



HAL
open science

Développement de sondes fluorogéniques pour le suivi du métabolisme et de la croissance de bactéries en gouttes

Roxanne Ornstein

► To cite this version:

Roxanne Ornstein. Développement de sondes fluorogéniques pour le suivi du métabolisme et de la croissance de bactéries en gouttes. Biochimie [q-bio.BM]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS288 . tel-03420099v2

HAL Id: tel-03420099

<https://theses.hal.science/tel-03420099v2>

Submitted on 10 Nov 2021

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.

Sorbonne Université

École doctorale 406 Chimie moléculaire de Paris Centre

Laboratoire des biomolécules - UMR 7203

Équipe Peptides, glycoconjugués et métaux en biologie

Développement de sondes fluorogéniques pour le suivi du métabolisme et de la croissance de bactéries en gouttes

Par Roxanne Ornstein

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par le Dr. Jean-Maurice Mallet

Présentée et soutenue publiquement le 07 novembre 2019

Devant un jury composé de :

Pr. Joanne Xie	Professeur, ENS Paris Saclay	Rapporteur
Dr. Boris Vauzeilles	Directeur de recherche, Université Paris Saclay	Rapporteur
Dr. Jean Baudry	Directeur de recherche, ESPCI	Examineur
Dr. Jean-Maurice Mallet	Directeur de recherche, Sorbonne Université	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse. Je remercie le docteur Boris Vauzeilles et le professeur Joanne Xie d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ce travail de thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté pour ce sujet. Je remercie également Jean Baudry qui m'a beaucoup aidé à éclairer les mystères de la microbiologie et qui a accepté d'être examinateur pour cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Sandrine Sagan, directrice du Laboratoire des biomolécules, et Anne Boutin, directrice du département de chimie de l'ENS, pour m'avoir accueillie et m'avoir permis de réaliser cette thèse dans un environnement si riche et épanouissant.

Je tiens bien évidemment à exprimer tout ma gratitude à Jean-Maurice Mallet pour m'avoir donné la possibilité de mener à bien ce projet au sein de son équipe ainsi que pour son encadrement en tant que directeur de thèse. Merci pour ta très grande implication dans ce projet, pour avoir toujours été disponible pour le faire avancer en proposant de nombreuses idées.

Je tiens également à remercier Solange Lavielle pour son encadrement pendant les six premiers mois de la thèse. Même si j'ai dû changer de direction pour cette thèse, je n'oublierai pas ta bienveillance et ta rigueur scientifique qui m'a beaucoup appris.

Un très grand remerciement à Laurent Cattiaux. Merci pour ton immense patience et ta grande générosité et pour n'avoir jamais été exaspéré par mes très nombreuses questions !

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe de Jean-Maurice Mallet. Merci à Blaise Dumat pour avoir partagé avec moi de nombreux conseils pour m'ouvrir au monde de la fluorescence. Merci également aux doctorants et post-doctorants qui ont partagé ces années à mes côtés au laboratoire : Agathe, Sylvestre, Antonio et Pascal. Ces trois ans n'auraient pas été les mêmes sans vous.

Un grand merci à Arthur Goldstein pour tout le temps que tu as pris pour m'initier à la microbiologie

J'exprime également ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont collaboré à ce projet de thèse. Merci à Olivier Buriez pour m'avoir réconciliée avec l'électrochimie. Merci à Jean-Pierre Grill, Luisa De Sordi, Germain Trugnan, Garance Coquant et Loïc Brot pour les expériences en microscopie cellulaire.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe 1 du Laboratoire des biomolécules et particulièrement à Rodrigue Marquant. De grands remerciements également pour l'ensemble des doctorants du Laboratoire des Biomolécules

Je remercie enfin les membres de mon comité de suivi de thèse, Gilles Lemières, Olivia Bistri et Candice Botuha pour leurs encouragements et leurs précieux conseils.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	9
Introduction générale	13
Chapitre 1. Étude des activités physiologiques des bactéries grâce aux sondes fluorescentes	Erreur ! Signet non défini.
I. Bactéries : caractérisation et culture	17
1.1 Classification des bactéries	17
1.2 Croissance bactérienne.....	21
1.3 Culture bactérienne	24
1.3.1 Facteurs chimiques de croissance bactérienne.....	24
1.3.2 Conditions physico-chimiques des milieux de culture.....	27
1.3.3 Techniques de culture bactérienne	29
1.4 Caractérisation des bactéries : apport des composés chromogéniques.....	30
1.4.1 Observation directe en boîte de Petri.....	30
1.4.2 Galerie API.....	32
1.5 Caractérisation des bactéries : apport des composés fluorogéniques.....	33
II. Les différentes fonctions cellulaires d'intérêt des sondes physiologiques	36
2.1 Introduction et différents types de sondes.....	36
2.2 Le potentiel électrochimique de membrane	38
2.3 L'intégrité membranaire.....	40
2.4 L'activité enzymatique.....	42
2.4.1 Activité oxydoréductase.....	42
2.4.2 Activité transférase	46
2.4.3 Activité hydrolase	48
2.5 L'activité pompe	57
III. Positionnement du sujet de thèse	59
3.1 Ciblage des activités enzymatiques extracellulaires.....	59
3.2 Approche millifluidique	60
3.3 Design des sondes fluorogéniques.....	61
3.3.1 Structures générales des sondes.....	61
3.3.2 Choix des différents motifs	63
3.4 Autres types de sondes fluorescentes	64
Chapitre 2. Synthèse des sondes pH et glycosidases	Erreur ! Signet non défini.

I. Introduction.....	67
II. Première stratégie de synthèse.....	67
2.1 Synthèse des fluorophores naphthalimide et coumarine.....	68
2.2 Étape de glycosylation.....	71
2.3 Couplage du polymère.....	75
III. Deuxième stratégie de synthèse.....	77
3.1 Synthèse de la sonde naphthalimide.....	78
3.2 Synthèse de la sonde coumarine.....	85
3.3 Synthèse de la sonde chlorocoumarine.....	86
IV. Synthèse de la sonde cyanine.....	90
4.1 Synthèse de la sonde pH cyanine.....	90
4.2 Glycosylation du fluorophore cyanine.....	93
Chapitre 3. Caractérisations physico-chimiques des sondes pH et glycosidases	
.....Erreur ! Signet non défini.	
I. Introduction à la fluorescence.....	99
II. Fonctionnement des sondes pH.....	101
III. Détermination du pKa des sondes pH.....	102
3.1 Sonde naphthalimide.....	102
3.2 Sonde coumarine.....	106
3.3 Sonde chlorocoumarine.....	108
3.4 Sonde cyanine.....	110
3.5 Sonde chlorocyanine.....	112
IV. Caractérisiques physico-chimiques des sondes.....	114
4.1 Fluorescence des sondes glycosidases.....	114
4.2 Détermination des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques.....	116
Chapitre 4. Études de l'activité pH et glycosidase des sondes en milieu microbiologique.....	
.....Erreur ! Signet non défini.	
I. Étude de l'activité pH des bactéries <i>Escherichia coli</i> en plaque 96 puits.....	121
1.1 Méthode expérimentale.....	121
1.2 Résultats et discussion.....	122
II. Études enzymatiques.....	126
1.1 Enzyme β -galactosidase.....	126
1.1.1 Test ONPG.....	126
1.1.2 Cinétique enzymatique des sondes galactosidases.....	128

1.2 Enzyme α -mannosidase	130
III. Étude de l'activité galactosidase des bactéries <i>Escherichia coli</i> en plaque 96 puits.....	132
3.1 Opéron lactose	132
3.2 Étude des sondes galactosidases en milieu microbiologique.....	133
3.2.1 Méthode expérimentale	133
3.2.2 Activité de la sonde naphthalimide.....	134
3.2.3 Activité de la sonde chlorocoumarine	136
3.2.4 Modification de la concentration en lactose.....	140
3.2.5 Étude de l'influence du polymère.....	145
3.3 Contrôle négatif.....	147
3.3.1 Modification du milieu.....	147
3.3.2 Utilisation des sondes mannosidases	149
IV. Étude de l'activité galactosidase des bactéries <i>Escherichia coli</i> en milieu millifluidique	152
4.1 Le choix de la millifluidique digitale.....	152
4.2 Suivi de la sonde naphthalimide en milieu millifluidique	153
Chapitre 5. Synthèse et activités biologiques de sondes amphiphiles . Erreur ! Signet non défini.	
I. Introduction.....	159
II. Synthèse des sondes amphiphiles	161
III. Caractérisations physico-chimiques des sondes amphiphiles	162
IV. Activité biologique des sondes amphiphiles	164
4.1 Sonde amphiphile verte 61	164
4.1.1 Etude de toxicité.....	164
4.1.2 Suivi de la fluorescence des bactéries.....	167
4.2 Sonde amphiphile bleue 63	168
4.3 Étude des sondes amphiphiles en microscopie	172
4.3.1 Essai de visualisation en microscopie optique.....	172
4.3.2 Caractérisation de la localisation cellulaire des sondes amphiphiles	173
Chapitre 6. Synthèse et activités électrochimiques et biologiques de sondes d'oxydation	Erreur ! Signet non défini.
I. Introduction.....	177
II. Synthèse.....	179
2.1 Première stratégie de synthèse.....	179
2.2 Deuxième stratégie de synthèse	183

III. Étude électrochimique	185
3.1 Voltamétrie cyclique.....	185
3.1.1 Principe.....	185
3.1.2 Expérience.....	186
3.2 Électrolyse à potentiel imposé.....	189
3.2.1 Principe.....	189
3.2.2 Expérience.....	189
IV. Activité biologique	192
Conclusion générale et perspectives	195
I. Développement de nouvelles sondes fluorogéniques pour le suivi de l'activité glycosidase.....	195
II. Développement de sondes fluorogéniques amphiphiles pour le marquage des membranes.....	199
III. Développement de sondes d'oxydation.....	201
Experimental part	Erreur ! Signet non défini.
Annexes	Erreur ! Signet non défini.
Bibliographie	277

Liste des abréviations

Ac	Acétyl
Ac ₂ O	Anhydride acétique
AcOH	Acide acétique
API	Analytical profile index
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
APF	Acide 2-[6-(4V-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoïque
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbone
Boc ₂ O	Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
Bz	Benzoyl
CFDA	Carboxyfluorescein diacetate
CCCP	[(3-Chlorophényl)hydrazono]malononitrile
CCM	Chromatographie sur couche mince
CTC	Chlorure de 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DCM	Dichlorométhane
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPH	Diphénylhexatriène
DVC	Direct Viable Count

EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Em	Émission
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ES	Électrolyte support
ESBL	β -lactamases à spectre élargi
EtOH	Éthanol
Exc	Excitation
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FDA	Fluorescein diacetate
FMN	Flavine mononucléotide
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HBTU	3-[Bis(diméthylamino)méthylumyl]-3H-benzotriazol-1-oxide hexafluorophosphate
HFE	Hydrofluoroéter
HFP	Acide 2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoïque
HOBt	Hydroxybenzotriazole
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
mAG	Mycolyl-arabinogalactan
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
MeOH	Méthanol
MO	Micro-ondes
NAD	Nicotinamide adénine dinucleotide
NCS	N-chlorosuccinimide
ONP	Ortho-nitro-phénol

ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Photoinduced electron transfer
PEG	Polyéthylène glycol
pTsOH	Acide paratoluènesulfonique
PVA	Alcool polyvinylique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TA	Température ambiante
TBA.BF ₄	Tétrabutylammonium tétrafluoroborate
TDM	Tréhalose dimycolate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography
TMM	Tréhalose monomycolate
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultraviolet
WGA	Wheat germ agglutinin

Introduction générale

Les bactéries sont omniprésentes dans le monde qui nous entoure et pourtant une certaine méconnaissance demeure quant au mode de fonctionnement de ces microorganismes. Leur capacité d'adaptation aux conditions les plus variées et les plus extrêmes en font une composante majeure de la biodiversité. Bien qu'elles interviennent de manière essentielle dans notre processus de digestion, elles sont surtout réputées pour leur pouvoir pathogène et leur résistance grandissante aux antibiotiques. Les infections bactériennes sont aujourd'hui considérées comme un problème de santé majeur, du fait de leur sévérité et de leur gravité¹.

Une meilleure connaissance des mécanismes mis en jeu lors des infections bactériennes est nécessaire pour le développement de nouveaux traitements et de nouveaux outils diagnostique plus performants et plus rapides. Aujourd'hui, les conditions standards de détections des infections bactériennes se basent sur l'ensemble d'une population de bactéries et ne s'intéressent pas à l'échelle de la cellule seule. Une part critique de l'information se retrouve donc manquante, car la dynamique d'adaptation d'une sous-population bactérienne n'est pas prise en compte et peut pourtant se révéler être la plus virulente. L'objectif de ce projet de thèse, effectué en collaboration avec l'équipe de Jean Baudry à l'ESPCI, est d'identifier la diversité fonctionnelle des bactéries provenant d'un même échantillon en séparant les bactéries dans des gouttes et en les comparant entre elles. Pour cela, une approche millifluidique sera employée et de nouvelles sondes fluorescentes permettant de suivre la croissance et le métabolisme des bactéries seront développées.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à l'état de l'art et les différentes fonctions cellulaires pouvant être étudiées grâce aux sondes fluorescentes seront décrites. Le deuxième chapitre sera consacré à la synthèse des nouvelles sondes fluorescentes. Leurs propriétés de fluorescence seront étudiées dans le troisième chapitre. Les essais de suivi du métabolisme et de la croissance des bactéries d'abord

optimisés en plaques 96 puits, puis en milieu millifluidique feront l'objet du quatrième chapitre.

Les deux derniers chapitres de ce manuscrit présenteront des travaux réalisés en parallèle ciblant d'autres sondes fluorescentes fonctionnelles. Ainsi, le cinquième chapitre décrira la synthèse et l'activité de sondes amphiphiles capables de marquer les membranes cellulaires. Enfin, dans le sixième et dernier chapitre, une sonde capable de détecter l'oxydation d'un milieu sera développée.

Chapitre 1. Étude des activités physiologiques des bactéries grâce aux sondes fluorescentes

I. Bactéries : caractérisation et culture

1.1 Classification des bactéries

Les micro-organismes ont été observés pour la première fois au microscope en 1683 par Anthony van Leeuwenhoek. Il a pourtant fallu attendre deux siècles pour que l'identification et le phénotypage de cette nouvelle forme de vie devienne une réelle problématique scientifique. À cette époque, la très ancienne théorie de la génération spontanée commence à être remise en question et divise les scientifiques. Dès 1852, Rudolf Virchow soutient la théorie de la biogenèse selon laquelle une cellule vivante ne peut être engendrée que par une cellule vivante préexistante. Cependant, le manque de preuves concrètes ne permet pas encore de confirmer cette hypothèse. Quelques années plus tard, les travaux de Louis Pasteur et de Robert Koch, qui sont les premiers à mettre en évidence le processus de fermentation et la responsabilité des bactéries dans l'apparition de maladies infectieuses, réfutent complètement la théorie de la génération spontanée et posent les fondements de la microbiologie².

Dès les premières observations au microscope, des premiers niveaux taxonomiques ont pu être élaborés en étudiant les propriétés morphologiques des micro-organismes. Ces observations montrent dans un premier temps que les bactéries peuvent adopter plusieurs formes cellulaires (Figure 1) : sphériques ou cylindriques (cocci) ; à axe droit (bacille) ou incurvé (vibrion) ; sous forme de fuseau (fusiforme) ou de filament hélicoïdal ou courbé (spirille, borrelia, treponeme)³. Des regroupements en colonies sous forme de paires, des chaînes ou d'amas de bactéries sont également mis en évidence. Ces études posent les bases de la classification et de l'identification des bactéries dans la mesure où les différents types de colonies et les caractères morphologiques individuels résultent de l'expression de nombreux gènes et sont donc caractéristiques d'une espèce ou d'un genre de bactéries⁴.

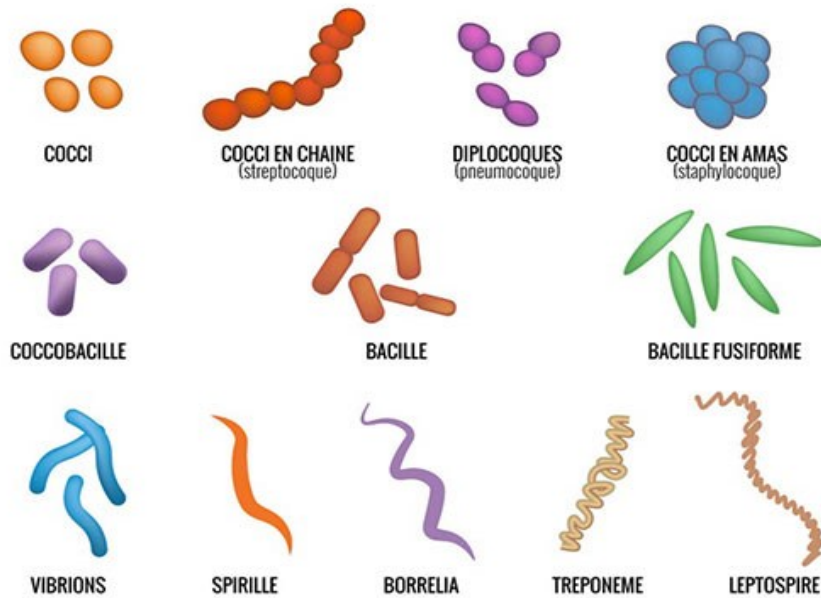


Figure 1 : Classification des bactéries selon leur forme⁵

Plus tard, l'étude plus précise de la cellule bactérienne a permis d'affiner ces premiers niveaux taxonomiques. Le bactériologiste Hans Christian Gram a ainsi développé, en 1884, un test colorimétrique permettant de séparer les bactéries en deux catégories en fonction de la structure et de la composition de leur paroi cellulaire. Ce test repose sur la coloration des bactéries à l'aide du violet de gentiane. La couleur violette reste fixée sur les bactéries à Gram positif, tandis qu'une décoloration est observée après traitement à l'alcool pour les bactéries à Gram négatif.

La paroi cellulaire correspond au squelette externe de la bactérie. Elle lui confère sa morphologie et l'empêche de se déformer lors de fortes variations de pression osmotique dans le milieu. Le composant principal de cette paroi est le peptidoglycane que l'on trouve à l'extérieur de la membrane cytoplasmique chez la majorité des bactéries. C'est une structure polymérique composée de plusieurs chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par de courts ponts interpeptidiques⁶. Chez les bactéries à Gram positif, la couche de peptidoglycane est beaucoup plus dense et épaisse que chez les bactéries à Gram négatif. Le peptidoglycane représente ainsi plus de 40% de la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram positif⁷ alors qu'il ne représente que 10 à 20% de la paroi chez les bactéries à Gram négatif. En outre, ces dernières possèdent une membrane externe asymétrique dont la structure ressemble à celle de la membrane cytoplasmique (Figure 2)⁸.

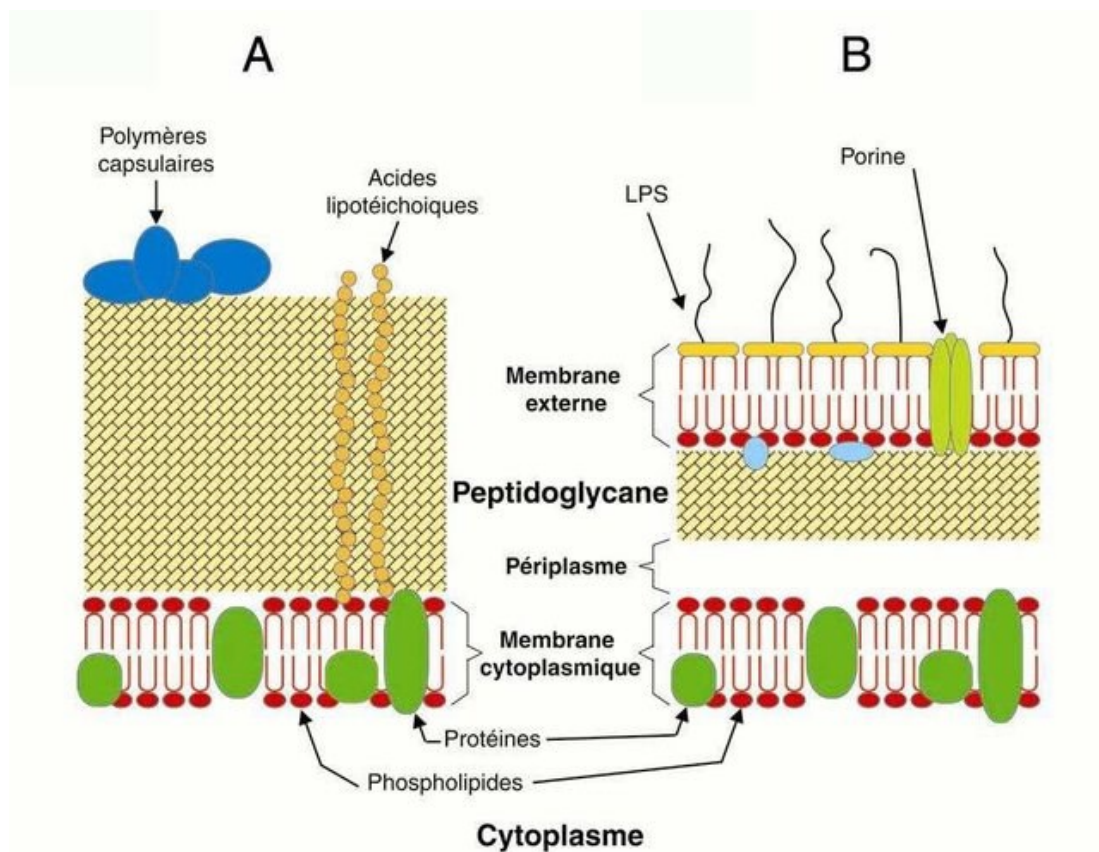


Figure 2: Différences de composition et de structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif (à gauche) et à Gram négatif (à droite)

Ces différentes méthodes basées sur la morphologie bactérienne ont permis une classification phénotypique des bactéries utile pour leur identification, mais n'apportaient aucune information sur les relations entre les différents micro-organismes d'un point de vue évolutif.

Les années 1970 sont marquées par la découverte majeure des enzymes de restriction, des enzymes capables de fragmenter l'ADN et qui entrent en jeu dans les mécanismes de défense contre les bactériophages. Cette évolution a permis le séquençage de l'ADN des micro-organismes et la mise au point d'une nouvelle approche basée sur l'étude des liens de parenté entre les procaryotes à partir de leur génome. Cette méthode, nommée phylogénétique, permet aux scientifiques de mieux comprendre la diversité et la complexité des cellules bactériennes. La distinction entre cellules procaryotes et eucaryotes est alors mieux définie et une nouvelle classification des procaryotes est

proposée, séparant bactéries et archées en deux sous-règnes distincts. L'existence des archées étaient connues depuis le début du siècle grâce aux travaux de Sohngen montrant que certains organismes peuvent utiliser le méthane comme source de carbone tandis que d'autres en produisent⁹. Cependant, l'étude réalisée par Woese sur l'ARN ribosomique établit le fait que les bactéries sont aussi différentes des eucaryotes que des archées¹⁰. Les grands groupes du vivant sont depuis divisés en trois domaines : eucaryotes, bactéries et archées (Figure 3)¹¹.

