Figure 82 : Nouvelles générations de cages *o*-nitrobenzyles EGTA présentant des propriétés photo-physiques remarquables pour l'excitation bi-photonique dans le DMSO. Les pinces EGTA sont des agents chélatants ayant une forte affinité pour la complexation de cation calcium. Les irradiations respectives de ces molécules à 740 et 775 nm ont permis de photo-libérer efficacement le ou les cations calcium chélatés par cassure du complexe.

2) La deuxième raison pour laquelle ces dérivés issus de la famille des *o*-nitrobenzyles nous ont interpelés réside dans leur mécanisme photochimique unique de libération du composé « cagé ». A l'image de la famille des coumarines, les *o*-nitrobenzyles peuvent se photo-fragmenter selon une seule voie décrite en Figure 83, qui conduit à la libération de la molécule d'intérêt.

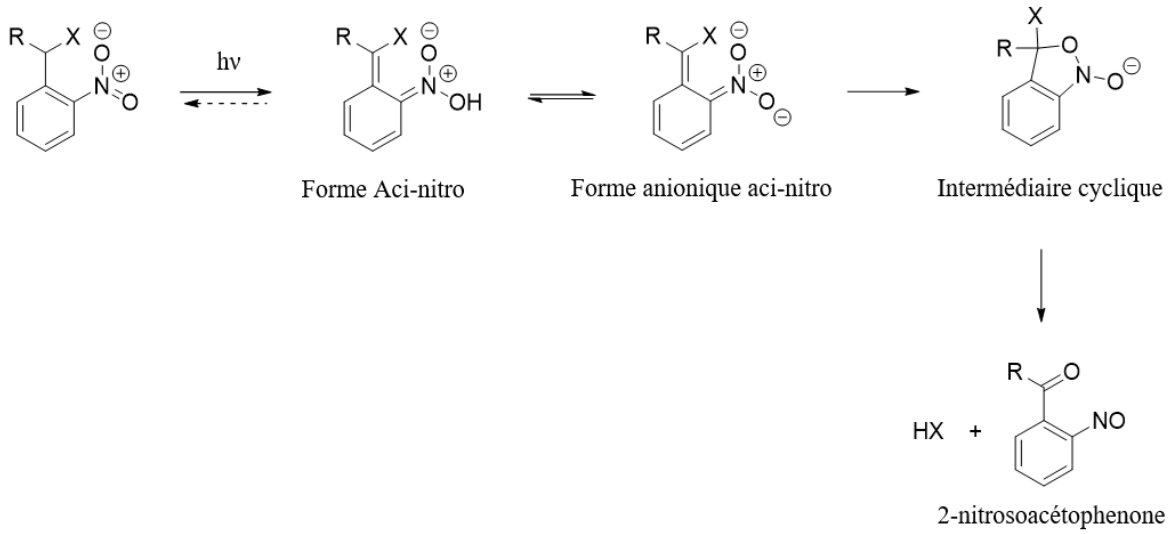


Figure 83 : Mécanisme de photo-fragmentation postulé pour les dérivés *o*-nitrophényle éthyle (*o*-NPE) de la famille des ortho-nitrobenzyles (*o*-NB).

Après absorption d'un photon, l'intermédiaire aci-nitro se forme rapidement et l'équilibre avec la forme anionique aci-nitro va permettre d'obtenir l'intermédiaire cyclique. L'ouverture de ce dernier est favorisée par le départ de la molécule d'intérêt et la formation d'un sous-produit de photolyse 2-nitrosoacetophenone.

V.2 Stratégie de synthèse

Dans le but de synthétiser un nouveau groupement protecteur photo-labile performant en excitation bi-photonique et conduisant au relargage efficace de nos analogues de doxycycline, nous avons décidé de mettre au point la synthèse d'une nouvelle molécule en nous inspirant de la structure développée par (Agarwal *et al.,* 2016). En effet, les valeurs de sections efficaces d'absorption à deux photons déterminées sont plus prometteuses que la structure proposée par (Jakkampudi *et al.,* 2016) et la présence de deux sites de conjugaison grâce à la symétrie de la molécule pourrait nous permettre de coupler deux analogues de doxycycline par unité de « cage », de sorte à créer de plus grands sauts de concentration lors de la photolyse.

Néanmoins certaines modifications doivent être apportées afin de respecter notre cahier des charges concernant la solubilité du composé final dans l'eau. En effet, dans la structure proposée par Agarwal et al, la solubilité est assurée en grande partie par les fonctions EGTA nécessaires pour complexer le calcium. Dans notre projet, ces fonctions EGTA n'ont aucune utilité et devront être remplacées.

Design d'un chromophore destiné à l'absorption bi-photonique :

La structure du nouveau groupement protecteur photo-labile que nous avons décidé de mettre au point est représentée selon le schéma rétrosynthétique en Figure 84 sous le nom de BNPET-OEG4 **50**, dont l'acronyme BNPET fait référence au chromophore 2,5-Bis-(NitroPhenylEthynyl)Thiophene.

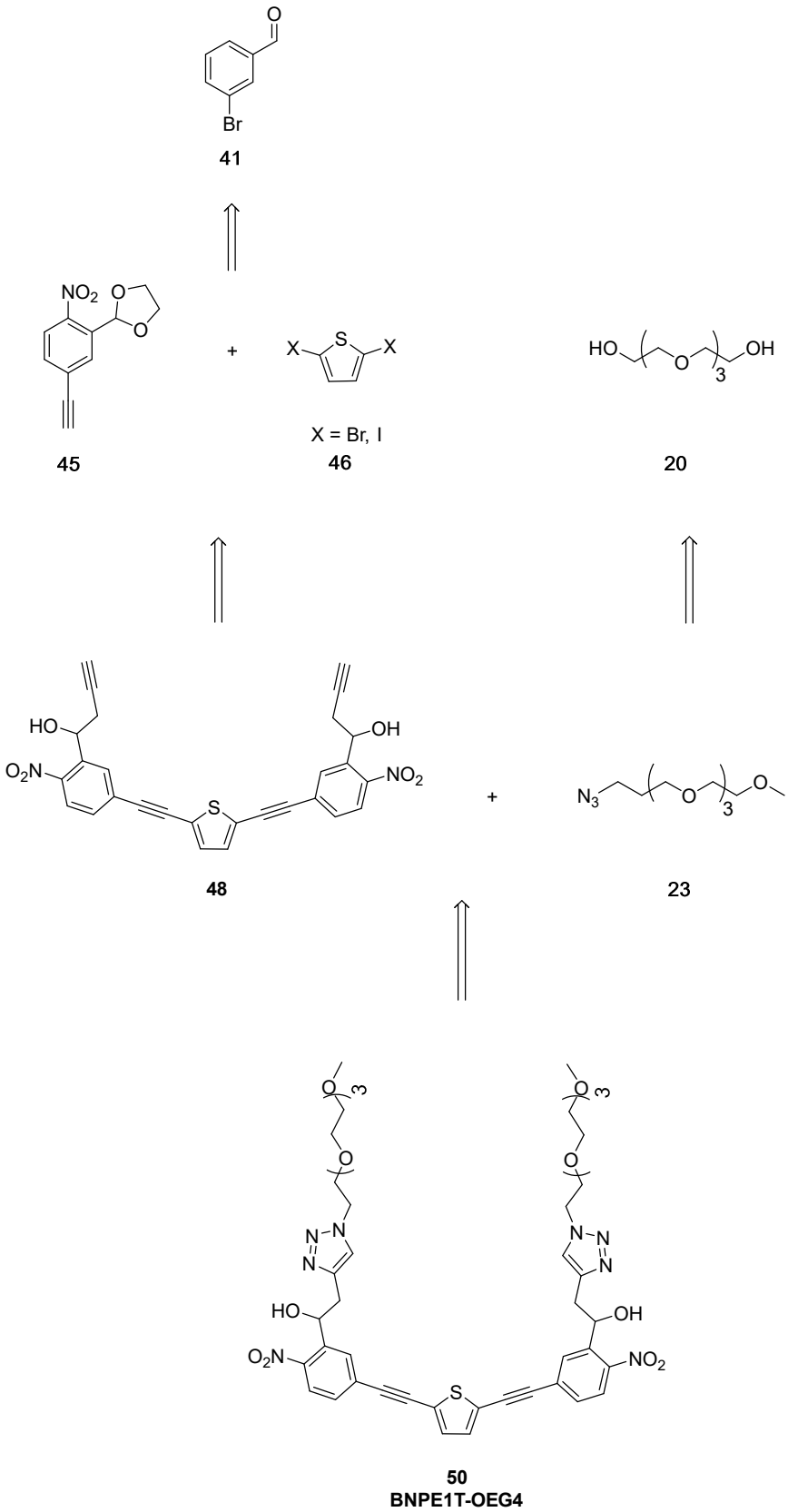


Figure 84 : Schéma rétrosynthétique concernant la synthèse du nouveau groupement protecteur photo-labile soluble BNPET-OEG4 **50**.

a) Chromophore à cœur hétéroaromatique :

Nous avons choisi d'abandonner les structures purement carbonées de type bi-phényle développées au laboratoire au profit de chromophores à cœur hétéroaromatique. Il existe dans la littérature de nombreux chromophores composés de systèmes hétéroaromatiques pyrrole, furane ou thiophène ayant d'excellentes propriétés en optique non-linéaire (Beverina *et al.,* 2005; Cheng *et al.,* 1991; Mignani *et al.,* 1990). Pour des applications biologiques, l'intérêt de l'introduction de cœurs thiophène au sein de fluorophores pour l'imagerie bi-photonique a été étudié par le groupe de K. D. Belfied en 2010. (Andrade et al., 2010; Yao and Belfield, 2012)

b) Les chaînes oligoéthylènes glycol (OEG) :

En s'inspirant de la stratégie de synthèse mise au point pour le dérivé coumarine PEG7-DEACM, nous avons décidé d'incorporer à nouveau des groupements oligoéthylènes glycol (OEG) par réaction CuAAC selon le schéma rétrosynthétique décrit en Figure 84, afin d'assurer la solubilité finale de notre nouveau groupement protecteur photo-labile et de rester neutre. L'apport de cette chaine OEG est double puisqu'en plus du facteur solubilité, son introduction en position benzylique devrait également augmenter le rendement quantique de photolyse ϕ_u de façon non négligeable (Klán *et al.,* 2013). En effet, l'effet électronique inductif donneur de cette chaine va stabiliser la double liaison de la forme *aci*-nitro (Figure 83, R = chaine OEG) lors de la première étape de la réaction photochimique.

c) La coplanarité

Afin d'améliorer encore l'efficacité d'absorption à deux photons (δ_a) de notre nouveau groupement protecteur photo-labile, nous avons décidé d'ajouter des triples liaisons à la place des doubles liaisons présentes sur la structure développée par Agarwal et al, ce qui permet de s'affranchir de la gêne stérique présente avec les doubles liaisons, et de préserver la coplanarité de la molécule grâce à une meilleur délocalisation des électrons.

De plus, les doubles liaisons impliquées dans le système π délocalisé étant susceptibles de se photo-isomériser, une partie de l'énergie absorbée par la molécule serait alors « gâchée » au profit de l'isomérisation plutôt qu'à la réaction de photolyse. Des résultats non publiés obtenus au laboratoire par le Dr. Sylvestre GUG concernant le rendement de libération du

glutamate dans quatre séries d'*o*-nitrophénétyles différents montrent que la présence d'une double liaison diminue drastiquement le rendement de libération (Figure 85).

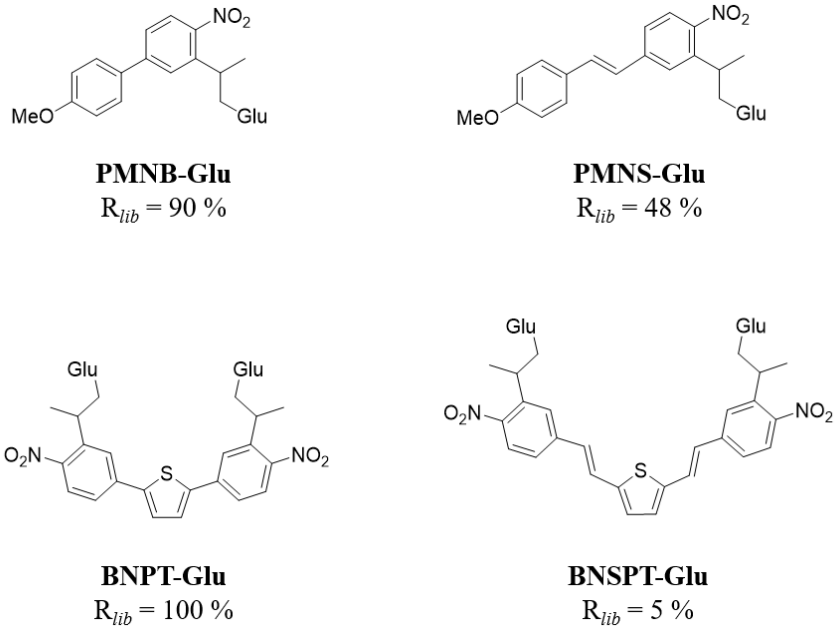


Figure 85 : Comparaison du rendement de libération (R_{lib}) du glutamate de quatre groupements protecteurs photo-labiles de la famille des *o*-nitrophénylléthyle. La présence d'une double liaison entre les deux aromatiques semble porter préjudice à la réaction photochimique dont une partie de l'énergie absorbée par la molécule est utilisée pour procéder à l'isomérisation de la double liaison.

V.3 Synthèse d'analogues de doxycyclines photo-activables BNPET-OEG4

V.3.1 Synthèse du groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 50

En démarrant la synthèse à partir du 3-bromobenzaldéhyde **41** commercial, le 5-bromo-2-nitrobenzaldéhyde **42** est obtenu par substitution électrophile aromatique. A l'aide d'un appareil de Dean-Stark, la protection de l'aldéhyde du dérivé **42** a été effectuée à partir de l'éthylène glycol et d'une catalyse acide à haute température afin d'obtenir quantitativement le 5-bromo-2-nitro-dioxolane **43** correspondant. L'usage de ce montage est obligatoire pour éviter l'hydrolyse immédiate du dioxalane formé. Le produit du couplage de Sonogashira entre le dérivé **43** et le triméthylsilylacétylène a permis d'obtenir le composé **44** en utilisant une catalyse au palladium classique (Sonogashira *et al.,* 1975). L'étape de protection de l'aldéhyde effectuée en amont s'est révélée être nécessaire puisque sans elle les rendements du couplage de Sonogashira observés étaient diminués de l'ordre de 30 %. En effet, l'acétylure de cuivre triméthylsilylé formé dans le second « cycle » (Figure 89 E) peut réagir avec en partie avec le carbonyle du 5-bromo-2-nitrobenzaldéhyde **42** lors de l'étape de transmétallation ce qui diminue la formation du complexe Pd^{II} (C) précédant l'étape d'élimination réductive. Enfin la déprotection de l'alcyne silylé en milieu basique a permis d'obtenir l'alcyne vrai **45**.

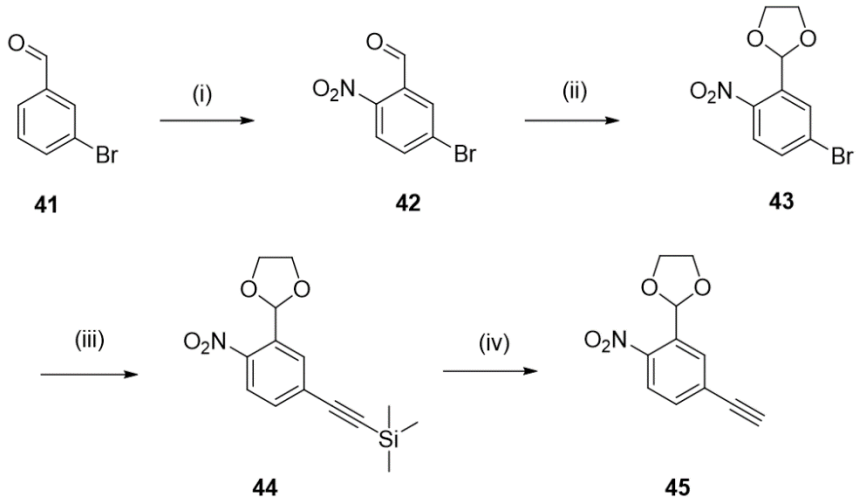


Figure 86 : Schéma réactionnel du dérivé nitro-phenylethynyl dioxalane **45**.

(i) HNO_3, H_2SO_4, 1h30, t.a, 85 %, (ii) Ethylène glycol, *p*TsOH, toluène anhydre, 1h30, 120 °C, 99 %, (iii) triméthylsilyléthyne, DIPEA, CuI, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, THF, t.a, 16 h, 94 %, (iv) K_2CO_3, CH_3OH, t.a, 30 min, 94 %.

L'étape de bis-couplage de Sonogashira mettant en jeu deux équivalents d'alcynes terminaux **45** pour un équivalent de 2,5-dihalogènethiophène **46** représentée en Figure 84 a fait l'objet d'une optimisation.

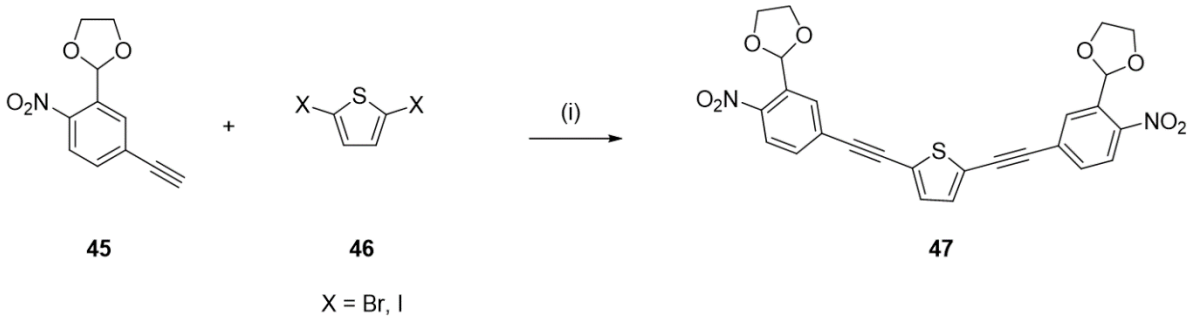


Figure 87 : Réaction de double couplage de Sonogashira entre le l'alcyne vrai **45** et le 2,5-dihalogènethiophène **46** pour l'obtention du produit de couplage **47**.

(i) A) 2,5-dibromothiophène, Et_3N, CuI (4 % mol), ($Pd(PPh_3)_4$) (6 % mol), THF, t.a, 16 h, 19 %, B) 2,5-dihalogéno-thiophène, Et_3N, CuI (4 % mol), ($Pd(PPh_3)_4$) (6 % mol), THF, 75 ° C, 4 h, 70 %.

En effet, les premiers bis-couplages ont été effectués en utilisant le 2,5-dibromothiophène disponible au laboratoire et les publications suivantes (Arias-Marin *et al.,* 2003; Hachiya *et al.,* 2013; Menchi *et al.,* 2000; Wu *et al.,* 2007) donnaient des rendements de couplage très efficaces pour des substrats similaires en utilisant différents catalyseurs comme le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) ($Pd(PPh_3)_4$), l'acétate de palladium ($Pd(OAc)_2$) ou encore le dichlorure de bis(triphénylphosphine)palladium(II) ($Pd(PPh_3)_2Cl_2$) en présence d'iodure de cuivre dans des proportions co-catalytiques (4 mol %). L'ensemble de ces conditions catalytiques a été reproduit en faisant également varier le type de bases, les solvants ou encore les méthodes de chauffage, aboutissant toujours à des rendements de réactions inférieurs à 20 % pour le meilleur des essais (Figure 87 A).

Dans l'ensemble de ces manipulations, le produit d'homocouplage **47'** (Figure 88 A) était majoritairement formé.

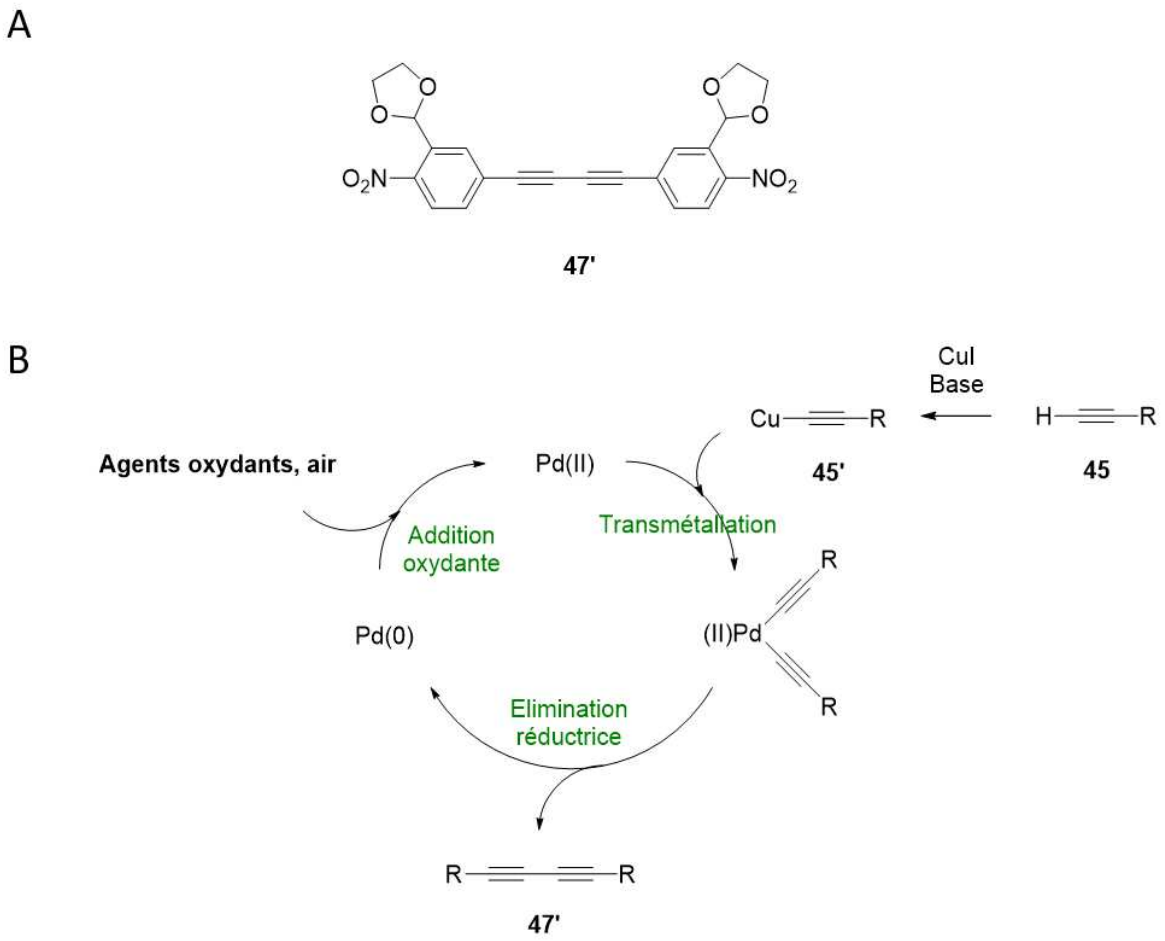


Figure 88 : A) Produit majoritaire d'homocouplage **47'** obtenu lors de l'étape de couplage de Sonogashira entre le dérivé **45** et le 2,5-dibromothiophène **46**.