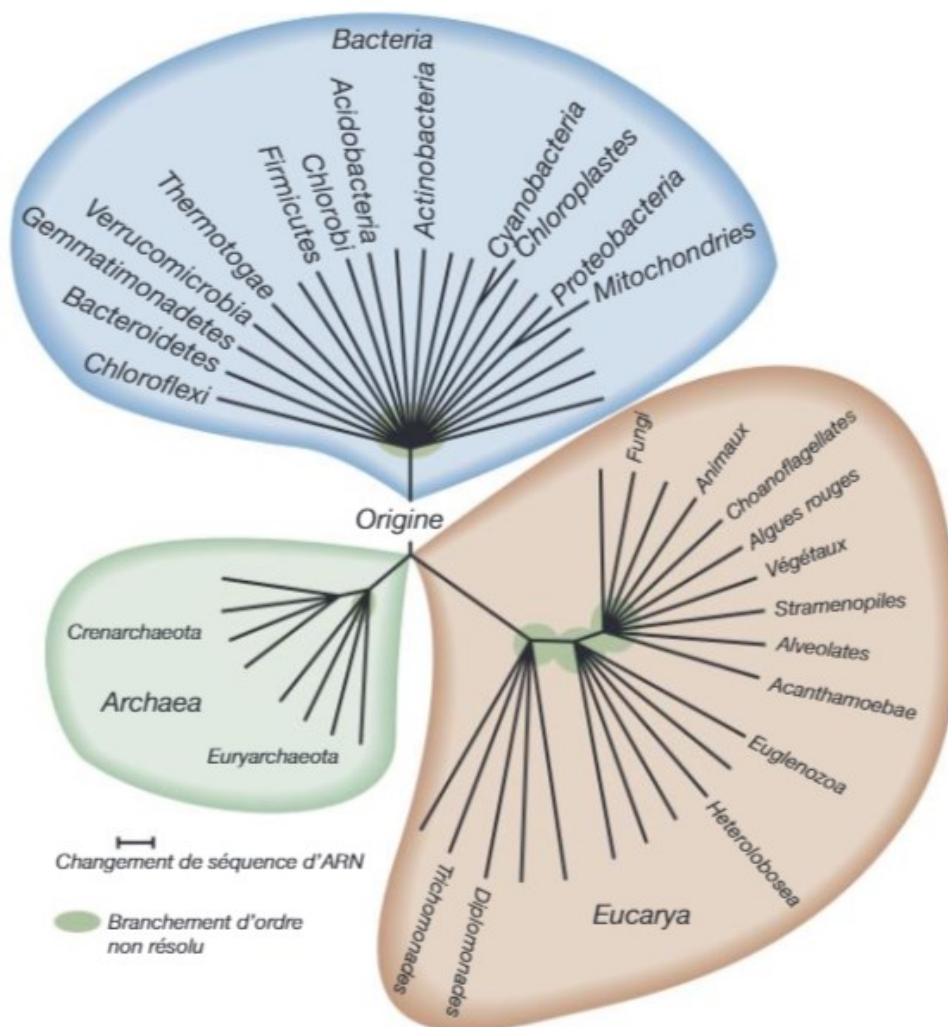


Figure 3 : Arbre phylogénétique universel basé sur les séquences d'ARN ribosomique⁴

1.2 Croissance bactérienne

Chez les micro-organismes, la croissance se caractérise par l'augmentation en taille, en masse et en volume de la cellule bactérienne suivie par une division cellulaire par fission binaire, ce qui se traduit par l'augmentation en nombre des bactéries¹². On simplifie donc souvent le concept de croissance bactérienne par l'augmentation de la biomasse sèche.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour estimer la croissance des bactéries à l'état planctonique qu'elles soient directes ou indirectes. Certaines méthodes se basent sur le dénombrement direct des bactéries viables par microscopie (méthode DVC)¹³, par comptage électronique grâce à la cytométrie de flux¹⁴ ou l'épifluorescence¹⁵ ou encore par comptage d'unités formant une colonie sur milieu de culture solide (UFC). D'autres méthodes se concentrent sur la détermination de la biomasse bactérienne comme la turbidimétrie qui est la mesure de l'absorbance d'une suspension bactérienne¹⁶.

Le taux de croissance des bactéries est un paramètre exponentiel et peut être modélisé par une courbe en six phases dans le cadre d'une croissance en milieu liquide sans renouvellement des constituants (Figure 4). La première phase est la phase de latence lors de laquelle la croissance bactérienne est nulle. C'est le temps nécessaire aux bactéries pour s'adapter à leur nouvel environnement et pour synthétiser les enzymes nécessaires à leur métabolisme. La croissance commence ensuite avec une phase d'accélération puis son taux atteint un maximum lors de la phase exponentielle. La vitesse de croissance va ensuite diminuer à cause d'un épuisement des ressources du milieu et l'accumulation de déchets toxiques jusqu'à une phase stationnaire où le taux de croissance redeviendra nul. Cette phase reflète un équilibre entre la multiplication cellulaire et la mort cellulaire. Enfin, la phase de déclin intervient lorsque le taux de croissance devient négatif¹⁷.

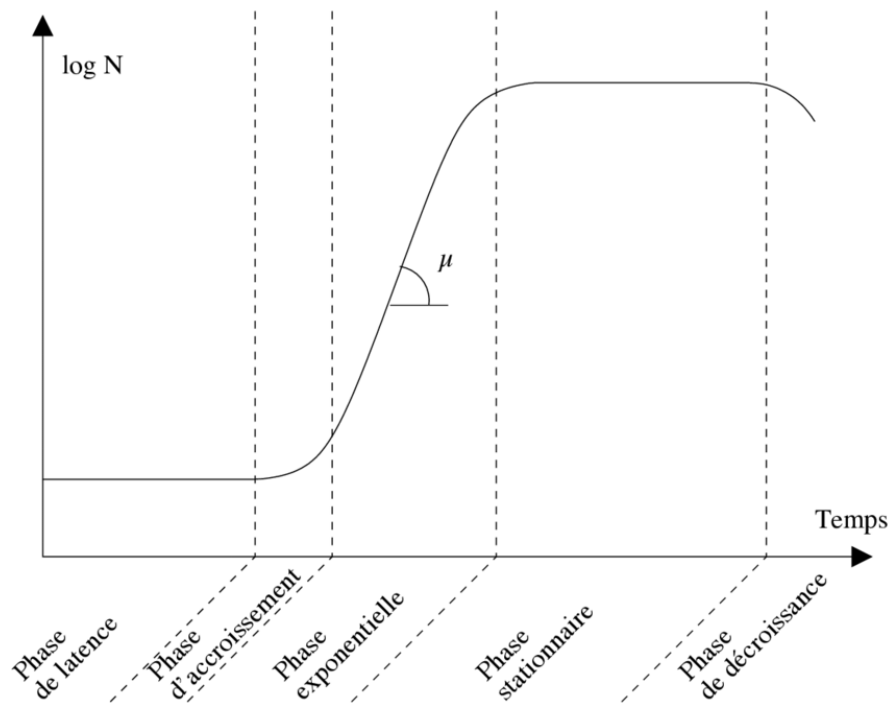


Figure 4: Courbe de croissance bactérienne¹⁸

Le déclin des bactéries en phase de décroissance est dû à un phénomène appelé autolyse des bactéries. En effet, les bactéries possèdent des enzymes endogènes nommées autolysines capables d'hydrolyser les liaisons covalentes du peptidoglycane composant la paroi cellulaire. Dans un contexte de privation nutritive ou en présence d'antibiotiques, ces enzymes vont bloquer la synthèse du peptidoglycane entraînant la destruction de la membrane bactérienne¹⁹. Malgré leurs effets autodestructeurs dans certaines conditions, les autolysines ont un rôle physiologique essentiel dans la croissance bactérienne puisqu'elles assurent notamment la régulation de la croissance de la paroi cellulaire, le renouvellement du peptidoglycane et jouent un rôle dans la séparation des cellules filles à la fin de la division cellulaire²⁰.

Les travaux de Costerton dans les années 1980 mettent en évidence la capacité des bactéries à s'organiser en biofilms alors caractérisés comme un agrégat de cellules bactériennes attachées à une surface et enrobées dans une matrice polymérique. Ces matrices extracellulaires sont présentes dans tous les environnements et sur une très

grande variété de surface et assurent une protection qui permet aux bactéries de survivre dans un milieu hostile²¹. Le biofilm est un environnement très hétérogène (autant dans la nature des bactéries qui la compose que dans sa structure) que l'on peut schématiser comme un système dynamique tridimensionnel dans lequel des courants aqueux transportent des nutriments jusqu'aux bactéries et éliminent leurs produits de dégradation²². Dans la nature, environ 80% de la biomasse bactérienne s'organise sous forme de biofilm. Les biofilms sont particulièrement étudiés en raison de la résistance qu'ils confèrent aux bactéries face à de nombreux agents antimicrobiens permettant aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. Elles seront également beaucoup plus résistantes aux antibiotiques comparativement aux bactéries planctoniques non organisées en biofilms (Figure 5)²³.

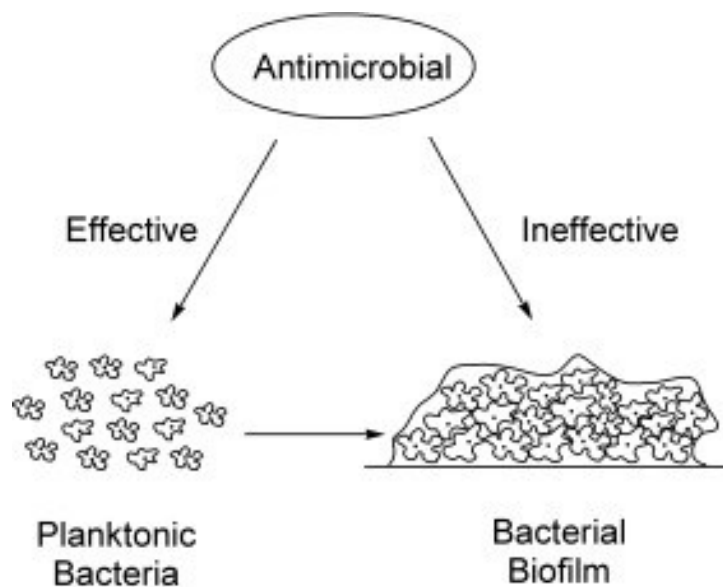


Figure 5 : Effet des agents antimicrobiens sur les bactéries

Selon que les bactéries soient en phase planctonique ou dans une phase de développement d'un biofilm, leurs états physiologiques vont différer. La formation d'un biofilm induit en effet une modification dans l'expression des gènes des bactéries et leur donnent des propriétés spécifiques de morphologie, de croissance et de communication²⁴. La caractérisation de ces phases spécifiques à chaque espèce est indispensable pour une

meilleure compréhension des différents phénotypes ou modifications métaboliques des bactéries.

La croissance des bactéries impliquées dans un biofilm est plus complexe et plus difficile à étudier du fait de l'organisation spatiale très hétérogène de cet environnement. Ainsi, au sein d'un même biofilm, les bactéries vont ainsi avoir des états physiologiques différents et donc se multiplier différemment²⁵.

1.3 Culture bactérienne

Pour contrôler la croissance *in vitro* des bactéries au laboratoire, il faut les mettre en culture dans des conditions bien précises. Cependant, avec les techniques actuelles, il est établi que seule 1 % de la biomasse bactérienne de la Terre peut être facilement cultivée *in vitro*²⁶. En effet, face à un environnement non familier et le manque de certains facteurs essentiels (oxygène, nutriments, température, pH, salinité, pression osmotique...), les bactéries peuvent adopter certaines stratégies de survie en diminuant leur activité métabolique les rendant incapables de proliférer²⁷. De plus, certaines bactéries auraient besoin, pour croître, d'interagir avec des molécules signal leur indiquant qu'elles sont bien dans un milieu connu²⁸. Il est donc essentiel d'adapter le milieu de culture en fonction de l'espèce de bactéries à étudier et d'identifier les nutriments requis ainsi que leur concentration²⁹.

1.3.1 Facteurs chimiques de croissance bactérienne

Les bactéries peuvent être classées en plusieurs catégories en fonction de leurs activités cataboliques. Certaines bactéries sont dites phototrophes, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour faire de la photosynthèse. Cependant, la plupart des bactéries étudiées sont chimiotrophes : elles utilisent des composés minéraux (lithotrophie) ou organiques (organotrophie) comme source d'énergie grâce à des réactions d'oxydo-réduction³⁰. Dans tous les cas, les bactéries ont besoin d'une source de carbone, d'azote, de soufre et de phosphore pour se développer.

Le carbone est le constituant majeur du matériel cellulaire et donc un élément indispensable pour les bactéries. Sa source la plus simple vient du CO₂. C'est l'unique source utilisée par les bactéries autotrophes. Les bactéries hétérotrophes, quant à elles, puisent plutôt leur besoin en carbone dans la dégradation de molécules hydrocarbonées comme les sucres. Le glucose est ainsi la source de carbone favorite de beaucoup de micro-organismes. Cette utilisation préférentielle des sources de carbone est un phénomène appelé répression catabolique du carbone.³¹ Jacques Monod a été le premier, en 1942, à mettre en évidence le fait que la présence d'au moins deux sources différentes de carbone va se traduire par une croissance diauxique des bactérie.³² Les bactéries vont ainsi assimiler en premier la source de carbone la plus rapidement métabolisable. Cette phase de croissance va être suivie par un temps de latence permettant aux bactéries de synthétiser les enzymes nécessaires pour la métabolisation de la source secondaire de carbone. Elle est ainsi suivie par une seconde phase de croissance exponentielle (Figure 6)³³.

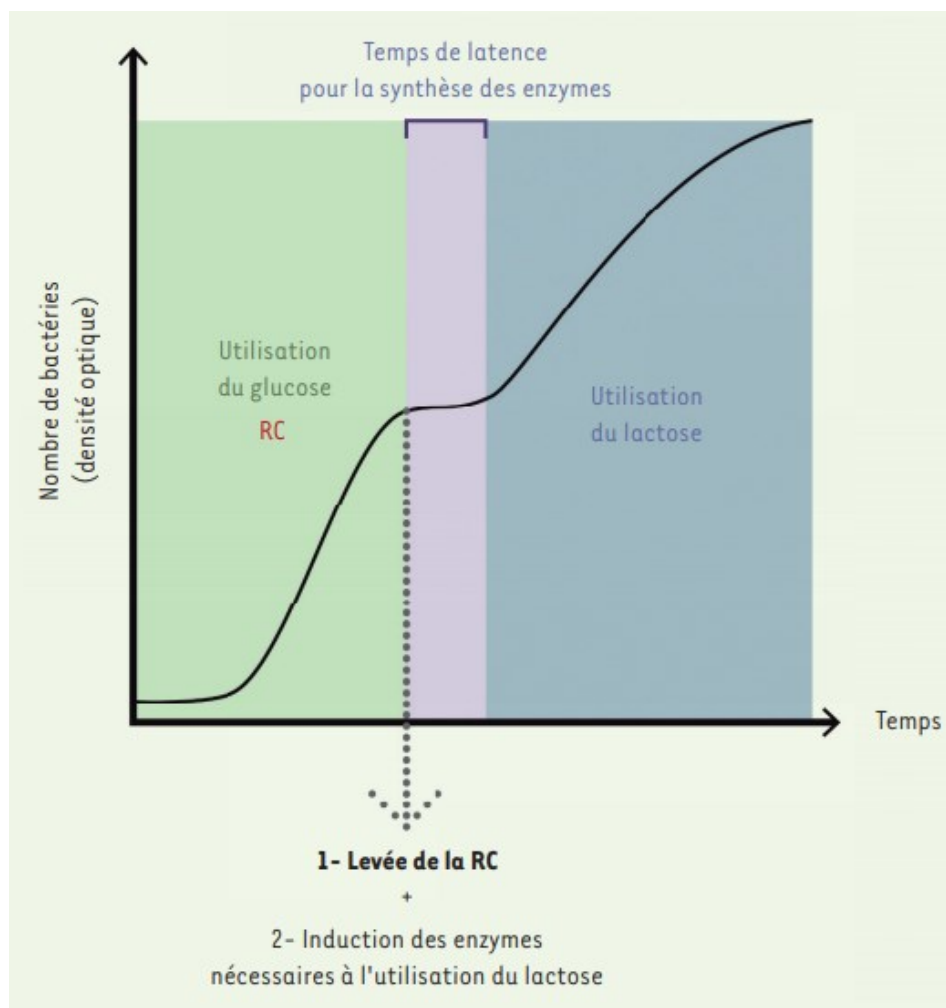


Figure 6 : Courbe de croissance diauxique de bactéries *Escherichia coli* en présence de glucose et de lactose

La répression catabolique du carbone est l'un des plus importants phénomènes de régulation globale des bactéries et a un impact majeur sur la physiologie d'un grand nombre de micro-organismes. Elle permet l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des sources de carbone secondaires ainsi que la régulation de l'expression de gènes intervenant dans des processus variés³³.

Certaines bactéries sont incapables de se développer dans un milieu contenant une seule source de carbone. Ces bactéries dites auxotrophes ont besoin de l'ajout de facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, bases azotées) dans le milieu de culture puisqu'elles sont incapables de les synthétiser elles-mêmes. *A contrario*, les bactéries prototrophes peuvent se diviser dans un milieu minimum contenant une seule source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux.

Le Tableau 1 propose un récapitulatif des différents types trophiques des bactéries.

Catégorie du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Lumineuse	Phototrophie
	Chimique	Chimiotrophie
Substrat énergétique	Minéral	Lithotrophie
	Organique	Organotrophie
Source de carbone	CO ₂	Autotrophie
	Substrats organiques	Hétérotrophie
Facteurs de croissance	Non indispensables	Prototrophie
	Indispensables	Auxotrophie

Tableau 1 : Récapitulatif des différents types trophiques des bactéries

En ce qui concerne les sources d'azote, certaines rares bactéries (*Azotobacter*, *Rhizobium*...) sont capables de fixer directement l'azote atmosphérique. Cependant, la plupart utilisent l'azote sous forme combinée : ammoniac, sel d'ammonium, nitrate, nitrite ou même issu de molécules organiques (acides aminés) après des réactions de

désamination ou de transamination. Les bactéries utilisent l'azote pour la synthèse de leurs protéines.

Les sources de soufre peuvent être issues de substances minérales ou organiques et les sources de phosphores viennent de phosphate inorganique. Ce dernier entre dans la composition des acides nucléiques et des phospholipides de la membrane plasmique ainsi que de l'adénosine triphosphate ou ATP (nucléotide essentiel qui intervient comme source de l'énergie cellulaire et dans la régulation d'activités enzymatiques)³⁴.

Enfin, les bactéries ont besoin, en très faible quantité, d'oligoéléments tels que le fer, le cuivre, le molybdène et le zinc qui sont essentiels au bon fonctionnement de certaines enzymes.

1.3.2 Conditions physico-chimiques des milieux de culture

Tous les facteurs chimiques décrits précédemment doivent être apportés dans un milieu où règnent des conditions physico-chimiques favorables pour l'espèce de bactéries à cultiver.

La présence de dioxygène est un élément à contrôler dans la culture des bactéries. Certaines bactéries dites aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'oxygène atmosphérique qui intervient dans la chaîne respiratoire, leur principale source d'énergie. La croissance de ces bactéries est limitée par la disponibilité du dioxygène. De nombreuses bactéries ont, dès lors, acquis la faculté de se développer en absence ou en présence variable de cet élément, ce sont les bactéries aéro-anaérobies facultatives. En l'absence de dioxygène, elles utilisent un métabolisme de type fermentatif ou de respiration anaérobie en remplaçant le dioxygène par d'autres accepteurs d'électrons. Enfin les bactéries anaérobies strictes ne peuvent pas se développer en présence de dioxygène et doivent se cultiver en milieu réducteur³⁵.

La température du milieu joue un rôle essentiel dans le développement des bactéries puisque celles-ci ne peuvent pas contrôler leur température interne. Chaque bactérie possède un intervalle de température optimum à laquelle sa croissance est favorisée. Les bactéries mésophiles comme *Escherichia Coli* se développent à une température optimale proche de celle du corps humain (37°C).

Comme pour la température, le pH va jouer un rôle important dans le développement des bactéries. On peut classer ces dernières en trois groupes :

- Les bactéries acidophiles qui se multiplient en milieu acide ;
- Les bactéries neutrophiles (la majorité) qui se multiplient à des pH compris en 5,5 et 8,5 ;
- Les bactéries alcalophiles qui se multiplient en milieu basique.

Dans les milieux de culture non ou peu tamponnés, une modification du pH est généralement induite en fonction du métabolisme de la bactérie : augmentation du pH dû à la décarboxylation d'acides aminés ou acidification dû à la dégradation de sucres. Il est important de tamponner le milieu de culture, car ces modifications de pH peuvent finir par faire obstacle au propre développement des bactéries. L'ajout de sel de phosphate permet ainsi à la fois de contrôler le pH du milieu et de servir de source de phosphore aux bactéries.

Les bactéries sont assez tolérantes aux variations de concentration ionique dans leur milieu et à des changements de pression osmotique, grâce à des systèmes de régulation exercés par la membrane cytoplasmique et à la rigidité de la paroi cellulaire³⁶. La disponibilité en eau dans le milieu de culture est un autre facteur déterminant de la croissance bactérienne. Ce phénomène est mesuré par l'activité de l'eau (A_w) qui est inversement proportionnelle à la pression osmotique et va donc être modifiée par la présence de sels ou de sucres dans le milieu. La plupart des bactéries se développent à des valeurs d' A_w comprises entre 0,91 et 1 (eau pure). Ainsi, la majorité des bactéries tolèrent la présence à des concentrations modérées d'ion sodium et, pour certaines, cet élément est même indispensable (bactéries halophiles). Il en va de même pour les sucres indispensables aux bactéries osmophiles.

1.3.3 Techniques de culture bactérienne

Il existe de nombreuses méthodes pour cultiver des bactéries que ce soit sur support solide ou en solution. Les milieux liquides sont utilisés pour cultiver des bactéries pures tandis que les milieux solides ou semi-solides permettent d'isoler des bactéries.

Historiquement, c'est le support solide gélifié et la boîte de Petri (du nom de son inventeur, Julius Richard Petri, 1852-1921) qui ont permis le développement de la culture bactérienne. Les premiers essais ont été réalisés avec de la gélatine, mais elle avait l'inconvénient d'être digérée et liquéfiée par les bactéries et trop facilement fusible. L'alternative du gel d'agarose, moins fusible et non dégradé par la majorité des bactéries, a été retenue depuis lors. À l'heure actuelle, le système le plus courant est un gel d'agarose dans une boîte de Petri contenant des conditions adaptées à la famille de bactéries que l'on veut observer : des éléments nutritifs et des composés inhibant la croissance d'autres bactéries (NaCl, tensioactifs, antibiotiques, etc.).

Ces techniques sont encore très utilisées pour leur fiabilité, leur simplicité technique et leur robustesse, mais tendent à être remplacées par de nouvelles méthodes que nous verrons par la suite.

Les milieux de culture les plus simples sont appelés milieux synthétiques, ce sont des milieux dont on connaît exactement la composition chimique qualitativement et quantitativement. Ils sont utilisés essentiellement pour cultiver des bactéries autotrophes ou étudier la croissance des bactéries chimio-organotrophes dans des milieux minimums. Ces dernières sont plus généralement cultivées dans des milieux complexes dont la composition est connue plus approximativement puisqu'elles dépendent des matières premières utilisées :

- extraits de viande ou de levure comme sources de vitamines et de facteurs de croissance ;

- peptones (hydrolysat de protéines) comme sources de carbone, d'azote et de soufre à la place des protéines qui sont difficilement solubles et métabolisables par les bactéries ;
- sucres ;
- liquides biologiques (sérum, sang...) occasionnellement.

Il est parfois nécessaire d'utiliser un milieu d'enrichissement qui est un milieu sélectif dans le sens où il favorise la croissance d'un seul type de micro-organisme. En général, il s'agit d'un milieu liquide qui favorise la multiplication des bactéries présentes initialement en faible quantité de manière à promouvoir la formation de colonies observables sur support gélifié³⁵.

1.4 Caractérisation des bactéries : apport des composés chromogéniques

Pour mieux caractériser les bactéries, des moyens permettant la mesure de leurs activités physiologiques comme la modification du pH du milieu ou la libération d'enzymes digestives (glycosidases, protéinases, lipases...) ont dû être développés. Ainsi, des composés donnant lieu à une réaction colorée (chromogénique) ont été proposés et inclus dans de nombreux kits commerciaux. On peut citer les deux principaux systèmes.

1.4.1 Observation directe en boîte de Petri

Le premier permet d'observer directement dans les boîtes de Petri certaines activités enzymatiques en les ciblant avec une grande spécificité. La société CHROMagar, par exemple, vend de nombreux milieux de culture pour l'identification de bactéries et de champignons³⁷.

Le principe de cette méthode repose sur la coloration des colonies bactériennes selon l'activité mesurée : le composé chromogénique est transformé en un pigment insoluble par la réaction enzymatique choisie dépendant des bactéries présentes. Le fait que le pigment soit insoluble présente deux avantages : une absence de diffusion dans le gel et peu de toxicité. Un substrat chromogénique idéal doit rester très localisé au sein de la

colonie de manière à ce que la différenciation entre les bactéries qui produisent l'enzyme cible et les autres soient clairement identifiable³⁸.

Parmi les chromogènes les plus exploités, on peut citer les dérivés du 3-hydroxy indole qui vont être hydrolysés par l'enzyme ciblée, puis oxydés pour donner un pigment indigo insoluble (Figure 7).



Figure 7: Coloration en indigo de la colonie de bactéries

La réaction qui a lieu est décrite dans le Schéma 1 : le groupe clivé par l'enzyme libère un 3-hydroxy indole qui s'oxyde spontanément à l'air et se dimérise pour donner le pigment. Les substituants halogénés sur l'indole vont avoir une grande influence sur la couleur du précipité qui peut aller du bleu au mauve³⁹.

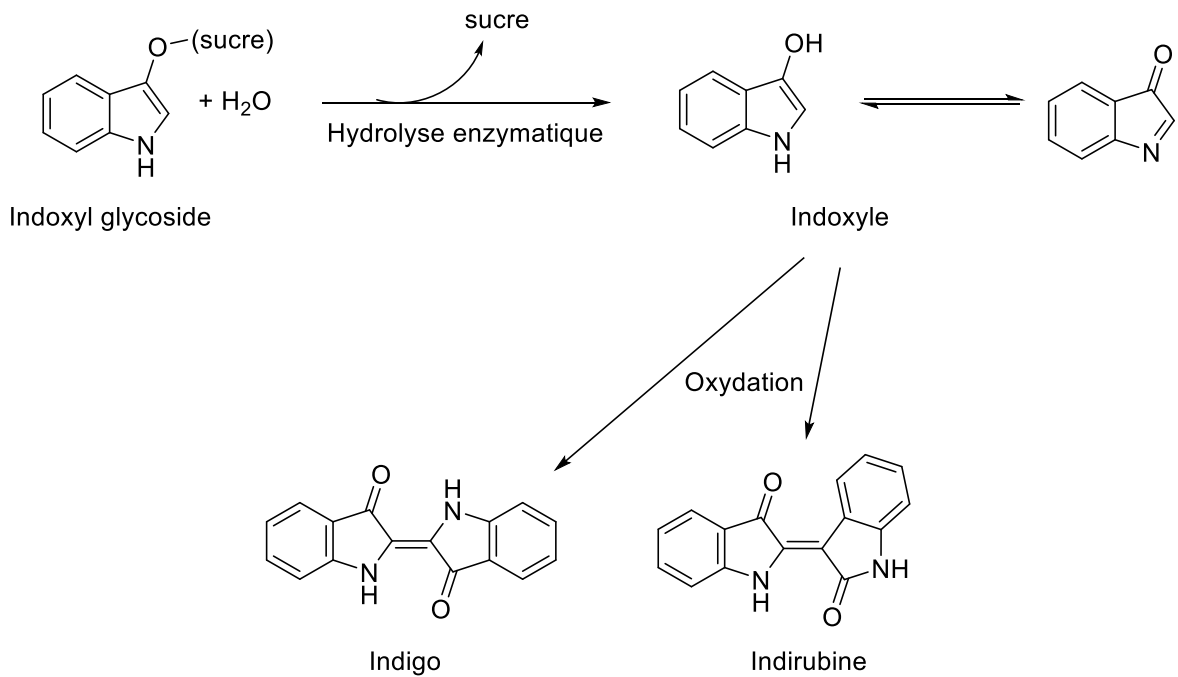


Schéma 1 : Réaction conduisant à la formation du pigment à partir du dérivé glycosilé du 3-hydroxy indol

Le choix du substrat se fait selon la bactérie (Tableau 2).

Pathogène	Enzyme ciblée
Bactéries à Gram positif	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Phosphatase ou α -glucosidase
<i>Clostridium difficile</i>	β -Glucosidase
<i>Streptococcus</i>	Phosphatase
Bactéries à Gram négatif	
<i>Salmonella</i>	C8-Estérase ou α -galactosidase
<i>Shigella</i>	β -Ribosidase
<i>Escherichia Coli</i>	β -Glucuronidase ou β -galactosidase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	β -Alanyl aminopeptidase

Tableau 2 : Exemples d'activités enzymatiques à cibler en fonction des bactéries

1.4.2 Galerie API

Le second dispositif est la galerie API (*analytical profile index*) dont le but est de caractériser une bactérie déjà isolée.

Cette technique a été mise au point dans les années 1970 pour l'identification d'entérobactéries, une des familles de bactéries à gram négatif la plus répandue. Aujourd'hui une vingtaine de tests ont été développés permettant l'identification d'environ 700 espèces de bactéries et de levures⁴⁰.

Le principe de cette méthode repose sur la mise en contact de l'inoculum bactérien avec un ensemble de substrats dont la modification de la coloration (ou l'absence de modification) après une période d'incubation donne un profil caractéristique. La coloration peut intervenir de manière spontanée ou être révélée par l'ajout de réactifs (Figure 8).



Figure 8 : Exemple de galerie d'API 20E pour l'identification de bactéries E-Coli⁴¹

1.5 Caractérisation des bactéries : apport des composés fluorogéniques

Les sondes fluorogéniques sont également très utilisées pour le suivi de l'activité physiologique des bactéries en milieux complexes et fonctionnent sur le même principe que les composés chromogéniques.

La grande différence de ces composés comparativement à des sondes fluorescentes classiques est le fait qu'ils n'émettent pas de fluorescence en début d'expérience⁴². En effet, la partie signalante de la sonde est couplée à une molécule qui désactive sa fluorescence. Le signal n'est alors libéré qu'une fois la sonde activée par un évènement déclencheur qui peut être une activité enzymatique, l'influence de la lumière ou une modification de milieu⁴³.

Dans le cas de la détection d'activités enzymatiques, trois principales méthodes d'activation de composés fluorogéniques ont été développées (Figure 9). Le groupe masquant la fluorescence peut être clivé ou bien modifié chimiquement par certaines enzymes entraînant la libération de la fluorescence (méthodes A et B). Généralement, le substituant clivé ou modifié libère un groupement phénol ou amine essentiel à la fluorescence. La troisième stratégie (méthode C) se base sur libération enzymatique de quenchers de sondes fluorescentes de type FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) ou PET (*Photoinduced electron transfer*). Les différentes enzymes ciblées sont généralement classées en fonction de la nomenclature EC (*Enzyme Commission numbers*) qui les répartit en fonction des réactions qu'elles catalysent. Les enzymes qui interviennent dans la modulation de fluorescence présentées précédemment sont les oxydoréductases (EC1), les transférases (EC2) et les hydrolases (EC3). Leurs activités seront développées dans la partie suivante. Ces modèles ne sont cependant pas adaptés pour cibler les enzymes de type lyases (EC4), isomérases (EC5) et ligases (EC6) présentent en trop faible quantité⁴⁴.

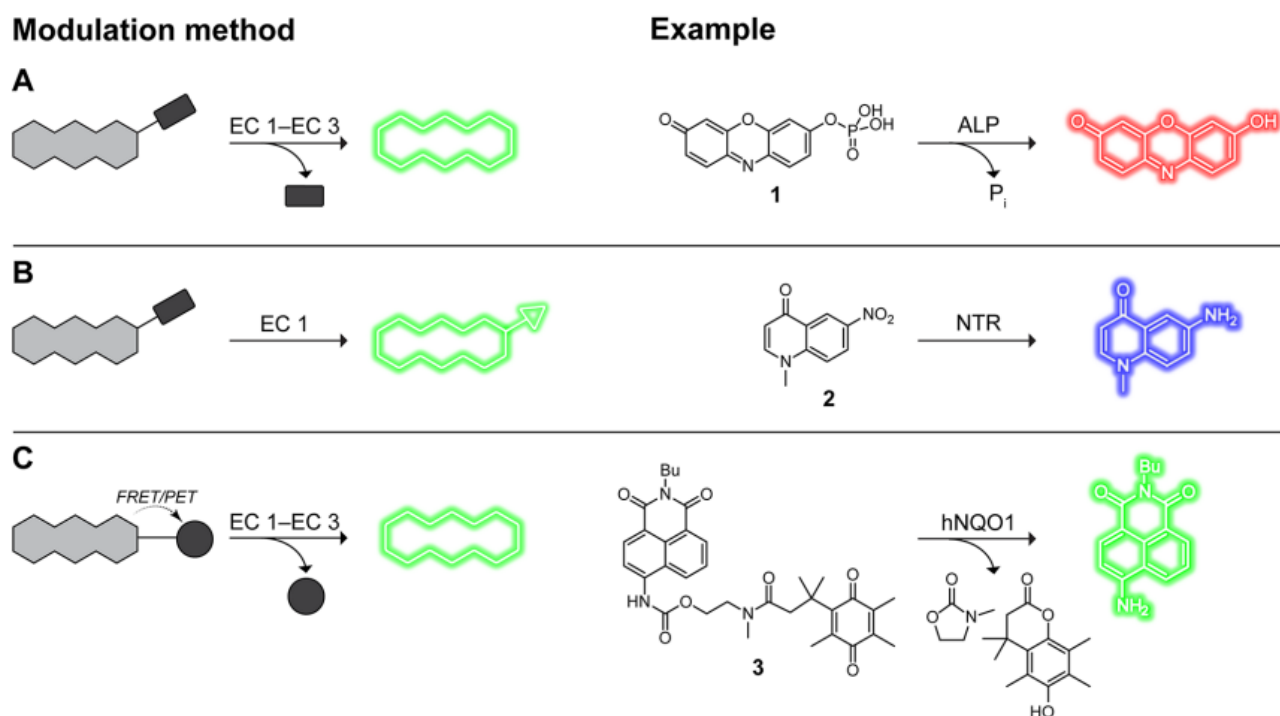


Figure 9 : Différentes méthodes de modulation de fluorescence utilisées dans la détection d'activités enzymatiques⁴⁴

Le principal avantage des sondes fluorogéniques vis-à-vis des composés chromogéniques est la grande sensibilité de la mesure, ce qui permet le suivi d'enzymes peu abondantes, mais caractéristiques ou présentes dans un milieu peu dense en bactéries (dans le cas d'une mesure en début de croissance ou de bactéries à croissance lente). Comparativement à la colorimétrie, cette technique permet également une quantification plus facile de l'activité enzymatique grâce à la limitation des interférences dues à d'autres composés.

L'une des difficultés majeures de cette technique vient de la présence de composés fluorescents endogènes qui confèrent aux bactéries une fluorescence intrinsèque nommée « autofluorescence ». Ce phénomène va induire l'apparition d'un bruit de fond et réduire la sensibilité de la sonde⁴⁵. De plus, les composés fluorogéniques utilisables pour le suivi en continue d'activités enzymatiques de bactéries doivent être élaborés selon un cahier des charges précis pour répondre à un certain nombre de critères :

- Les sondes doivent être stables dans le milieu physiologique. L'étude peut être envisagé avec un fluorophore soluble donnant un composé fluorescent insoluble, mais le plus souvent le composé fluorescent final sera lui aussi soluble.
- Le milieu de culture doit être adapté de manière à ce que les bactéries sécrètent l'enzyme d'intérêt qui doit cliver ou modifier sélectivement et efficacement le fluorophore. La fluorescence doit donc être libérée uniquement si la bactérie d'intérêt est présente dans le milieu⁴⁶.
- Les sondes, qu'elles soient activées ou non, ne doivent pas présenter de toxicité pour les bactéries au niveau cellulaire comme à celui de l'organisme entier et ne doivent pas perturber leur activité métabolique.

II. Les différentes fonctions cellulaires d'intérêt des sondes physiologiques

2.1 Introduction et différents types de sondes

La cellule bactérienne possède une incroyable hétérogénéité qui confère aux bactéries la capacité de survivre à travers les siècles dans une multitude d'environnements et même dans des conditions extrêmes. Les différentes espèces de bactéries présentent donc de très nombreuses disparités autant d'un point de vue génétique que phénotypique. Cette hétérogénéité peut être classée dans au moins quatre grandes catégories : les différences génétiques, physiologiques, morphologiques et comportementales⁴⁷. Parmi tous les outils disponibles pour étudier cette grande hétérogénéité bactérienne, la fluorescence présente de nombreux avantages et peut être utilisée pour cibler toutes sortes d'activités et de sites cellulaires (Figure 10)⁴⁸. Les sondes fluorescentes ou fluorogéniques peuvent être classées en deux catégories en fonction des informations qu'elles fournissent : les sondes taxonomiques qui permettent d'identifier l'appartenance taxonomique des micro-organismes étudiés⁴⁹ et les sondes physiologiques qui ciblent les activités métaboliques ou biochimiques des bactéries.

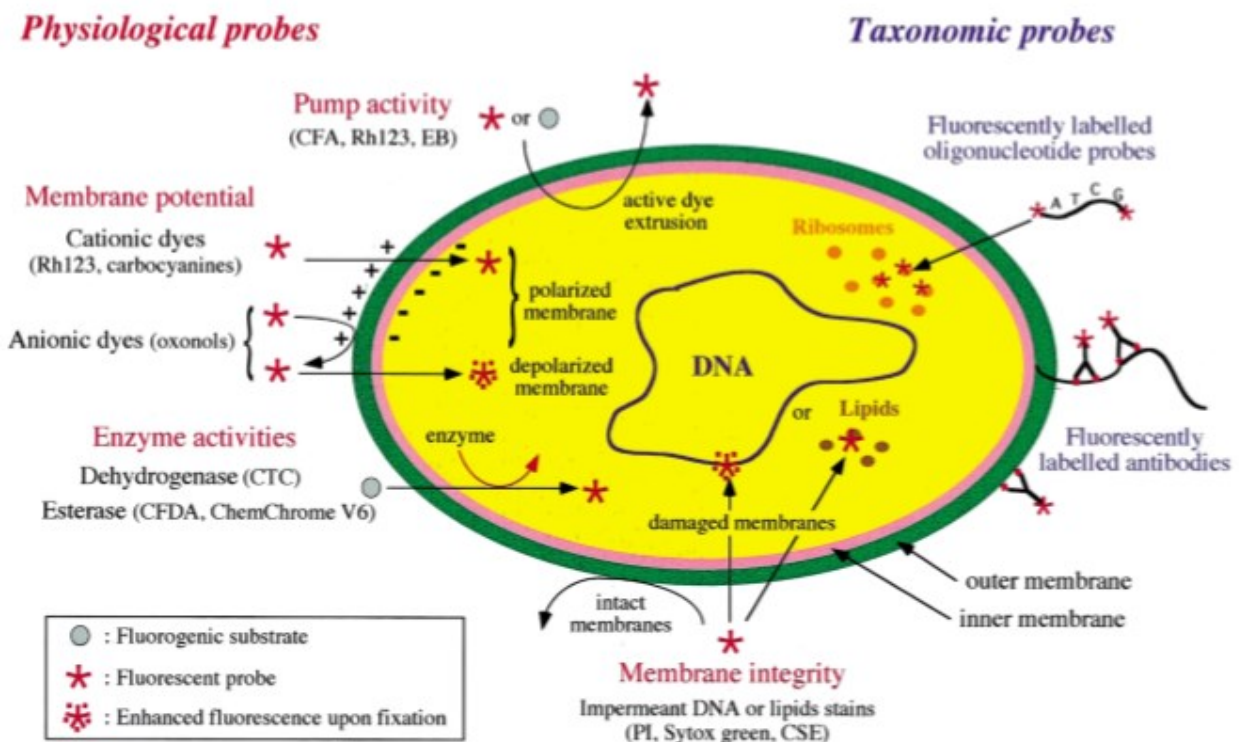


Figure 10 : Différents sites cellulaires ciblés par les sondes physiologiques et taxonomiques⁴⁸

Quatre types de sondes physiologiques peuvent être utilisées en fonction de l'activité à cibler. Les premières sont toujours capables de traverser la membrane cytoplasmique que la cellule bactérienne soit intacte ou bien rendue perméable. La seconde catégorie de sondes peut uniquement passer la membrane des cellules rendues perméables. Le troisième type sont les sondes fluorogènes qui permettent de cibler une activité enzymatique précise et peuvent agir de manière intracellulaire ou extracellulaire. Enfin, des sondes fluorescentes chargées sont utilisées pour la détection du potentiel électrochimique de membrane. Les différentes sondes peuvent être combinées pour mesurer plusieurs paramètres simultanément⁵⁰.

Le Tableau 3 récapitule différentes fonctions cellulaires que l'on peut cibler grâce aux sondes physiologiques et qui vont être détaillées par la suite.

Fonction cellulaire	Activité mesurée	Type de sondes
<i>Potentiel électrochimique de membrane</i>	Différence de répartition de charges de part et d'autre de la membrane cytoplasmique	Sondes fluorescentes anioniques ou cationiques perméables, se liant aux composés lipidiques
<i>Intégrité membranaire</i>	Perméabilité sélective de la membrane cytoplasmique	Sondes fluorescentes non perméables marquant les acides nucléiques
<i>Activité enzymatique</i>	Présence de certaines enzymes fonctionnelles	Sondes fluorogéniques
<i>Activité pompe</i>	Transport actif à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule	Sondes fluorescentes perméables marquant les acides nucléiques

Tableau 3 : Différents types de sondes à utiliser en fonction de la fonction cellulaire ciblée

En plus de cibler différentes activités cellulaires, les sondes peuvent également permettre de répondre à la question de la viabilité des cellules bactériennes. Pendant très longtemps, on a considéré que le caractère viable des cellules bactériennes était seulement lié à leur

capacité à se dupliquer. La croissance en culture des bactéries était donc le seul élément sur lequel les microbiologistes pouvaient se baser pour évaluer la viabilité des bactéries et les termes « viable » et « cultivable » étaient confondus. La mise en évidence de bactéries actives métaboliquement mais non cultivables a remis en question cette définition de la viabilité bactérienne et de nouvelles techniques, notamment de fluorescence, ont dû être mises au point pour prendre en compte les différentes formes d'activités cellulaires⁵¹.

2.2 Le potentiel électrochimique de membrane

La membrane cytoplasmique est une enveloppe qui sépare le cytoplasme du milieu extracellulaire ou d'un compartiment subcellulaire. Le compartiment intracellulaire est chargé négativement contrairement à l'extérieur de la membrane, ce qui induit une différence de potentiel électrochimique entre les deux faces de la membrane⁵². Ce potentiel s'explique plus particulièrement par les différences de concentration des ions répartis de chaque côté de la membrane (appelé gradient de concentration) et la perméabilité sélective de la membrane pour un grand nombre de substances dont certains ions. Ainsi, la membrane cytoplasmique peut s'opposer au passage de certains anions ou cations et en laisser d'autres rejoindre le compartiment intracellulaire grâce à des protéines transmembranaires que l'on nomme pompes ioniques et canaux ioniques. Les pompes ioniques sont ainsi capables de déplacer les ions à l'encontre de leur gradient de concentration en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP ou des gradients électrochimiques d'autres ions par échange d'ions. Les canaux ioniques, quant à eux, laissent passer les ions sélectivement grâce à un phénomène de diffusion passive qui ne nécessite pas d'apport d'énergie, car il ne va pas à l'encontre du gradient de concentration⁵³.

Le potentiel électrochimique joue ainsi un rôle clé dans divers processus essentiels au métabolisme cellulaire (synthèse de l'ATP, régulation du pH intracellulaire, import de petites molécules nutritives, export d'enzymes extracellulaires et de déchets, etc.) et est maintenu tout au long de la vie cellulaire⁴⁸. Cette importance physiologique explique la nécessité du développement de sondes sensibles au courant capables de mesurer le

potentiel de membrane des cellules bactériennes et de donner des informations sur la viabilité de celles-ci.

En fonction de la polarisation des cellules bactériennes, différentes sondes fluorescentes chargées peuvent être utilisées : des sondes cationiques pour les cellules polarisées et des sondes anioniques pour les cellules dépolariées. L'action de ces sondes est basée sur leur capacité à se lier à la bicouche phospholipidique chargée négativement à l'intérieur de la membrane, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence⁵⁰. La rhodamine 123 (Figure 11) est communément utilisée comme sonde cationique pour détecter le potentiel de membrane⁵⁴. Elle a cependant pour inconvénient de requérir une étape de perméabilisation dans le cas des bactéries à Gram négatif ce qui peut entraîner des biais dans certains résultats, notamment lors d'études liées à la résistance aux antibiotiques de ces micro-organismes.

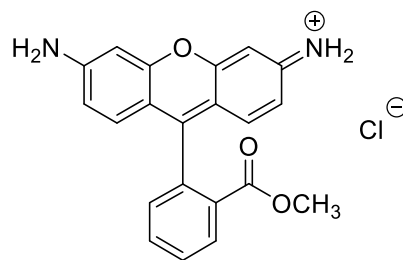


Figure 11: Structure de la Rhodamine 123

Ces inconvénients peuvent être évités par l'utilisation d'autres sondes cationiques de type carbocyanines (Figure 12). Cependant, ces sondes intracellulaires peuvent se lier à des régions hydrophobes non spécifiques de la cellule entraînant un faux signal positif. Elles risquent également de s'agréger ce qui cause de forts décalages des maximums d'absorption et/ou d'excitation⁵⁵.

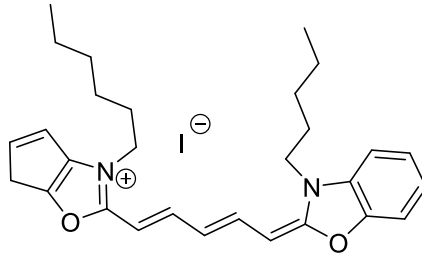


Figure 12: Exemple de carbocyanine utilisée pour la détection de potentiel de membre (iodure de 3,3'-dihexyloxycarbocyanine)

Dans le cas des sondes anioniques, les plus utilisées sont les bis-oxonols tels que le DiBAC₄(3) (Figure 13) qui sont plus efficaces pour mesurer le potentiel de membrane des bactériens à Gram négatif⁵⁰.

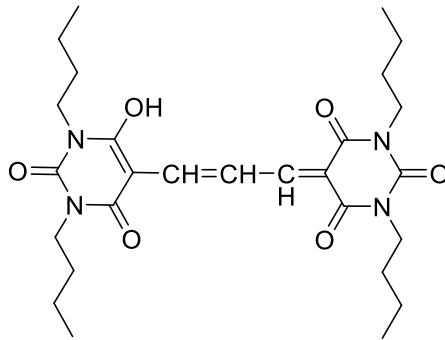


Figure 13 : Structure de la sonde DiBAC₄(3)

2.3 L'intégrité membranaire

Le maintien de l'intégrité membranaire est essentiel pour le bon fonctionnement des cellules bactériennes du fait de l'importance de la membrane cytoplasmique dans les activités métaboliques de la cellule bactérienne. La perte de l'intégrité membranaire est un phénomène généralement considéré comme irréversible et comme étant la principale cause de mort cellulaire même si des cas de régénérescence ont été rapportés⁵⁶. De plus, l'intégrité membranaire peut être affectée durant la phase exponentielle de croissance bactérienne.

L'étude de cette activité repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes qui, à faible concentration, ne traversent pas la membrane cellulaire tant que la cellule conserve son

intégrité membranaire. Les mécanismes d'exclusion varient en fonction de la sonde utilisée et la combinaison de plusieurs sondes peut donc permettre de révéler différentes informations. La stratégie la plus courante pour évaluer la perte d'intégrité membranaire est l'utilisation de sondes marquant les acides nucléiques tel que l'iodure de propidium (Figure 14). Une cellule ayant perdue son intégrité membranaire laissera alors traverser ces sondes qui iront se lier aux acides nucléiques et deviendront beaucoup plus fluorescents que sous leur forme libre⁵⁰.

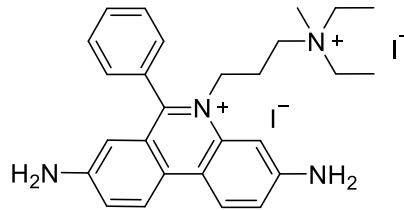


Figure 14 : Structure de l'iodure de propidium

L'étude de l'intégrité membranaire est utilisée dans plusieurs applications comme la détermination de l'efficacité d'antibiotiques ou de phages ou même dans des études d'électroporation, une technique qui consiste à augmenter la perméabilité membranaire sous l'action d'un champ électrique⁵⁷. Combinée à d'autres types de sondes, elle permet également de distinguer simultanément les cellules viables mais non cultivables de celles dont l'intégrité est compromise de manière létale ou non.

Pour cette dernière application, un kit nommé Live/Dead BacLight a été développé commercialement contenant de l'iodure de propidium combiné à une sonde SYTO-9^{48,58}. L'émission de cette sonde participe à l'excitation de l'iodure de propidium par transfert d'énergie⁵⁹. SYTO-9 traverse à la fois les membranes bactériennes intactes et celles endommagées et donne une émission dans le vert à 500 nm. L'iodure de propidium quant à lui colore en rouge (émission à 635 nm) les cellules dont l'intégrité membranaire est compromise. Cette combinaison de sondes permet de visualiser simultanément les cellules vivantes et compromises et éviter ainsi les faux positifs (Figure 15).