B) Mécanisme général proposé pour l'homocouplage d'alcynes en présence de Pd(II), plus connu sous la terminologie de couplage de Glaser. La présence d'agents oxydants dans le milieu réactionnel en présence d'acétylure de cuivre **45'** permet d'expliquer la formation du produit d'homocouplage dont l'addition oxydante avec le 2,5-dibromothiophène ne s'est pas faite au profit de l'oxydation du Pd(0) en Pd(II).

Dans les années 1975, Sonogashira et Hagihara ont montré que l'ajout d'iodure de Cu(I) en condition co-catalytique et en présence de palladium accélérait grandement les réactions de couplage et permettait même d'effectuer des alcynylations à température ambiante alors qu'elles sont classiquement obtenues à haute température (Sonogashira *et al.,* 1975).

En plus d'inclure un nouveau réactif dangereux pour l'environnement, l'addition de sels de cuivre en tant que co-catalyseur dans les réactions de couplage croisé de Sonogashira présente un autre inconvénient.

La génération *in situ* de l'acétylure de cuivre (Figure 88 B, **45'**) créé souvent des produits d'homocouplages entre les alcynes terminaux que l'on appelles couplage de Glaser (Siemsen *et al.,* 2000; 2002) lors de l'exposition du Pd (0) aux agents oxydants. Dans notre cas, l'oxydation du Pd (0) en Pd (II) serait cinétiquement plus rapide que l'addition oxydante du

2,5-dibromothiophène **46** (Figure 89, A → B), d'autant plus que la présence du noyau thiophène par effet donneur désactiverait le C sp^2 portant le brome et affaiblirait de façon conséquente sa réactivité. Lorsque nous parlons d'agents oxydants, nous pensons premièrement à l'air ambiant. Néanmoins, avant de procéder à ces expérimentations, nous connaissions l'existence de ce couplage « indésirable » et c'est pourquoi nous procédions systématiquement au dégazage du milieu réactionnel en suivant la procédure de cycle « freeze-pump-thaw » avant l'ajout du palladium afin d'exclure toute trace d'air qui pouvait être piégé dans le solvant ou dans le montage.

Par conséquent les propriétés oxydantes du 2,5-dibromothiophène et/ou l'excédent d'iodure de cuivre (I) pourraient être des agents oxydants suffisants afin d'expliquer ce type d'homocouplage.

N'ayant pas été en mesure de reproduire les modes opératoires des équipes citées précédemment, nous avons décidé d'explorer cette étape de bis-couplage croisée de Sonogashira en utilisant cette fois-ci le 2,5-diiodothiophène.

En effet, comme le mentionne l'équipe de (Rodriguez *et al.,* 2006) concernant le mode opératoire des équipes précédentes : « Etonnamment, la réaction de couplage utilisant le 2,5-dibromothiophène conduit exclusivement au dérivé d'homocouplage, ce qui n'est le cas en utilisant le 2,5-diiodothiophène dont la réactivité semble beaucoup plus grande ».

Comme ces deux spécialistes de catalyse le stipulent dans leur revue (Chinchilla and Nájera, 2007), l'utilisation d'un substrat dont R = I ou OTf (triflate) facilite grandement l'étape d'addition oxydante du cycle catalytique.

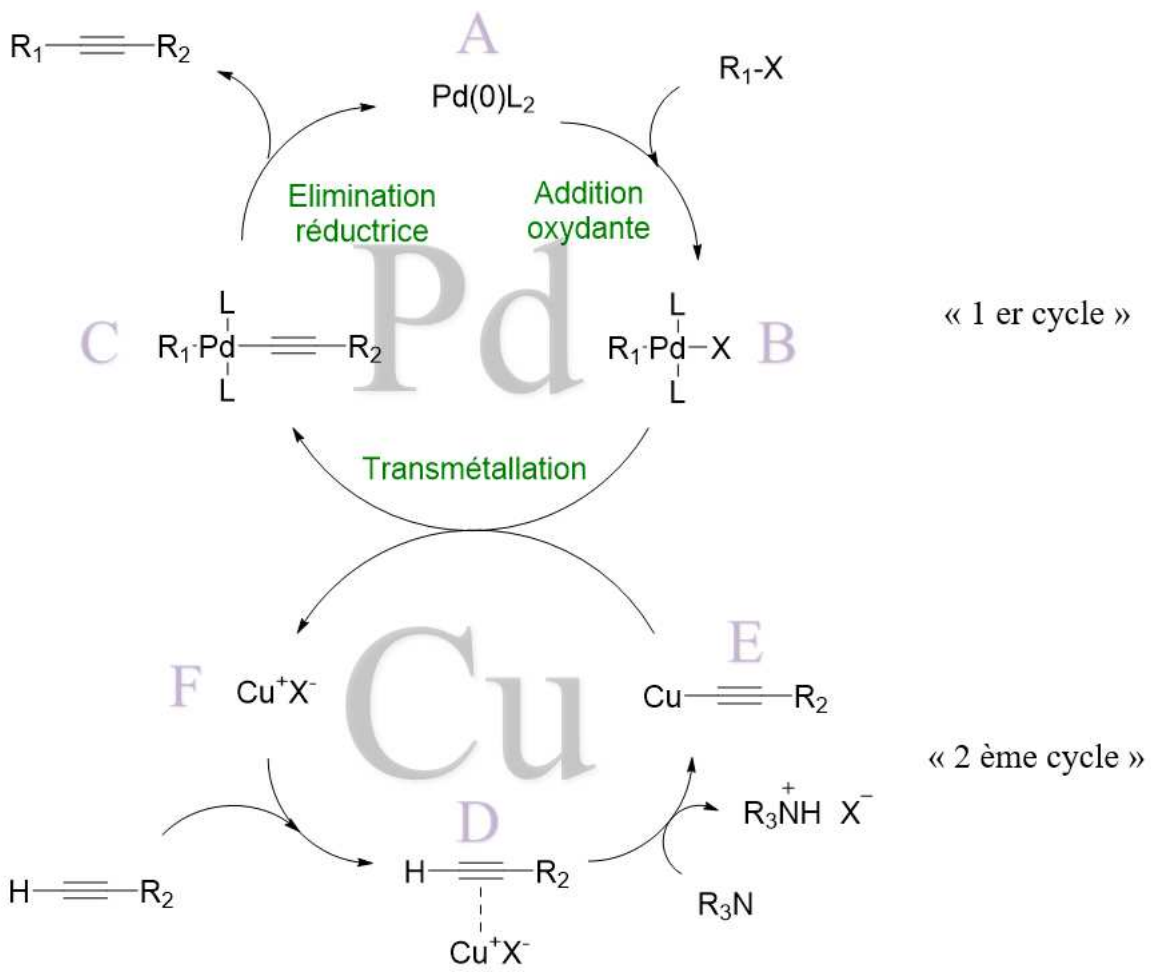


Figure 89 : La réaction de couplage de Sonogashira co-catalysée se fait à travers deux cycles catalytiques indépendants (Pd et Cu, appelés respectivement 1er et 2ème cycle).

A partir de deux équivalents d'alcynes terminaux **45** pour un équivalent de 2,5-diiodothiophène **46** (Figure 87 B) en présence de tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (6 % mol) et d'iodure de cuivre (I) (4 % mol), le produit de couplage **47** a été obtenu par chauffage au micro-ondes pendant 4 h avec des rendements satisfaisants atteignant maintenant les 70 %. Il est important de noter qu'il subsiste toujours entre 20 et 30 % d'homocouplage **47'** mais l'utilisation d'un dérivé, dont le C sp^2 présente une meilleure réactivité semble tout de même être la clé de cette réaction de couplage. Malgré tout, nous avons fait le choix de poursuivre la synthèse et de ne pas optimiser d'avantage cette réaction par manque de temps.

La déprotection du dérivé bis-dioxalane **47** en milieu acide dans un mélange d'eau, d'acétonitrile et de dichlorométhane à 80 ° C a permis d'obtenir, après filtration du brut réactionnel, le produit bis-aldéhyde correspondant **48** pur sous forme de cristaux oranges. En utilisant le même schéma réactionnel développé pour le groupement protecteur photo-labile coumarine, le composé **49** est obtenu par addition du bromure de propargyl zinc fraîchement préparé sur le bis-aldéhyde **48**. Enfin, la réaction de cyclo-addition catalysée au cuivre (CuAAC) (Chassaing *et al.,* 2016) entre les précurseurs alcyne **49** et azido **23** synthétisés précédemment a permis d'obtenir le nouveau groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 **50** souhaité.

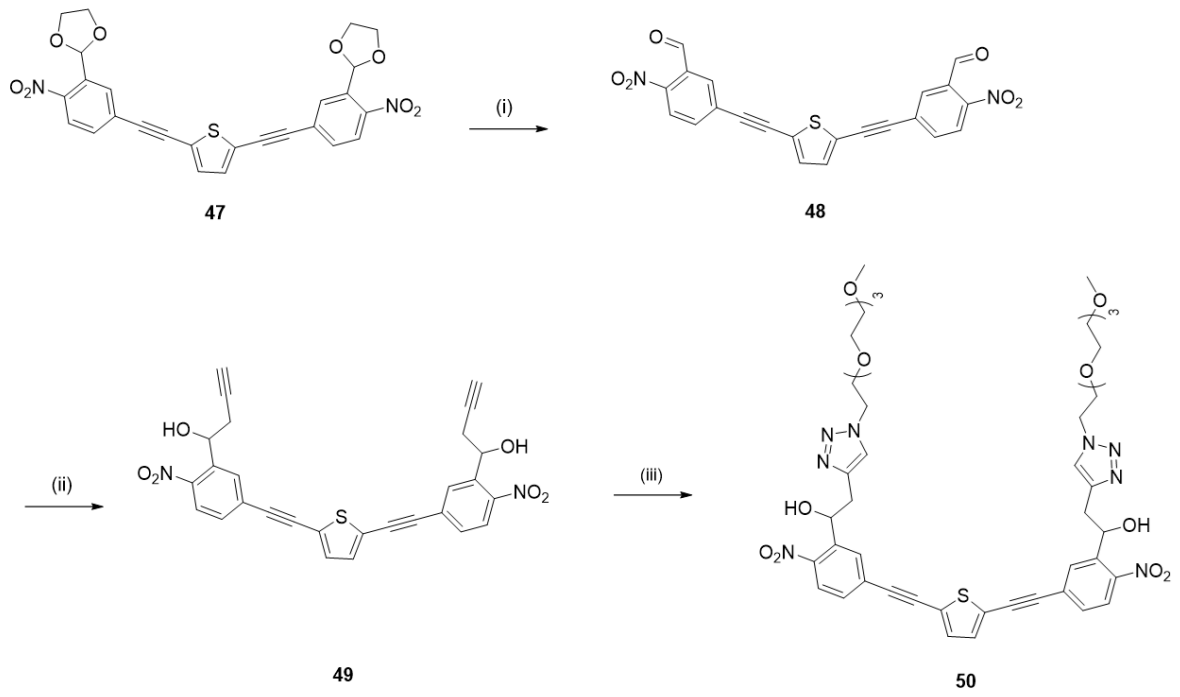


Figure 90 : Schéma réactionnel pour l'obtention du nouveau groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 **50**.

(i) *p*TsOH, $H_2O/CH_3CN/DCM$, 80 °C, 6 h, 99 %, (ii) a) bromure de propargyle, Zinc, THF, 0 °C, 1 h, b) **48**, 0 °C à t.a, THF, 1 h, 70 %, (iii) **23**, $CuSO_4$, ac. ascorbique, *L*-proline, DMF/*t*-BuOH/H_2O, 60 °C, 24 h, 80 %.

V.3.2 Méthode de couplage pour le dérivé 9-glycyl-amido-doxycycline

V.3.2.1 Utilisation des carbonates de bis-nitrophénol

Afin d'effectuer le bis-couplage final entre le nouveau groupement protecteur photo-labile **50** et l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline **5** décrit en Figure 91, nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales mises au point précédemment mettant en jeu le couplage entre la coumarine DEACM et l'analogue de doxycycline aminé par l'utilisation du carbonate de bis(4-nitrophenyle). Ainsi nous avons été capables d'obtenir le BNPET-OEG4-bis-9-glycyl-amido-doxycycline **52** avec un très bon rendement.

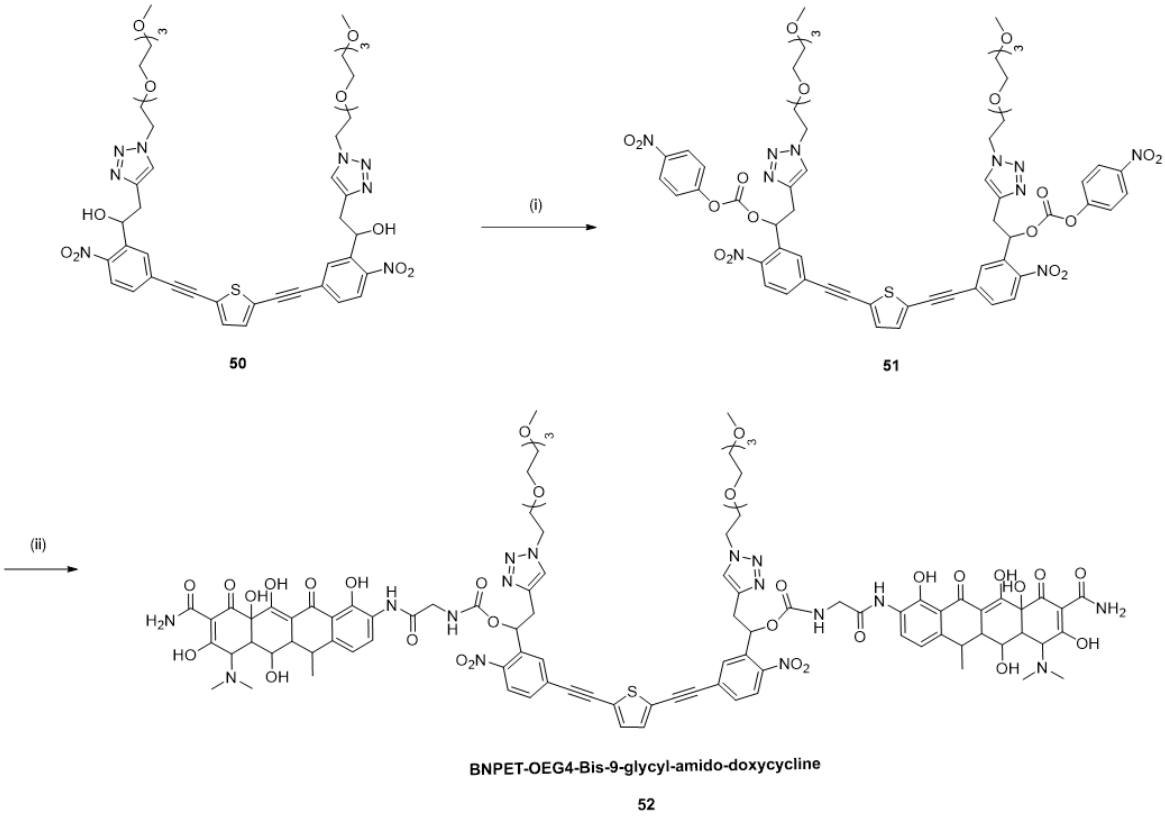


Figure 91 : Stratégie de couplage utilisant le carbonate de bis-nitrophénol pour préparer les carbonates de bis-BNPET-OEG4 activé **51** correspondant afin d'effectuer l'étape de couplage avec l'analogue 9-glycyl-amido-doxycycline.

(i) Carbonate de bis-nitrophénol, Et_3N, DMF, t.a, 1h30, 99 % (ii) 9-glycyl-amido-doxycycline **5**, Et_3N, DMF, t.a, 2 h, 80 %

V.4 Etudes photo-physiques du chromophore BNPET

Après avoir synthétisé le nouveau groupement protecteur photo-labile **52**, nous nous sommes penchés sur les caractérisations photo-physiques de ce composé. En effet, cette molécule étant nouvelle, il est nécessaire de déterminer ses propriétés photo-physique et photo-chimique afin d'évaluer sa potentielle utilisation en excitation bi-photonique. Il nous faut en particulier déterminer sa section efficace de photo-libération à deux photons (δ_u) représentée par l'équation (3) définie dans le chapitre d'introduction :

$$\delta u = \delta a \, \phi u \qquad (3)$$

L'ensemble des caractérisations qui vont suivre ont été effectuées sur le chromophore BNPET représenté ci-dessous en Figure 92A et synthétisé d'après le mode opératoire développé par (Jung *et al.,* 2000).

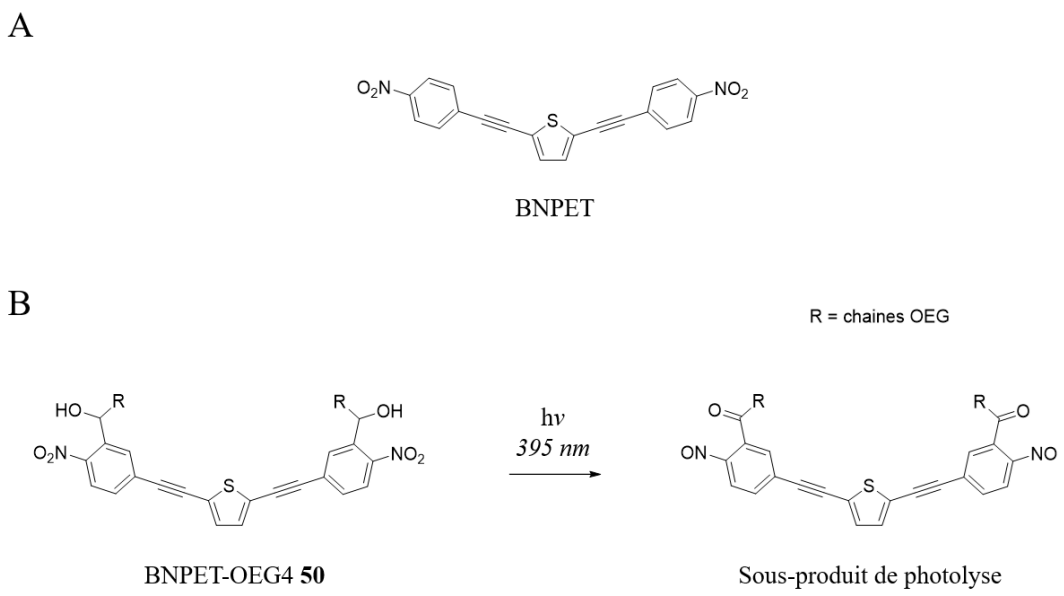


Figure 92 : A) Structure du chromophore BNPET, B) Mécanisme photochimique conduisant à la formation du sous-produit 2-bis-nitrosoacetophenone

Lorsque nous avons commencé les caractérisations directement sur le nouveau groupement protecteur photo-labile **50**, nous avons pu observer le déclenchement du mécanisme photochimique de photo-fragmentation postulé pour les dérivés *o*-nitrophényle éthyle (*o*-NPE) en Figure 93 B. Ce mécanisme a été confirmé à la fois par spectrométrie UV-visible par le biais du déplacement de la longueur d'onde λ_{max} ainsi que par la caractérisation

du sous-produit de photolyse 2-bis-nitrosoacetophenone par spectrométrie de masse. Le simple fait d'effectuer des mesures d'absorbance ou de laisser la cuve à la lumière est suffisant pour initier le processus photochimique conduisant au relargage d'un anion OH^-. Ce mécanisme photochimique rapide est problématique lors de la mesure de la section efficace d'absorption à deux photons (ADP) abordée ci-dessous puisque les propriétés de fluorescence de la molécule **50** et du sous-produit de photolyse ne sont pas identiques, et donc la détermination de cette valeur se verrait biaisée.

V.4.1 Détermination expérimentale de la section efficace d'absorption à deux photons δ_a (ADP)

La mesure expérimentale de la section efficace d'ADP (δ_a) d'une molécule, qui représente son efficacité à absorber les photons en excitation bi-photonique, est possible en utilisant différentes techniques (Twarowski and Kliger, 1977). Les deux méthodes expérimentales les plus utilisées pour la détermination des sections efficaces d'absorption à deux photons sont la méthode de Z-Scan (Sheik-Bahae *et al.,* 1990) et la méthode de fluorescence induite par excitation à deux photons (Xu and Webb, 1996).
L'objectif principal de ces travaux n'étant pas basé sur le développement des méthodes permettant de mesurer une section efficace d'ADP, je n'aborderais pas la méthode de Z-Scan qui n'a pas été utilisée lors de ces travaux.

Dans notre cas, comme le chromophore BNPET est fluorescent, nous avons décidé de déterminer sa section efficace d'ADP (δ_a) par la mesure d'intensité de fluorescence induite par excitation à deux photons.

V.4.1.1 Mesure d'une section efficace d'ADP par la méthode de fluorescence

Comme nous venons de le dire, la mesure directe de la section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) est difficile à obtenir. Par conséquent, il est plus courant d'obtenir cette valeur de façon indirecte grâce à un composé référence par la mesure de sa section efficace de fluorescence à deux photons (δ_f) selon l'équation (4). Cette équation représente par analogie une expérience de photo-fragmentation à deux photons conduisant à une photo-libération d'après l'équation (4).

$$\delta_f = \delta_a \phi_f \quad (4)$$

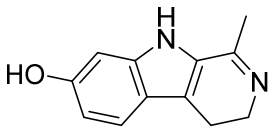
Par conséquent, être capables de déterminer expérimentalement le rendement quantique de fluorescence ϕf de notre composé BNPET va nous permettre de déterminer indirectement sa section efficace d'ADP (δ_a). Voyons maintenant ensemble comment nous pouvons mesurer le rendement quantique de fluorescence d'un composé grâce à une référence connue.