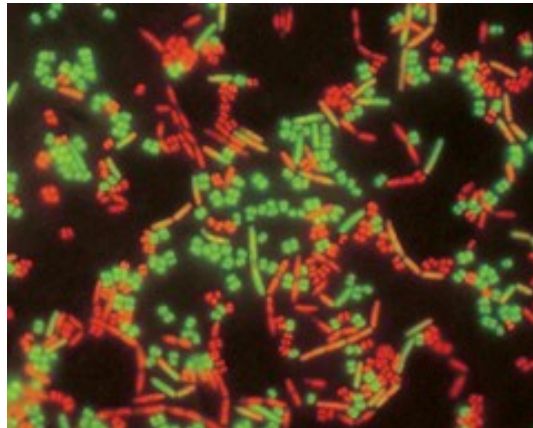


Figure 15 : Colonie de bactérie traitée avec le kit Live/Dead BacLight⁶⁰

2.4 L'activité enzymatique

2.4.1 Activité oxydoréductase

A) Enzymes déshydrogénases

Les oxydoréductases représentent la classe d'enzymes catalytiques capables d'oxyder ou de réduire une large variété de molécules, le plus souvent à l'aide de coenzymes tels que la flavine adénine dinucléotide (FAD) ou encore la flavine mononucléotide (FMN).

L'une des applications la plus courante des sondes ciblant l'activité oxydoréductase est le suivi de la respiration des bactéries. Les premières sondes développées dans ce sens ont été les sels de tétrazolium qui sont toujours énormément utilisés aujourd'hui. Étant donné que le transport actif d'électrons est directement relié au métabolisme énergétique qui permet la respiration cellulaire, la capacité des cellules à réduire ce type de sondes est un bon indicateur de l'activité bactérienne⁴⁸.

L'un des sels de tétrazolium le plus utilisé pour la fluorescence est le chlorure de 5-Cyano-2,3-ditolyle tétrazolium (CTC), un composé qui se solubilise dans l'eau, donnant une solution incolore non fluorescente. Le CTC pénètre rapidement à l'intérieur des cellules et est réduit par l'action des enzymes déshydrogénases liées à la respiration bactérienne. Il se forme alors une sonde fluorescente rouge de la famille du formazan (Figure 16) qui précipite et va s'accumuler au sein de la cellule bactérienne⁶¹. Le formazan formé émet à 630 nm lorsqu'il est excité à 480 nm et peut être observé par épifluorescence⁶². Cette

technique peut être utilisée dans des conditions aérobies et anaérobies⁶³. Cependant, les sels de tétrazolium peuvent devenir toxiques pour les bactéries une fois leur réduction complète, car ils entrent en compétition avec l'oxygène moléculaire comme accepteur artificiel d'électrons¹⁵.

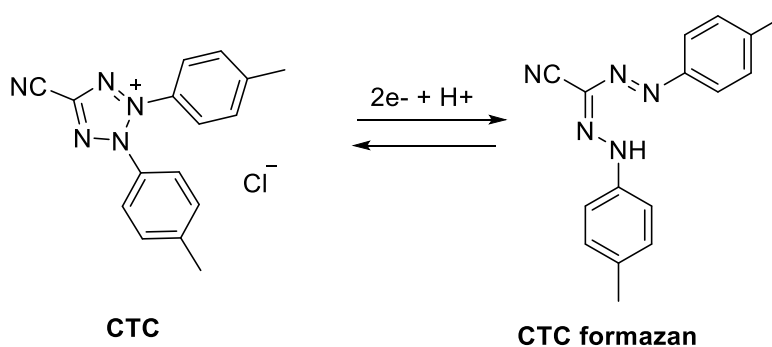


Figure 16 : Structures chimiques du sel de tétrazolium CTC et sa forme réduite

Les sondes CTC ne permettent pas de déterminer quantitativement le nombre de bactéries viables et actives dans une colonie à moins d'être associées au 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), une sonde qui se lie aux acides nucléiques⁶⁴. De plus, la précipitation du formazan est un inconvénient pour les tests colorimétriques, puisqu'ils nécessitent une étape préliminaire de solubilisation. Cependant, il a été récemment démontré que ce phénomène peut être exploité dans des analyses électrochimiques et permettre la détection de molécules hydrophobes générées par le métabolisme respiratoire comme l'ubiquinone et la ménaquinone⁶¹. La première joue le rôle de transporteur d'électrons dans le mécanisme respiratoire et la deuxième est produite lors du processus de fermentation par les bactéries.

Ces dix dernières années, une autre sonde rouge, la résazurine, a été développée pour suivre le métabolisme lié à la respiration des bactéries. Le principe est le même que pour la sonde CTC : la résazurine, au départ faiblement fluorescente, est réduite de manière irréversible en résorufine sous l'effet des enzymes déshydrogénases issues des cellules bactériennes viables⁶⁵. Un autre sous-produit, la dihydrorésorufine non fluorescente contrairement à la résorufine, peut également être formé (Figure 17). Cependant, sous l'effet de l'oxygène atmosphérique, la réversibilité de cette réaction secondaire est quasiment instantanée et n'entrave donc pas les résultats de fluorescence⁶⁶.

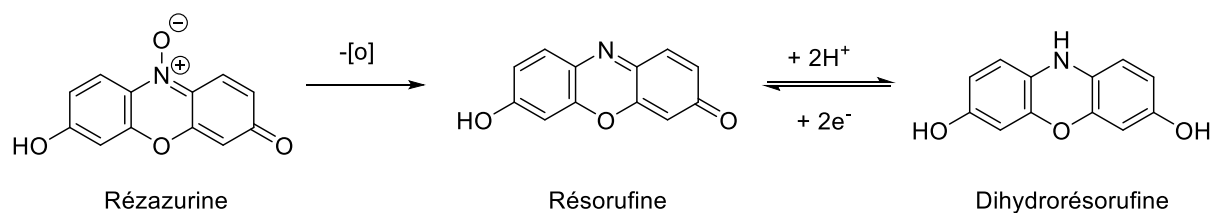


Figure 17 : Structures de la résazurine et de ses analogues

Cette sonde est décrite comme un « marqueur intelligent » dans le domaine de l'hydrologie, car elle fournit des informations sur l'environnement des bactéries et est particulièrement utilisée pour l'étude des écosystèmes aquatiques⁶⁷. De plus, contrairement au formazan, la résorufine n'est que très faiblement toxique pour les bactéries. Le complexe résazurine/résorufine est efficace pour toutes les bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives. Seules les bactéries anaérobies strictes ne peuvent pas réduire la résazurine⁶⁵.

B) Enzymes nitroréductases

Une autre classe d'enzymes que l'on peut cibler avec des composés fluorogéniques sont les nitroréductases caractérisées par leur capacité à réduire un groupement nitro (-NO₂) lié à un cycle aromatique, notamment grâce à une coenzyme appelée nicotinamide adénine dinucléotide (NAD(P)H). Il existe deux types d'enzymes nitroréductases qui diffèrent par leur sensibilité à la présence d'oxygène moléculaire. Les nitroréductases de type 1 peuvent générer des groupements nitroso (-NO), hydroxylamine (-NHOH) et/ou amine (-NH₂) en présence d'oxygène moléculaire. Les nitroréductases de type 2 ne peuvent générer ces produits qu'en l'absence d'oxygène⁶⁸.

Ainsi les enzymes de type 2 vont réduire le nitro par transferts successifs d'un électron en passant par un radical anion intermédiaire qui serait rapidement ré-oxidé en présence d'oxygène. Les enzymes de type 1 agissent par transfert de deux électrons et réduisent donc directement le groupement nitro en nitroso (Figure 18)⁶⁹.

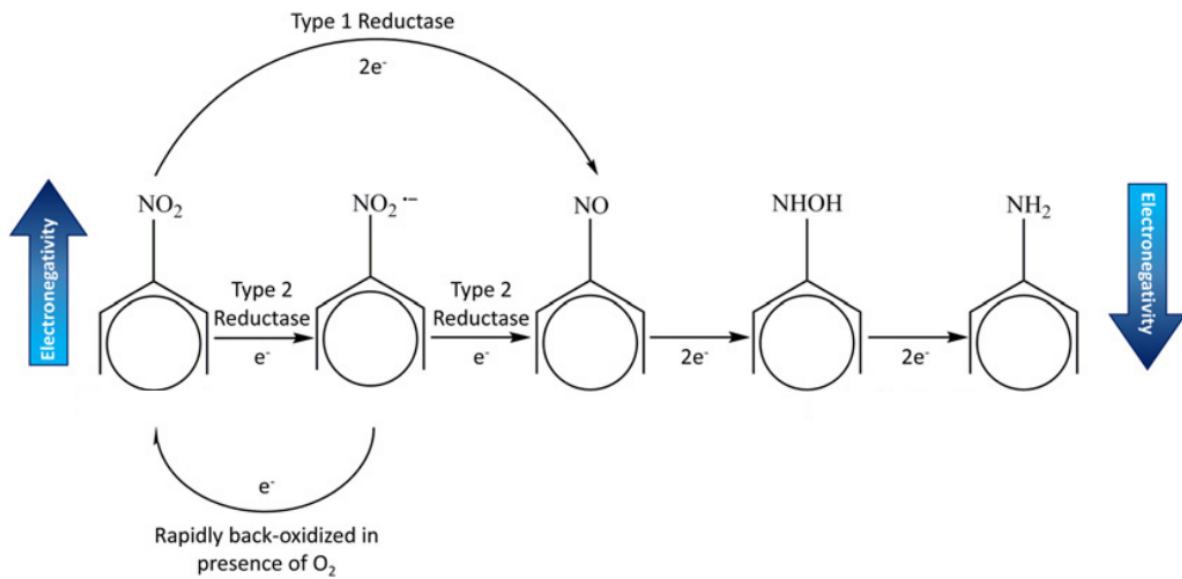


Figure 18 : Réduction d'un composé nitroaromatique par des enzymes nitroréductases de type 1 et de type 2

L'utilisation de composés fluorogéniques pour la détection d'enzymes nitroréductases issues de tissus et cellules tumoraux a été beaucoup décrite récemment contrairement à son équivalent en microbiologie. Ainsi, peu de sondes ont été développées pour détecter l'activité nitroréductases des bactéries. En 2017, S. Xu *et al* ont présenté une sonde rouge qui cible cette activité de manière à détecter rapidement et en temps réel la présence de bactéries pathogènes. Cette sonde est une cyanine conjuguée à un groupement nitroimidazole qui bloque la fluorescence de la molécule. Celle-ci n'est libérée que lorsque le nitro est réduit en amine (Figure 19). Cette sonde de nature lipophile et dotée d'une charge positive traverse facilement la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif et à Gram négatif⁷⁰.

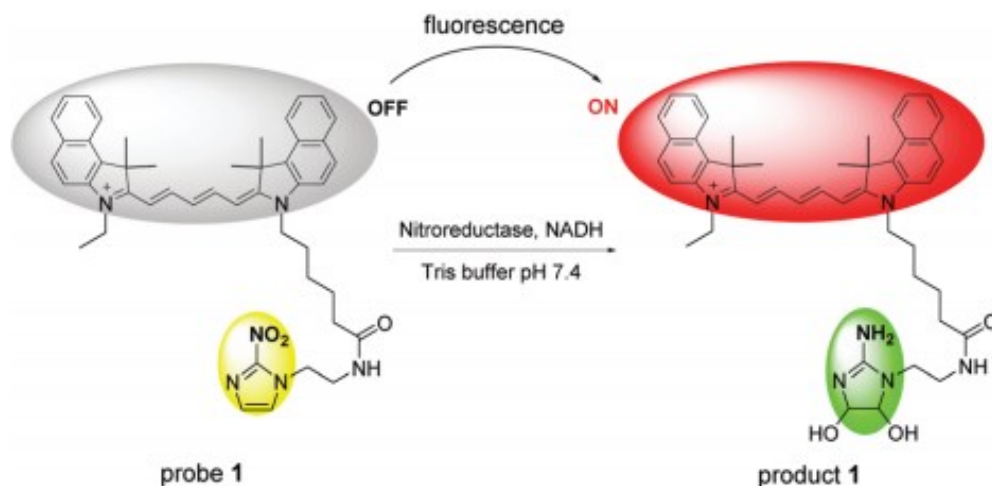


Figure 19 : Structure de la sonde cyanine et réaction avec l'enzyme nitroréductase

2.4.2 Activité transférase

Les enzymes transférases catalysent le transfert d'un groupement fonctionnel d'un substrat donneur à un accepteur. Assez peu de composés fluorogéniques ciblent l'activité transférase qui est pourtant essentielle dans de nombreux processus biochimiques. L'enzyme DD-transpeptidase intervient par exemple dans la formation de ponts peptidiques entre les chaînes saccharidiques qui composent le peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries. Cette activité étant capitale pour le maintien de la résistance mécanique de la paroi et donc pour la survie bactérienne, une famille d'antibiotiques ciblant les transpeptidases a été développée. Ces antibiotiques, appelés β -lactamines, sont les plus largement utilisés et comprennent entre autres tous les dérivés de la pénicilline. Ils agissent en se fixant de manière covalente au site actif des transpeptidases sur la face externe de la membrane cytoplasmique⁷¹.

La plus grosse difficulté dans le design de sondes fluorogéniques est de construire des molécules capables de différencier l'activité transférase de l'activité hydrolase⁴⁴. L'un des rares exemples que l'on peut citer est une sonde qui cible spécifiquement les acyltransférases des mycobactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Corynebacterium diphtheriae*. Les mycobactéries ont une paroi cellulaire dont la composition diffère de celle des autres procaryotes notamment au niveau de leur membrane externe riche en acide mycolique. Heather L. Hodges *et al* ont ainsi développé

une sonde fluorogénique FRET qui ciblent les enzymes mycolyltransférases intervenant dans la construction de cette membrane. La sonde mise en jeu est un mime du tréhalose monomycolate (TMM), un disaccharide transformé par réaction de transestérification en tréhalose dimycolate (TDM) par les mycolyltransférases. La sonde est ainsi également reconnue par l'enzyme et est hydrolysée en un composé fluorescent non toxique pour les bactéries (Figure 20). Dans cette étude, le groupe de recherche a ainsi pu mettre en évidence le caractère asymétrique de l'activité des mycolyltransférases⁷².

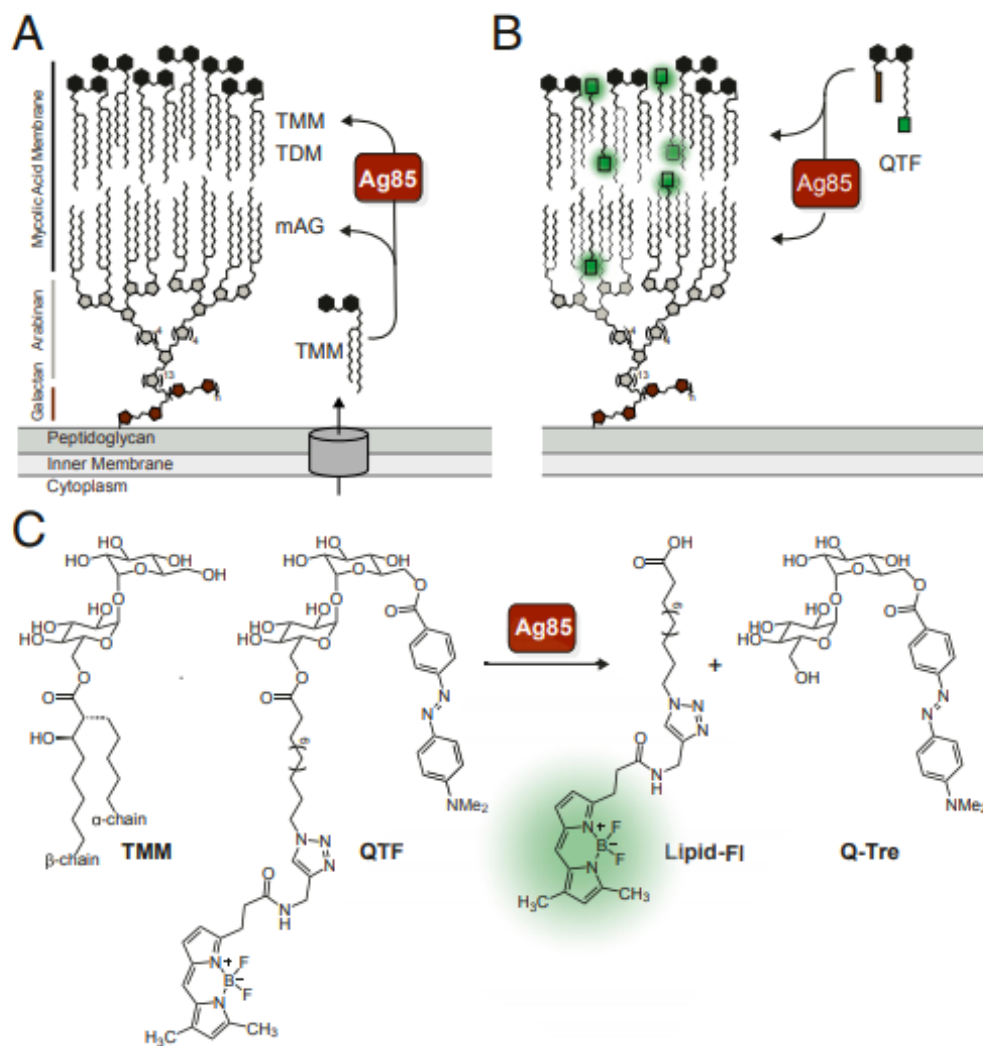


Figure 20 : Présentation de la sonde QTF ciblant l'enzyme mycolyltransférases (ici Ag85, l'antigène de *M. tuberculosis*). (A) Composition de la paroi cellulaire des mycobactéries incluant le mycolyl-arabinogalactane (mAG), le tréhalose monomycolate (TMM) et le tréhalose dimycolate (TDM). (B) La sonde QTF est un mime de TMM incluant un fluorophore et un groupement quencher. Il donne un composé fluorescent sous l'action de Ag85. (c) Structures chimiques de TMM, QTF et des produits du clivage de QTF par Ag85.

2.4.3 Activité hydrolase

A) Enzymes estérases

Les estérases sont des enzymes présentes dans tous les organismes vivants et qui font partie d'une famille très variée capable de catalyser l'hydrolyse de nombreuses fonctions chimiques telles que les esters, les thioesters, les phosphoesters, les amides et les époxydes⁷³.

La détection de ces enzymes nécessite l'utilisation de sondes fluorogéniques non chargées et lipophiles. Une étape de perméabilisation est donc souvent nécessaire pour permettre à ces sondes de traverser la membrane bactérienne intacte. Lorsque la membrane est endommagée, ces sondes ont tendance à être expulsées rapidement dans le milieu extérieur, ce qui permet d'étudier à la fois l'activité estérase et l'intégrité membranaire avec une même sonde.

Les sondes de la famille du di-acétate de fluorescéine (FDA) sont les plus couramment utilisées pour étudier l'activité estérase. Ces molécules peuvent être hydrolysées par un grand nombre d'enzymes : des estérases, mais aussi des protéases et des lipases. L'équation de la réaction d'hydrolyse de la FDA en fluorescéine est donnée en Figure 21⁷⁴. L'hydrolyse de la FDA libère ainsi de la fluorescéine qui émet à 510 nm et peut être mesurée par spectrophotométrie.

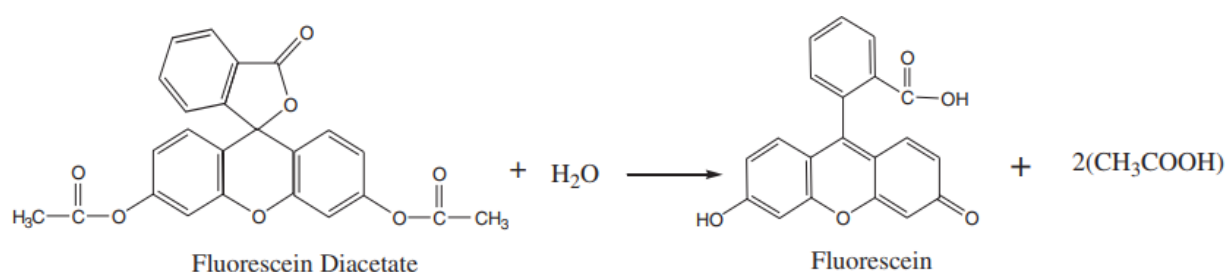


Figure 21 : Hydrolyse de la FDA

Plusieurs dérivés hydrophobes de la FDA ont été développés pour améliorer le signal de fluorescence et la rétention des sondes à l'intérieur de la membrane bactérienne tel que le di-acétate de carboxyfluorescéine (CFDA) qui présente les meilleures propriétés⁷⁵.

L'activité estérase est particulièrement étudiée dans le cadre des nouvelles stratégies de lutte contre la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ainsi, récemment, de nouvelles sondes estérases agissant comme prodrogues ont été développées⁷³.

En 2013, Šilhár *et al* ont présenté une sonde dérivée d'une coumarine liée à l'acide 1-adamantylacétohydroxamique (Figure 22) qui combine un effet diagnostique et thérapeutique (action théranostique). Plus particulièrement, elle est un potentiel inhibiteur de la toxine botulique, une protéine sécrétée par les bactéries à Gram positif *Clostridium botulinum* responsables du botulisme, une infection alimentaire grave.

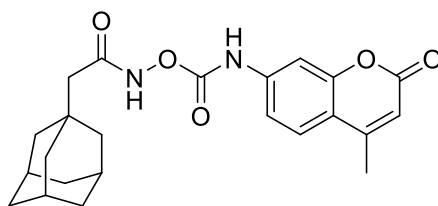


Figure 22 : Structure de la sonde fluorogénique développée à partir de l'acide 1-adamantylacétohydroxamique et d'une coumarine

Les deux parties de la molécule sont connectées par un lien hydroxamate qui inactive l'activité cellulaire et la fluorescence. Une fois entrée dans la membrane cytoplasmique, la sonde est hydrolysée ce qui permet la libération de la molécule active d'un côté et de la coumarine de l'autre. Lorsque la molécule est directement administrée sous sa forme « active », elle perd son activité cellulaire (Figure 23)⁷⁶.

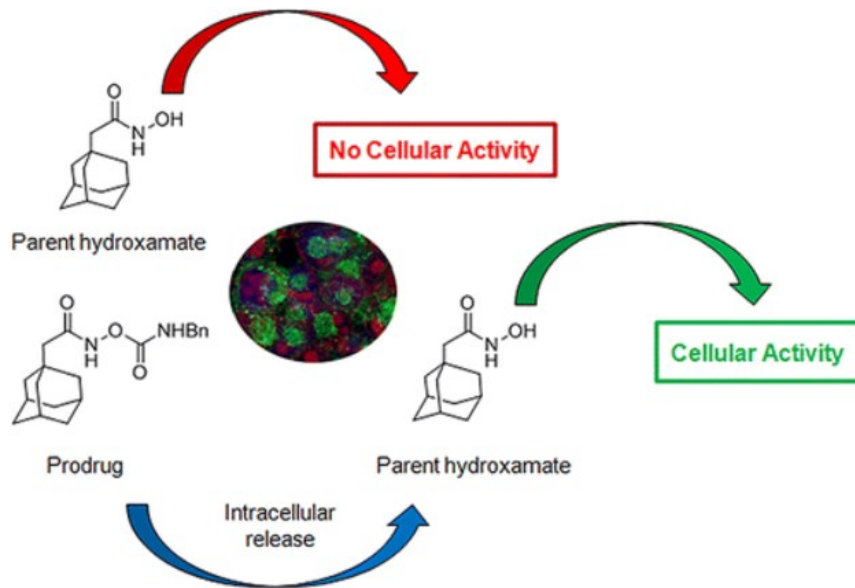


Figure 23 : Activation de l'acide 1-adamantylacétohydroxamique

B) Enzymes phosphatases

Quelques études ont été réalisées pour cibler les enzymes phosphatases acides des procaryotes hétérotrophes en milieux aquatiques. Le phosphore est une source essentielle et, dans la plupart des milieux, les bactéries ont accès à du phosphore inorganique. Cependant, les bactéries présentes dans les milieux aquatiques n'ont que peu accès à ce phosphore inorganique et utilisent du phosphore organique comme alternative. Pour digérer cette source de phosphore qui ne peut pas être directement ingérée à l'intérieur de la membrane bactérienne, elles sécrètent des exoenzymes de type phosphatase acide ou phosphatase alcaline capables d'hydrolyser les phosphomonoesters à l'extérieur de la cellule⁷⁷.

Pour étudier cette activité extracellulaire, l'une des sondes de choix est la sonde ELF97 (Figure 24) qui, une fois hydrolysée, libère un phénol qui précipite et donne une fluorescence à 550 nm⁷⁸.

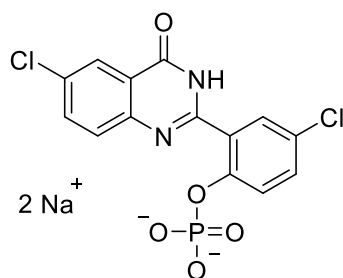


Figure 24 : Structure de la sonde EFL 97 phosphatase

C) Enzymes peptidases

Il est possible de cibler les enzymes peptidases en ajoutant des peptides ou des mimes de peptides en tant que groupes masquant la fluorescence des sondes.

Un exemple de sonde chromogénique détectant l'activité de la β -alanyl aminopeptidase, une enzyme spécifique des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* peut être cité pour illustrer cette activité. L'acide aminé β -alanine est lié à une sonde de type résorufamine. Le substrat initialement orange prend une coloration violette une fois hydrolysé par l'enzyme (Figure 25). Le principe peut également être adapté à des sondes fluorogéniques telles que des naphthalimides ou des coumarines⁷⁹.



Figure 25 : (a) Réaction de la sonde chromogénique résorufamine avec l'enzyme β -alanyl aminopeptidase des bactéries *P. aeruginosa* (b) Coloration orange avant hydrolyse par l'enzyme BAP

D) Enzymes glycosidases

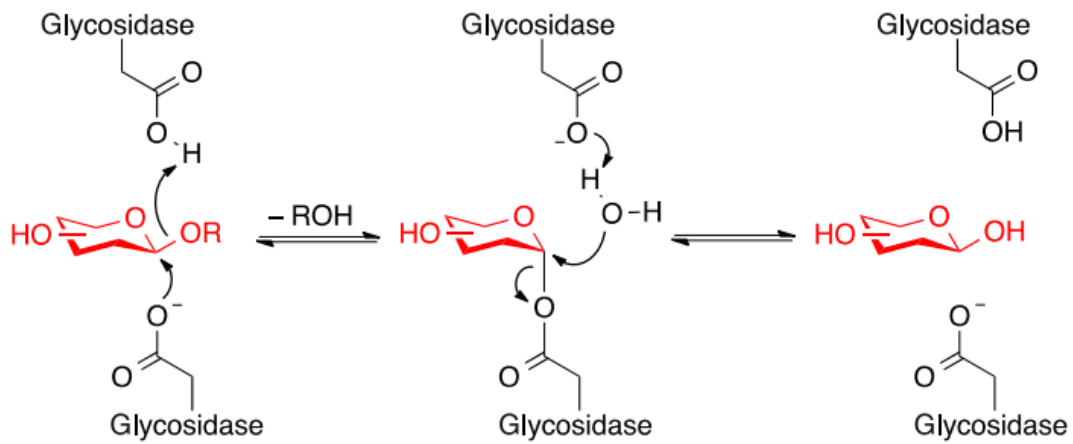
Les enzymes glycosidases sont une très vaste classe de protéines intervenant dans de nombreux processus biologiques et capables d'hydrolyser sélectivement les liaisons glycosidiques. Ces dernières sont les liaisons covalentes les plus stables chimiquement de tous les biopolymères naturels. Ces enzymes permettent de cliver ces liaisons 10^{17} fois plus rapidement que lors d'une hydrolyse spontanée, ce qui en font les catalyseurs connus les plus efficaces⁸⁰.

Du fait du nombre très important de glucides différents que l'on peut trouver dans la nature, il existe un très grand nombre d'enzymes impliqués dans leur assemblage (glycosyltransférases) et dans la cassure des liaisons glycosidiques (glycoside hydrolases, polysaccharide lyases, carbohydate estérases). Afin de les regrouper en fonction de leur mécanisme catalytique, de leur spécificité vis-à-vis d'un substrat et de leurs caractéristiques structurales tridimensionnelles, une nouvelle classification plus précise que la nomenclature EC a dû être élaborée. Les différentes protéines ont ainsi été classées à travers plus de 120 familles dans une nouvelle base de données nommée CAZy (pour *carbohydrate active enzyme*). Depuis 1991, ce classement est régulièrement mis à jour pour suivre les découvertes réalisées dans le domaine⁸¹.

Les enzymes glycosidases peuvent également être séparées en exo-glycosidases et endo-glycosidases en fonction de la position du site de coupure ainsi qu'en α -glycosidases et β -glycosidases selon la stéréochimie de la liaison qu'elles peuvent hydrolyser.

Deux mécanismes d'action principaux des enzymes glycosidases ont été mis en évidence induisant dans un cas une rétention de la stéréochimie du carbone anomérique et dans l'autre une inversion de cette stéréochimie (Figure 26)⁸².

A Retaining glycosidase



B Inverting glycosidase

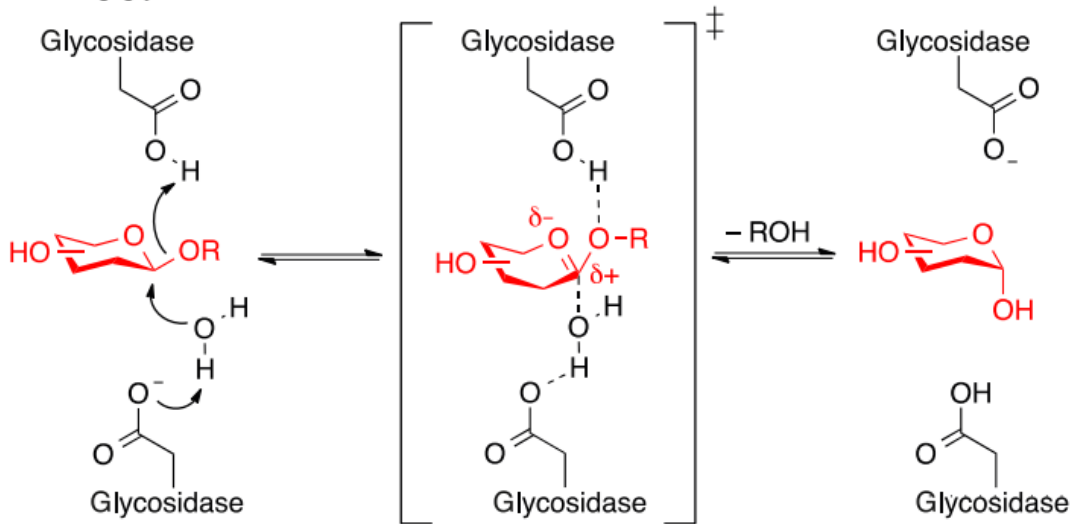


Figure 26 : Mécanismes d'hydrolyse d'une liaison glycosidase avec rétention de configuration (A) et inversion de configuration (B)

Dans les deux mécanismes, une paire d'acides carboxyliques située au niveau du site actif joue un rôle acido-basique majeur dans la réaction. L'hydrolyse avec rétention de configuration a lieu en deux étapes. La première étape correspond à la formation d'un complexe covalent glycosyl-enzyme conduisant au départ du produit aglycone protoné par l'acide du site actif. Dans la deuxième étape, une molécule d'eau agit comme nucléophile pour libérer le sucre et régénérer l'enzyme. La configuration du carbone anomérique se retrouve inversée à chaque étape, ce qui lui permet de conserver sa stéréochimie à la fin de la réaction.

L'hydrolyse avec inversion de configuration du carbone anomérique se fait en une seule étape et passe par un état de transition intermédiaire formant un ion glycosyl oxocarbenium. L'attaque d'une molécule d'eau déprotonée par l'un des acides du site actif sous forme carboxylate sur le carbone anomérique, la protonation de l'oxygène de la liaison anomérique et le départ du produit aglycone ont lieu de manière concomitante et concertée⁸³.

D'autres mécanismes existent dans certaines familles d'enzymes faisant par exemple intervenir le cofacteur NAD(P)H, une co-enzyme capable de remplacer un groupement basique manquant ou encore la participation d'un groupe voisin du site actif.

L'étude fonctionnelle des enzymes glycosidases trouve ses applications dans de nombreux domaines et notamment celui de la santé où elle promet des avancées à la fois thérapeutiques et diagnostiques⁸⁴. Des inhibiteurs de glycosidases sont utilisés dans le traitement de nombreuses maladies comme les infections virales, le diabète et le cancer⁸⁵. Les enzymes glycosidases sont également connues pour leur rôle dans de nombreuses pathologies : les anomalies génétiques de ces enzymes sont associées aux maladies de Gaucher et de Parkinson^{80,86}. L'étude des glycosidases permet également l'analyse quantitative des interactions sucre-protéine, l'analyse de la spécificité de substrat et la détection de pathogènes⁸⁴.

Une large gamme de sondes peut être utilisée pour la détection de l'activité glycosidase comme les dérivés de coumarines, de fluorescéines et de rhodamines. Depuis quelques années, les sondes ratiométriques possédant un grand déplacement de Stokes et un effet bathochrome significatif sont les plus recherchées⁸⁰. La plupart de ces sondes possèdent un monosaccharide comme site clivable spécifique de l'enzyme ciblée. Il a été montré que pour le suivi catalytique des bactéries possédant l'enzyme β -galactosidase comme *Escherichia coli*, les substrats contenant un β -galactose présentent de meilleurs résultats que ceux possédant un β -lactose⁸⁶.

Plusieurs exemples de sondes glycosidases sont disponibles dans la littérature⁸⁰ M. Najah *et al* ont présenté une gamme de sondes glycosidases basées sur un fluorophore 7-hydroxycoumarine sulfoné utilisée pour détecter les activités β -glucosidase, β -xylosidase, endo-1,4- β -Dxylanase et cellobiohydrolase. Cette dernière activité a pu être suivie en milieu microfluidique. La sulfonation du fluorophore permet de maintenir le produit obtenu après clivage à l'intérieur des gouttes et de prévenir les échanges entre les gouttes⁸⁷.

J. Y. Hyun *et al* ont montré que les sondes glycosidases, en plus de permettre le suivi de l'activité glycosidase, peuvent être utilisées pour déterminer la valeur d'IC50 d'inhibiteurs de glycosidase⁸⁴.

E) Enzymes β -lactamases

Les antibiotiques de type β -lactamides représentent 60% des traitements administrés contre les infections bactériennes et leur utilisation intensive a conduit petit à petit à une forte résistance des bactéries d'abord chez les Gram positif puis chez les Gram négatif. La résistance des bactéries est essentiellement due aux enzymes β -lactamases capables d'hydrolyser la liaison amide du cycle β -lactame présent chez cette classe d'antibiotiques et d'ainsi les désactiver^{88,89}.

La rapide évolution de ces enzymes et leur large diversification en font une cible de choix dans le développement de nouvelles méthodes de détection. Les sondes fluorogéniques ciblant ces enzymes reposent le plus souvent sur le couplage d'un carbapénème sur un substrat fluorogénique activable tels que des coumarines^{90,91}, naphthalimides⁹² ou sondes proche-infrarouge⁹³. La coupure de la liaison lactame par les β -lactamases entraîne la libération de la sonde et l'apparition de fluorescence (Figure 27).

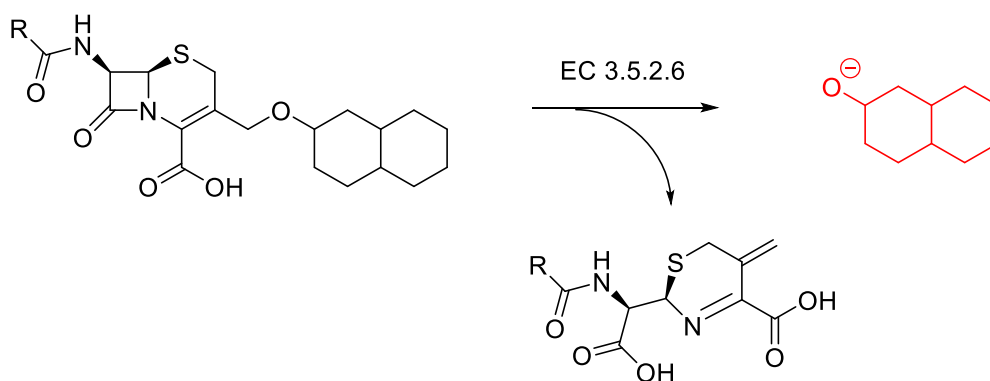


Figure 27 : Schéma générale de l'hydrolyse des sondes fluorogéniques par les β -lactamases

Plusieurs stratégies sont possibles pour cibler une catégorie particulière de β -lactamases. W. Mao *et al*, se sont inspirés de la structure de deux antibiotiques (le céfotaxime et le cefpodoxime) pour le design de la partie carbapénème de leur sonde. Ainsi l'ajout de substituants très encombrés sur les carbapénèmes permettent de cibler les β -lactamases à spectre élargi (ESBL) dont le site actif est plus gros et plus flexible que celui des β -lactamases à spectre étroit (Figure 28)⁹².

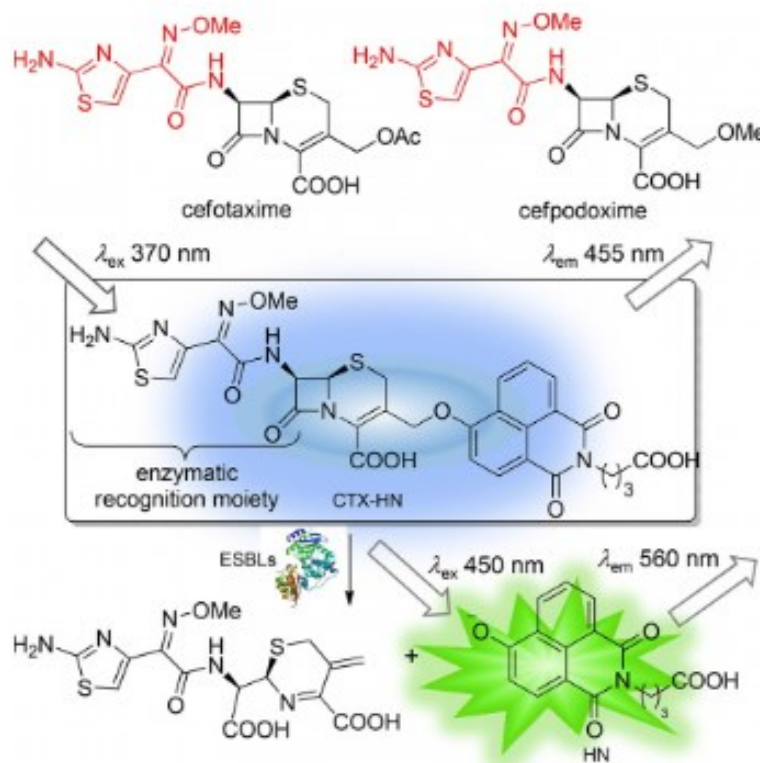


Figure 28 : Structure de la sonde de détection d'enzymes β -lactamases à spectre élargi

Une autre possibilité est de modifier le substrat fluorogénique en intégrant un groupe partant en position ortho du phénol de manière à former un accepteur de Michael (Figure 29). Dans cet exemple, l'hydrolyse du carbapénème par les β -lactamases entraîne un départ du groupe partant formant un intermédiaire de type méthylène quinone capable de créer une liaison covalente avec la protéine. Ce mécanisme permet de libérer la fluorescence de la sonde, mais également de l'immobiliser et d'ainsi éviter un phénomène de diffusion⁹⁴.

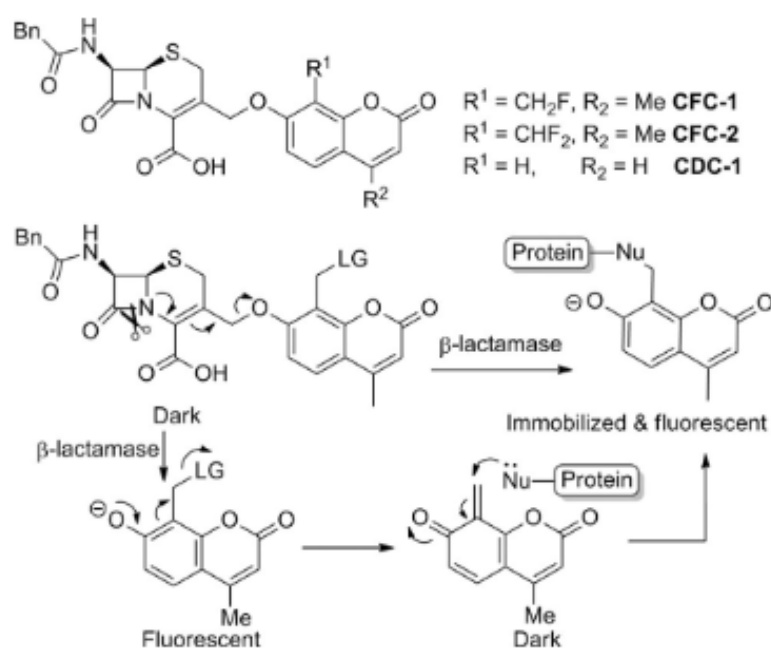


Figure 29 : Structure de la sonde coumarine et proposition d'un mécanisme d'action

2.5 L'activité pompe

Les bactéries possèdent de nombreux mécanismes leur permettant de se protéger contre les attaques toxiques. Il existe des mécanismes passifs comme la modification de la fluidité et de la stabilité de la membrane cytoplasmique ou de la paroi cellulaire et des mécanismes actifs comme le transport de molécules toxiques ou de déchets à l'extérieur de la membrane sans altération du composé⁵⁰. Ce système d'efflux actif est contrôlé par des transporteurs membranaires appelés « pompes à efflux » qui maintiennent l'homéostasie cellulaire en s'opposant à l'accumulation de certains composés à l'intérieur de la membrane bactérienne⁹⁵. L'activité pompe est ainsi l'une des nombreuses causes de

la résistance aux antibiotiques des bactéries comme cela a été montré dès les années 1980 dans les travaux de McMurtry sur l'efflux actif de la tétracycline par *Escherichia coli*⁹⁶.

La spécificité de substrat des pompes à efflux varie en fonction de leur structure primaire. Il existe cinq grandes familles de pompes dont certaines ont une spécificité limitée à une seule famille de molécules alors que d'autres ont un spectre beaucoup plus large et sont surtout présentes chez les bactéries à Gram négatif⁹⁷. Certaines bactéries possèdent même les cinq types de pompes à efflux et ont donc un mécanisme de résistance très général.

Certaines sondes fluorescentes comme la rhodamine 123 décrite précédemment peuvent subir les effets de l'activité pompe et être rejetées en dehors de la membrane⁹⁸. Pour inhiber le système d'efflux de manière réversible, certains composés comme l'azoture de sodium⁹⁹, le verapamil¹⁰⁰ ou encore le [(3-chlorophényl)hydrazono]malononitrile (CCCCP) peuvent être ajoutés dans le milieu. Ces composés ont ainsi été étudiés pour répondre à plusieurs modes d'action¹⁰¹ :

- Une inhibition compétitive : compétition entre deux substrats qui se lient au même site d'interaction à l'intérieur de la pompe.
- Une inhibition non compétitive : composé se liant à la pompe et induisant un encombrement stérique à l'intérieur des cavités de la pompe.
- Une perte d'énergie directe ou indirecte indispensable au bon fonctionnement des pompes à efflux.

L'activité pompe, lorsqu'elle n'est pas inhibée, peut également être étudiée comme mesure de l'activité cellulaire grâce à des sondes telles que le bromure d'éthidium (Figure 30), un agent intercalant de l'ADN qui pénètre de manière lente dans la membrane cytoplasmique⁴⁸.

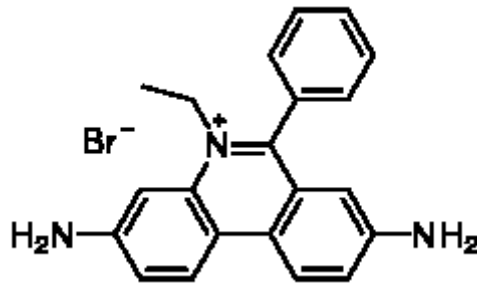


Figure 30 : Structure du bromure d'éthidium

III. Positionnement du sujet de thèse

3.1 Ciblage des activités enzymatiques extracellulaires

Comme cela a été vu précédemment, les bactéries possèdent de nombreux systèmes de transport pour digérer les nutriments présents dans leur environnement dont elles ont besoin pour leur croissance. Elles utilisent un système de transport actif pour les molécules tels que les sucres et les acides aminés dans lequel sont impliquées de très diverses protéines. Mais avant d'être transportés à travers la membrane bactérienne, les nutriments présents sous forme complexe sont modifiés chimiquement de manière extracellulaire par des enzymes. Les enzymes extracellulaires mis en jeu dans la modification chimique des nutriments sont très variées en fonction des bactéries et sont ainsi des marqueurs des différentes espèces de bactéries. L'enzyme β -galactosidase est ainsi un marqueur très connu des bactéries *Escherichia coli* et agit dans la dégradation du lactose en molécules de glucose et de galactose grâce au contrôle exercé par l'opéron lactose.

Le but principal de ce sujet de thèse est de proposer des outils pour identifier la diversité fonctionnelle des bactéries d'un échantillon en ciblant ces activités enzymatiques extracellulaires. Pour cela, nous utiliseront une technique millifluidique permettant d'isoler les bactéries dans des gouttes d'eau et ainsi de pouvoir les étudier de manière individuelle, ce qui permet de les comparer entre elles. De nouvelles sondes fluorescentes compatibles avec cette approche millifluidique seront développées et caractérisées afin de suivre la croissance et le métabolisme des bactéries encapsulées dans ces gouttes.

3.2 Approche millifluidique

L'encapsulation d'une population de bactéries en gouttes est une méthode de choix pour pouvoir travailler à l'échelle d'une seule cellule de manière à comparer les variations génétiques et phénotypiques des micro-organismes possédant un même fond génétique. L'approche millifluidique comparativement à la microfluidique permet d'utiliser des volumes plus importants pouvant aller jusqu'à 100 nL. L'utilisation de cette technique est possible grâce à l'analyseur développé dans l'équipe de Jean Baudry au laboratoire colloïdes et matériaux divisés à l'ESPCI. L'analyseur est capable de former plus de 10^3 gouttes d'eau dans l'huile qui agissent chacun comme des mini-réacteurs permettant l'encapsulation de cellules vivantes.

L'analyseur est composé de deux parties principales : une partie où sont produites les gouttes et une partie détection (Figure 31). La première permet l'encapsulation des bactéries dans des milieux de culture ajustables. Les bactéries, les nutriments et les potentiels antibiotiques sont injectés indépendamment et se rejoignent à la première jonction (cross A). Les gouttes d'eau dans l'huile sont formées à la deuxième jonction (cross B) en utilisant de l'huile fluorocarbonée comme phase continue. Des gouttes d'huile minérale sont également formées afin de servir d'espaceur entre les différentes gouttes contenant les bactéries. La seconde partie est équipée d'un détecteur d'épifluorescence permettant de suivre la croissance et le comportement des bactéries dans chaque goutte. En fin d'expérience, un système de récupération permet également d'isoler les gouttes d'intérêt¹⁰².

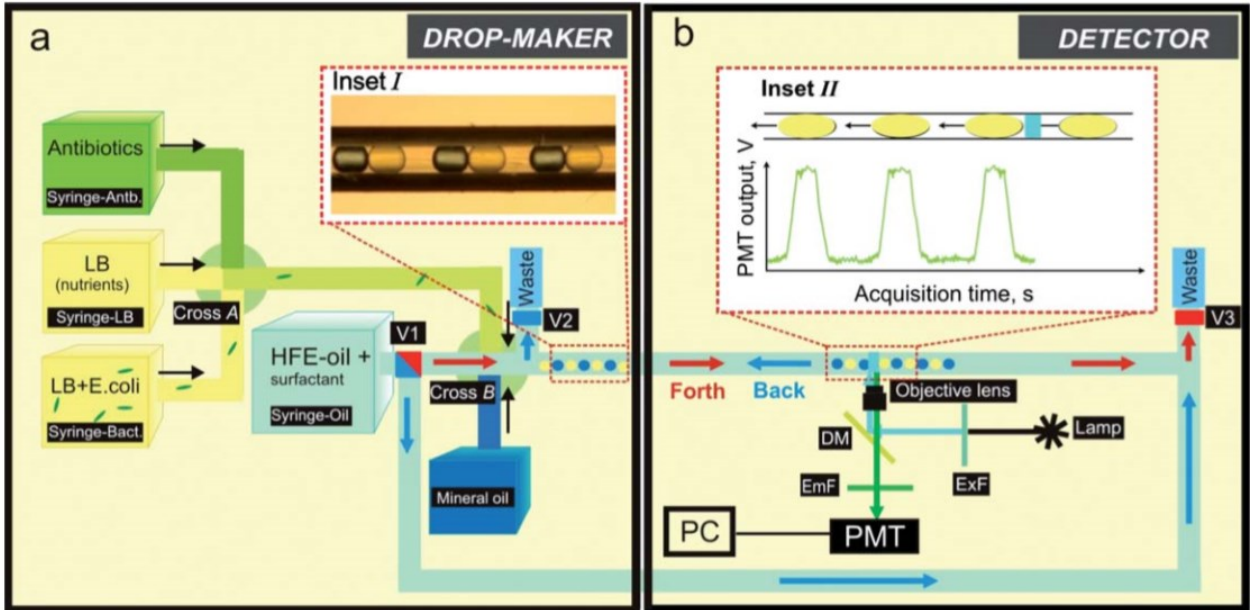


Figure 31 : Schéma du système millifluidique

Cette technique présente de nombreux avantages comme sa standardisation et des bénéfices en termes de temps et de débit, mais demande également de l'adaptation en ce qui concerne la détection de la fluorescence. Les sondes utilisées devront être compatibles avec la mesure en milieu complexe et les sondes ainsi que leurs produits de dégradation devront rester solubles dans ce milieu.