V.4.1.1.1 Détermination du rendement quantique de fluorescence ϕf de BNPET:

Méthode :

Le rendement quantique de fluorescence (ϕf) est défini comme étant le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par l'échantillon.

En pratique, on détermine un rendement quantique de fluorescence d'un composé inconnu à l'aide d'un composé de référence dont le rendement quantique est parfaitement connu. Il suffit alors de relever les spectres d'émission du composé à étudier (I^{BNPET}) et du composé pris comme référence ($I^{réf}$) dans les mêmes conditions. Les longueurs d'excitation et d'émission devant correspondre pour les deux composés, nous avons opté pour l'harmalol (Figure 92 bis) en solution dans un mélange éthanol-acide sulfurique comme substance de référence dont le rendement quantique de fluorescence (ϕf = 0.48) a été déterminé précisément par méthode directe (Pardo *et al.,* 1988).



harmalol

Figure 92 bis : Structure de l'harmalol

Lors des mesures des spectres, les concentrations du composé à étudier et du composé pris comme référence sont choisies de manière à ce que les absorbances des deux solutions soient identiques pour la longueur d'onde d'excitation choisie, ainsi l'équation (5) peut être simplifiée en supprimant le rapport des absorbances respectives. Comme le solvant de l'échantillon (CH_2Cl_2) n'est pas le même que celui de la référence (EtOH, H_2SO_4), il faut introduire un facteur correctif de leurs indices de réfraction respectifs lors du calcul du rendement quantique (Durham *et al.,* 1982) selon l'équation :

$$\Phi_f^{BNPET} = \Phi_f^{Réf}\left(\frac{A^{réf}}{A^{BNPET}}\right)\left(\frac{I^{BNPET}}{I^{réf}}\right)\left(\frac{n_D^{BNPET}}{n_D^{réf}}\right)^2 \quad (5)$$

Φ_f^{BNPET} : Rendement quantique de BNPET à déterminer

$\Phi_f^{Réf}$: Rendement quantique de la référence Harmalol

$A^{réf,BNPET}$: Absorbance de la référence et du BNPET

$I^{BNPET,réf}$: Intensité de l'émission du BNPET et de la référence

$n_D^{BNPET,réf}$: Indice de réfraction des solvants utilisés pour le BNPET et la référence

Finalement, en remplaçant dans l'équation (5) le rendement quantique de fluorescence, ainsi que les valeurs d'intensités de fluorescence déterminées expérimentalement par comparaison à l'Harmalol, nous obtenons un rendement quantique $\Phi_f^{BNPET} = 0.16$ pour notre molécule BNPET.

Maintenant que nous connaissons le rendement quantique ϕf de notre molécule, nous allons pouvoir, grâce à l'analogie existante entre les deux équations (3) et (4), déterminer expérimentalement la section efficace d'ADP (δ_a) de notre composé par comparaison à une molécule de référence dont le ϕf et le δ_a sont précisément connus.

V.4.1.1.2 Détermination de la section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) de BNPET :

Méthode :

La section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) de notre chromophore BNPET a été déterminée par la comparaison de son intensité de fluorescence par excitation à deux photons à celle de la rhodamine B dont le spectre d'absorption à deux photons et le rendement quantique de fluorescence sont précisément connus (Xu *et al.,* 1995).

En pratique, un laser Ti:sapphire à impulsion femtoseconde a été utilisé pour irradier les solutions contenant respectivement la référence rhodamine B (Rho B) et notre composé BNPET. Nous avons balayé la zone de longueur d'onde (λ) comprise entre 700 et 900 nm en relevant les valeurs des intensité de fluorescence à deux photons résultantes.
De façon similaire à la détermination expérimentale du rendement quantique de fluorescence, la section efficace d'ADP peut être calculée selon l'équation (6) :

$$\delta_a^{BNPET} = \delta_a^{RhoB}\left(\frac{A^{RhoB}}{A^{BNPET}}\right)\left(\frac{I^{BNPET}}{I^{RhoB}}\right)\left(\frac{\Phi_f^{RhoB}}{\Phi_f^{BNPET}}\right)\left(\frac{n_D^{RhoB}}{n_D^{BNPET}}\right) \quad (6)$$

δ_a^{BNPET} : Section efficace d'ADP de BNPET à déterminer

δ_a^{RhoB} : Section efficace d'ADP de la Rhodamine B connue

$A^{RhoB,BNPET}$: Absorbances respectives des solutions de Rho B et de BNPET

$I^{BNPET,RhoB}$: Intensité de l'émission de fluorescence mesurée de BNPET et de la Rho B

Φ_f^{BNPET} : Rendement quantique de fluorescence de BNPET déterminé précédemment

Φ_f^{RhoB} : Rendement quantique de Rho B connu

$n_D^{BNPET,RhoB}$: Indice de réfraction des solvants utilisés pour les solutions de BNPET et Rho B

D'après les valeurs d'intensités de fluorescence (I) à deux photons mesurées pour notre composé BNPET et pour la Rhodamine B à chaque longueur d'onde, nous avons obtenu, d'après l'équation (6), le spectre d'ADP pour le composé BNPET représenté ci-dessous en Figure 93. La dépendance quadratique de l'intensité de fluorescence par rapport à la puissance du laser indique bien un processus d'absorption bi-photonique.

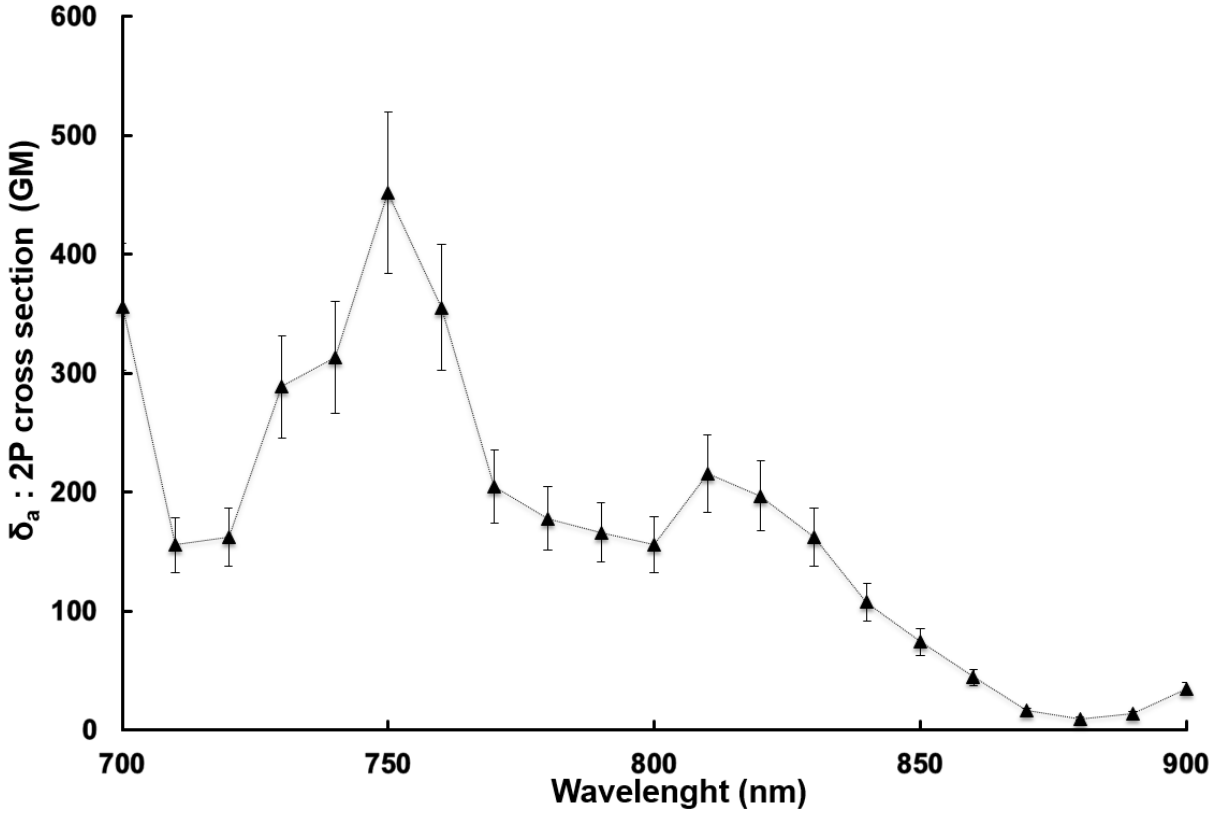


Figure 93 : Spectre d'efficacité d'absorption à deux photons du composé BNPET.

On constate d'après ce spectre que notre composé BNPET possède des valeurs de δ_a supérieures à 150 GM pour des longueurs d'ondes entre 700 et 830 nm. Cette gamme de longueurs d'ondes est très intéressante pour des applications *in vivo* puisque nous nous approchons de la région *proche*-infrarouge, zone dans laquelle les chromophores biologiques ont tendance à moins absorber ce type de rayonnement.

L'obtention de cette première caractéristique photo-physique de δ_a n'est toutefois pas suffisante pour conclure sur les propriétés générales de cette molécule quant à son efficacité pour la photo-libération à deux photons. D'après l'équation (3), nous voyons que la section efficace de photo-libération à deux photons (δ_u) est directement proportionnelle à la valeur du δ_a et du ϕ_u. En considérant les valeurs de δ_a mesurées, nous pensons que les chances d'aboutir à un groupement protecteur photo-labile performant en excitation bi-photonique sont importantes.

En effet, un étudiant de Master 2 a très récemment utilisé le groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 **50** pour la photo-libération d'un chromophore de référence (Figure 94).

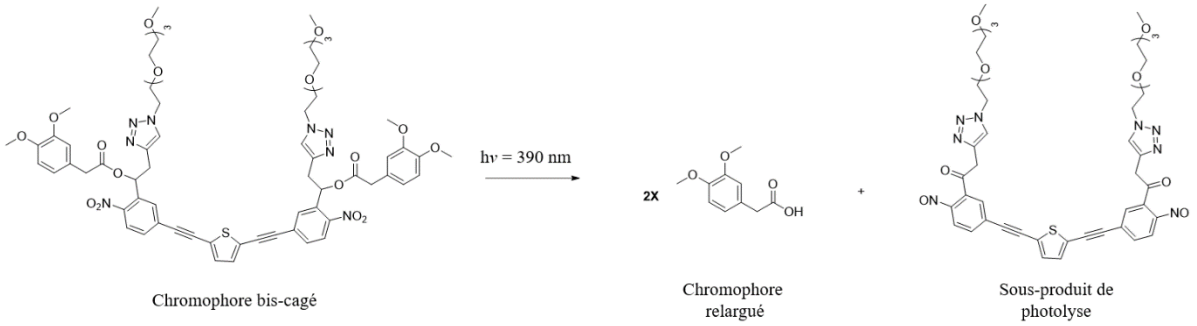


Figure 94 : Réaction de photolyse effectuée à 390 nm dans un tampon PBS pour la photo-libération de l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique.

Lors des expériences de photolyse, il a pu mettre en évidence un rendement de libération à un photon R_{lib} avoisinant les 195 % dans un tampon aqueux avec des temps d'irradiation inférieur à 8 min. En considérant que le rendement quantique ϕ_u est directement lié au rendement de libération R_{lib} selon l'équation (8), nous avons de fortes raisons de penser que l'efficacité finale de notre nouveau groupement protecteur photo-labile en excitation bi-photonique soit bonne.

$$\phi_u = R_{lib}\phi_{dis} \quad (8)$$

Pour conclure, les bonnes sections efficaces d'absorption à deux photons (δ_a) du nouveau groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 **50** combinées au rendement de libération (R_{lib}) quasiment quantitatif mesuré lors du relargage d'un chromophore de référence font du dérivé BNPET-OEG4 un excellent candidat potentiel pour la photo-libération à deux photons pour des expériences *in vivo* dont la mesure déterminante de la section efficace de photo-libération à deux photons (δ_u) est actuellement en cours d'investigation. La mesure du rendement quantique de libération à un photon est également en cours de détermination.

CHAPITRE VI

Conclusion et perspectives

VI.1 Conclusions

Mon projet de recherche à l'interface de la chimie et de la biologie a eu pour objectif d'apporter des outils photochimiques nouveaux, principalement pour les neurosciences afin de pouvoir étudier la structuration des réseaux neuronaux. Pour comprendre la formation et l'activité de ces réseaux, nous avons développé une méthode qui, à terme, devrait permettre de contrôler *in vivo* sous l'action de la lumière l'expression des gènes impliqués dans ce phénomène à l'échelle d'une cellule neuronale individuelle.

Pour mettre au point cette méthode, nous avons eu recours aux groupements protecteurs photo-labiles qui, une fois couplés avec la biomolécule d'intérêt (tétracyclines), apportent l'orthogonalité et le contrôle spatio-temporel nécessaires à l'étude d'un système biologique d'intérêt. Néanmoins, l'utilisation d'une excitation classique (mono-photonique dans l'UV ou le proche visible) ne permet pas d'envisager une application *in vivo* de cette méthode. C'est pourquoi nous avons eu recours à des groupements protecteurs photo-labiles sensibles à une excitation bi-photonique qui permettent l'utilisation de longueurs d'ondes appropriées pour l'étude du vivant.

Afin d'étudier un gène et plus particulièrement sa fonction, nous avons eu recours au système d'expression de gène inductible par la tétracycline (Tet system) qui est aujourd'hui le système le plus communément utilisé pour l'induction de transgène dans les cultures cellulaires, tissus et organismes vivants avec une résolution spatio-temporelle élevée.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à mettre au point une stratégie qui permet de coupler efficacement la tétracycline avec un groupement protecteur photo-labile performant en excitation bi-photonique qu'est l'EANBP. Nous avons dans un premier temps choisi de mettre au point un analogue de tétracycline protégé sur différentes positions par synthèse totale afin d'accéder à des conditions de couplage efficaces en procédant à des déprotections sélectives.

Suite aux problèmes de synthèses rencontrés, nous avons changé de stratégie et mis au point la synthèse de deux nouveaux analogues de doxycycline modifiés en position 9 obtenus par hémi-synthèse depuis la doxycycline commerciale.

Les résultats *in vitro* obtenus sur des cellules neuronales d'hippocampe de rats exprimant le système d'expression de gène à la tétracycline se sont révélés prometteurs puisque l'activité biologique de l'analogue 9-amino-doxycycline a été conservée après modification chimique.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons mis au point des conditions de couplage efficaces entre les deux nouveaux analogues de doxycycline chimiquement modifiés et le groupement protecteur photo-labile EANBP performant en excitation bi-photonique. Nous avons été en mesure d'obtenir des rendements de couplages honorables en utilisant la fonction chloroformiate comme précurseur de liaison carbamate qui nous ont permis d'avoir accès aux premiers analogues de doxycycline cagés recherchés.

Malheureusement, les expériences de photochimies effectuées en milieu aqueux n'ont pas permis de photo-libérer efficacement les analogues de doxycycline. En effet, nous avons mis en évidence chez les dérivés *o*-nitrophénétyles la présence d'un mécanisme secondaire qui ne conduit pas à la photo-libération du composé attendu, ce qui est expliqué par de probables interactions de type π-π stacking entre les différents blocs aromatiques.

Dans la troisième partie de ces travaux, nous avons mis au point un nouveau groupement protecteur photo-labile soluble de type coumarinique (PEG7-DEACM), pour lequel un seul mécanisme photo-chimique est possible et conduit à la photo-libération du composé attendu. Nous avons également mis au point une nouvelle stratégie de couplage mettant en jeu un carbonate de nitrophenol, ce qui nous a permis d'augmenter considérablement les rendements des réactions de couplage.

Par la suite, les tests photo-chimiques ont été entrepris et nous avons été en mesure de photo-libérer à un photon les deux analogues de doxycycline **3** et **5** avec des rendements quantiques de libération respectifs d'environ 0.25 et 0.21 à 405 nm. Ce nouveau groupement protecteur photo-labile présente également une section efficace de photo-libération ($\delta_a\phi_u$) estimée à deux photons d'environ 3.8 GM à 740 nm, ce qui est à notre connaissance la valeur à deux photons la plus élevée pour les dérivés coumariniques DEACM.

Les premières expérimentations *in vitro* pour la photo-libération des deux analogues de doxycycline sur des cultures cellulaires neuronales d'hippocampe de rats exprimant le système d'expression de gène à la tétracycline sont actuellement en cours d'investigation.

Enfin, nous avons dans une dernière partie mis au point la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile soluble et performant en excitation bi-photonique (BNPET-OEG4) de la famille des *o*-nitrobenzyle à l'aide d'un chromophore de type 2,5-bis-(nitrophényléthynyl)thiophène. Les premières caractérisations photo-physiques de ce chromophore ont été réalisées et les valeurs de section efficace d'absorption à deux photons δ_a

= 450 et 210 GM à 750 et 810 nm respectivement obtenues dans le dichlorométhane sont très prometteuses. Nous avons également été en mesure de photo-libérer quantitativement (R*lib* = 200 %) un chromophore de référence lors de tests photo-chimiques préliminaires laissant présager une section efficace finale de photo-libération à deux photons à 750 et 810 nm remarquable pour l'étude de processus biologiques sur un organisme vivant.

En parallèle, le bis-couplage entre le groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 et l'analogue de doxycycline **3** a été effectué avec d'excellents rendements en ayant recours au carbonate de 4-nitrophényle correspondant.

Pour conclure, ces travaux de recherche nous ont permis de mettre au point une synthèse efficace d'analogues de tétracyclines photo-activables en utilisant une stratégie ingénieuse permettant d'assurer un couplage sélectif entre le groupement protecteur photo-labile et la biomolécule d'intérêt.

Ces travaux ont également permis de mettre au point la synthèse d'un nouveau groupement protecteur photo-labile dont les propriétés bi-photoniques semblent être tout à fait adéquates pour les futures expérimentations *in vivo*, et devraient *in fine* nous permettre de photo-réguler l'expression d'un gène impliqué dans la formation et l'activité des réseaux neuronaux.

VI.2 Perspectives

Les deux analogues de doxycycline « cagés » **34** et **35** sont actuellement testés *in vitro* par l'équipe du Dr Sidney Cambridge à Heidelberg sur des cultures cellulaires neuronales issues d'hippocampes de rats. Si les tests de photo-libération sont concluants, cette même équipe procèdera aux premiers tests *in vivo* chez le rat en effectuant directement les irradiations sur le cortex cérébral. Ainsi, nous nous dirigerons vers l'étape finale du projet qui a pour but de photo-réguler *in vivo* l'expression de la protéine Kir2.1 impliquée dans le « silencing » du signal électrique des neurones.

En parallèle, lorsque nous aurons terminé les caractérisations photo-physiques du nouvel analogue de doxycycline photo-activable **52** (notamment le ϕ_u), il s'agira de tester également ce nouvel analogue de façon similaire à ce qui a été abordé précédemment. En effet, il sera testé *in vitro* pour confirmer que la photo-libération est efficace sur des cultures cellulaires neuronales puis il sera testé *in vivo* sur l'animal.

Nous plaçons un réel espoir dans cet analogue au vu des premières caractérisations photo-physiques effectuées, notamment pour sa rapidité de photo-libération mais également pour la libération simultanée de deux biomolécules, ce qui devrait permettre des sauts de concentrations importants à l'endroit de la photolyse.

C'est pourquoi nous souhaitons également élargir l'utilisation de ce nouveau groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4 **50** pour d'autres thématiques et plus particulièrement pour la photo-libération de glutamate. En effet, la photo-libération rapide et le saut de concentration élevé sont deux critères importants et nécessaires pour l'étude des réseaux neuronaux et plus particulièrement à l'échelle synaptique tant les cinétiques d'activation des récepteurs glutamates sont rapides. Une collaboration avec le laboratoire de Physiologie des réseaux neuronaux de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives – UPR 3212 a été démarrée dans le but de cartographier le réseau cérébelleux à l'aide de notre nouveau groupement protecteur photo-labile BNPET-OEG4.

Enfin, nous souhaiterions tirer profit du mécanisme intramoléculaire « indésirable » à l'origine de la formation de l'analogue 9-amino-doxycycline lactame **3'** en milieu physiologique que nous avons abordé dans le chapitre IV (Figure 69) et en tirer parti dans le développement de nouveaux antibiotiques. En effet, les phénomènes de résistance aux

antibiotiques sont de plus en plus courants et difficiles à combattre, ce qui implique la nécessité de développer de nouvelles stratégies pour les contourner.

Les bactéries à Gram négatif ont la particularité d'avoir une structure bi-membranée dont l'interstice est composé par un milieu acide alors que leur cytoplasme est composé d'un milieu neutre. Nous pourrions utiliser ces différences d'acidité à notre avantage dont la libération de l'antibiotique se ferait par réaction intramoléculaire après avoir diffusé dans le cytoplasme. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe d'Isabelle Schalk et de Gaëtan Mislin, nous allons d'abord vérifier si cet analogue lactame possède une activité antibiotique exploitable vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et si tel est le cas, nous souhaiterions modifier chimiquement la position 9 de la 9-amino-doxycycline à l'aide de groupements permettant d'effectuer la réaction intramoléculaire à pH physiologique. Ainsi nous aurions alors une méthode donnant accès à une stratégie de pro-drogue efficace pour la libération d'un antibiotique au sein de la bactérie à pH physiologique représentée en Figure 95.

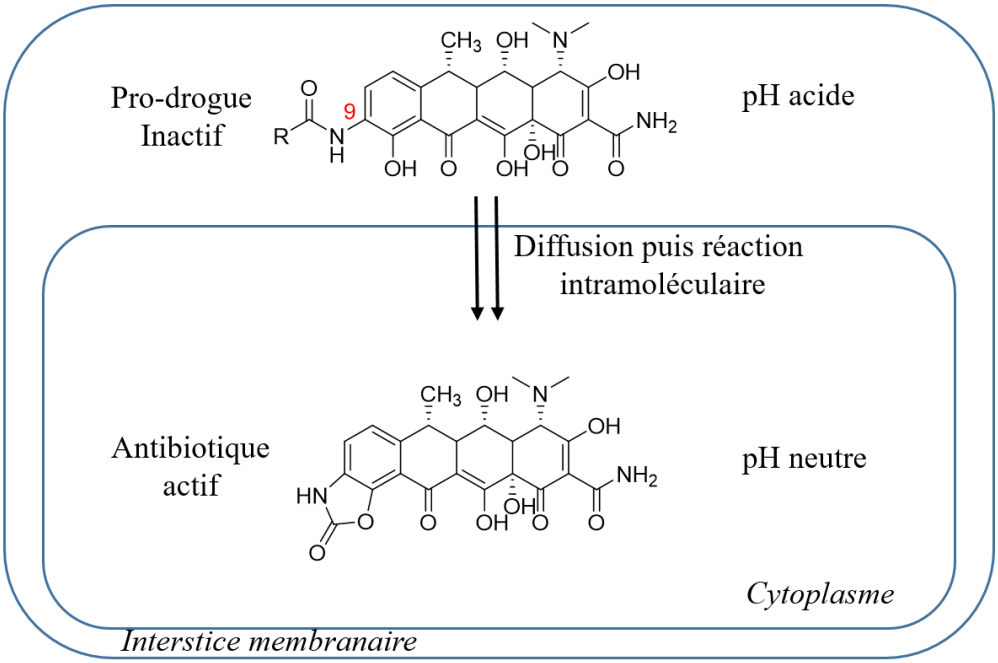


Figure 95 : Stratégie faisant appel à l'utilisation d'une pro-drogue pour la libération d'un antibiotique à l'aide d'une réaction intramoléculaire à pH physiologique.