3.3 Design des sondes fluorogéniques

3.3.1 Structures générales des sondes

Les sondes développées pour suivre l'activité enzymatique des bactéries en gouttes seront des sondes fluorogéniques dont la fluorescence dépendra de la déprotonation d'un groupement phénol. Ces sondes seront composées de trois parties principales : le substrat fluorogénique lié d'un côté au groupement qui sera reconnu par l'enzyme et de l'autre à un polymère hydrosoluble non métabolisable.

Dans cette étude, le groupement de reconnaissance pour l'enzyme sera un sucre de manière à cibler l'activité glycosidase des bactéries. Cependant, ces sondes sont

facilement modulables et le suivi d'autres enzymes telles que les lipases ou les kinases est tout à fait envisageable.

Comparativement aux sondes déjà existantes dans la littérature, ces sondes ont l'intérêt de posséder un polymère hydrosoluble à leur extrémité leur permettant de rester en solution tout au long de l'expérience. En effet, il a été montré que certaines sondes, en précipitant ou pénétrant dans la cellule, peuvent induire une toxicité pour les bactéries. Le but de ce travail est de développer de nouvelles sondes sans contact qui ne pénètrent pas dans la membrane bactérienne et ne perturberont pas l'activité bactérienne. Le métabolisme des bactéries sera suivi grâce au clivage du groupement glycosyl par les enzymes d'intérêt qui entraînera la libération de la fluorescence de la molécule comme le montre la Figure 32.

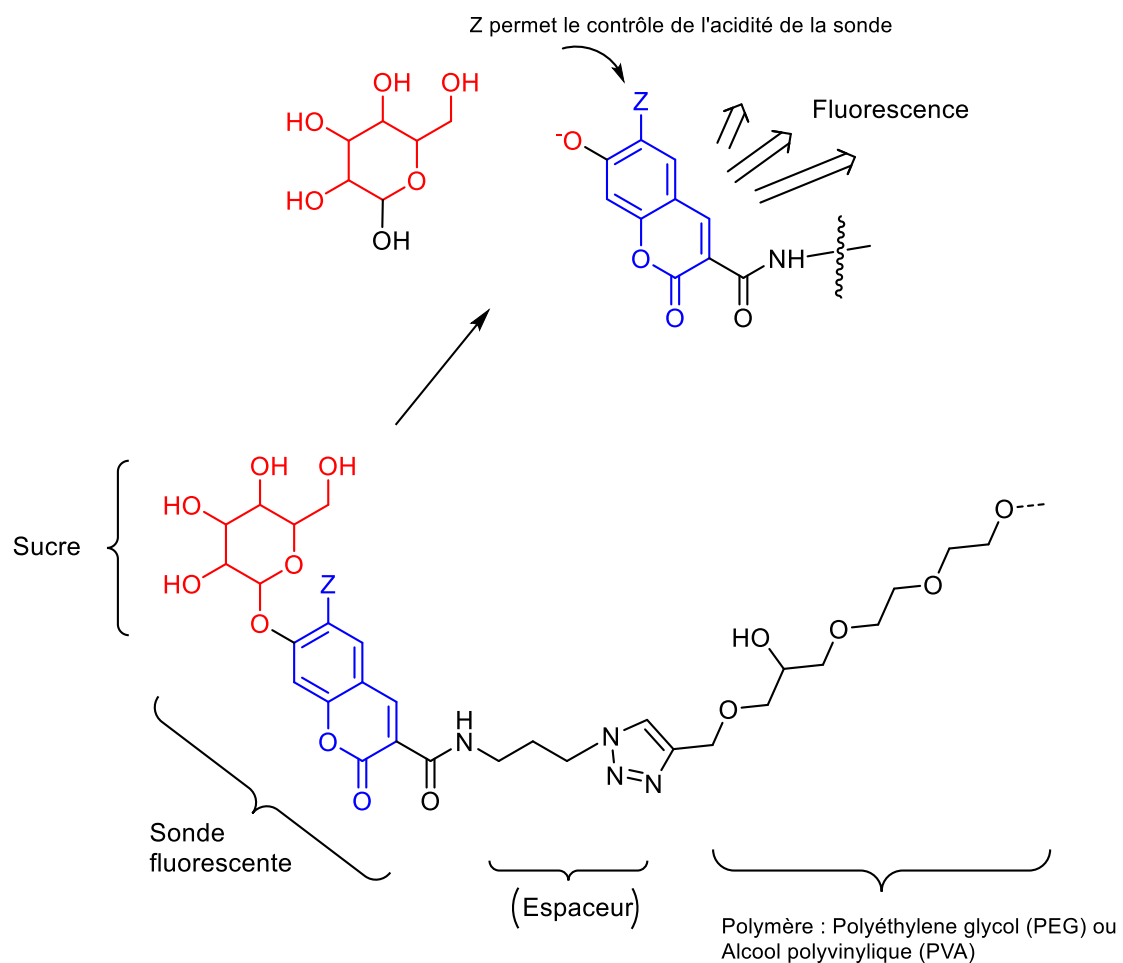


Figure 32 : Structure générale des sondes fluorogéniques

Le fait que ces sondes dépendent de la déprotonation d'un phénol en milieu complexe aqueux induit la nécessité d'adapter le pKa du phénol. Il sera possible de modifier structurellement les sondes en ajoutant un groupement inductif attracteur en position ortho du phénol de manière à augmenter son acidité. En effet, il est important que la variation de pH due à l'activité des bactéries ne perturbe pas la mesure et que le pH final de la culture soit au-dessus du pKa du phénol. Un pKa en dessous de 6 est donc recherché.

Une autre application de ce type de sondes en tant que sondes de pH sera également possible selon le pKa du phénol.

3.3.2 Choix des différents motifs

Plusieurs fluorophores ont été choisis de manière à obtenir des sondes émettant dans des zones différentes ce qui permet de mesurer plusieurs paramètres simultanément. Une sonde classique de type coumarine a été retenue pour l'émission dans le bleu. Pour l'émission dans le vert et le rouge, un naphthalimide et une cyanine ont été respectivement sélectionnés (Figure 33). À noter qu'une sonde rouge, la résazurine est utilisée pour suivre la respiration bactérienne ; la sonde cyanine a donc été choisie de manière à posséder une longueur d'onde d'émission assez éloignée de celle-ci.

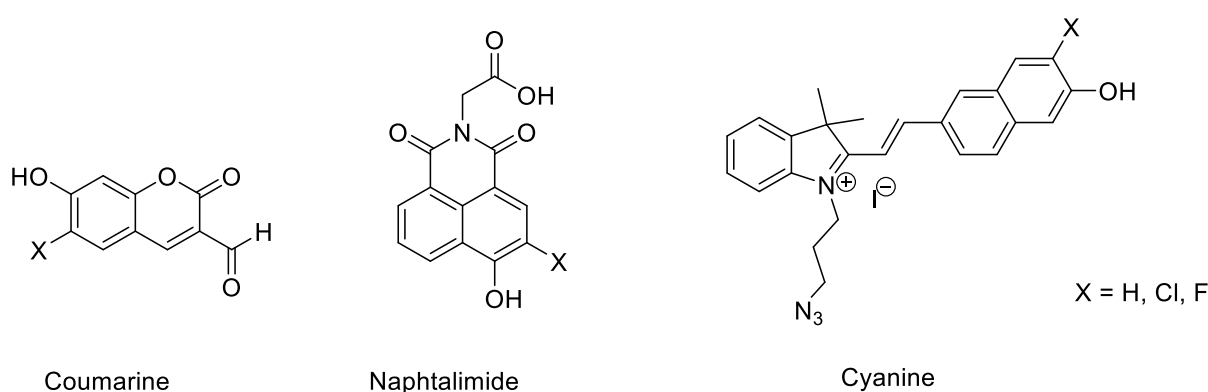


Figure 33 : Fluorophores sélectionnés

Dans un premier temps, les sondes retenues seront testées sur un modèle de bactéries de type *Escherichia coli*. Le sucre greffé sur ces fluorophores sera donc un β -galactose de

manière à cibler l'enzyme β -galactosidase, marqueur de ces bactéries. Un autre sucre de type α -mannose sera également couplé à ces fluorophores afin d'être utilisé pour les tests négatifs. Enfin, les polymères hydrosolubles sélectionnés sont des polymères non chargés et non métabolisables par les bactéries de type polyéthylène glycol (PEG) et alcool polyvinylique (PVA).

3.4 Autres types de sondes fluorescentes

En complémentarité de ce projet ciblant les activités enzymatiques des bactéries, trois autres types de sondes répondant à des besoins différents seront développées dans ce travail :

- Des sondes amphiphiles éteintes dans l'eau et s'allumant en milieu lipidique. Ces sondes capables de se fixer sur les membranes bactériennes ne permettent pas d'étudier l'intégrité membranaire, mais constituent une nouvelle méthode de suivi de la croissance bactérienne de manière beaucoup plus sensible que l'existant. Elles permettent également la visualisation des cellules en microscopie.
- Des sondes extracellulaires permettant de détecter l'oxydation d'un milieu.
- Des sondes fluorées utiles pour mieux visualiser les gouttes d'eau dans l'huile dans le cadre de l'approche millifluidique.

Les voies de synthèse, les caractérisations physico-chimiques et les activités biologiques de ces sondes seront développées dans les chapitres 4, 5 et 6.

Chapitre 2. Synthèse des sondes pH et glycosidases

I. Introduction

Ce chapitre est consacré à la synthèse des sondes fluorogéniques destinées à suivre l'activité glycosidase des bactéries. Ces sondes seront également développées en tant que sondes pH, le groupement phénol sera alors laissé libre. En fonction du pKa des sondes qui sera déterminé dans le chapitre suivant, les sondes pourront être utilisées uniquement en tant que sondes pH ou pourront combiner une activité pH et glycosidase. Pour étudier l'utilité du polymère, chacune des sondes sera synthétisée en deux versions : une version avec le polymère et une version sans polymère.

Deux stratégies de synthèse ont été principalement utilisées pour le développement des sondes coumarine et naphthalimide induisant des modifications sur la structure des fluorophores et des polymères et sur le mode de greffage de ces deux parties. Ces deux stratégies seront présentées ainsi que la synthèse de la sonde cyanine.

II. Première stratégie de synthèse

La première stratégie envisagée consiste à greffer le polymère sur le fluorophore via une liaison amide. Les premiers fluorophores coumarine et naphthalimide ont donc été synthétisés de manière à ce qu'ils possèdent un groupement acide (Schéma 2) qui sera par la suite couplé à un polyéthylène glycol possédant une terminaison amine.

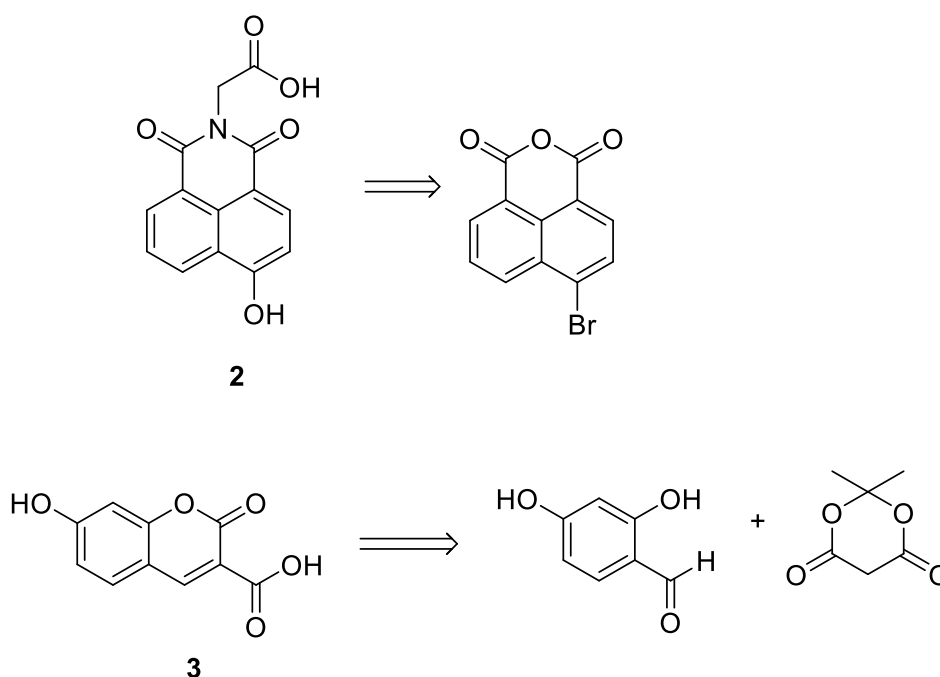


Schéma 2 : Rétrosynthèse des fluorophores naphthalimide et coumarine

2.1 Synthèse des fluorophores naphthalimide et coumarine

La synthèse du fluorophore naphthalimide (Schéma 3) débute par la réaction entre l'anhydride 4-bromo-1,8-naphthalique et la glycine qui est activée par l'ajout d'acide acétique. Ainsi, l'amine intermédiaire formée par ouverture de l'anhydride est recyclisée grâce à l'acide présent en excès. Le naphthalimide **1** contenant la fonction acide carboxylique recherchée est ainsi formé par précipitation dans l'eau avec un rendement quantitatif¹⁰³. La seconde étape consiste en la substitution du groupement brome par un hydroxyle apporté par la soude à reflux pendant 24 heures dans l'eau. Le fluorophore naphthalimide **2** est ainsi obtenu avec un rendement de 79 %. Cependant, après quelques jours, nous avons remarqué l'apparition d'un second produit visible par CCM et en RMN. Le fluorophore **2** semble ainsi se dégrader sous l'effet de la lumière entraînant une ouverture du cycle et une perte de fluorescence entraînant l'apparition d'une tache noire sur CCM.

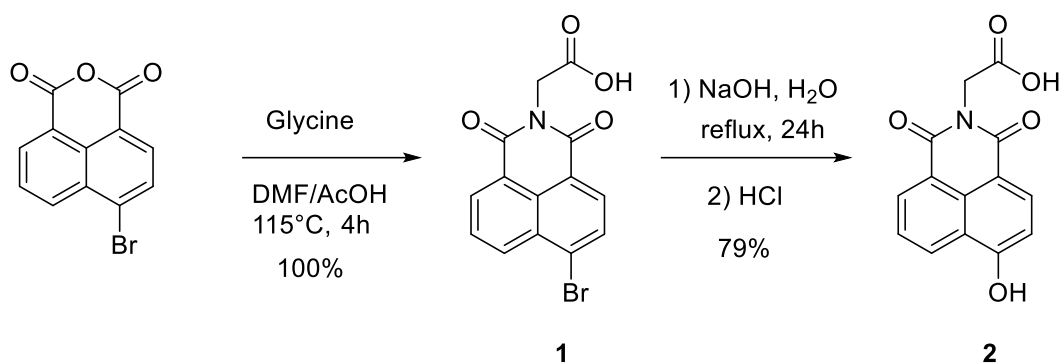


Schéma 3 : Synthèse du fluorophore naphthalimide acide

Une des voies préférentielles pour la synthèse d'acide coumarine-3-carboxylique est une condensation de Knoevenagel entre un *ortho*-hydroxyaryl aldéhyde et un dérivé de malonate ou de cyanoacétate en présence d'un catalyseur^{104,105}. Le fluorophore coumarine a ainsi été formé en une seule étape à partir du 2,4-dihydroxybenzaldehyde et de l'acide de Meldrum (Schéma 4). La cyclisation intramoléculaire a été réalisée en conditions douces dans l'eau à température ambiante en présence du carbonate de potassium agissant comme catalyseur. Le produit **2** a ainsi été obtenu par précipitation dans un très bon rendement de 94 %.

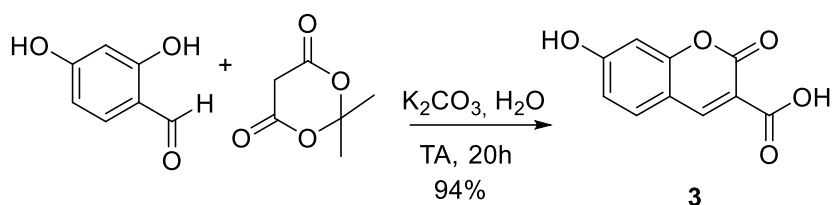


Schéma 4 : Synthèse du fluorophore coumarine acide

Des essais ont également été réalisés afin d'acidifier le phénol de ces deux fluorophores. L'acidification du phénol nécessite l'ajout d'un groupement inductif attracteur en position ortho ou para du phénol entraînant une augmentation de la polarisation de la liaison O-H et une stabilisation de la forme phénoxyde. Dans nos deux cas, les positions para n'étant pas libres, c'est en position ortho que l'hydrogène devrait être substitué par un chlore. Le groupement chlore a été choisi, car son effet devrait être suffisamment fort pour modifier significativement le pKa du phénol et tout en offrant des voies de synthèses plus simples que pour l'ajout d'un groupement fluor ou un nitro.

Concernant le fluorophore coumarine, la réaction de chloration a été directement effectuée sur le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (Schéma 5). L'utilisation d'un équivalent de N-chlorosuccinimide et de l'acide chlorhydrique en quantité catalytique a permis la monochloration de l'aldéhyde à la position souhaitée¹⁰⁶. Le produit chloré **4** a ainsi été obtenu avec un rendement de 92 %. Par la suite, l'étape de cyclisation pour la formation du fluorophore chlorocoumarine **5** a été identique à celle de la coumarine et le produit a été obtenu avec un rendement similaire.

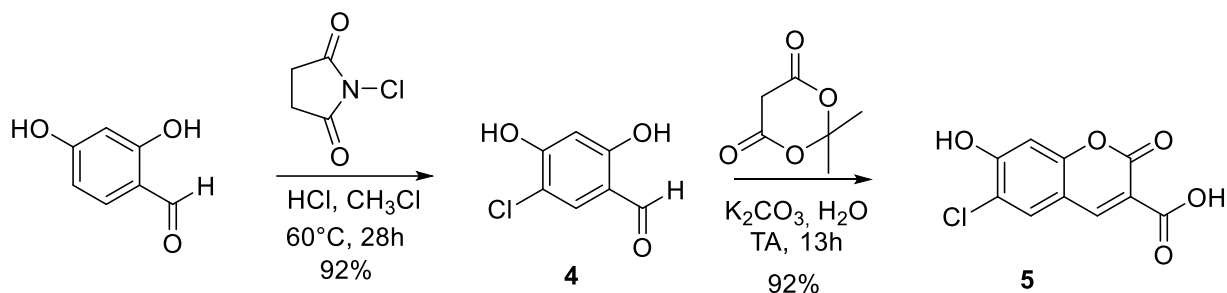


Schéma 5 : Synthèse du fluorophore chlorocoumarine acide

La chloration du fluorophore naphthalimide a posé nettement plus de problèmes que celle de la coumarine. Cette étape ne pouvait se faire qu'à partir du phénol **2** pour éviter la substitution du brome. Dans un premier temps, la même voie de synthèse que pour la coumarine a été testée (Schéma 6), mais a conduit à un mélange de produits difficilement à séparer et à identifiables.

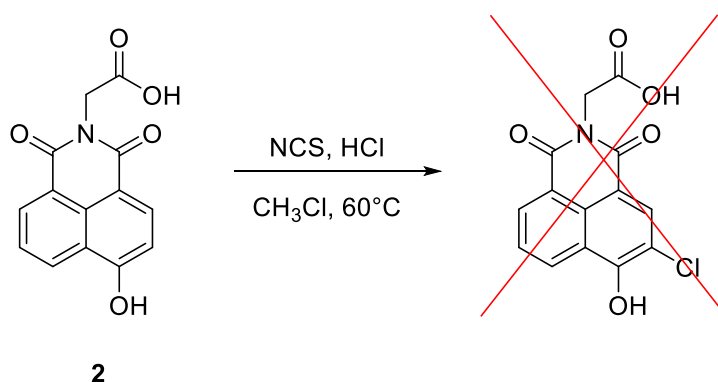


Schéma 6 : Premier essai de chloration du fluorophore naphthalimide

Une deuxième méthode a été utilisée avec le couple de réactifs acide paratoluènesulfonique et N-chlorosuccinimide dans l'eau en présence de chlorure de sodium¹⁰⁷ (Schéma 7). Cependant, les mêmes observations que précédemment ont été

faites avec cette deuxième voie de synthèse. Malgré une purification par chromatographie sur colonne conduisant à une plaque CCM propre ne révélant qu'une seule tâche, la RMN montre la présence de plusieurs produits pouvant correspondre à un mélange entre un produit chloré et le réactif de départ ou de plusieurs sondes chlorées sur différentes positions. En effet contrairement à la coumarine où une position était favorisée, il était ici plus difficile de prévoir sur quelle position aurait lieu la chloration. Face à ces difficultés, les essais de chloration du fluorophore naphthalimide ont été abandonnés et le fluorophore **2** a été utilisé pour la suite.

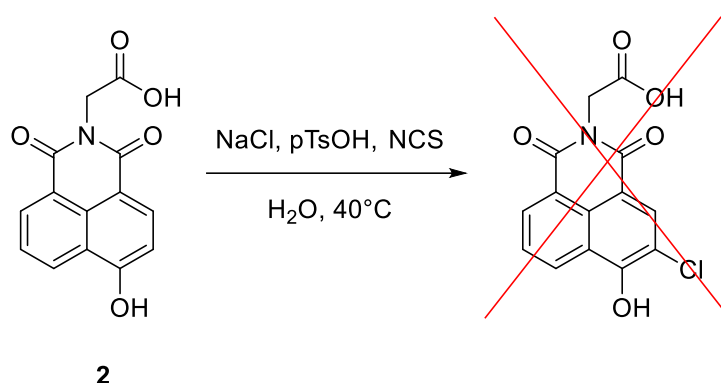


Schéma 7 : Deuxième essai de chloration du fluorophore naphthalimide

2.2 Étape de glycosylation

Une fois les fluorophores obtenus, l'objectif suivant était le couplage du sucre sur les positions phénol. Pour préparer cette étape, les fonctions acides ont été protégées pour ne pas entrer en compétition avec les phénols lors de la glycosylation.

Un premier essai de protection avec un groupement benzyl a été réalisé, mais la réaction n'était pas sélective à l'acide carboxylique, ce qui entraînait une dibenzylation à la fois de l'acide et du phénol. Finalement, une stratégie plus simple a été mise en place pour les trois fluorophores : la formation de l'ester méthylique. Pour cela, le chlorure de thionyle a été utilisé comme agent d'activation de l'acide et l'excès de méthanol a permis la formation des esters **6**, **7** et **8** (Schéma 8). Les différences de rendement entre le fluorophore naphthalimide et les coumarines s'expliquent par la faible stabilité du naphthalimide **2**, comme cela a été expliqué précédemment. Les coumarines **7** et **8** étaient suffisamment propres pour être utilisées sans étape de purification tandis que le

naphtalimide a dû être purifié par chromatographie sur colonne pour éliminer le produit de dégradation. Néanmoins, la protection de l'acide carboxylique a résolu les problèmes de stabilité de la sonde.

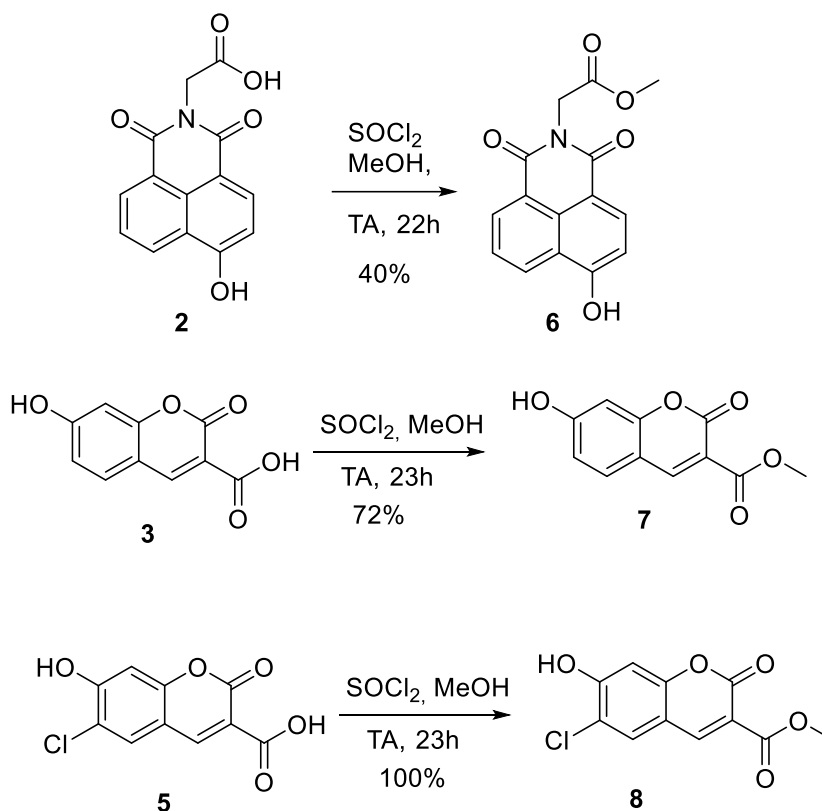


Schéma 8 : Protection des fonctions acides carboxyliques des trois fluorophores

Une autre voie de synthèse permet de passer directement du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde au fluorophore coumarine possédant l'acide protégé par un ester éthylique¹⁰⁸. Cette voie de synthèse a été testée pour le fluorophore chlorocoumarine. Le composé **4** a été mis en réaction pendant 2 heures avec deux équivalents de malonate de diéthyle en présence de pipéridine agissant comme catalyseur (Schéma 9). Le composé **9** souhaité a bien été formé, mais le rendement moyen de 52% étant inférieur à celui obtenu précédemment en deux étapes, cette voie de synthèse n'a pas été retenue pour la suite.

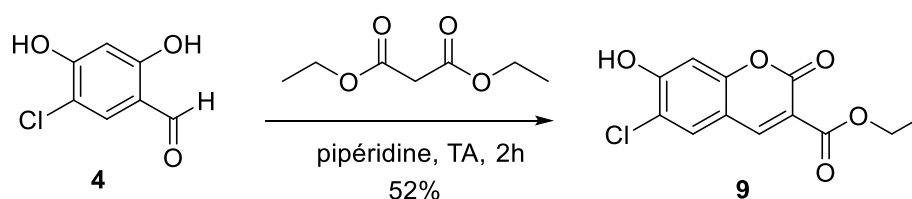


Schéma 9 : Alternative en une seule étape pour les fluorophores coumarines

La méthode de Koenigs-Knorr¹⁰⁹ a été choisie pour la réaction de glycosylation. Cette méthode fait réagir un donneur, le sucre sous forme de bromure, avec un accepteur, le phénol, en présence d'un promoteur. La méthode nécessite donc la préparation du bromure de galactose (Schéma 10). Le sucre a tout d'abord été protégé par des groupements benzoates par réaction avec le chlorure de benzoyle dans la pyridine¹¹⁰, puis le groupement en position anomérique a été substitué par un brome¹¹¹ de manière à former le groupement donneur de la méthode de Koenigs et Knorr. Pour cela, le composé **10** a été mis en réaction avec une solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique. Le produit **11** obtenu correspond à l'anomère α qui est l'anomère le plus stable par effet anomérique.

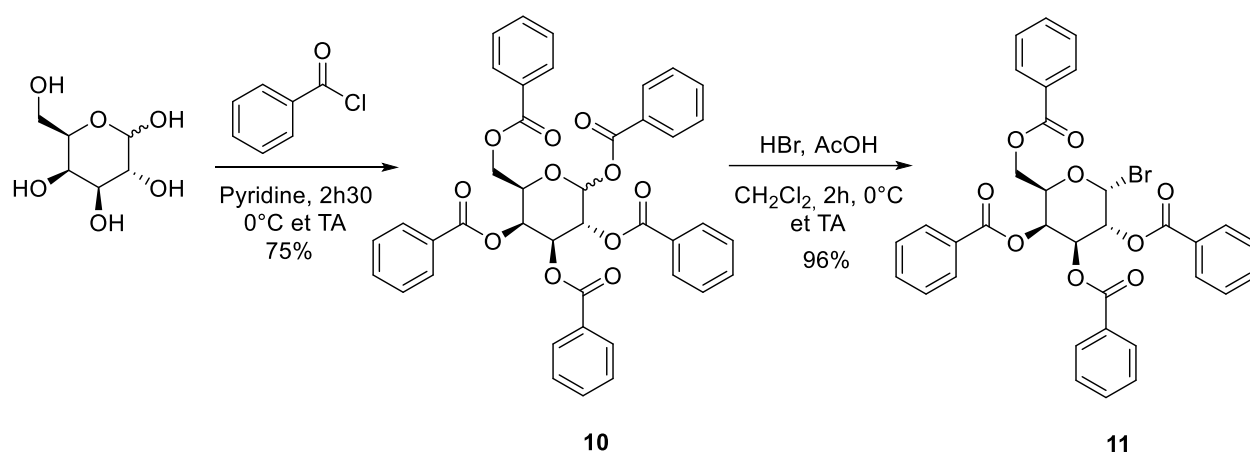


Schéma 10 : Voie de synthèse permettant la préparation du α -D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tétrabenzoate

Plusieurs conditions ont été testées pour la réaction de glycosylation (Tableau 4). La première condition consistait à faire réagir les fluorophores avec le bromure de galactose dans le DMF à température ambiante. Le promoteur original de la réaction de Koenigs-Knorr a été remplacé par du carbonate de potassium. Ces conditions conviennent bien pour le fluorophore coumarine dont le phénol est moins acide et plus réactif que celui des sondes naphthalimide et chlorocoumarine. Pour ces deux fluorophores, une deuxième méthode a été utilisée qui consistait à remplacer le DMF par de l'acétonitrile en chauffant à 70°C pendant 24 heures¹¹². Cela a permis d'augmenter significativement le rendement du naphthalimide **12** et d'obtenir la chlorocoumarine **14**. Enfin, un dernier essai de glycosylation par transfert de phase a été réalisé avec la sonde naphthalimide. Celle-ci a été mise en solution dans un mélange acétone / solution aqueuse de soude (1 M) en présence

d'un agent de transfert de phase, le bromure de tétrabutylammonium^{113,114}. Malheureusement, aucun produit n'a été récupéré à l'issue de la purification avec cette méthode.

Fluorophore	Réactifs	Solvant	Conditions	Rendement
<i>Coumarine</i>	K ₂ CO ₃ (3 eq) - Galactose (1 eq)	DMF	Température ambiante, 48h	25%
<i>Coumarine</i>	K ₂ CO ₃ (3 eq) - Galactose (1 eq)	ACN	70°C, 24h	16%
<i>Chlorocoumarine</i>	K ₂ CO ₃ (3 eq) - Galactose (1 eq)	DMF	Température ambiante, 48h	0%
<i>Chlorocoumarine</i>	K ₂ CO ₃ (3 eq) - Galactose (1 eq)	ACN	70°C, 24h	13%
<i>Naphtalimide</i>	K ₂ CO ₃ (2 eq) - Galactose (2 eq)	DMF	Température ambiante, 48h	11%
<i>Naphtalimide</i>	K ₂ CO ₃ (1 eq) - Galactose (1.1 eq)	ACN	70°C, 24h	45%
<i>Naphtalimide</i>	Bromure de tétrabutylammonium (1,5 eq) - Galactose (3 eq)	Acétone / NaOH 1M	0°C puis température ambiante, 16h	0%

Tableau 4 : Différentes conditions de glycosylation testées

Pour chaque essai, la formation de la liaison glycosidique se fait grâce à l'assistance d'un groupement participant en position 2 (Schéma 11). Le départ du groupement partant entraîne la formation de l'ion oxocarbénium qui est stabilisé de manière intramoléculaire grâce à la participation du groupement acyl en position 2. Ainsi, dans le cas du galactose, l'attaque du nucléophile ne peut se faire que par la face du haut ce qui entraîne majoritairement la formation de la liaison 1,2-trans glycosidique (anomère β).

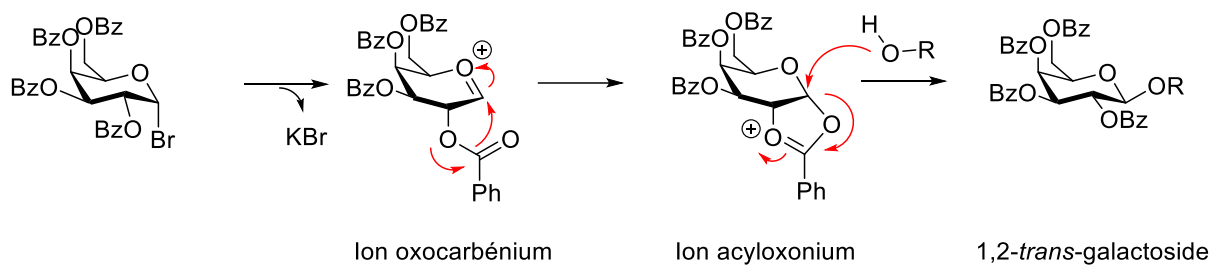


Schéma 11 : Mécanisme de la glycosylation du galactose avec assistance du groupement participant

La structure des différentes sondes obtenues sont décrites en Schéma 12.

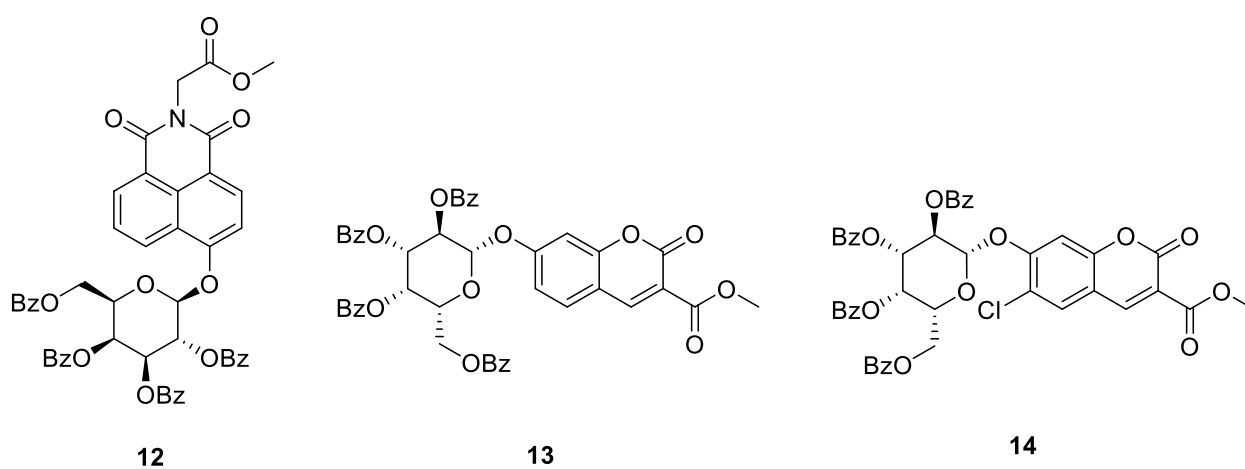


Schéma 12 : Structure des sondes obtenues après glycosylation

2.3 Couplage du polymère

Le couplage du polymère sur les fluorophores nécessite tout d'abord l'hydrolyse de l'ester méthylique de manière à déprotéger l'acide carboxylique. Cette réaction risquant de toucher également les fonctions benzoates, le sucre a auparavant été déprotégé grâce à la réaction de transestérification de Zemplén¹¹⁵. L'ester méthylique a ensuite été hydrolysé en conditions basiques (Schéma 13).

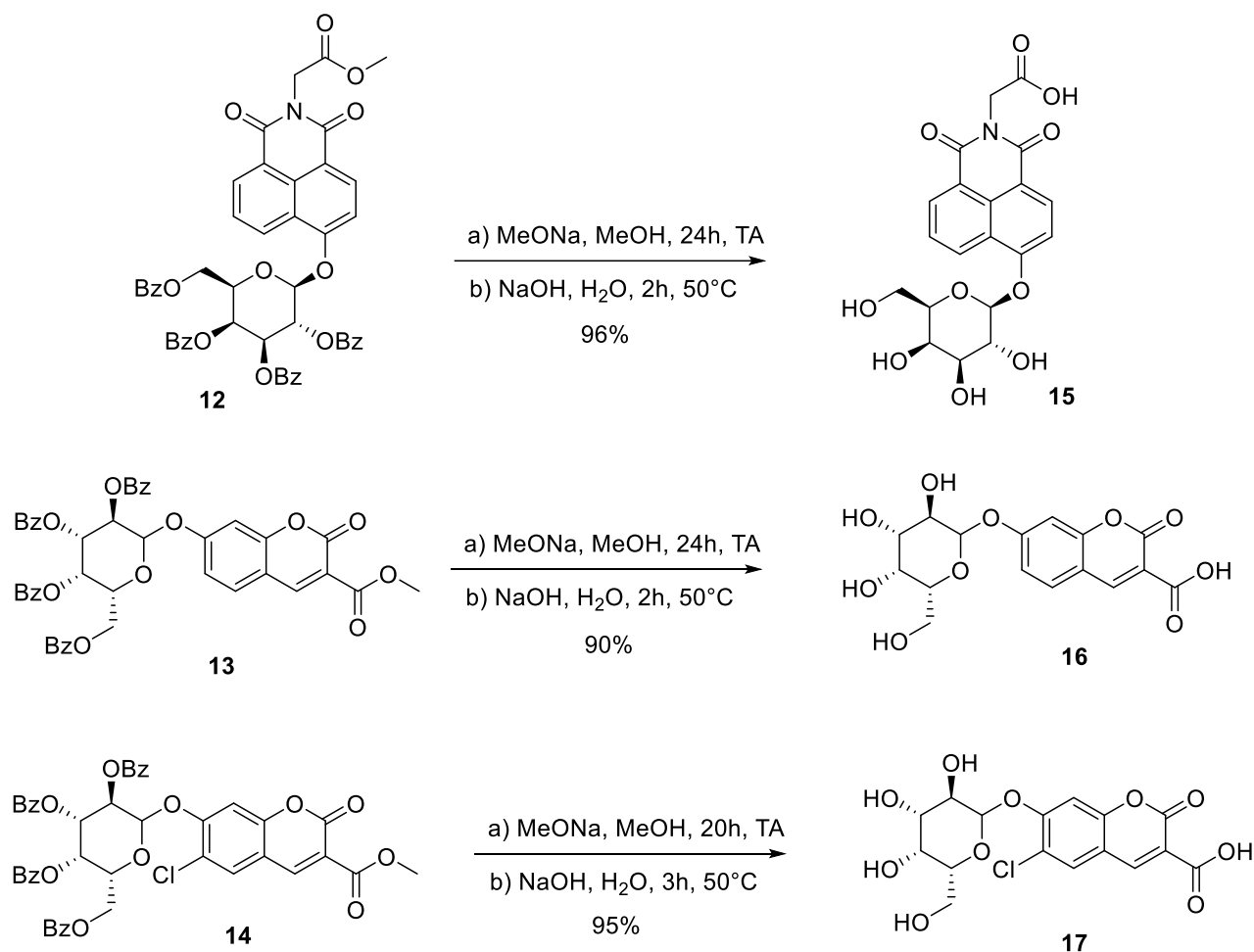


Schéma 13 : Déprotection des différentes fonctions des trois sondes

Un essai de couplage d'un polymère de type polyéthylène glycol de masse molaire 750 g/mol a été tenté sur la sonde naphthalimide brut **15** ainsi que sur le fluorophore **2** (Schéma 14). Les deux réactions ont été faites dans le dichlorométhane en présence du couple de réactifs EDC/HOBt¹¹⁶, ce qui a conduit à la formation des sondes finales **18** et **19** dans de faibles rendements de 20%. En raison de la différence de masse molaire entre les sondes et les impuretés, les sondes ont été purifiées par exclusion stérique sur une colonne G25 dans l'eau distillée.

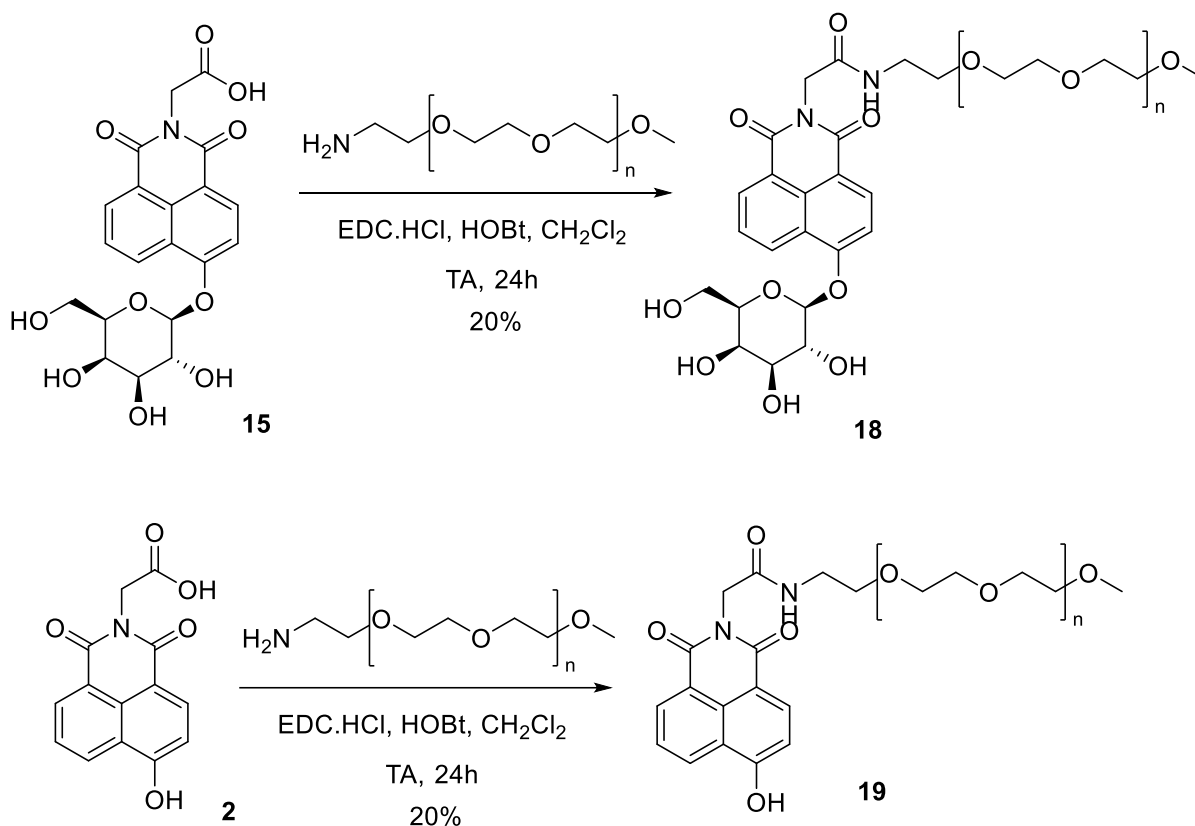


Schéma 14 : Couplage des sondes 2 et 15 avec le polymère polyéthylène glycol

Malgré le fait que nous ayons réussi à obtenir les produits souhaités, cette première voie de synthèse pose plusieurs problèmes. Les deux dernières étapes nécessitent de se placer en conditions basiques, ce qui fragilise la liaison glycosidique et peut conduire à sa coupure. En plus du faible rendement de l'étape de couplage peptidique, une partie de la sonde finale **19** obtenue a perdu son groupement galactose. De plus, le coût élevé du polymère PEG utilisé pour ce couplage et sa disponibilité en quantités limitées est un deuxième frein à cette voie de synthèse. Nous avons donc décidé de synthétiser ces sondes avec quelques modifications pour pouvoir remplacer le couplage amide par un couplage de type chimie click.

III. Deuxième stratégie de synthèse

La deuxième voie de synthèse consiste donc à préparer d'un côté les mêmes sondes en remplaçant le groupement acide carboxylique par un azoture. De l'autre côté, les

polymères doivent également être modifiés afin de leur intégrer une fonction alcyne. Le couplage des deux parties ensemble se fera alors par une réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire.

3.1 Synthèse de la sonde naphthalimide

Le fluorophore naphthalimide de deuxième génération a été synthétisé de manière à remplacer la fonction acide carboxylique par un azoture. Pour cela, une chaîne 1-azido-3-aminopropane a été synthétisée à partir du 3-bromopropylamine hydrobromine et d'azoture de sodium¹¹⁷. La chaîne **20** a ensuite remplacé la glycine dans la réaction avec l'anhydride 4-bromo-1,8-naphthalique dans les mêmes conditions que pour l'obtention de la molécule **1** (Schéma 15).

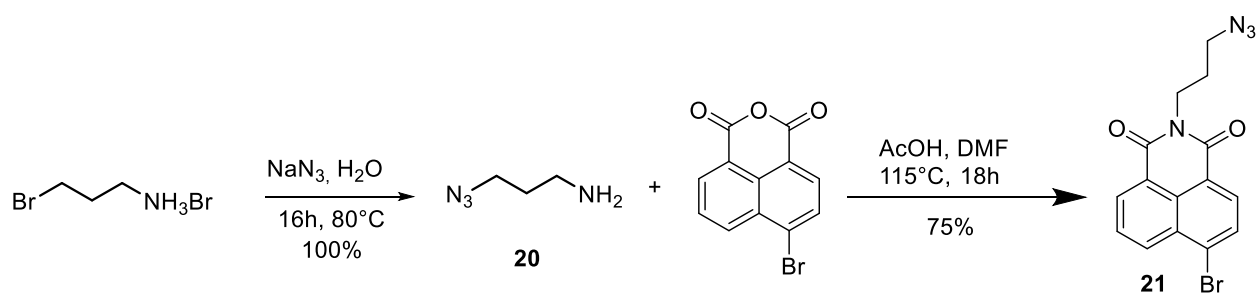


Schéma 15 : Voie de synthèse permettant de remplacer la fonction acide carboxylique par un azoture

Cependant, la réaction de substitution nucléophile nécessaire pour la formation du phénol a posé beaucoup plus de difficultés pour la molécule **21** que pour la molécule **1**. Les mêmes conditions que précédemment ont été testées : la molécule **21** a été mis à reflux dans une solution de soude pendant plusieurs jours. Finalement, la molécule n'a pas réagi et a pu être récupérée à l'issue de la réaction. Un autre essai avec l'ajout de THF en tant que co-solvant a été fait montrant les mêmes résultats. Cette absence de réactivité de la sonde peut être expliquée par son manque de solubilité dans les solvants utilisés.

Une deuxième stratégie a été employée et consistait à former l'éther méthylique, puis à revenir au phénol par hydrolyse dans l'acide iodhydrique¹¹⁸ (Schéma 16). La première étape a été réalisée à reflux dans du méthanolate de sodium en présence d'un catalyseur

à base de cuivre et la sonde **22** a été obtenue dans un rendement de 49%. Cependant, celle-ci s'est dégradée lors de la seconde étape et la sonde **23** n'a donc pas été formée.