CHAPITRE VII

Partie expérimentale et références bibliographiques

VII.1 Partie expérimentale :

VII.1.1 Appareils et services

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du proton (^{1}H) et du carbone-13 (^{13}C) de tous les produits ont été enregistrés sur des spectromètres RMN 400 et 500 MHz Brucker Avance II au sein de la faculté de Pharmacie. Les déplacements chimiques (δ) ont été indiqués en ppm par rapport à la référence interne des spectres correspondant au pic du solvant deutéré ($CDCl_3$: 7.26 ppm ; CD_3OD : 3.31 ppm ; CD_3CN : 1.94 ppm ; $(CD_3)_2CO$: 2.05 ppm en ^{1}H-RMN et $CDCl_3$: 77.1 ppm ; CD_3OD : 49.0 ppm ; CD_3CN : 1.3 et 118.2 ppm ; $CD_3)_2CO$: 29.8 et 206.2 ppm en ^{13}C-RMN). Les attributions sont données de la façon suivante : déplacement chimique puis entre parenthèse :

1. Multiplicité du signal (s, d, t, q, m, dd, et dq correspondent respectivement à singulet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, doublet dédoublé et doublet quadruplé),
2. Nombre de protons,
3. Constante de couplage exprimée en Hz.

Spectrométrie de masse

Les analyses HPLC-MS ont été réalisées 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.

Les spectres de masse ESI ont été réalisés 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-dihydroxybenzoïque (DHB), super-DHB (mélange d'acide 2-hydroxy-5-methoxybenzoïque et d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque) et dithranol.

Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-visibles ont été mesurés sur un spectrophotomètre double faisceau UVIKON XS.
Les spectres d'émission de fluorescence ont été obtenus sur un spectrofluoromètre fluoroMax.

Micro-ondes

Les réactions pallodo-catalysées ont été réalisées en utilisant un micro-ondes Anton Paar Monowave 300.

VII.1.2 Supports chromatographiques

Chromatographies :

Les analyses par 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 automatisées 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.

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 colonnes analytiques Phenomenex C18 PolarRP 4 micron (4.6 x 250 mm), Thermo Betabasic 5 micron (4.6 x 250 mm), Agilent Zorbax SB-C18 5 microns (4.6 x 250 mm) ou Kromasil 100-5C18 (4.6 x 250 mm). Les analyses sont effectuées à l'aide d'un gradient partant de 100% d'H_2O mQ

acidifiée avec 0.01% de TFA et montant à 100% d'acétonitrile en 30 min à un débit de 1 mL/min.

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 x 250 mm), Thermo Betabasic 5 micron (10 x 250 mm), ou Kromasil 100-5C18 (10 x 250 mm). Les purifications ont été effectuées à l'aide d'élution isocratique avec un débit de 4 mL/min.

VII.1.3 Solvants et réactifs

Solvants et réactifs

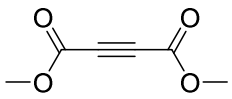
Les réactifs ainsi que les solvants anhydres utilisés pour les synthèses ont été commandés chez Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, TCI EUROPE ou Acros Organics. Tous les produits et réactifs commerciaux ont été ensuite utilisés sans traitement préalable.

VII.1.4 Synthèses chimiques

VII.1.4.1 Synthèse de l'énone AB

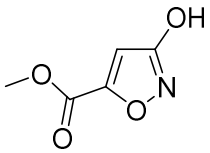
Dimethyl acetylenedicarboxylate

(1)



Methyl 3-hydroxyisoxazole-5-carboxylate

(2)



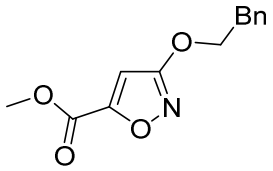
Hydroxyurea (5.6 g, 73.6 mmol) was dissolved in methanol (100 mL), then DBU was added dropwise at room temperature (12.1 mL, 81 mmol). After 1 h, dimethyl acetylenedicarboxylate (9 mL, 73.6 mmol) was added dropwise via syringe at 0-10 °C and then, the solution was stirred

for 2 h. The reaction mixture was evaporated under vacuum then the red oil was dissolved in water and acidified to pH 1 by addition of HCl. The aqueous solution was extracted with ether (3 x 30 mL), and sodium chloride (2x30 mL). The remaining organic layer was dried with anhydrous $MgSO_4$, and the solvent was removed by rotary evaporation to give a yellow solid witch was purified by recrystallization from chloroform to give 3.4 g of the title compound in 37 % yield.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.58 (s, 1H), 3.95 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.6, 159.9, 156.6, 101.1, 52.9 ppm.

Methyl 3-phenethoxyisoxazole-5-carboxylate

(3)

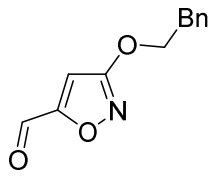


In a 250 mL round balloon flask, methyl 3-hydroxyisoxazole-5-carboxylate (3 g, 21 mmol), and K_2CO_3 (5.8 g, 42 mmol) were dissolved in acetone (50 mL). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 1 h, then a solution of benzyl bromide (3.8 mL, 31.5 mmol) was added dropwise over 10 min and the reaction was stirred for another 3 h. The reaction mixture was filtered and concentrated in vacuo and a light yellow oil was obtained. The crude was purified by flash chromatography on silica gel using a gradient elution of Heptane/Ethyl acetate: 7/3 to give 2.6 g of the titled compound in 53 % yield as a yellow solid.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.4 (m, 5H), 6.55 (s, 1H), 3.92 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 164.4, 156.8, 156.6, 133.9, 128.8, 128.3, 128.1, 106.2, 53.1, 49.5 ppm.

3-(benzyloxy)-1,2-oxazole-5-carbaldehyde

(4)

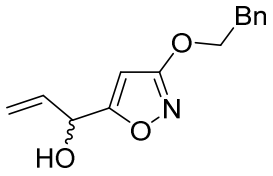


Methyl 3-(benzyloxy)isoxazole-5-carboxylate (9.3 g, 40 mmol) was dissolved in dichloromethane (60 mL) then a solution of DIBAL-H in hexane (1M, 16.1 mmol) (16.1 mL) was added dropwise via a syringe at - 78 °C and the reaction mixture was stirred for 1 h at - 78 °C. After completion of the reaction, the mixture was diluted with ammonium sulfate and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The reaction products were purified using silica gel column chromatography (heptane/Ethyl acetate: 95/5 to give the target compound in 80 % yield (6.5g) as an orange oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.78 (s, 1H), 7.39 (m, 5H), 6.57 (s, 1H), 5.31 (s, 2H) ppm.

(R,S)-1-(3-phenethoxyisoxazol-5-yl)prop-2-en-1-ol

(5)



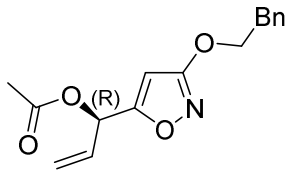
3-(benzyloxy)-1,2-oxazole-5-carbaldehyde **(4)** (2.28 g, 11.22 mmol) was dissolved in anhydrous THF (23 mL) then a solution of vinylmagnesium bromide in THF was added via a syringue (1M, 33.7 mL, 33.7 mmol) at -78 °C. The reaction mixture was stirred for 40 min at -78 °C then the cooling bath was removed and a solution of saturated aqueous ammonium chloride (30 mL) was added. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (30 mL) and washed with saturated aqueous sodium chloride (20 mL). The extract was dried over sodium

sulfate. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure to give the title compound in 99 % yield (2.6 g). The product was used in the next step without further purifications.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.4 (m, 5H), 6.01 (m, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.45 (dt, 1H, J = 17 Hz, 1.2 Hz), 5.32 (dt, 1H, J = 10.4 Hz, 1.2 Hz), 5.23 (s, 1H), 5.21 (d, 2H, J = 6.5 Hz) ppm.

(R)-1-(3-phenethoxyisoxazol-5-yl)allyl acetate

(6)

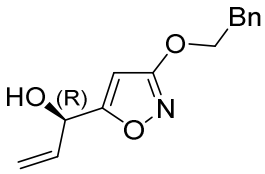


A solution of allylic alcool **(5)** (2.6 g, 11.24 mmol) in anhydrous hexane (35 mL) was charged with vinyl acetate (9 mL, 96 mmol), 3 A molecular sieves (169 mg) and Amano Lipase AK (0.325 g). After stirring at room temperature over 76 H, the reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (90/10, Heptane/AcOEt grading to 80/20) to give separately the R-allylic acetate (1.3 g, 42 %) as a yellow oil from the S-allylic alcool (1 g, 38 %) as a yellow oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.36 (m, 5H), 6.26 (dq, 1H, J = 6.6 Hz, 1 Hz), 6.01 (m, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.45 (dt, 1H, J = 17 Hz, 1.2 Hz), 5.32 (dt, 1H, J = 10.4 Hz, 1.2 Hz), 5.24 (s, 1H), 5.21 (d, 2H, J = 6.5 Hz), 2.11 (s, 3H) ppm.

(R)-1-(3-phenethoxyisoxazol-5-yl)prop-2-en-1-ol

(7)



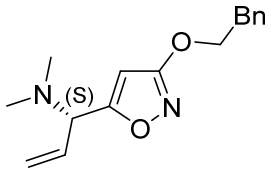
In a solution of (R)-allylic benzoate **(6)** (320 mg, 0.95 mmol) in methanol (3 mL) was added potassium carbonate (198 mg, 1.43 mmol). After stirring at room temperture for 15 min, the

reaction mixture was partioned between water (50 mL) and diethyl ether (50mL). The organic layer was washed with saturated sodium chloride and dried on anhydrous magnesium sulfate. The crude was purified by flash chromatography using (heptane/ AcOEt: 7/3) as eluant to give the title compound in 62 % yield (4.3 g).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.4 (m, 5H), 6.03 (m, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.44 (dt, 1H, J = 17 Hz, 1.2 Hz), 5.32 (dt, 1H, J = 10.4 Hz, 1.2 Hz), 5.23 (s, 1H), 5.2 (d, 2H, J = 6.5 Hz) ppm.

(S)-N,N-dimethyl-1-(3-phenethoxyisoxazol-5-yl)prop-2-en-1-amine

(8)



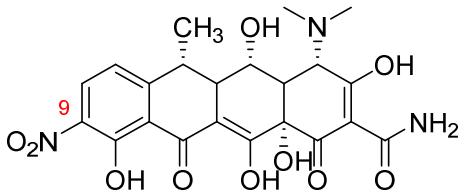
(R)-allylic alcohol **(7)** (50 mg, 0.22 mmol) and DIPEA (46.5 µL, 0.28 mmol) were dissolved in dichloromethane (2 mL). The solution was cooled to –12 °C and methanesulfonyl chloride (21.8 µL, 0.28 mmol) was added dropwise. After stirring 40 min at -12 °C, the reaction mixture was cooled to -30 °C and then a solution of dimethylamine (2M, 0.65 mL, 1.3 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to warm up untill 15 °C over 4.5h. The reaction mixture was then extracted with dichloromethane, dried over magnesium sulfate and evaporated under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel using gradient elution of Heptane/AcOEt: 60/40 % to give the title compound in 36 % yield (20 mg) as a colorless oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.36 (m, 5H), 5.94 (m, 1H), 5.81 (s, 1H), 5.3 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 2.27 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.6, 171.6, 135.9, 134.2, 128.6, 128.5, 128.2, 119.5, 93.9, 71.5, 66.2, 42.3 ppm.

VII.1.4.2 Synthèse des analogues de doxycyclines

9-nitro-doxycycline

(2)

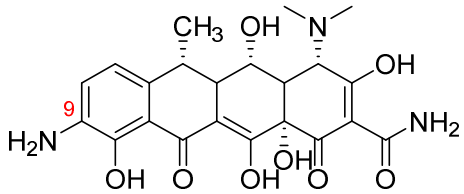


Doxycycline hyclate (**1**) (1 g, 2.25 mmol) was slowly added to concentrated H_2SO_4 (30 mL). After gas evolution had stopped, concentrated (99 %) HNO_3 (112 μL, 2.7 mmol) was slowly added to the reaction mixture at 0 °C and the reaction was stirred under argon until completion of the reaction according HPLC. After 1 hour, the reaction mixture was dripped into ice-cooled, stirred ether to give a yellow-brown precipitate, which was collected by filtration and washed again with cold ether (10 mL, x3) to give 9-nitro-doxycycline without further purification.

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.55 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 2.36 (ddd, 1H, J = 10.6, 5.4, 2.5 Hz), 2.43 (dd, 1H, J = 13.2, 8.1 Hz), 2.78 (dq, 1H, J = 13.5, 6.5 Hz), 2.92 (dd, 1H, J = 18.7, 2.2 Hz), 3.04 (dd, 1H, J = 18.6, 5.2 Hz), 3.65 (dd, 1H, J = 10.8, 8.3 Hz), 7.08 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.10 ppm (d, 1H, J = 8.6 Hz). ^{13}C NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 16.17, 31.04, 40.42, 44.82, 47.15, 69.77, 76.02, 99.58, 107.94, 116.58, 119.01, 132.44, 138.03, 155.62, 156.81, 175.01, 177.46, 194.19, 196.34 ppm.

9-amino-doxycycline

(3)

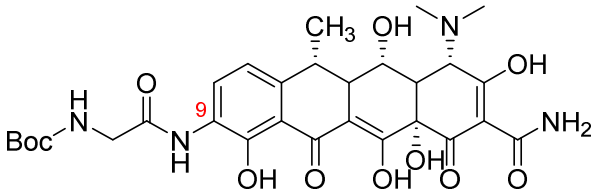


9-nitro-doxycycline (**2**) (550 mg, 1.12 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (20 mL) and carefully degassed with argon. Then, 10 % Pd/C (100 mg) was added and the flask was sealed under vacuum and exposed to a H_2 balloon with stirring for 2 h. After filtration of the catalyst through Celite, the filtrate was concentrated to 5 mL and dripped into ice-cooled stirred ether to give a yellow precipitate which was collected by filtration and washed with cold ether (10 mL, x3) to give 9-amino-doxycycline without further purification.

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.54 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 2.35 (ddd, 1H, J = 10.6, 5.3, 1.9 Hz), 2.42 (dd, 1H, J = 12.5, 8.3 Hz), 2.75 (dq, 1H, J = 12.8, 6.3 Hz), 2.92 (dd, 1H, J = 18.3, 1.7 Hz), 3.05 (dd, 1H, J = 18.3, 5.3 Hz), 3.66 (dd, 1H, J = 10.6, 8.3 Hz), 7.04 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 7.48 ppm (d, 1H, J = 8.3 Hz). ^{13}C NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 16.21, 30.99, 39.89, 44.92, 47.99, 69.87, 75.97, 99.57, 101.39, 108.03, 117.01, 117.67 128.39, 146.93, 154.55, 159.10, 175.08, 175.53, 194.94, 196.45 ppm.

9-(N-Boc-glycylamino) doxycycline

(4)



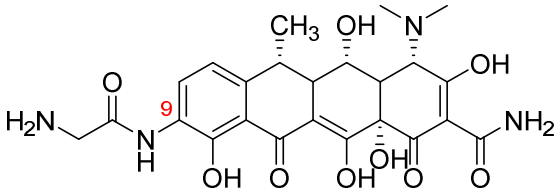
DIC (69.36 µL, 0.44 mmol) was added to N-Boc-glycine (173.7 mg, 0.99 mmol) in dichloromethane (3 mL) at room temperature and under argon. The reaction mixture was stirred for 30 min. The precipitate was filtered off, and the filtrate was concentrated in vacuo. The

filtrate was dissolved in dichloromethane/dimethylformamide (2 mL, 1:1 in vol.) then 9-amino-doxycycline (**3**) in dichloromethane/dimethylformamide (2 mL, 1:1 in vol.) was added to the filtrate. The reaction mixture was stirred for 2 hours and the solvent was removed under vacuum. 9-(N-Boc-glycylamino) doxycycline (**9**) was obtained with the same procedure of precipitation in cold ether.

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.49 (s, 9H), 1.54 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 2.56 (dd, 1H, J = 12.0, 8.3 Hz), 2.75 (dq, 1H, J = 13.2, 6.6 Hz), 2.82 (d, 1H, J = 11.3), 2.96 (s, 6H), 3.56(dd, 1H, J = 11.3, 8.3 Hz), 3.90 (s, 2H), 4.41 (s, 1H), 6.95 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.34 ppm (d, 1H, J = 8.3 Hz); ^{13}C NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 16.12, 28.71, 39.76, 42.96, 43.03, 45.53, 48.01, 67.08, 69.99, 74.66), 81.04, 101.43, 108.52, 116.28, 117.20, 126.52, 128.33, 144.00, 155.43, 158.61, 170.86, 173.03, 174.08, 195.58 ppm.

9-glycylamino-doxycycline

(5)



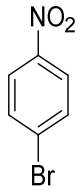
9-(N-Boc-glycylamino) doxycycline (**4**) (100 mg, 0.16 mmol) was taken up in TFA (4 mL), stirred 45 min and then dripped into cold ether (150 mL), and the precipitate was collected by filtration to give pure 9-glycylamino-doxycycline as a yellow powder.

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.57 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 2.59 (dd, 1H, J = 11.4, 8.1 Hz), 2.76 (dq, 1H, J = 13.2, 6.6 Hz), 2.81 (d, 1H, J = 11.3), 2.94 (s, 6H), 3.58 (dd, 1H, J = 11.4, 8.1 Hz), 3.96 (s, 2H), 4.37 (s, 1H), 6.98 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 8.3 ppm (d, 1H, J = 8.8 Hz).

VII.1.4.3 Synthèses des groupements protecteurs photo-labiles et couplages

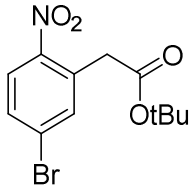
1-bromo-4-nitrobenzène

(6)



***tert*-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)acetate**

(7)

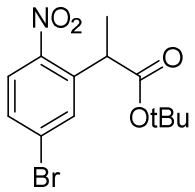


To a stirred solution of *t*-BuOK (17.4 g, 155 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) was added through a cannula a solution of 4-Bromonitrobenzene (5.00 g, 24.75 mmol) and *tert*-butyl chloroacetate (5.45 g, 38.37 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) and the reaction was carried out for 2 hours under argon at room temperature. 5 % HCl (60 mL) was poured into the mixture at 0°C. The mixture was then extracted with AcOEt, the extract dried over Na_2SO_4 and the combined extracts were evaporated. The crude wasn't submitted to any purification to afford yellowish oil (6.67 g, 85 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 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) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 168.4, 136.1, 132.3, 131.4, 128.14, 126.6, 82.2, 40.7, 27.9 ppm ; HRMS (ESI) : calcd. for $C_{12}H_{14}BrNO_4$: 316.1510 ; found 316.1489.

tert-butyl-2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propanoate

(7')

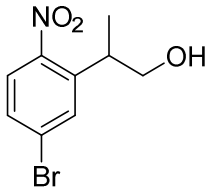


tert-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)acetate (9.16 g, 28.97 mmol) was dissolved in an anhydrous solution of sodium hydride (100 %, 0.7 g, 28.97 mmol) in 80 ml of anhydrous DMF. Methyl iodide (3.6 mL, 28.97 mmol) was then added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at room temperature under argon for 24 h. The crude was precipitated in HCl (3M) and filtrated on silica gel. The crude wasn't submitted to any purification to afford yellowish oil (9.19 g, 96 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 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) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 171.6, 147.9, 137.7, 132.8, 130.9, 127.9, 126.3, 81.8, 27.8, 17.4 ppm ; HRMS (ESI) : calcd for $C_{13}H_{16}BrNO_4$: 330.0160 ; found 316.0146.

2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propan-1-ol

(8)

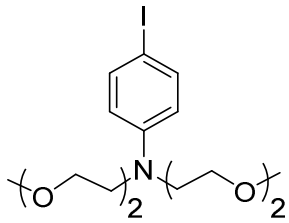


45 ml of a solution of DIBAL-H (1M in THF) (45.43 mmol) were slowly added to a solution of tert-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)propanoate (5.0 g, 15.14 mmol) in 45 mL of THF at 0°C. The mixture was stirred for 2 hours at room temperature. HCl solution (3M) were added drop wise until pH = 1. The mixture was then extracted with AcOEt, the extract dried over Na2SO4 and the combined extracts were evaporated. The crude was purified by flash chromatography using gradient elution of heptane/EtOAc: 9/1 to 8/2 in vol. gave 2.6 g, 9.99 mmol of the title compound in 66 % yield as a pale red oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 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) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.4, 140.5, 131.6, 130.4, 127.5, 125 .7, 67.6, 36.4, 17.4 ppm ; HRMS (ESI) : calcd. for $C_9H_{10}BrNO_3$: 260.9742 ; found 260.9724.

4-iodo-N,N-bis(methoxyethyl)aniline

(10)

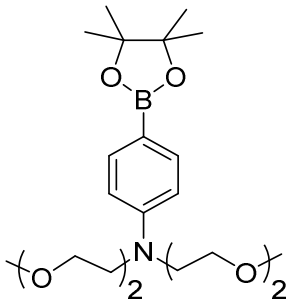


N,N-bis(methoxyethyl)aniline (688 mg 2.31 mmol), obtained as described by Ros-Li *et al*, was dissolved in dioxane (15 mL) and pyridine (15 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Iodine (1.76 g, 6.15 mmol) was added in one portion. The solution progressively took a dark brown colour. After 1 h, the ice bath was removed and a supplementary portion of iodine (566 mg, 2.31 mmol) was added. The solution was further stirred for one hour at room temperature. A saturated solution of sodium thiosulfatewas then added until the brown color disappeared. The mixture was extracted with dichloromethane (200 mL) and washed with water (200 mL). After evaporation, the product was filtered through a short plug of silica, eluted with ethyl acetate, to afford 827 mg of the 4-iodo-N,N-bis(methoxyethyl)aniline (10) (84 %) as a brown oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.35 (s, 6H), 3.55 (m, 16H), 6.47 (d, J =9.2 Hz, 2H), 7.39 (d, J =9.2 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 50.9, 59.1, 68.3, 70.6, 72.0, 92.1, 114.1, 137.7, 147.4 ppm

4-boronic acid pinacol ester-N,N-bis(methoxyethyl)aniline

(11)

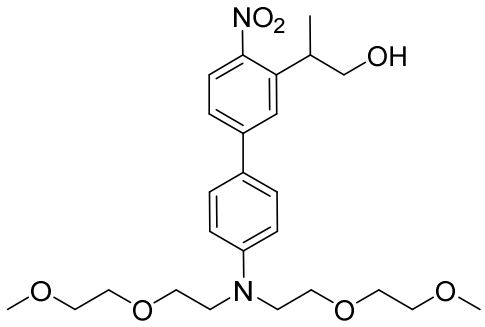


4-iodo-N,N-bis(methoxyethyl)aniline (7 g, 16.6 mmol) was dissolved in 150 mL of dry DMSO under argon atmosphere. bis(pinacolato)diboron (4.63 g, 18.2 mmol), potassium acetate (2.11 g, 21.5 mmol) and Pd(dppf)Cl_2 (0.24 g, 0.3 mmol) were successively added. The reaction mixture was heated at 80 °C for 20 hours. The mixture was cooled at room temperature andthen quenched with 300 mL of water. The solution was extracted 3 times with ethyl acetate (200 mL) and the combined organic layer was washed with 200 mL of brine. The organic layer was removed under reduced pressure, resulting in a dark oil. The crude extract was submitted to flash chromatography (heptane/AcOEt: 40/60 in vol.), resulting in 4.3 g of desired product (62%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 7.67 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 6.70 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 3.64 (m, 12H), 3.53 (m, 4H), 3.39 (s, 6H), 1.32 (s, 12H) ppm.

EANBP cage

(12)

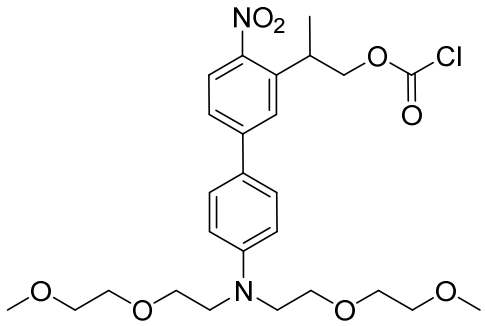


A mixture of 4-boronic acid pinacol ester-N,N-bis(methoxyethyl)aniline (**11**) (97 mg, 0.32 mmol), 4-iodo-N,N-bis(methoxyethyl)aniline (**10**) (161 mg, 0.38 mmol), K_2CO_3 (65 mg, 0.48 mmol), Bu_4NBr (345 mg, 0.72 mmol), and $Pd(OAc)_2$ (catalytic) in EtOH (10 mL) and water (5mL) was heated under microwave conditions at 150 °C for 10 min. Water (100 mL) was added and the organic extracted into EtOAc (200 mL). Purification by flash chromatography using gradient elution of heptane/EtOAc : 2/8 in vol. gave 105 mg of the EANBP Cage (**12**) in 70 % yield.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.35 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 3.36 (s, 6H), 3.50-3.67 (m, 17H), 3.81 (m, 2H), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.46-7.49 (m, 3H), 7.58 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.8 Hz, 1H) ppm ; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.7, 36.5, 51.0, 59.1, 68.1, 68.4, 70.7, 72.0, 112.0, 124, 4, 125.3, 126.1, 128.3, 136.0, 139.1, 145.8, 148.1, 148.3 ppm.

EANBP-Chloroformate

(13)

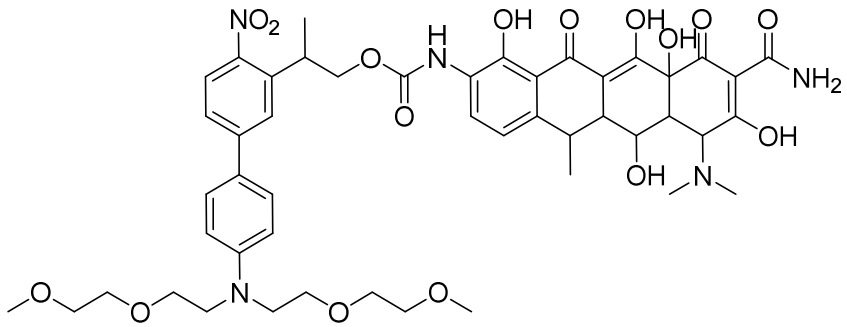


In a solution of EANBP (**12**) (63.5 mg, 0,13 mmol) and triphosgene (39.54 mg, 0,13 mmol) in 1.5 mL of anhydrous THF was added drop wise a solution of DIPEA (22.2 μL, 0.13 mmol) at

0 °C. The reaction mixture was stirred at room for 1h30 then the solvant was evaporated to give the EANBP-Chloroformate (**13**) as a pale yellow oil and was used in the next step without further purification.

EANBP-9-amino-doxycycline

(14)

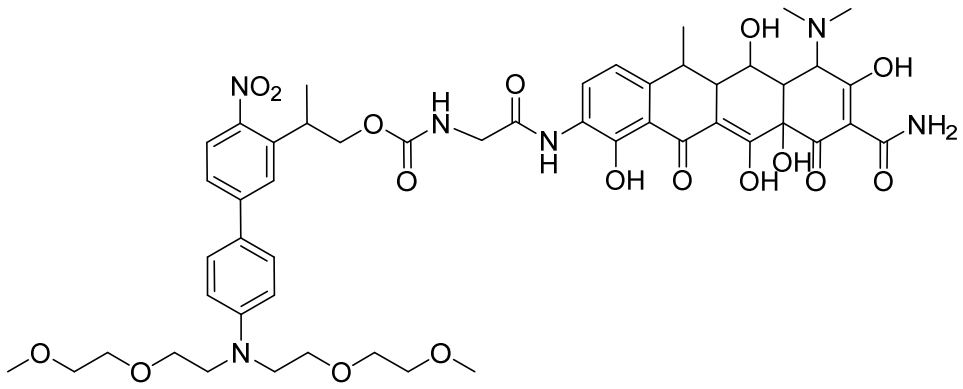


9-amino-doxycycline (**3**) (47.2 mg, 0.10 mmol) and $NaHCO_3$ (21.6 mg, 0.26 mmol) were dissolved in water (5 mL). After gas evolution had stopped, EANBP-Chloroformate (**13**) (36 mg, 0.07 mmol) dissolved in dioxane (5 mL) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h then additional $NaHCO_3$ (21.6 mg, 0.26 mmol) and EANBP-Chloroformiate (**13**) (36 mg, 0.07 mmol) were added and the reaction mixture was stirred another hour. The reaction was considered complete according to HPLC analysis. The solvants were removed under vacum and the residue was purified by RP-HPLC to afford 25 mg (**14**) (25 %) as a yellow powder.

Analytical HPLC : t_R : 19.2 min, purity : > 99 % ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.57 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 3.15 (s, 6H), 3.37 (s, 6H), 3.6 (m, 16H), 3.93 (m, 2H), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.8 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 6.9 Hz), 7.46 (m, 3H), 7.58 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.5 Hz, 1H) ppm.

EANBP-9-glycyl-amino-doxycycline

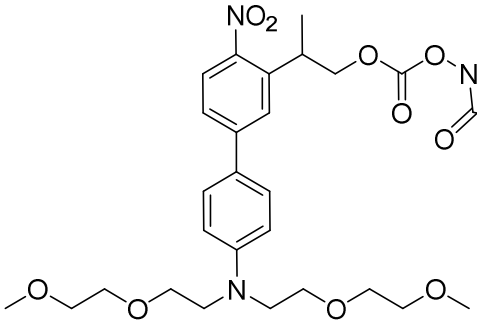
(15)



9-glycyl-amino-doxycycline (**5**) (86.2 mg, 0.17 mmol) and $NaHCO_3$ (35 mg, 0.41 mmol) were dissolved in water (5 mL). After gas evolution had stopped, EANBP-Chloroformate (**13**) (49 mg, 0.09 mmol) dissolved in dioxane (5 mL) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h then additional $NaHCO_3$ (35 mg, 0.41 mmol) and EANBP-Chloroformiate (**13**) (49 mg, 0.09 mmol) were added and the reaction mixture was stirred another hour. The reaction was considered complete according to HPLC analysis. The solvents were removed under vacuum and the residue was purified by RP-HPLC to afford 50 mg (**15**) (29%) as a yellow powder.

Analytical HPLC : t_R : 19.6 min, purity : > 99 % ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.57 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 3.15 (s, 6H), 3.37 (s, 6H), 3.6 (m, 16H), 3.85 (s, 2H), 3.93 (m, 2H), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.8 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 6.9 Hz), 7.46 (m, 3H), 7.58 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.5 Hz, 1H) ppm.

EANBP-N-succinimydyl carbonate (16)

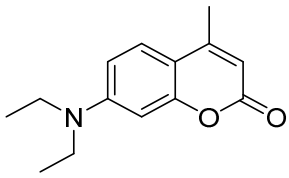


To a solution of EANBP (**12**) (55 mg, 0.12 mmol) in dry acetonitrile (1 mL), triethylamine (76.3 μL, 0.46 mmol) and N,N-disuccinimidyl carbonate (59.1 mg, 0.23 mmol) were added. The solution was stirred under argon atmosphere for 16 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum, the remaining soli dis acidified with 3 M HCl (1.6 mL) and extracted three times with dichloromethane. The combined organic layers were washed with $NaHCO_3$ solution and dried over anhydrous $MgSO_4$. After evaporation the crude was purified by flash chromatography to give 63 mg, of the title compound in 89 % yield as an orange oil.

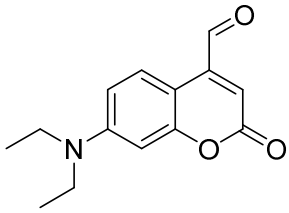
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.45 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 2.79 (s, 4H), 3.37 (s, 6H), 3.50-3.67 (m, 17H), 3.94 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 4.55 (m, 2H), 6.79 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.46-7.53 (m, 3H), 7.58 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.91 ppm (d, J = 8.7 Hz, 1H).

7-diethylamino-4-methylcoumarin

(17)



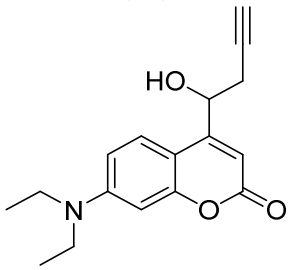
4-carbaldehyde-7-diethylamino-coumarin
(18)



Selenium dioxide (8.6 mmol, 960 mg) was added to a solution of 7-Diethylamino-4-methylcoumarin (4.3 mmol, 1 g) in *p*-xylene (42 mL). The resulting mixture was heated at reflux for 16 h until complete consumption of the starting material and filtered while hot to remove black selenium. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude was purified by column chromatography on silica gel (heptane/ethylacetate 8/2 (v/v)) to yield 4-carbaldehyde-7-diethylamino-coumarin (500 mg, 48 %) as an orange oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10 (s, 1H), 8.3 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.6 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, 2.4 Hz), 6.51 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.43 (s, 1H), 3.4 (q, 4H, J = 7.0 Hz), 1.2 (t, 6H, J = 7.0 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 192.5, 161.8, 157.4, 151.0, 143.9, 126.7, 117.2, 109.7, 103.7, 98.3, 44.8, 12.4 ppm.

7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one
(19)



Preparation of activated Zn: Dust Zn was successively washed with diluted HCl (5%), H_2O (3x), EtOH and finally with anhydrous diethyl ether.

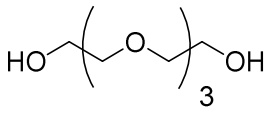
Activated zinc (500 mg, 7.6 mmol) was suspended in dry THF and propargylbromide (350 μL, 3.2 mmol, 2.5 equiv) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1h30 then a solution of 3-bromopropyne zinc in THF (2.5 eq) was added on the corresponding aldehyde (165 mg, 0.38 mmol). After completion of the reaction (1h), the mixture was stopped by adding NH_4Cl sat. solution and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified

by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/CH_3OH: 9/1 in vol.) to afford the titled compound as a yellow oil, 310 mg (85%).

Analytical HPLC : t_R : 17 min, UV : 385 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.36 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.54 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, 2.6 Hz), 6.47 (d, 1H, J = 2.6 Hz), 6.27 (s, 1H), 5.1 (m, 1H), 3.38 (q, 4H, J = 7.1 Hz), 2.82 (m, 2H), 2.6 (m, 1H), 1.18 (t, 6H, J = 7.1 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 162,5, 156.7, 155.6, 150.6, 124.9, 108.8, 106, 98.2, 79.6, 72.4, 68.2, 44.9, 27.9, 12.7 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{17}H_{19}NO_3$: 285.136, found 285.049.

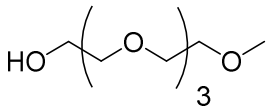
Tetraethyleneglycol

(20)



Tetraethyleneglycol monomethyl ether

(21)

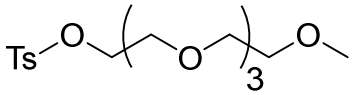


Tetraethyleneglycol **20** (5.3 mL, 30.9 mmol) in DMF (65 mL) was added drop wise to a suspension of NaH (60% dispersion in mineral oil) (1.36 g, 33.98 mmol) in THF (65 mL) at 0 °C. This mixture was stirred for a further 60 min at 0 °C, then a solution of iodomethane (2 mL, 32.1 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight and allowed to warm to room temperature. All volatile materials were removed by rotary evaporation. The yellow oil was dissolved into toluene (100 mL), and the organic layer was washed with 3 x 150 mL of water. The aqueous layer was next extracted with 3 x 150 mL of chloroform. The remaining organic layer was dried with anhydrous $MgSO_4$, and the solvent was removed by rotary evaporation. The yellow oil that remained was distilled under vacuum (185 °C, 5.5 mbar) to give the target compound as a clear yellow oil in 50 % yield (3.2 g).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.27 (s, 3H), 6.54 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, 2.6 Hz), 3.44-3.62 ppm (m, 16H).

Tetraethylene glycol monomethyl ether tosylate

(22)

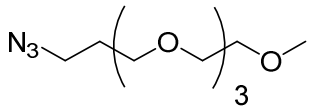


A solution of tetraethyleneglycol monomethyl ether (1 g, 4.8 mmol) in THF (1.4 mL) was treated with a solution of NaOH (384 mg, 9.6 mmol) in distilled H_2O (1.3 mL) at 0 °C under N_2 atmosphere. After stirring for 15 min, a solution of tosyl chloride (915 mg, 4.8 mmol) in THF (4.8 mL) was added dropwise at 0 °C. Stirring was continued at r.t. for 30 min. All volatile materials were evaporated and the crude mixture poured into distilled water (10 mL) and extracted with Et_2O (3 × 10 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and evaporated to afford the right compound in 79 % yield (1.4 g) as pale yellow oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.39 (s, 3 H), 3.32 (s, 3 H), 3.48–3.64 (m, 14 H), 4.1 (t, 2H, J = 4.6 Hz), 7.28 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.74 ppm (d, 2H, J = 8.8 Hz); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.70, 59.07, 68.72, 69.32, 70.56, 70.57, 70.63, 70.65, 70.78, 71.98, 128.03, 129.88, 133.06, 144.86 ppm.

Triethyleneglycol monomethyl ether azide

(23)

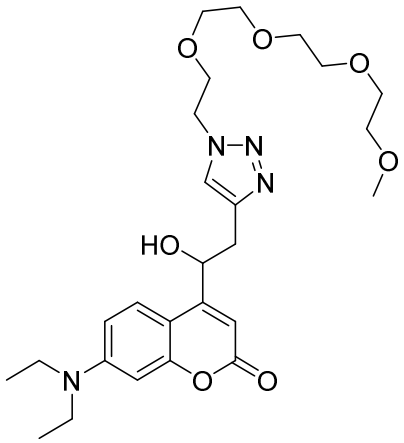


Tetraethyleneglycol monomethyl ether tosylate (240 mg, 0.66 mmol) was dissolved in ethanol (18 mL) and sodium azide (86.1 mg, 1.3 mmol) was added. The solution was heated under reflux (85 °C) for 2.5 h until TLC showed no more starting material. The solvent was removed under vacuum and CH_2Cl_2 was added to the crude mixture. The organic layer was extracted with water (3 times), dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The remaining oil was purified by column chromatography on silica gel (Heptane/AcOEt: 5/5 in vol.) and revealed with a solution of phosphomolybdic Acid (*PMA*) to afford the titled compound as a yellow oil in 85 % yield (310 mg).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.31 (m, 5H), 3.48 (m, 2H), 3.58-3.62 ppm (m, 12H); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 50.8, 59.1, 70.1, 70.6, 70.7, 72 ppm.

DEACM-OEG4

(24)

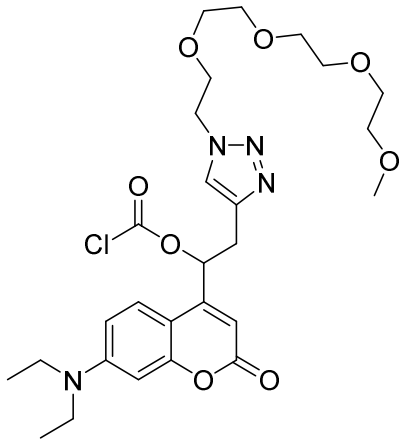


Alkyne **19** (138 mg, 0.48 mmol), triethyleneglycol monomethyl ether azide **23** (124.1 mg, 0.53 mmol), ascorbic acid (42.6 mg, 0.24 mmol) and proline (11.1 mg, 0.1 mmol) were dissolved in a mixture of DMF/*t*-butanol/water (1:15:1 in vol). The mixture was degassed by three freeze–pump–thaw cycles then copper sulfate (15.4 mg, 0.1 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C and monitored by TLC/HPLC until all starting material disappeared (approximatively 24h). After completion of the reaction, the mixture was diluted with water and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The reaction products were purified using silica gel column chromatography (CH_2Cl_2/CH_3OH: 1/0 to 96/4 in vol.) and revealed with a solution of phosphomolybdic Acid (*PMA*) to give the target compound in 85 % yield (212 mg) as an orange oil.

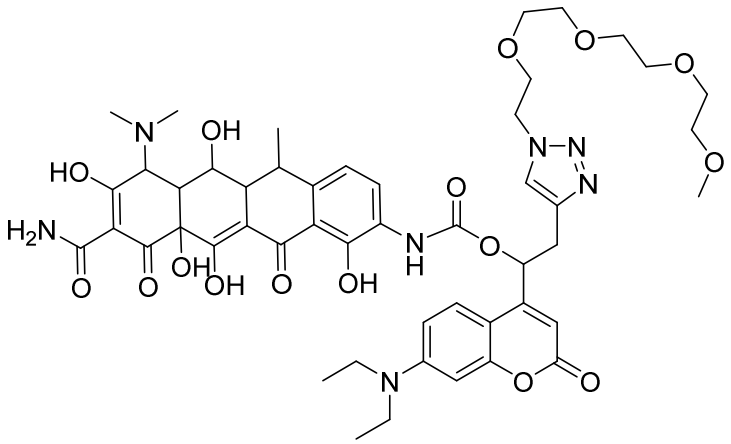
Analytical HPLC : t_R : 15 min ; UV : 387 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.7 (s, 1H), 7.5 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 6.56 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, 2.6 Hz), 6.49 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 6.26 (s, 1H), 5.3 (m, 2H), 4.51 (m, 2H), 4.06 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 3.83 (t, 2H, 4.8 Hz), 3.6 (m, 10H), 3.47 (t, 2H, 4.6 Hz), 3.38 (q, 4H, *J* = 7.1 Hz), 3.28 (s, 3H), 2.98 (m, 1H), 1.18 (t, 6H, *J* = 7.1 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 162,5, 157.3, 156.7, 150.5, 144.2, 125.2, 123.7, 108.8, 106.3, 105.6 98.1, 72.1, 70.8, 70.7, 70.67, 70.61, 69.7, 69, 59.1, 53.6, 50.5, 44.9, 33.8, 12.7 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{26}H_{38}N_4O_7$: 518.274, found 518.192

DEACM-OEG4-Chloroformate

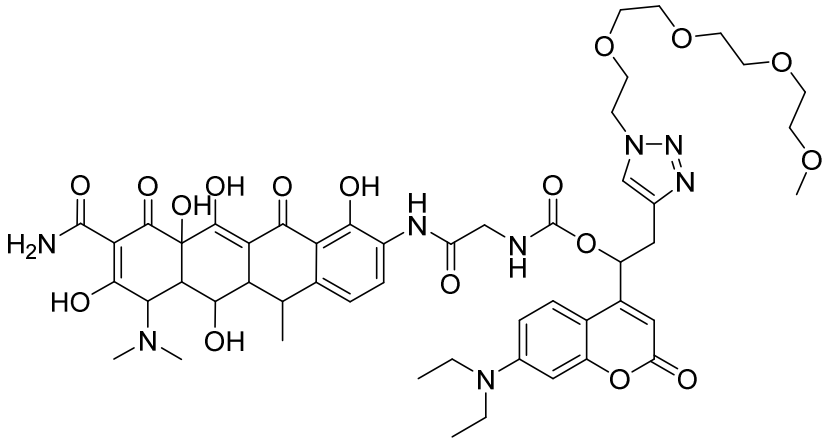
(25)



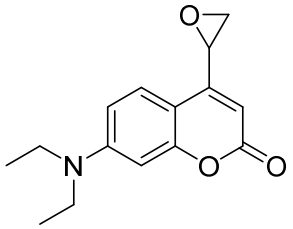
DEACM-OEG4-9-amino-doxycycline
(26)



DEACM-OEG4-9-glycyl-amino-doxycycline
(27)



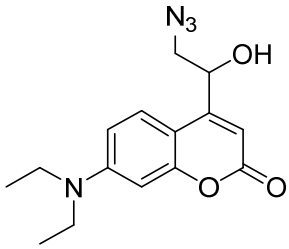
7-(diethylamino)-4-(oxiran-2-yl)-2H-chromen-2-one
(28)



4-carbaldehyde-7-diethylamino-coumarin **18** (236 mg, 0.96 mmol) and cesium carbonate (470 mg, 1.44 mmol) were dissolved in THF (4 mL) and heated at 60 °C for 10 min. Then a suspension of (carboxymethyl)(4-cyanophenyl)methylsulfanium (300 mg, 1.44 mmol) prepared by (Forbes *et al.,* 2006) procedure in THF (6 mL) was slowly added to the reaction mixture and the reaction was heated for 2 h. The solution was cooled at room temperature, filtered through celite, concentrated under reduced pressure, dried over anhydrous $MgSO_4$ and purified by column chromatography on silica gel (heptane/AcOEt : 7/3 in vol.) to give the targeted compound in 69 % yield (173 mg) as an orange-red oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.5 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.6 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, 2.4 Hz), 6.51 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.02 (s, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.4 (q, 4H, J = 7.0 Hz), 3.21 (m, 1H), 2.7 (m, 2H), 1.2 (t, 6H, J = 7.0 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ =162, 156.2, 151.9, 150.8, 124.6, 108.7, 106.9, 103.9, 97.8, 49.9, 48.6, 44.8, 12.5 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{15}H_{17}NO_3$: 259.121, found 259.013.

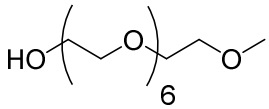
4-(2-azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one
(29)



To a mixture of 7-(diethylamino)-4-(oxiran-2-yl)-2H-chromen-2-one **28** (173.2 mg, 0.67 mmol) in EtOH (2 mL) was added NaN_3 (52.11 mg, 0.8 mmol), NH_4Cl (36.8 mg, 0.69 mmol) and then water (2 mL). The mixture was stirred at reflux for 16 h, then the crude was filtrated to remove NaN_3 excess and EtOH was removed by rotary evaporation. H_2O (10 mL) was added and the solution was extracted with Et_2O (3×15 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (Heptane/AcOEt : 3/7 in vol.) to give the targeted compound in 62 % yield (125.5 mg) as a clear red oil

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.3 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.5 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, 2.4 Hz), 6.48 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.3 (s, 1H), 5.1 (m, 1H), 3.5 (m, 2H), 3.4 (q, 4H, J = 7.0 Hz), 2.7 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 1.2 (t, 6H, J = 7.0 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 162.6, 156.7, 154.4, 150.7, 148.3, 124.5, 108.9, 106.3, 105.8, 98.3, 69.6, 56.6, 45.1, 12.5 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{15}H_{18}N_4O_3$: 302.138, found 302.042.

Hexaethylene glycol monomethyl ether
(30)



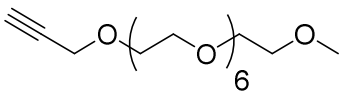
Under argon atmosphere, triethylene glycol (1.2 g, 8.2 mmol) was dissolved in anhydrous THF (2 mL), and the resulting solution was brought to reflux. Freshly ground KOH (88 mg, 1.5 mmol) was added in small portions. After complete dissolution, the solution was cooled to room temperature, and tetraethylene glycol monomethyl ether tosylate **22** (500 mg, 1.4 mmol) in THF (2 mL) was added drop by drop. The solution was then refluxed under argon overnight until no

starting mater was detected by TLC. After evaporation of THF under vacuum, water was added to the resulting mixture, and the solution was extracted with dichloromethane until no starting mater was detected by TLC (eluent: AcOEt). The titled compound was obtained in 95 % yield as a pale yellow oil without further purification.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.34 (s, 3H), 3.50 (m, 2H), 3.54-3.65 (m, 24H), 3.68 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 59.3, 62.1, 70.6, 70.8, 72.1, 72.8 ppm.

mPEG7-propyne

(31)

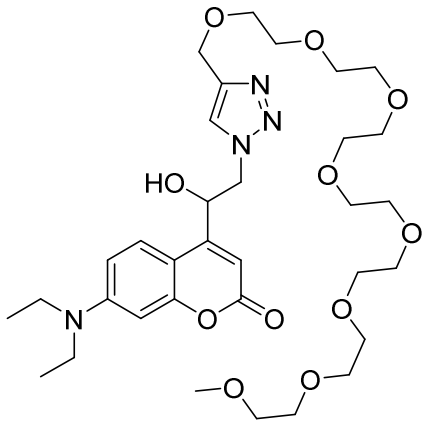


NaH (60% w/w in mineral oil, 16.5 mg, 0.4 mmol) was dissolved in anhydrous THF (4 mL) at 0 °C under an N_2 atmosphere. A catalytic amount (spatula tip) of Bu_4NI (0.05 equiv) and propargyl bromide (67 μL, 0.6 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at overnight and allowed to warm to room temperature, and all volatile materials were removed by rotary evaporation. Purification of the residue by flash column chromatography (CH_2Cl_2/CH_3OH : 1/0 to 98/2 in vol.) gave the titled compound in 68 % yield (105 mg) as pale yellow oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.4 (s, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.54-3.7 (m, 28H), 4.1 ppm (s, 2H); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 58.5, 59.2, 69.3, 70.4, 70.7, 72.1, 74.6, 79.8 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{18}H_{34}O_8$: 378.462, found 378.142.

PEG7-DEACM

(32)

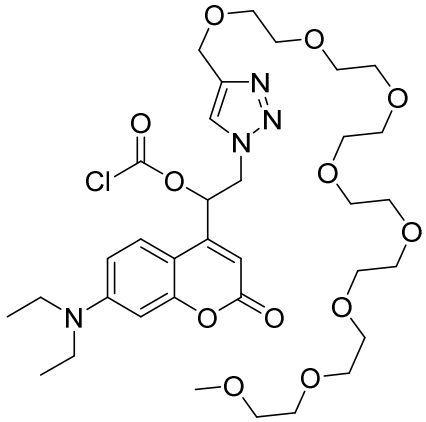


Alkyne **31** (150 mg, 0.40 mmol), 4-(2-azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **29** (126.1 mg, 0.42 mmol), ascorbic acid (34.9 mg, 0.19 mmol) and proline (9.1 mg, 0.08 mmol) were dissolved in a mixture of DMF/t-butanol/water (1:15:1 in vol.). The mixture was degassed by three freeze–pump–thaw cycles then copper sulfate (12.7 mg, 0.08 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C and monitored by TLC/HPLC until all starting material disappeared (approximatively 24h). After completion of the reaction, the mixture was diluted with water and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The reaction products were purified using silica gel column chromatography (CH_2Cl_2/CH_3OH: 1/0 to 96/4) and revealed with Phosphomolybdic Acid (*PMA*) TLC stain to give the target compound in 69 % yield (185 mg) as an orange oil.

Analytical HPLC : t_R : 16.2 min ; UV : 390 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.88 (s, 1H), 7.53 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.61 (dd, 1H, J = 8.8 Hz, 2.4 Hz), 6.5 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.35 (d, 1H, J = 9.1 Hz), 4.8 (d, 1H, J = 13.5 Hz), 4.69 (s, 2H), 4.29 (m, 1H), 3.3-3.7 (m, 32H), 3.32 (s, 3H), 1.19 (t, 6H, J = 7.0 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 162.7, 156.6, 154.8, 150.9, 145, 124.7, 109.1, 106.2, 105.9, 97.9, 72.1, 70.6, 69.8, 68.9, 64.6, 59.2, 56.1, 44.9, 12.6 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{33}H_{52}N_4O_{11}$: 680.363, found 680.275.

PEG7-DEACM-chloroformiate

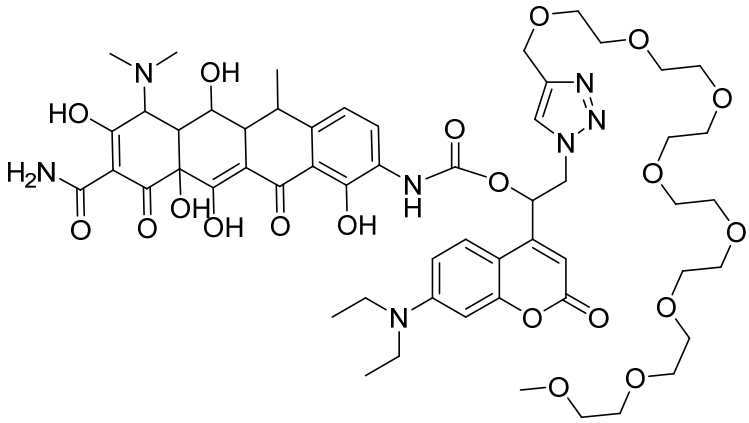
(33)



To a stirred solution of PEG7-DEACM **(32)** (56 mg, 0.08 mmol) in 1.5 mL of anhydrous THF, triphosgene (26.9 mg, 0.09 mmol) and DIPEA (15 μL, 0.06 mmol) were slowly added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1h30 then the solvant was removed by rotary evaporation to give the PEG7-DEACM-chloroformiate **(33)** as a pale yellow oil and was used for the next step without further purification.

PEG7-DEACM-9-amino-doxycycline

(34)



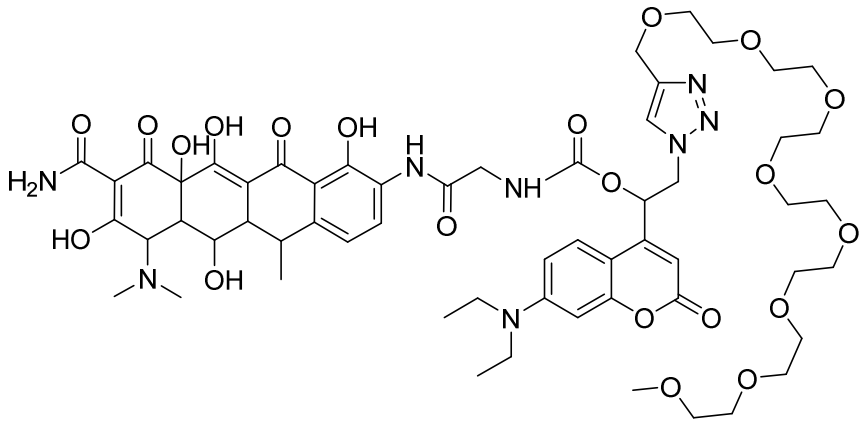
9-amino-doxycycline (**3**) (34.8 mg, 0.07 mmol) and $NaHCO_3$ (15.9 mg, 0.07 mmol) were dissolved in water (1 mL). After gas evolution had stopped, PEG7-DEACM-chloroformiate (**33**) (56.2 mg, 0.07 mmol) dissolved in dioxane (2 mL) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was considered complete according to

HPLC analysis. The solvants were removed under vacum and the residue was purified by RP-HPLC to afford 35 mg (**34**) (40 %) as a yellow powder.

Analytical HPLC : t_R : 17.3 min ; UV : 345, 390 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.8 (s, 1H), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.72 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.59 (dd, 1H, *J* = 8.5 Hz, 2.5 Hz), 6.4 (s, 1H), 6.25 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz),, 5.97 (s, 1H), 4.79 (d, 1H, *J* = 13.5 Hz), 4.64 (m, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.44-3.56 (m, 28H), 3.32 (q, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.85 (s, 6H), 1.12 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz) ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{56}H_{75}N_7O_{20}$: 1165.506, found 1165.328.

PEG7-DEACM-9-glycyl-amido-doxycycline

(35)

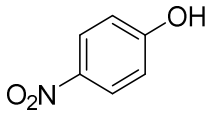


To a stirred solution PEG7-DEACM-4-nitrophenyl carbonate **(38)** (47.6 mg, 0.06 mmol) in dry DMF (1 mL) was added triethylamine (15.6 μL, 0.11 mmol) followed by 9-glycyl-amido-doxycycline **(5)** (14.5 mg, 0.03 mmol). The reaction was considered complete according to HPLC analysis. The solvants were removed under vacum and the residue was purified by RP-HPLC to afford 13.5 mg (**35**) (39 %) as a pale yellow oil.

Analytical HPLC : t_R : 17.7 min ; UV : 345, 390 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.9 (s, 1H), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.76 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.62 (dd, 1H, *J* = 8.5 Hz, 2.5 Hz), 6.45 (s, 1H), 6.29 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz),, 6.12 (s, 1H), 4.79 (d, 1H, *J* = 13.5 Hz), 4.88 (m, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.75-3.50 (m, 28H), 3.32 (q, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.85 (s, 6H), 1.3 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz) ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{58}H_{78}N_8O_{21}$: 1222.528, found 1222.406.

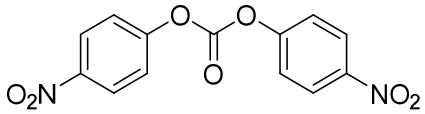
4-nitrophenol

(36)



Bis(4-nitrophenyl) carbonate

(37)

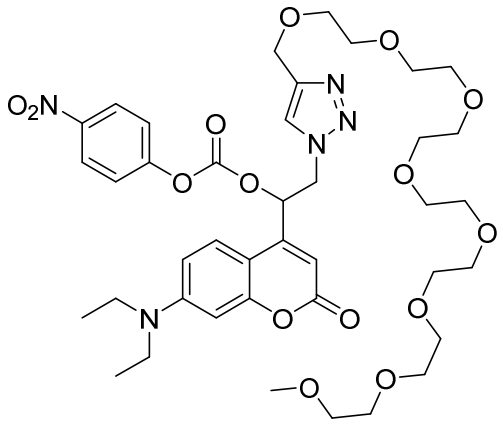


To a mixture of 4-nitrophenol (400 mg, 2.8 mmol) and DIPEA (1.2 mL, 7.1 mmol) in THF (18 mL), cooled to 0 °C, was added drop wise a solution of triphosgene (609 mg, 2.1 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) over 5 min. The reaction mixture was stirred for 0.5 h (TLC, 100% CH_2Cl_2), then was poured into 1N HCl (15 mL), and was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 5mL). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4, and concentrated to give a white solid, which was purified by flash chromatography (eluent: CH_2Cl_2), to give bis(4-nitrophenyl) carbonate (450 mg, 72%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.32 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 7.48 (d, 2H, J = 8.9 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 154.8, 150.1, 145.8, 125.6, 121.6 ppm.

PEG7-DEACM-4-nitrophenyl carbonate

(38)

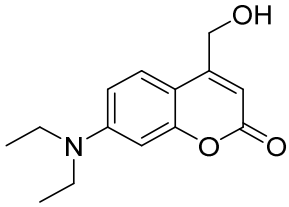


To a stirred solution of PEG7-DEACM **(32)** (40 mg, 0.06 mmol) in dry DMF (2 mL) was added triethylamine (16 μL, 0.12 mmol) followed by bis (4-nitrophenyl)carbonate (53.6 mg, 0.18 mmol). The solution was stirred overnight in the dark at rt after which it was cooled and acidified with 4 mL of 1% HCl. The mixture was extracted with 10 mL of CH_2Cl_2 and the organic layer was washed with saturated NaHCO3 (3x5 mL) solution and brine (1x 5 mL) and dried over anhydrous MgSO4. The solution was filtered, concentrated and purified by flash column chromatography (1:0 ; CH_2Cl_2: CH_3OH to 95:5 in vol.) to yield pale yellow oil. (43 mg, 86 %).

Analytical HPLC : t_R : 20.7 min ; UV : 390 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.23 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.75 (s, 1H), 7.51 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 6.63 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.51 (s, 1H), 6.32 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.17 (s, 1H), 4.81 (m, 2H), 3.66-3.48 (m, 28H), 3.4 (q, 4H, J = 7.0 Hz), 3.33 (s, 3H), 1.19 (t, 6H, J = 7.0 Hz) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 162.7, 156.6, 154.8, 150.9, 145, 125.6, 124.7, 122.13, 109.1, 106.2, 105.9, 97.9, 72.1, 70.6, 69.8, 68.9, 64.6, 59.2, 56.1, 44.9, 12.6 ppm.

7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one

(39)

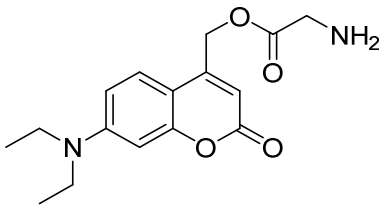


A solution of 4-carbaldehyde-7-diethylamino-coumarin **(18)** (115 mg, 0.47 mmol) in THF (5 mL) was cooled to 0 °C, treated with $NaBH_4$ (35.5 mg, 0.94 mmol) and stirred for 5 h at rt. until completion of the reaction. Then a solution of $NaHCO_3$ was added and the organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were dried with anhydrous $MgSO_4$. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by silica gel chromatography (Heptane:EtOAc, 8:2 to 5:5 in vol.) to give the tilted compound in 60 % yield (69 mg) as a yellow oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.28 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.52 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.44 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.8 (s, 2H), 3.36 (q, 4H, J = 6.9 Hz), 1.16 (t, 6H, J = 6.9 Hz) ppm.

DEACM-glycine

(40)



N-*tert*-Boc-glycine (156 mg, 0.9 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (10.2 mg, 0.08 mmol), and DIC (123 mg, 0.97 mmol) in 6 mL of dichloromethane (CH_2Cl_2) were stirred at room temperature for 10 min. Then a solution of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one **(39)** (69 mg, 0.28 mmol) in 2 mL of THF was added to the reaction mixture. The resulting mixture was stirred at room temperature in the dark for 30 min after which, it was filtered and

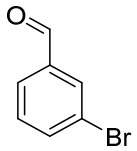
the solvent evaporated to give a yellow solid of DEACM-N-*tert*-Boc-glycine used for the next step without further purification

DEACM-N-*tert*-Boc-glycine (105 mg, 0.26 mmol) was dissolved in 7 mL of dichloromethane, and the reaction mixture was cooled to 0 °C. Trifluoroacetic acid (2.5 mL) was slowly added, and the resulting solution was stirred in the dark for 24 h, bringing it to room temperature. The solvants were removed under vacum and the residue was purified by RP-HPLC to afford 30.8 mg of DEACM-glycine (39 %).

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ = 7.63 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.20 (d, 1H J = 2.4 Hz), 7.15 (dd, J = 9.0 Hz, 2.6 Hz), 6.38 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.48 (q, 4H, J = 7.1 Hz), 0.98 (t, 6H, J = 7.1 Hz) ppm.

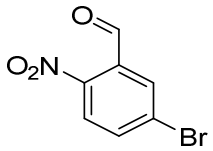
3-bromo-benzaldehyde

(41)



5-bromo-2-nitrobenzaldehyde

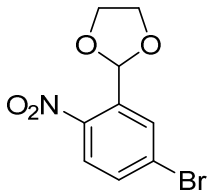
(42)



At 0 °C 1.2 mL HNO_3 (65 % solution in H2O) and 2.4 mL H_2SO_4 (97 % solution in H_2O) were mixed in a 25 mL round-bottom flask, and 3-bromobenzaldehyde **(41)** (0.63 mL, 5.4 mmol) were slowly added. During the addition, a yellow/orange light precipitate was formed, and after 30 min at 0 °C, the suspension was allowed to stirred for 45 min at room temperature. The mixture was poured into 30 mL ice cold saturated $NaHCO_3$ solution and extracted with EtOAc (3x). The combined yellow organic layers were washed with saturated $NaHCO_3$ solution until the pH of the aqueous phase was 8-9 and dried over Na_2SO_4. After filtration and evaporation of the solvent, the yellow crude product was purified by flash column chromatography (Heptane/AcOEt : 9/1 in vol.) afforded 900 mg (72 %) of compound as white solid.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.85 (dd, 9H, J = 8.5 Hz, 1.5 Hz), 8 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.03 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 10.38 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 186.7, 148.1, 136.9, 132.6, 130.1, 129.5, 126.1 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_7H_4BrNO_3$: 228.937, found 228.822.

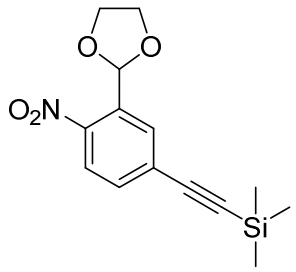
2-(5-bromo-2-nitrophenyl)-[1,3]dioxalane
(43)



5-bromo-2-nitrobenzaldehyde **(42)** (1 g, 4.3 mmol), ethylene glycol (0.29 mL, 5.2 mmol) and *p*-toluene-sulfonic acid (74.8 mg, 0.43 mmol) were dissolved in anhydrous toluene (20 mL). The reaction mixture was stirred and heated at 130 °C. Water formed during the reaction was removed azeotropically by a Dean-Stark apparatus setup during 2 h. After evaporation of the solvent, the mixture was poured in water and extracted with CH_2Cl_2 (three times). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure to get the titled compound as a pale white-yellow solid, 1.18 g (99 %) and used for next step without further purification.

Analytical HPLC : t_R : 21.6 min ; UV : 270 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.93 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.79 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.61 (dd, 1H, J = 8.6 Hz, 1.8 Hz), 6.54 (s, 1H), 4.02 (m, 4H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 147.5, 135.3, 132.7, 130.9, 127.9, 126.1, 99, 65.4 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_9H_8BrNO_4$: 272.964, found 272.845.

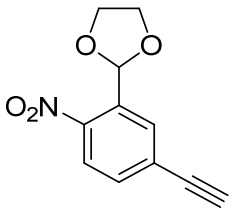
((3-(1,3-dioxolan-2-yl)-4-nitrophenyl)ethynyl)trimethylsilane
(44)



2-(5-bromo-2-nitrophenyl)-[1,3]dioxalane **(43)** (1.1 g, 4 mmol), trimethylsilylacetylene (860 μL, 6 mmol), Et_3N (840 μL, 6 mmol) were dissolved in anhydrous THF (32 mL). The mixture was degassed by two freeze–pump–thaw cycles then CuI (153 mg, 0.8 mmol) and $Pd(PPh_3)_4$ (460 mg, 0.4 mmol) were added. A last freeze–pump–thaw cycle was performed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted with water and extracted with dichloromethane (three times). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (heptane/AcOEt : 9/1 in vol.) to afford the titled compound as a yellow liquid, 1.08 g (92 %).

Analytical HPLC : t_R : 27.7 min ; UV : 287 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.84 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.83 (s, 1H), 7.52 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.46 (s, 1H), 4.01 (m, 4H), 0.25 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 147.9, 133.9, 132.9, 131.3, 128.6, 102.9, 99.9, 99.5, 65.6 ppm; HRMS (ESI) : calcd. for $C_{14}H_{17}BrNO_4$: 291.09268, found 291.08204.

2-(5-ethynyl-2-nitrophenyl)-1,3-dioxolane
(45)



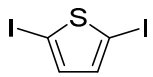
((3-(1,3-dioxolan-2-yl)-4-nitrophenyl)ethynyl)trimethylsilane **(44)** (1 g, 3.5 mmol) was dissolved in methanol (36 mL) and N_2 was bubbled in the resulting solution for 10 min. K_2CO_3 (960 mg, 7 mmol) was added and the suspension was stirred at room temperature for 45 min. The mixture was filtered, the filtrate evaporated and the residue was taken up in CH_2Cl_2. The

organic phase was washed with water, brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the titled compound as a white-yellow solid (771 mg, 97 %). The residue was used for next step without purification.

Analytical HPLC : t_R : 20.6 min ; UV : 278 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.86 (s, 1H), 7.85 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.45 (s, 1H), 4.01 (m, 4H), 3.28 (s,1H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 148.3, 134, 133.1, 131.5, 127.4, 124.9, 99.4, 81.8, 81.7, 65.6 ppm: HRMS (ESI) : calcd. for $C_{11}H_9NO_4$: 219.05316, found 219.06017.

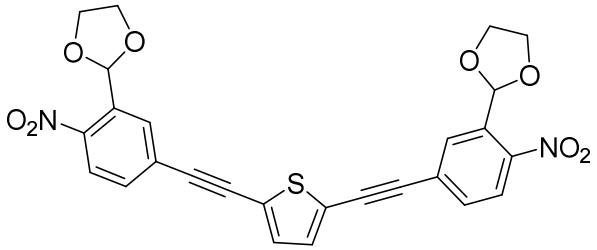
2,5-diiodothiophene

(46)



2-{5-[2-(5-{2-[3-(1,3-dioxolan-2-yl)-4-nitrophenyl]ethynyl}thiophen-2-yl)ethynyl]-2-nitrophenyl}-1,3-dioxolane

(47)

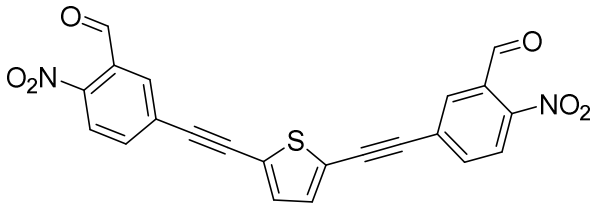


To a solution of 2-(5-ethynyl-2-nitrophenyl)-1,3-dioxolane (143,5 mg, 0.66 mmol) in THF (2.4 mL), 2,5-diiodothiophene (100 mg, 0.3 mmol) and triethylamine (0.2 mL, 1.5 mmol) were added. Three freeze–pump–thaw cycles were performed before $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (10 mol %) and CuI (5 mol %) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 4 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted with a solution of NH_4Cl sat. and extracted with chloroform (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (heptane/AcOEt : 6/4 in vol.) to afford the target compound as a yellow solid, 128.6 mg (83%). (A Glaser-type oxidative homocoupling (12%) was observed during the reaction).

Analytical HPLC : t_R : 27.6 min ; UV : 383 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD3)_2CO$): δ = 8.02 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.93 (s, 2H), 7.81 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.5 (s, 2H), 6.4 (s, 2H), 4.05 (s, 8H)

ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 148, 134.2, 133.4, 132.3, 130.7, 127.80, 125.1, 124.8, 99.5, 92.9, 86.5, 65.6 ppm; HRMS (ESI): calcd. for $C_{26}H_{18}N_2O_8S$: 518.07839, found 518.07735.

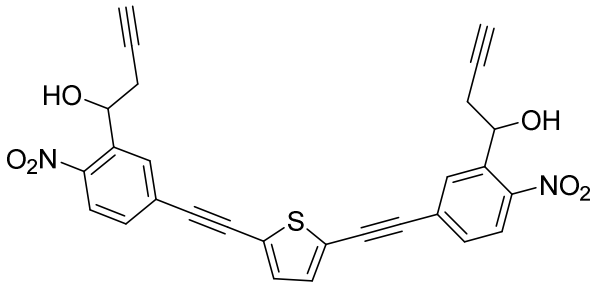
5-(2-{5-[2-(3-formyl-4-nitrophenyl)ethynyl]thiophen-2-yl}ethynyl)-2-nitrobenzaldehyde (48)



A solution of *p*-toluenesulfonic acid (697 mg, 4 mmol) in acetonitrile (6 mL) and water (2 mL) was added to the solution of compound **(46)** (210 mg, 0.4 mmol) in dichloromethane (2.6 mL). The mixture was then stirred at 80 °C overnight and an orange precipitate appeared. After cooling to room temperature, the organic solvent was removed under reduced pressure. Filtration was done to collect the residue, which was washed with water to give 173 mg of a pure compound in quantitative yield as an orange solid.

Analytical HPLC : t_R : 26.3 min ; UV : 394 nm ; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.4 (s, 2H), 8.14 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 8 (s, 2H), 7.81 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.29 (s, 2H) ppm; ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 187.6, 148.3, 135.7, 133.9, 132.5, 132, 129.5, 125.2, 124.9, 92.2, 88.3 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{26}H_{18}N_2O_8S$: 430.026, found 430.960.

1-{5-[2-(5-{2-[3-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-4-nitrophenyl]ethynyl}thiophen-2-yl)ethynyl]-2-nitrophenyl}but-3-yn-1-ol
(49)



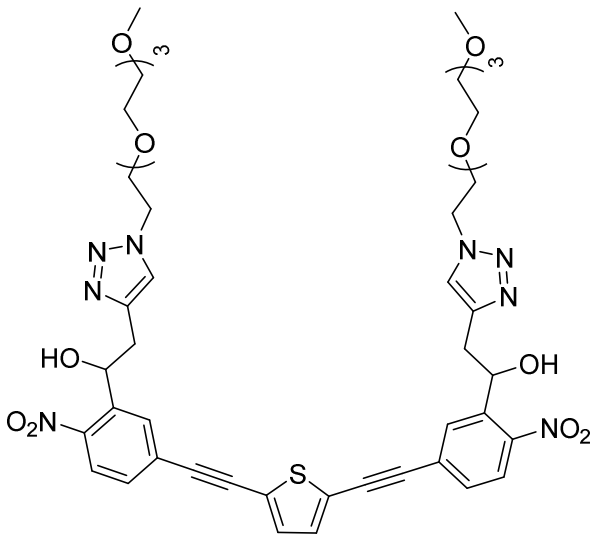
Preparation of activated Zn: Dust Zn was successively washed with diluted HCl (5%), H_2O (3x), EtOH and finally with anhydrous diethyl ether.

Activated zinc (160 mg, 2.4 mmol) was suspended in dry THF (1.2 mL) and propargylbromide (9.2 M) (110 μL, 1 mmol, 2.5 equiv) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1h30 then a solution of 3-bromopropyne zinc in THF (2.5 eq) was added on the corresponding aldehyde (165 mg, 0.38 mmol). After completion of the reaction (1h), the mixture was stopped by adding NH_4Cl sat. solution and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/CH_3OH: 9/1 in vol.) to afford the titled compound as a yellow oil, 166 mg (85%).

Analytical HPLC : t_R : 24.4 min ; UV : 384 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.02 (s, 2H), 7.98 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.55 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.25 (s, 2H), 5.52 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 2.92 (dt, 2H, J = 16.9 Hz, 2.6 Hz), 2.66 (ddd, 2H, J = 16.9 Hz, 7.3 Hz, 2.6 Hz), 2.1 (s, 2H) ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{28}H_{18}N_2O_6S$: 510.088, found 510.020.

BNPET-OEG4

(50)

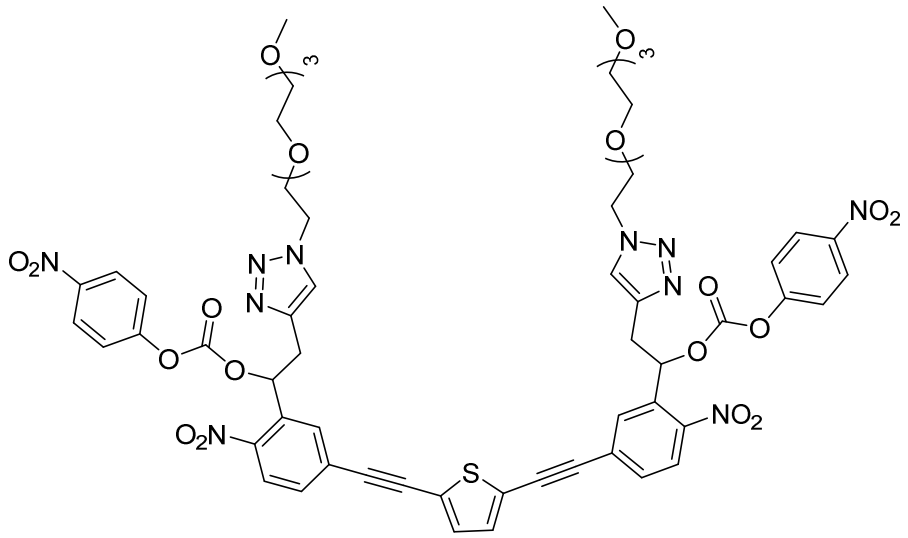


Alkyne **(49)** (66.6 mg, 0.13 mmol), triethylene glycol monomethyl ether azide **23** (63.9 mg, 0.27 mmol), ascorbic acid (11.5 mg, 0.06 mmol) and proline (3 mg, 0.03 mmol) were dissolved in a mixture of DMF/*t*-butanol/water (1:15:1 in vol; 0.4:8:0.4 mL). The mixture was degassed by three freeze–pump–thaw cycles then copper sulfate (4 mg, 0.2 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C and monitored by TLC/HPLC until all starting material disappeared (approx 24h). After completion of the reaction, the mixture was diluted with water and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The reaction products were purified using silica gel column chromatography (CH_2Cl_2/CH_3OH: 1/0 to 96/4 in vol.) and revealed with Phosphomolybdic Acid (*PMA*) TLC stain to give the target compound in 56 % yield (71.3 mg) as an orange solid.

Analytical HPLC : t_R : 21.7 min ; UV : 385 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.07 (s, 2H), 7.96 (d, 2H, d, J = 9 Hz), 7.68 (s, 2H), 7.51 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.24 (s, 2H), 5.57 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 4.67 (s, 2H), 4.53 (t, 4H, J = 4.9 Hz), 3.86 (t, 4H, J = 8.4 Hz), 3.63-3.56 (m, 20H), 3.5-3.45 (m, 4H), 3.29 (s, 6H), 3.04-2.96 (m, 2H) ppm; ^{3}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 146.7, 144.7, 140.3, 133.35, 131.7, 130.8, 128.5, 124.96, 124.9, 123.5,93.2, 86.6, 72, 70.8, 70.7, 70.6, 69.7, 69, 59.1, 50.6, 34.8 ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{56}N_8O_{14}S$: 976.363, found 976.378.

BNPET-OEG4

(51)



To a stirred solution of BNPET-OEG4 **(50)** (58 mg, 0.06 mmol) in dry DMF (2 ml) was added triethylamine (33 μL, 0.24 mmol) followed by bis (4-nitrophenyl)carbonate (72.2 mg, 0.23 mmol). The solution was stirred overnight in the dark at rt after which it was cooled and acidified with 4 mL of 1% HCl. The mixture was extracted with 10 mL of CH_2Cl_2 and the organic layer was washed with saturated $NaHCO_3$ (3x5 mL) solution and brine (1x 5 mL) and dried over anhydrous $MgSO_4$. The solution was filtered, concentrated and purified using silica gel column chromatography (1:0 ; CH_2Cl_2: CH_3OH to 95 :5 in vol.) to yield pale orange oil. (77 mg, 99 %).

Analytical HPLC : t_R : 25 min ; UV : 385 nm ; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.22 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.06 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.84 (s, 2H), 7.71 (s, 2H), 7.62 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.34 (s, 2H, J = 8.7 Hz), 7.29 (s, 2H), 6.6 (m, 2H), 4.53 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 3.85 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 3.66-3.42 (m, 24H), 3.33 (s, 6H) ppm; MS (ESI): calcd. for $C_{60}H_{62}N_{10}O_{22}S$: 1306.376, found 1306.488.

VII.2 Références bibliographiques :

Agarwal, H.K., Janicek, R., Chi, S.-H., Perry, J.W., Niggli, E., and Ellis-Davies, G.C.R. (2016). Calcium Uncaging with Visible Light. J. Am. Chem. Soc. *138*, 3687–3693.

Ahmad, M. (2016). Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes. Curr. Opin. Plant Biol. *33*, 108–115.

Airan, R.D., Thompson, K.R., Fenno, L.E., Bernstein, H., and Deisseroth, K. (2009). Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. Nature *458*, 1025–1029.

Amit, B., Ben-Efraim, D.A., and Patchornik, A. (1976). Light-sensitive amides. The photosolvolysis of substituted 1-acyl-7-nitroindolines. J. Am. Chem. Soc. *98*, 843–844.

Ando, H., Furuta, T., Tsien, R.Y., and Okamoto, H. (2001). Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. Nat. Genet. *28*, 317–325.

Andrade, C.D., Yanez, C.O., Rodriguez, L., and Belfield, K.D. (2010). A Series of Fluorene-Based Two-Photon Absorbing Molecules: Synthesis, Linear and Nonlinear Characterization, and Bioimaging. J. Org. Chem. *75*, 3975–3982.

Arias-Marin, E., Le Moigne, J., Maillou, T., Guillon, D., Moggio, I., and Geffroy, B. (2003). Amphiphilic Phenyl−Ethynylene Polymers and Copolymers. Synthesis, Characterization, and Optical Emission Properties. Macromolecules *36*, 3570–3579.

Banaszynski, L.A., and Wandless, T.J. (2006). Conditional Control of Protein Function. Chem. Biol. *13*, 11–21.

Bao, C., Fan, G., Lin, Q., Li, B., Cheng, S., Huang, Q., and Zhu, L. (2012). Styryl Conjugated Coumarin Caged Alcohol: Efficient Photorelease by Either One-Photon Long Wavelength or Two-Photon NIR Excitation. Org. Lett. *14*, 572–575.

Barden, T.C., Buckwalter, B.L., Testa, R.T., Petersen, P.J., and Lee, V.J. (1994). “Glycylcyclines”. 3. 9-Aminodoxycyclinecarboxamides. J. Med. Chem. *37*, 3205–3211.

Beverina, L., Fu, J., Leclercq, A., Zojer, E., Pacher, P., Barlow, S., Van Stryland, E.W., Hagan, D.J., Brédas, J.-L., and Marder, S.R. (2005). Two-Photon Absorption at Telecommunications Wavelengths in a Dipolar Chromophore with a Pyrrole Auxiliary Donor and Thiazole Auxiliary Acceptor. J. Am. Chem. Soc. *127*, 7282–7283.

Bieschke, E.T., Wheeler, J.C., and Tower, J. (1998). Doxycycline-induced transgene expression during Drosophila development and aging. Mol. Gen. Genet. MGG *258*, 571–579.

Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A., and Ekker, S.C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. Zebrafish *6*, 69–77.

Blidner, R.A., Svoboda, K.R., Hammer, R.P., and Monroe, W.T. (2008). Photoinduced RNA interference using DMNPE-caged 2'-deoxy-2'-fluoro substituted nucleic acids in vitro and in vivo. Mol. Biosyst. *4*, 431–440.

Boothe, J.H., Hlavka, J.J., Petisi, J.P., and Spencer, J.L. (1960). 6-DEOXYTETRACYCLINES. I. CHEMICAL MODIFICATION BY ELECTROPHILIC SUBSTITUTION. J. Am. Chem. Soc. *82*, 1253–1254.

Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat. Neurosci. *8*, 1263–1268.

Brubaker, J.D., and Myers, A.G. (2007). A Practical, Enantioselective Synthetic Route to a Key Precursor to the Tetracycline Antibiotics. Org. Lett. *9*, 3523–3525.

Buskirk, A.R., and Liu, D.R. (2005). Creating Small-Molecule-Dependent Switches to Modulate Biological Functions. Chem. Biol. *12*, 151–161.

Cambridge, S.B., Geissler, D., Keller, S., and Cürten, B. (2006). A caged doxycycline analogue for photoactivated gene expression. Angew. Chem. Int. Ed Engl. *45*, 2229–2231.

Cambridge, S.B., Geissler, D., Calegari, F., Anastassiadis, K., Hasan, M.T., Stewart, A.F., Huttner, W.B., Hagen, V., and Bonhoeffer, T. (2009). Doxycycline-dependent photoactivated gene expression in eukaryotic systems. Nat. Methods *6*, 527–531.

Canepari, M., Nelson, L., Papageorgiou, G., Corrie, J.E.T., and Ogden, D. (2001). 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.

Charest, M.G., Lerner, C.D., Brubaker, J.D., Siegel, D.R., and Myers, A.G. (2005). A convergent enantioselective route to structurally diverse 6-deoxytetracycline antibiotics. Science *308*, 395–398.

Chassaing, S., Bénéteau, V., and Pale, P. (2016). When CuAAC "Click Chemistry" goes heterogeneous. Catal. Sci. Technol. *6*, 923–957.

Chaulk, S.G., and MacMillan, A.M. (1998). Caged RNA: photo-control of a ribozyme reaction. Nucleic Acids Res. *26*, 3173–3178.

Chen, D., Gibson, E.S., and Kennedy, M.J. (2013). A light-triggered protein secretion system. J. Cell Biol. *201*, 631–640.

Chen, S., Fahmi, N.E., Nangreave, R.C., Mehellou, Y., and Hecht, S.M. (2012). Synthesis of pdCpAs and transfer RNAs activated with thiothreonine and derivatives. Bioorg. Med. Chem. *20*, 2679–2689.

Chen, Z., Li, N., Chen, L., Lee, J., and Gassensmith, J.J. (2016). Dual Functionalized Bacteriophage Qβ as a Photocaged Drug Carrier. Small *12*, 4563–4571.

Cheng, L.T., Tam, W., Stevenson, S.H., Meredith, G.R., Rikken, G., and Marder, S.R. (1991). Experimental investigations of organic molecular nonlinear optical polarizabilities. 1. Methods and results on benzene and stilbene derivatives. J. Phys. Chem. *95*, 10631–10643.

Chinchilla, R., and Nájera, C. (2007). The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. Chem. Rev. *107*, 874–922.

Chiu, Y.-L., and Rana, T.M. (2002). RNAi in Human Cells. Mol. Cell *10*, 549–561.

Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *65*, 232–260.

Chopra, I., Hawkey, P.M., and Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. J. Antimicrob. Chemother. *29*, 245–277.

Christie, J.M., Gawthorne, J., Young, G., Fraser, N.J., and Roe, A.J. (2012). LOV to BLUF: Flavoprotein Contributions to the Optogenetic Toolkit. Mol. Plant *5*, 533–544.

Coffman, J.A., Dickey-Sims, C., Haug, J.S., McCarthy, J.J., and Robertson, A.J. (2004). Evaluation of developmental phenotypes produced by morpholino antisense targeting of a sea urchin Runx gene. BMC Biol. *2*, 6.

Conover, L.H., Moreland, W.T., English, A.R., Stephens, C.R., and Pilgrim, F.J. (1953). TERRAMYCIN. XI. TETRACYCLINE. J. Am. Chem. Soc. *75*, 4622–4623.

Coonrod, S.A., Bolling, L.C., Wright, P.W., Visconti, P.E., and Herr, J.C. (2001). A morpholino phenocopy of the mouse mos mutation. Genes. N. Y. N 2000 *30*, 198–200.

Corrie, J.E.T., and Trentham, D.R. (1992). Synthetic, mechanistic and photochemical studies of phosphate esters of substituted benzoins. J. Chem. Soc. [Perkin 1] *0*, 2409–2417.

Corrie, J.E.T., Furuta, T., Givens, R., Yousef, A.L., and Goeldner, M. (2005). Photoremovable Protecting Groups Used for the Caging of Biomolecules. In Dynamic Studies in Biology, urice Goeldner, and R.S. Givens, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 1–94.

Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. Curr. Biol. *8*, S1–S2.

Dantley, K.A., Dannelly, H.K., and Burdett, V. (1998). Binding interaction between Tet(M) and the ribosome: requirements for binding. J. Bacteriol. *180*, 4089–4092.

Dcona, M.M., Mitra, D., Goehe, R.W., Gewirtz, D.A., Lebman, D.A., and Hartman, M.C.T. (2012). Photocaged permeability: a new strategy for controlled drug release. Chem. Commun. *48*, 4755–4757.

Donato, L., Mourot, A., Davenport, C.M., Herbivo, C., Warther, D., Léonard, J., Bolze, F., Nicoud, J.-F., Kramer, R.H., Goeldner, M., et al. (2012). 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.

Dreuw, A., Polkehn, M.A., Binder, R., Heckel, A., and Knippenberg, S. (2012). Computational design of improved two-photon active caging compounds based on nitrodibenzofuran. J. Comput. Chem. *33*, 1797–1805.

Duggar, B.M. (1948). Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. Ann. N. Y. Acad. Sci. *51*, 177–181.

Durham, B., Caspar, J.V., Nagle, J.K., and Meyer, T.J. (1982). Photochemistry of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) ion. J. Am. Chem. Soc. *104*, 4803–4810.

Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 457–467.

Engels, J., and Schlaeger, E.J. (1977). Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-benzyltriesters. J. Med. Chem. *20*, 907–911.

Esengil, H., Chang, V., Mich, J.K., and Chen, J.K. (2007). Small-molecule regulation of zebrafish gene expression. Nat. Chem. Biol. *3*, 154–155.

Fenno, L., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2011). The Development and Application of Optogenetics. Annu. Rev. Neurosci. *34*, 389–412.

Fife, T.H., and McMahon, D.M. (1970). Hydrolysis of bis(4-nitrophenyl) carbonate and the general base catalyzed hydrolysis of o-(4-nitrophenylene) carbonate. J. Org. Chem. *35*, 3699–3704.

Forbes, D.C., Amin, S.R., Bean, C.J., and Standen, M.C. (2006). Aryl-Substituted Sulfonium Betaines: Preparation and Use in the Epoxidation of Aldehydes. J. Org. Chem. *71*, 8287–8290.

Frutos, S., Goger, M., Giovani, B., Cowburn, D., and Muir, T.W. (2010). Branched intermediate formation stimulates peptide bond cleavage in protein splicing. Nat. Chem. Biol. *6*, 527–533.

Furth, P.A., St Onge, L., Böger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., and Hennighausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 9302–9306.

Furuta, T., and Iwamura, M. (1998). New caged groups: 7-substituted coumarinylmethyl phosphate esters. Methods Enzymol. *291*, 50–63.

Furuta, T., Wang, S.S.-H., Dantzker, J.L., Dore, T.M., Bybee, W.J., Callaway, E.M., Denk, W., and Tsien, R.Y. (1999a). Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 1193–1200.

Furuta, T., Wang, S.S.-H., Dantzker, J.L., Dore, T.M., Bybee, W.J., Callaway, E.M., Denk, W., and Tsien, R.Y. (1999b). Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. *96*, 1193–1200.

Givens, R.S., and Matuszewski, B. (1984). Photochemistry of phosphate esters: an efficient method for the generation of electrophiles. J. Am. Chem. Soc. *106*, 6860–6861.

Givens, R.S., and Park, C.-H. (1996). p-Hydroxyphenacyl ATP1: A new phototrigger. Tetrahedron Lett. *37*, 6259–6262.

Givens, R.S., Athey, P.S., Matuszewski, B., Kueper, L.W., Xue, J., and Fister, T. (1993). Photochemistry of phosphate esters: .alpha.-keto phosphates as a photoprotecting group for caged phosphate. J. Am. Chem. Soc. *115*, 6001–6012.

Givens, R.S., Jung, A., Park, C.-H., Weber, J., and Bartlett, W. (1997). New Photoactivated Protecting Groups. 7. p-Hydroxyphenacyl: A Phototrigger for Excitatory Amino Acids and Peptides1. J. Am. Chem. Soc. *119*, 8369–8370.

Givens, R.S., Weber, J.F.W., Conrad, P.G., Orosz, G., Donahue, S.L., and Thayer, S.A. (2000). New Phototriggers 9: p-Hydroxyphenacyl as a C-Terminal Photoremovable Protecting Group for Oligopeptides. J. Am. Chem. Soc. *122*, 2687–2697.

Göppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. Ann. Phys. *401*, 273–294.

Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 5547–5551.

de Graaf, M., Zivkovic, D., and Joore, J. (1998). Hormone-inducible expression of secreted factors in zebrafish embryos. Dev. Growth Differ. *40*, 577–582.

Hachiya, S., Asai, K., and Konishi, G. (2013). Environment-responsive multicolor fluorescent dyes based on nitrophenyl or nitrophenylethynyl oligothiophene derivatives: correlation between fluorescence and π-conjugation length. Tetrahedron Lett. *54*, 3317–3320.

Hagen, V., Dekowski, B., Kotzur, N., Lechler, R., Wiesner, B., Briand, B., and Beyermann, M. (2008). {7-[Bis(carboxymethyl)amino]coumarin-4-yl}methoxycarbonyl Derivatives for Photorelease of Carboxylic Acids, Alcohols/Phenols, Thioalcohols/Thiophenols, and Amines. Chem. – Eur. J. *14*, 1621–1627.

Hasan, A., Stengele, K.-P., Giegrich, H., Cornwell, P., Isham, K.R., Sachleben, R.A., Pfleiderer, W., and Foote, R.S. (1997). Photolabile protecting groups for nucleosides: Synthesis and photodeprotection rates. Tetrahedron *53*, 4247–4264.

Hayashi, K., Hashimoto, K., Kusaka, N., Yamazoe, A., Fukaki, H., Tasaka, M., and Nozaki, H. (2006). Caged gene-inducer spatially and temporally controls gene expression and plant development in transgenic Arabidopsis plant. Bioorg. Med. Chem. Lett. *16*, 2470–2474.

He, G.S., Tan, L.-S., Zheng, Q., and Prasad, P.N. (2008). Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. Chem. Rev. *108*, 1245–1330.

Heasman, J., Kofron, M., and Wylie, C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: a novel antisense approach. Dev. Biol. *222*, 124–134.

Helmchen, F., and Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. Nat. Methods *2*, 932–940.

Herbivo, C., Omran, Z., Revol, J., Javot, H., and Specht, A. (2013). Synthesis and Characterization of Cell-Permeable Caged Phosphates that Can Be Photolyzed by Visible Light or 800 nm Two-Photon Photolysis. ChemBioChem *14*, 2277–2283.

Hochstein, F.A., Stephens, C.R., Conover, L.H., Regna, P.P., Pasternack, R., Gordon, P.N., Pilgrim, F.J., Brunings, K.J., and Woodward, R.B. (1953). The Structure of Terramycin1,2. J. Am. Chem. Soc. *75*, 5455–5475.

Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.-W., Park, J.H., Heck, M., and Ernst, O.P. (2009). A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. Trends Biochem. Sci. *34*, 540–552.

Huang, C.-J., Jou, T.-S., Ho, Y.-L., Lee, W.-H., Jeng, Y.-T., Hsieh, F.-J., and Tsai, H.-J. (2005). Conditional expression of a myocardium-specific transgene in zebrafish transgenic lines. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *233*, 1294–1303.

Jain, P.K., Shah, S., and Friedman, S.H. (2011). Patterning of Gene Expression Using New Photolabile Groups Applied to Light Activated RNAi. J. Am. Chem. Soc. *133*, 440–446.

Jakkampudi, S., Abe, M., Komori, N., Takagi, R., Furukawa, K., Katan, C., Sawada, W., Takahashi, N., and Kasai, H. (2016). Design and Synthesis of a 4-Nitrobromobenzene Derivative Bearing an Ethylene Glycol Tetraacetic Acid Unit for a New Generation of Caged Calcium Compounds with Two-Photon Absorption Properties in the Near-IR Region and Their Application in Vivo. ACS Omega *1*, 193–201.

Jung, T.S., Kim, J.H., Jang, E.K., Kim, D.H., Shim, Y.-B., Park, B., and Shin, S.C. (2000). Synthesis and physical properties of α,ω-bis[Co2(CO)6{μ-η2:η2-C(R)C}]oligothiophenes. J. Organomet. Chem. *599*, 232–237.

Juzenas, P., Juzeniene, A., Kaalhus, O., Iani, V., and Moan, J. (2002). Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo. Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. *1*, 745–748.

Kaplan, J.H., Forbush, B., and Hoffman, J.F. (1978). 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.

Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., and Tucker, C.L. (2010). Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nat. Methods *7*, 973–975.

Kerry, C.J., Ramsey, R.L., Sansom, M.S.P., and Usherwood, P.N.R. (1988). Glutamate Receptor Channel Kinetics. Biophys. J. *53*, 39–52.

Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lübbert, H., and Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 10933–10938.

Klán, P., Šolomek, T., Bochet, C.G., Blanc, A., Givens, R., Rubina, M., Popik, V., Kostikov, A., and Wirz, J. (2013). Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. Chem. Rev. *113*, 119–191.

Kolm, P.J., and Sive, H.L. (1995). Efficient hormone-inducible protein function in Xenopus laevis. Dev. Biol. *171*, 267–272.

Lin, W., and Lawrence, D.S. (2002). A Strategy for the Construction of Caged Diols Using a Photolabile Protecting Group. J. Org. Chem. *67*, 2723–2726.

Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P., and Tsien, R.Y. (2009). Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics. Biophys. J. *96*, 1803–1814.

Lin, W., Albanese, C., Pestell, R.G., and Lawrence, D.S. (2002). Spatially Discrete, Light-Driven Protein Expression. Chem. Biol. *9*, 1347–1353.

Link, K.H., Shi, Y., and Koh, J.T. (2005). Light Activated Recombination. J. Am. Chem. Soc. *127*, 13088–13089.

Liu, N.-A., Huang, H., Yang, Z., Herzog, W., Hammerschmidt, M., Lin, S., and Melmed, S. (2003). Pituitary Corticotroph Ontogeny and Regulation in Transgenic Zebrafish. Mol. Endocrinol. *17*, 959–966.

Makosza, M. (2010). Nucleophilic substitution of hydrogen in electron-deficient arenes, a general process of great practical value. Chem. Soc. Rev. *39*, 2855–2868.

Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C.V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., and Tanguay, R.L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. J. Biol. Chem. *282*, 35202–35210.

Menchi, G., Scrivanti, A., and Matteoli, U. (2000). Improvements in the synthesis of terminal alkynes via coupling of arylbromides with 2-methylbut-3-yn-2-ol. J. Mol. Catal. Chem. *152*, 77–82.

Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. Proc. Natl. Acad. Sci. *92*, 6991–6995.

Mignani, G., Leising, F., Meyrueix, R., and Samson, H. (1990). Synthesis of new thiophene compounds with large second order optical non-linearitles. Tetrahedron Lett. *31*, 4743–4746.

Miller-Bertoglio, V.E., Fisher, S., Sánchez, A., Mullins, M.C., and Halpern, M.E. (1997). Differential regulation of Chordin expression domains in mutant zebrafish. Dev. Biol. *192*, 537–550.

Monroe, W.T., McQuain, M.M., Chang, M.S., Alexander, J.S., and Haselton, F.R. (1999). Targeting Expression with Light Using Caged DNA. J. Biol. Chem. *274*, 20895–20900.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002). Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. Science *296*, 2395–2398.

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 13940–13945.

Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. Nat. Genet. *26*, 216–220.

No, D., Yao, T.P., and Evans, R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 3346–3351.

Olson, J.P., Banghart, M.R., Sabatini, B.L., and Ellis-Davies, G.C.R. (2013). Spectral Evolution of a Photochemical Protecting Group for Orthogonal Two-Color Uncaging with Visible Light. J. Am. Chem. Soc. *135*, 15948–15954.

Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor–operator system. Nat. Struct. Mol. Biol. *7*, 215–219.

Ostap, E.M., and Thomas, D.D. (1991). Rotational dynamics of spin-labeled F-actin during activation of myosin S1 ATPase using caged ATP. Biophys. J. *59*, 1235–1241.

Papageorgiou, G., Ogden, D.C., Barth, A., and Corrie, J.E.T. (1999). Photorelease of Carboxylic Acids from 1-Acyl-7-nitroindolines in Aqueous Solution: Rapid and Efficient Photorelease of l-Glutamate1. J. Am. Chem. Soc. *121*, 6503–6504.

Pardo, A., Reyman, D., Martin, E., Poyato, J.M.L., Camacho, J.J., Hidalgo, J., and Sanchez, M. (1988). Quantum yield and fluorescence lifetime measurements of neutral and cationic species for six β-carboline derivatives. J. Lumin. *42*, 163–168.

Park, C.-H., and Givens, R.S. (1997). New Photoactivated Protecting Groups. 6. p-Hydroxyphenacyl: A Phototrigger for Chemical and Biochemical Probes1,2. J. Am. Chem. Soc. *119*, 2453–2463.

Pawlicki, M., Collins, H.A., Denning, R.G., and Anderson, H.L. (2009). Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. Angew. Chem. Int. Ed. *48*, 3244–3266.

Pillai, V.N.R. (1980). Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis. Synthesis *1980*, 1–26.

Raffelberg, S., Wang, L., Gao, S., Losi, A., Gärtner, W., and Nagel, G. (2013). A LOV-domain-mediated blue-light-activated adenylate (adenylyl) cyclase from the cyanobacterium Microcoleus chthonoplastes PCC 7420. Biochem. J. *455*, 359–365.

Renicke, C., Schuster, D., Usherenko, S., Essen, L.-O., and Taxis, C. (2013). A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. Chem. Biol. *20*, 619–626.

Ridgway, P., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2000). Tetracycline-regulated gene expression switch in Xenopus laevis. Exp. Cell Res. *256*, 392–399.

Roberts, M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol. Rev. *19*, 1–24.

Rodriguez, J.G., Esquivias, J., Lafuente, A., and Rubio, L. (2006). Synthesis of conjugated 2 and 2,5-(ethenyl) and (ethynyl)phenylethynyl thiophenes: fluorescence properties. Tetrahedron *62*, 3112–3122.

Sakmar, T.P. (2002). Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. Curr. Opin. Cell Biol. *14*, 189–195.

Satou, Y., Imai, K.S., and Satoh, N. (2001). Action of morpholinos in Ciona embryos. Genesis *30*, 103–106.

Schade, B., Hagen, V., Schmidt, R., Herbrich, R., Krause, E., Eckardt, T., and Bendig, J. (1999). Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)methyl Derivatives. 1. Photocleavage of (7-Methoxycoumarin-4-yl)methyl-Caged Acids with Fluorescence Enhancement. J. Org. Chem. *64*, 9109–9117.

Schindler, S.E., McCall, J.G., Yan, P., Hyrc, K.L., Li, M., Tucker, C.L., Lee, J.-M., Bruchas, M.R., and Diamond, M.I. (2015). Photo-activatable Cre recombinase regulates gene expression in vivo. Sci. Rep. *5*, 13627.

Schmidt, R., Geissler, D., Hagen, V., and Bendig, J. (2007). Mechanism of Photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl Esters. J. Phys. Chem. A *111*, 5768–5774.

Seyfried, P., Eiden, L., Grebenovsky, N., Mayer, G., and Heckel, A. (2017). Photo-Tethers for the (Multi-)Cyclic, Conformational Caging of Long Oligonucleotides. Angew. Chem. Int. Ed. *56*, 359–363.

Shah, S., and Friedman, S.H. (2007). Tolerance of RNA Interference Toward Modifications of the 5' Antisense Phosphate of Small Interfering RNA. Oligonucleotides *17*, 35–43.

Shah, S., Rangarajan, S., and Friedman, S.H. (2005). Light-Activated RNA Interference. Angew. Chem. Int. Ed. *44*, 1328–1332.

Shah, S., Jain, P.K., Kala, A., Karunakaran, D., and Friedman, S.H. (2009). Light-activated RNA interference using double-stranded siRNA precursors modified using a remarkable regiospecificity of diazo-based photolabile groups. Nucleic Acids Res. *37*, 4508–4517.

Sheehan, J.C., and Wilson, R.M. (1964). Photolysis of Desyl Compounds. A New Photolytic Cyclization. J. Am. Chem. Soc. *86*, 5277–5281.

Sheik-Bahae, M., Said, A.A., Wei, T.-H., Hagan, D.J., and Van Stryland, E.W. (1990). Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. IEEE J. Quantum Electron. *26*, 760–769.

Shembekar, V.R., Chen, Y., Carpenter, B.K., and Hess, G.P. (2005). A Protecting Group for Carboxylic Acids That Can Be Photolyzed by Visible Light. Biochemistry (Mosc.) *44*, 7107–7114.

Shembekar, V.R., Chen, Y., Carpenter, B.K., and Hess, G.P. (2007). Coumarin-Caged Glycine that Can Be Photolyzed within 3 µs by Visible Light †. Biochemistry (Mosc.) *46*, 5479–5484.

Shestopalov, I.A., Sinha, S., and Chen, J.K. (2007). Light-controlled gene silencing in zebrafish embryos. Nat. Chem. Biol. *3*, 650–651.

Siemsen, null, Livingston, null, and Diederich, null (2000). Acetylenic Coupling: A Powerful Tool in Molecular Construction. Angew. Chem. Int. Ed Engl. *39*, 2632–2657.

Sinha, D.K., Neveu, P., Gagey, N., Aujard, I., Benbrahim-Bouzidi, C., Le Saux, T., Rampon, C., Gauron, C., Goetz, B., Dubruille, S., et al. (2010). Photocontrol of Protein Activity in Cultured Cells and Zebrafish with One- and Two-Photon Illumination. ChemBioChem *11*, 653–663.

Sonogashira, K., Tohda, Y., and Hagihara, N. (1975). A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. Tetrahedron Lett. *16*, 4467–4470.

Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. J. Mol. Biol. *150*, 467–486.

Stierl, M., Stumpf, P., Udwari, D., Gueta, R., Hagedorn, R., Losi, A., Gärtner, W., Petereit, L., Efetova, M., Schwarzel, M., et al. (2011). Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium Beggiatoa. J. Biol. Chem. *286*, 1181–1188.

Sum, P.-E., Lee, V.J., Testa, R.T., Hlavka, J.J., Ellestad, G.A., Bloom, J.D., Gluzman, Y., and Tally, F.P. (1994). Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. J. Med. Chem. *37*, 184–188.

Sun, C., Wang, Q., Brubaker, J.D., Wright, P.M., Lerner, C.D., Noson, K., Charest, M., Siegel, D.R., Wang, Y.-M., and Myers, A.G. (2008). A Robust Platform for the Synthesis of New Tetracycline Antibiotics. J. Am. Chem. Soc. *130*, 17913–17927.

Tamura, N., Konishi, S., and Yamaguchi, A. (2003). Mechanisms of drug/H+ antiport: complete cysteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach. Curr. Opin. Chem. Biol. *7*, 570–579.

Tang, X., and Dmochowski, I.J. (2006). Controlling RNA Digestion by RNase H with a Light-Activated DNA Hairpin. Angew. Chem. Int. Ed. *45*, 3523–3526.

Tang, X., and Dmochowski, I.J. (2007). Synthesis of light-activated antisense oligodeoxynucleotide. Nat. Protoc. *1*, 3041–3048.

Tang, X., Maegawa, S., Weinberg, E.S., and Dmochowski, I.J. (2007). Regulating Gene Expression in Zebrafish Embryos Using Light-Activated, Negatively Charged Peptide Nucleic Acids. J. Am. Chem. Soc. *129*, 11000–11001.

Tang, X., Swaminathan, J., Gewirtz, A.M., and Dmochowski, I.J. (2008). Regulating gene expression in human leukemia cells using light-activated oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. *36*, 559–569.

Taniguchi, A., Sohma, Y., Kimura, M., Okada, T., Ikeda, K., Hayashi, Y., Kimura, T., Hirota, S., Matsuzaki, K., and Kiso, Y. (2006). "Click peptide" based on the "o-acyl isopeptide method": control of A beta1-42 production from a photo-triggered A beta1-42 analogue. J. Am. Chem. Soc. *128*, 696–697.

Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell *51*, 503–512.

Twarowski, A.J., and Kliger, D.S. (1977). Multiphoton absorption spectra using thermal blooming. Chem. Phys. *20*, 259–264.

Walbert, S., Pfleiderer, W., and Steiner, U.E. (2001). Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Mechanistic Studies of the 2-(2-Nitrophenyl)ethyl Group. Helv. Chim. Acta *84*, 1601–1611.

Walker, J.W., Somlyo, A.V., Goldman, Y.E., Somlyo, A.P., and Trentham, D.R. (1987). Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. Nature *327*, 249–252.

Wang, X., Chen, X., and Yang, Y. (2012). Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. Nat. Methods *9*, 266–269.

Warther, D., Bolze, F., Léonard, J., Gug, S., Specht, A., Puliti, D., Sun, X.-H., Kessler, P., Lutz, Y., Vonesch, J.-L., et al. (2010). Live-Cell One- and Two-Photon Uncaging of a Far-Red Emitting Acridinone Fluorophore. J. Am. Chem. Soc. *132*, 2585–2590.

Weis, S., Shafiq, Z., Gropeanu, R.A., and del Campo, A. (2012). Ethyl substituted coumarin-4-yl derivatives as photoremovable protecting groups for amino acids with improved stability for SPPS. J. Photochem. Photobiol. Chem. *241*, 52–57.

Willenbucher, R.F., Xie, Y.N., Eysselein, V.E., and Snape, W.J. (1992). Mechanisms of cAMP-mediated relaxation of distal circular muscle in rabbit colon. Am. J. Physiol. *262*, G159-164.

Wöll, D., Smirnova, J., Galetskaya, M., Prykota, T., Bühler, J., Stengele, K.-P., Pfleiderer, W., and Steiner, U.E. (2008). 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.

Wu, R.-H., Hu, S., Xu, H.-H., Wei, X.-Y., and Hu, L. (2007). The synthesis and photolarvicidal activity of 2,5-diarylethynylthiophenes. J. Photochem. Photobiol. B *88*, 180–184.

Xu, C., and Webb, W.W. (1996). Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. JOSA B *13*, 481–491.

Xu, C., Denk, W., Guild, J., and Webb, W.W. (1995). Determination of absolute two-photon excitation cross sections by in situ second-order autocorrelation. Opt. Lett. *20*, 2372–2374.

Yao, S., and Belfield, K.D. (2012). Two-Photon Fluorescent Probes for Bioimaging. Eur. J. Org. Chem. *2012*, 3199–3217.

Zimmermann, M., Cal, R., Janett, E., Hoffmann, V., Bochet, C.G., Constable, E., Beaufils, F., and Wymann, M.P. (2014). Cell-Permeant and Photocleavable Chemical Inducer of Dimerization. Angew. Chem. Int. Ed. *53*, 4717–4720.

(2002). Handbook of organopalladium chemistry for organic synthesis (New York: Wiley-Interscience).

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Bastien GOEGAN

EDSC
École Doctorale des Sciences Chimiques

Synthèse et application d'inducteurs de gènes photo-activables pour le contrôle *in vivo* de l'expression d'un gène

Résumé

La structuration des réseaux neuronaux est un processus fondamental qui assure le bon fonctionnement du cerveau. Afin de comprendre la formation et l'activité de ces réseaux, nous souhaitons développer une méthode qui permette de contrôler *in vivo* sous l'action de la lumière l'expression de gènes ciblés impliqués dans ce phénomène, à l'échelle d'une cellule neuronale individuelle.

Pour ce faire, nous utilisons une réaction de photo-clivage permettant de libérer de façon contrôlée un inducteur d'expression de gène sous l'action de la lumière, à l'aide de groupements photo-labiles sensibles aux excitations bi-photoniques développés au laboratoire et favorables aux applications *in vivo*.

Afin de photo-réguler l'expression des gènes *in vivo* et avec un contrôle spatio-temporel élevé, nous combinons le système d'expression de gène inductible par la tétracycline « Tet-on » à une variété de précurseurs photo-activables d'analogues de tétracycline que nous avons synthétisés. Ceci devrait nous permettre de disposer d'un système efficace pour l'expression *in vivo* d'un gène d'intérêt par excitation lumineuse, et plus précisément dans le but de photo-réguler le gène Kir2.1 impliqué dans la régulation de l'activité électrique des neurones.

Mots-clés : groupements protecteurs photo-labiles, photolyse, absorption à deux photons, système d'expression de gène, tétracycline.

Abstract

The structural neural network's is a fundamental process that ensures the proper functioning of the brain. To understand the formation and activity of these networks, we are developing a method which spatio-temporally controlled in vivo, the expression of targeted genes involved in this process at individual neuron cells scale by light.

To achieve this *in vivo* tests, it is necessary to work with methods which are orthogonal to their cellular environment. Photochemical activation by photo-cleavage of an inert biological precursor offers a unique orthogonal way to attain this spatio-temporal control.

Therefore, we have recently developed a new family of photoremovable group which are sensitive to two-photon (TP) excitation sensitive, in order to irradiate at favorable wave-lengths for *in vivo* applications. Moreover, to photo-regulate the expression of genes with high spatial and temporal resolution, we are combining the inducible gene expression system by tetracycline called « Tet-on » system to different photo-activable precursors of tetracycline analogs obtained by hemi-synthesis.

All this, should allow us to get an effective system for the in vivo expression of a gene of interest by light excitation in order to photoactivate Kir2.1, a gene that cell-autonomously silences the electrical activity of neurons in a subset of cells.

Keywords : photo-removable groups, photolysis, two-photon absorption, gene expression system, tetracycline.