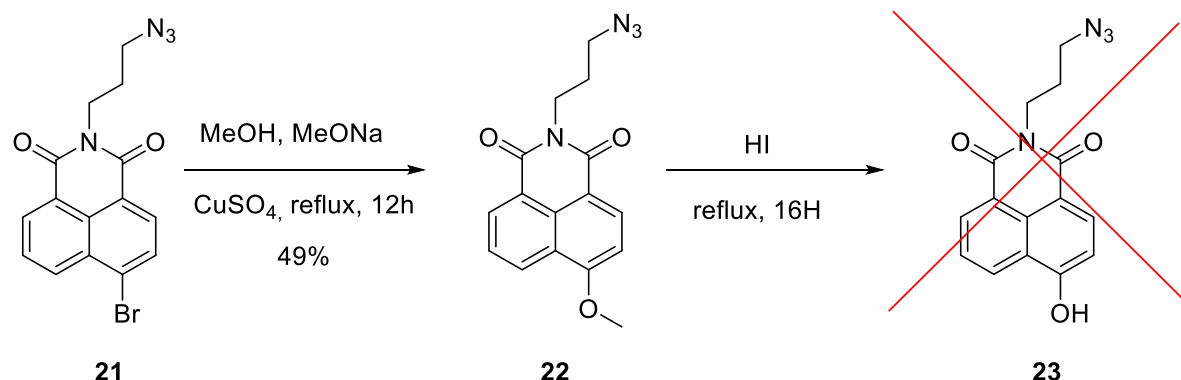


Schéma 16 : Deuxième stratégie envisagée pour la formation du phénol

La troisième stratégie employée a finalement permis la formation de la sonde **23** (Schéma 17)¹¹⁹. La molécule **21** a été mis dans un mélange DMSO/H₂O (1:1) en présence d'hydroxyde de potassium et de sulfate de cuivre agissant comme catalyseur. De l'ascorbate de sodium a également été ajouté afin d'obtenir le cuivre au bon degré d'oxydation (cuivre (I)). Au bout de 3 jours d'agitation à 120°C, la sonde **23** a été obtenue avec un rendement quantitatif.

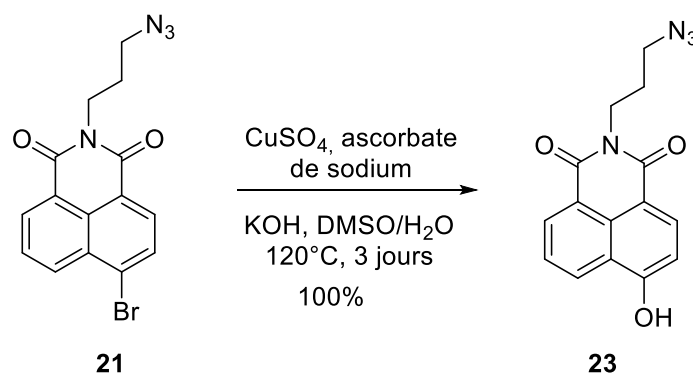


Schéma 17 : Troisième stratégie envisagée pour la formation du phénol

La réaction de glycosylation a ensuite été effectuée avec le galactose et le mannose. Pour cela, le mannose a été préparé comme le galactose précédemment permettant d'obtenir le bromure **25** (Schéma 18).

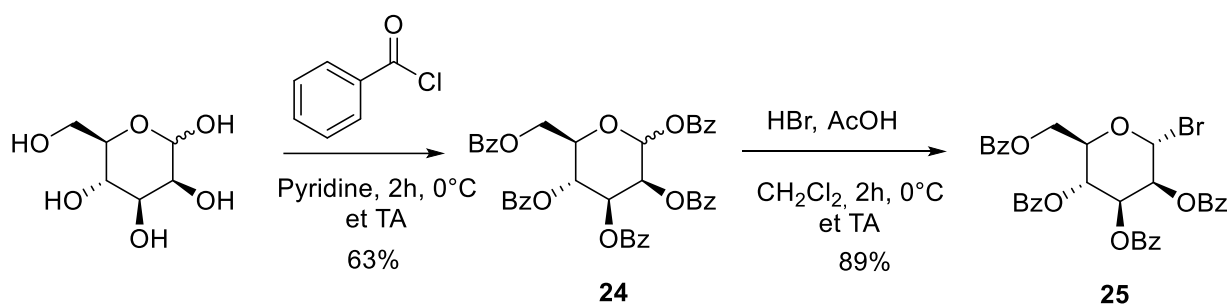


Schéma 18 : Voie de synthèse permettant la préparation du bromure de 2,3,4,6-tétrabenzoate d'α-D-mannopyranosyle

Une version du bromure avec comme groupement protecteur des acétates en remplacement des benzoates a également été synthétisée (Schéma 19).

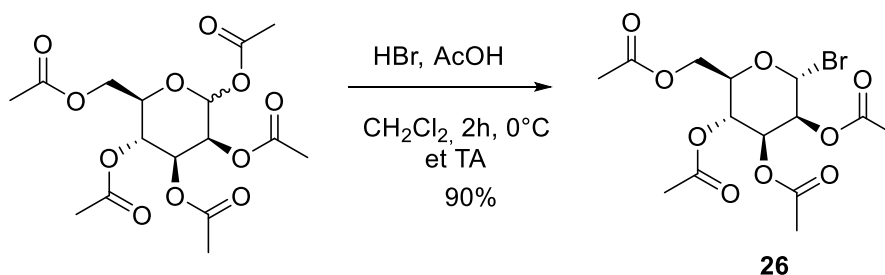


Schéma 19 : Préparation du mannose protégé par des acétates

Vis-à-vis des essais précédents de glycosylation, la réaction a été améliorée en augmentant le nombre d'équivalents de sucre et de base impliqués dans la réaction et en augmentant la concentration du milieu. Le carbonate de potassium a également été remplacé par du carbonate de césium et la réaction a été faite comme précédemment dans l'acétonitrile à 70°C pendant 20 heures. Les sondes **27** et **28** ont ainsi été synthétisées avec un rendement de respectivement 85% et 61% (Schéma 20). Le sucre protégé par les groupements benzoates sont plus difficiles à déprotéger, mais ont l'avantage de faciliter l'étape de purification de la glycosylation. Avec les acétates, la différence de polarité entre l'excès de sucre et la sonde glycosylé est trop faible pour permettre une bonne purification des sondes. Pour la suite, les sucres seront donc toujours protégés avec une fonction benzoate.

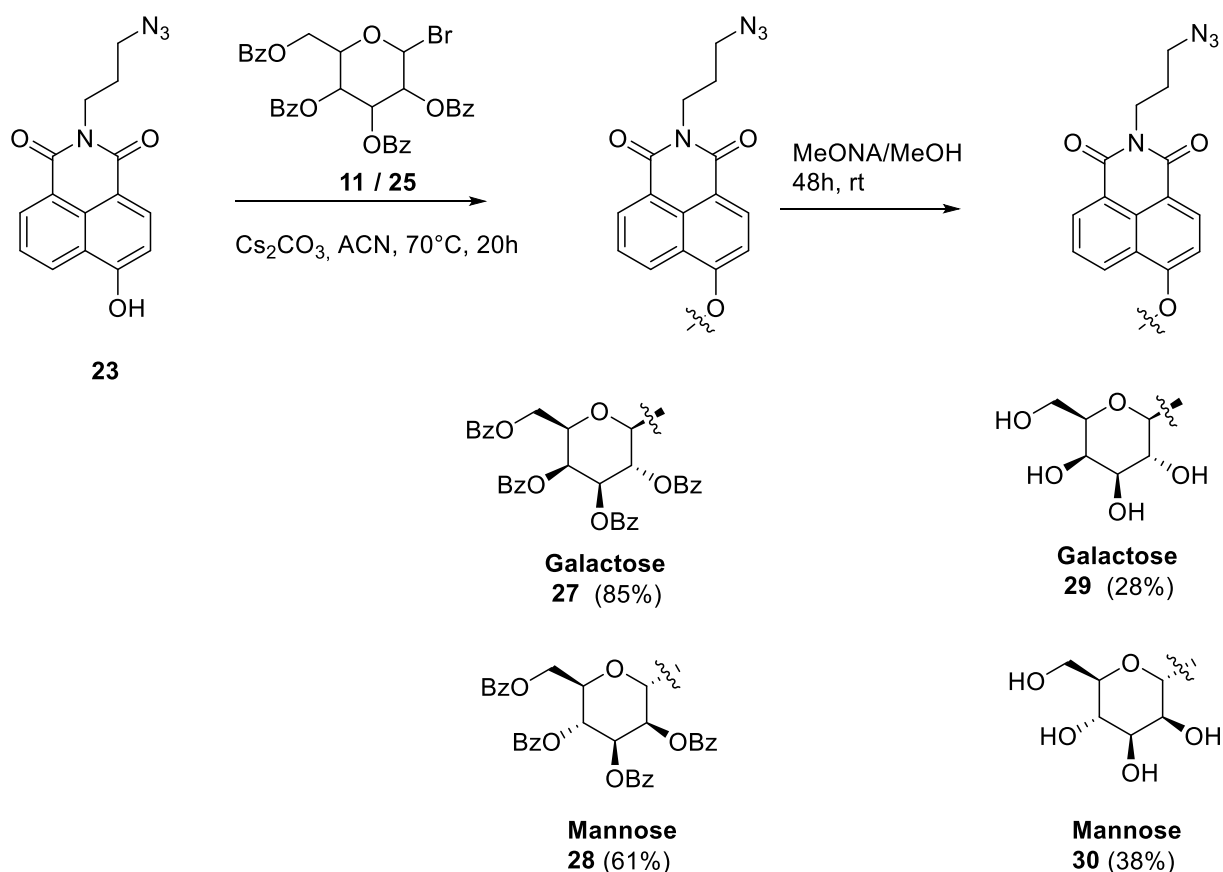


Schéma 20 : Glycosylation du naphthalimide et déprotection du sucre

Contrairement au galactose qui est obtenu sous forme β à l'issue de la glycosylation, c'est l'anomère α qui est synthétisé dans le cas du mannose. En effet, le groupement participant du carbone 2 est ici en position axiale, ce qui induit l'attaque du nucléophile uniquement par la face du bas (Schéma 21).

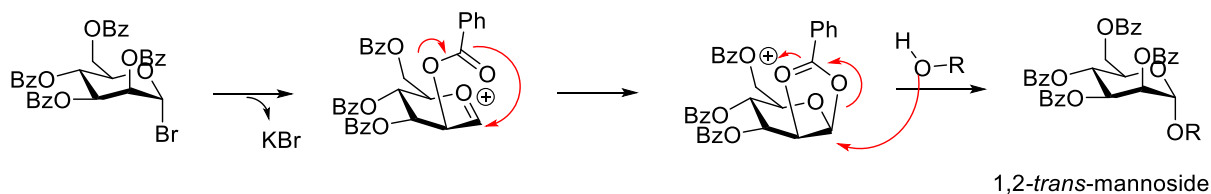


Schéma 21 : Mécanisme de la glycosylation du mannose avec assistance du groupement participant

Une partie des sondes **27** et **28** formées ont été déprotégée pour obtenir les sondes finales sans polymère **29** et **30** (Schéma 20).

Avant de réaliser la réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire entre les deux sondes **27** et **28** et les polymères de type PEG ou PVA, il a fallu préparer ces derniers de manière à ce qu'ils possèdent une fonction alcyne¹²⁰. Pour cela du polyéthylène glycol de masse molaire 1000 g/mol possédant une fonction terminal alcool à chaque bout a été mis à réagir avec un époxyde de type glycidyl propargyl éther dans une solution aqueuse de soude (0.1 M). La même réaction a été faite avec un alcool polyvinylique de masse molaire 10 000 g/mol (Schéma 22). Il a été montré par RMN que le polymère PVA **32** possède une triple liaison pour trois alcools libres. Ces polymères ont été purifiés par dialyse ou par exclusion stérique sur une colonne Sephadex G25. L'avantage de ces deux polymères est qu'il va être possible de greffer plusieurs sondes, identiques ou différentes, sur un même polymère

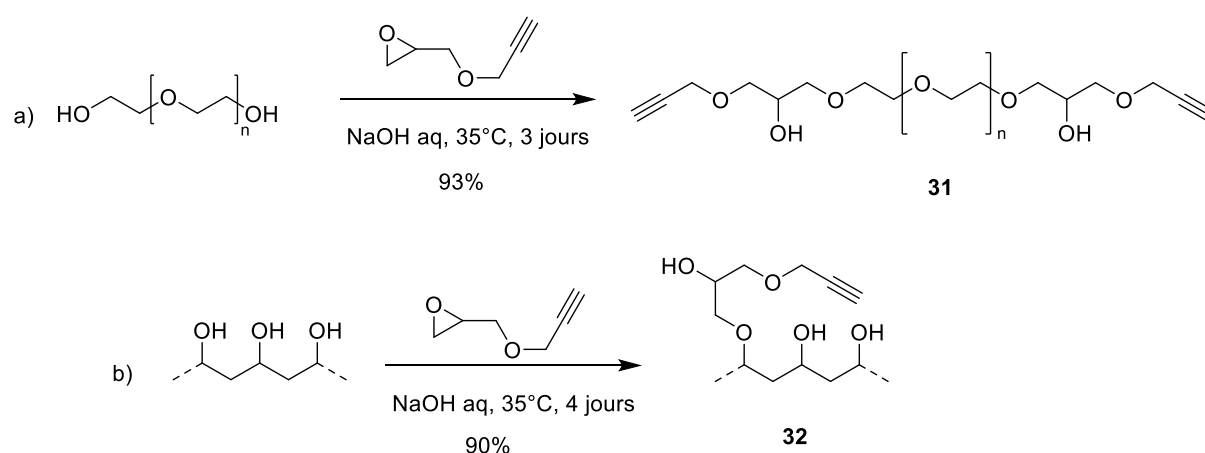


Schéma 22 : Préparation des polymères : a) Polyéthylène glycol ; b) Alcool polyvinylique

La réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire a été réalisée dans les conditions de Sharpless¹²¹ en présence d'un sel de cuivre (I) afin de contrôler la stéréochimie de la réaction et d'obtenir uniquement le 1,2,3- triazole 1,4-disubstitué et de diminuer la température et le temps de réaction vis-à-vis des conditions classiques. Le mécanisme de cette réaction est composé de cinq étapes (Schéma 23)¹²². La première étape correspond à la formation du complexe entre le cuivre (I) et l'alcyne. L'atome de cuivre active ensuite la fonction azoture, qui se substitue à un ligand pour former l'intermédiaire **c**. L'alcyne peut alors attaquer l'azoture pour former le métallacycle à 6 chaînons **d**. La formation du cycle à 5 chaînons et la protonation du dérivé cuprate de triazole permet d'obtenir le 1,2,3- triazole 1,4-disubstitué souhaité et de régénérer le catalyseur de cuivre.

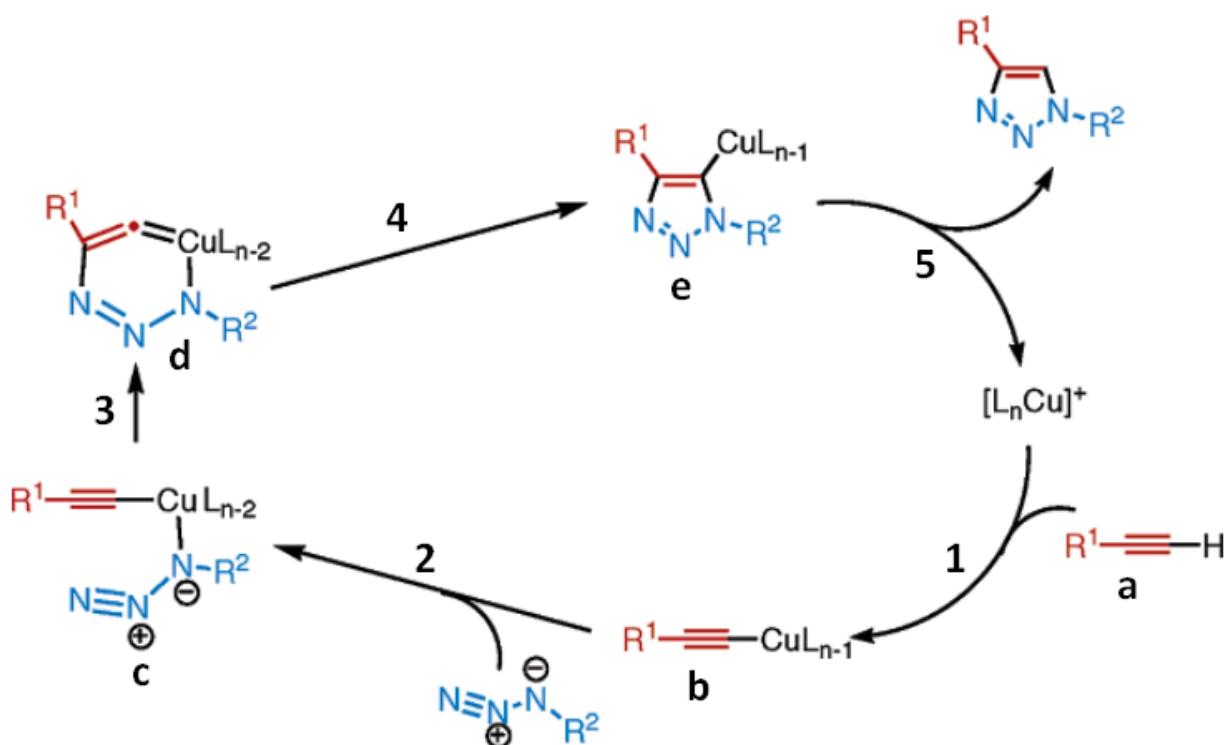


Schéma 23 : Mécanisme de 1,3-cycloaddition catalysée par le cuivre (I)

La réaction a été réalisée à température ambiante dans un mélange H₂O/DMF (1:9)¹²³. Le cuivre (I) a été généré à partir de sulfate de cuivre (II) et d'ascorbate de sodium. Le greffage du PEG a été directement suivi par la déprotection du sucre. Le brut obtenu a été purifié par exclusion stérique pour donner les sondes finales **33** et **34** (Schéma 24). Le greffage du PVA a été testé uniquement avec la sonde chlorocoumarine et sera donc abordé dans la partie concernée.

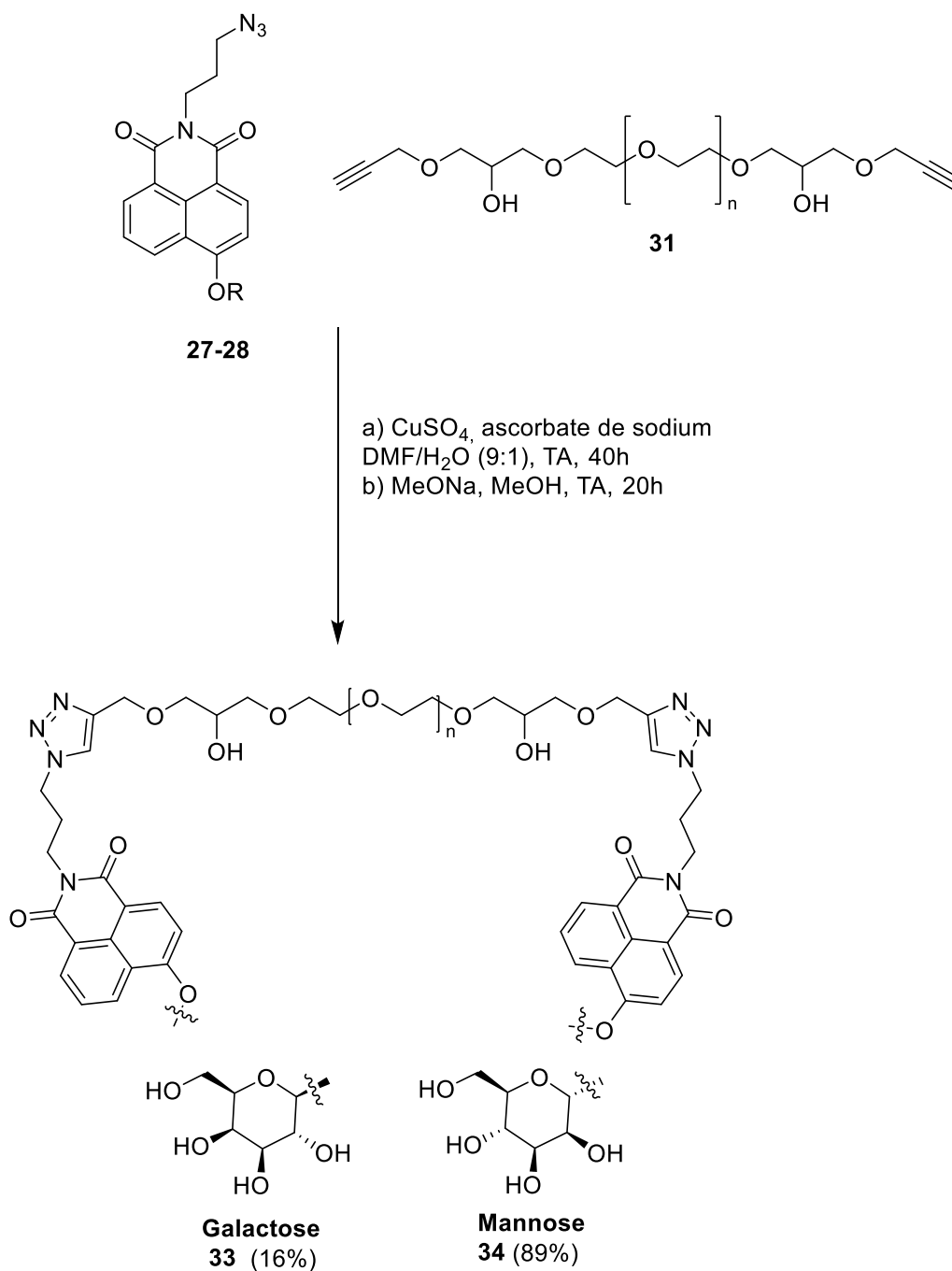


Schéma 24 : Couplage par chimie click et déprotection du sucre pour la sonde naphthalimide

La même réaction a également été réalisée avec la sonde **23** dans laquelle la fonction phénol est libre afin de former la sonde pH finale **35** (Schéma 25).

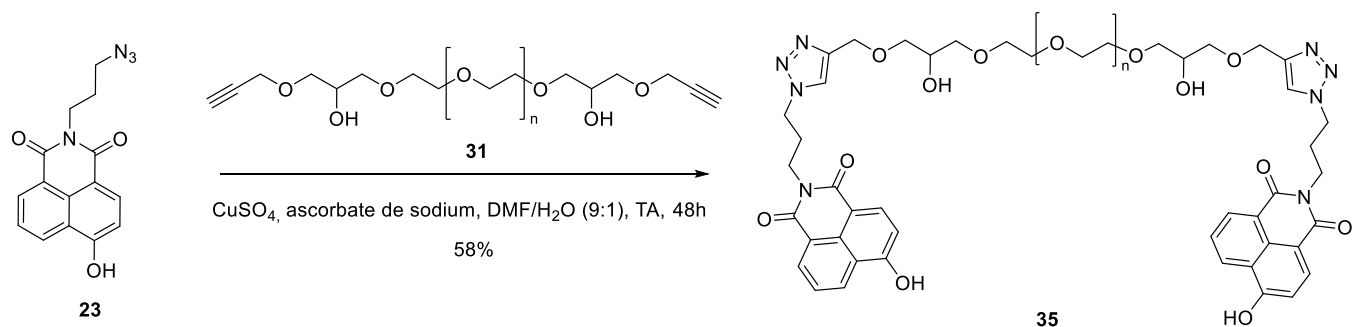


Schéma 25 : Dernière étape de la synthèse de la sonde pH naphthalimide

3.2 Synthèse de la sonde coumarine

La stratégie de synthèse utilisée pour la sonde coumarine a été de repartir du fluorophore **3** possédant une fonction acide carboxylique et de la coupler avec la chaîne **20** par une réaction de type couplage peptidique à partir du couple de réactif HBTU et DIEA (Schéma 26)¹²⁴.

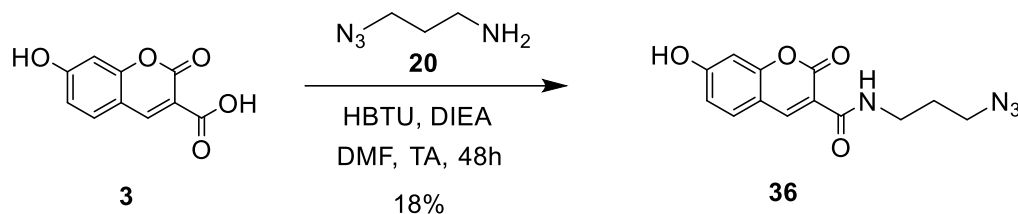


Schéma 26 : Synthèse du fluorophore coumarine

Le faible rendement de 18% s'explique par les difficultés de purification de cette sonde dû à sa très faible solubilité dans les solvants usuels de chromatographie. Ainsi, tout le brut n'a pas pu être purifié et le rendement de 18% ne correspond qu'à la partie purifiée, bien que plus de sondes **36** se soit formée en réalité.

La coumarine a uniquement été synthétisée en tant que sonde pH. La dernière étape de cette synthèse a donc consisté à greffer le PEG sur le fluorophore **36** par réaction de chimie click, dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 27). La sonde coumarine finale **37** a ainsi été obtenue avec un rendement de 56%.

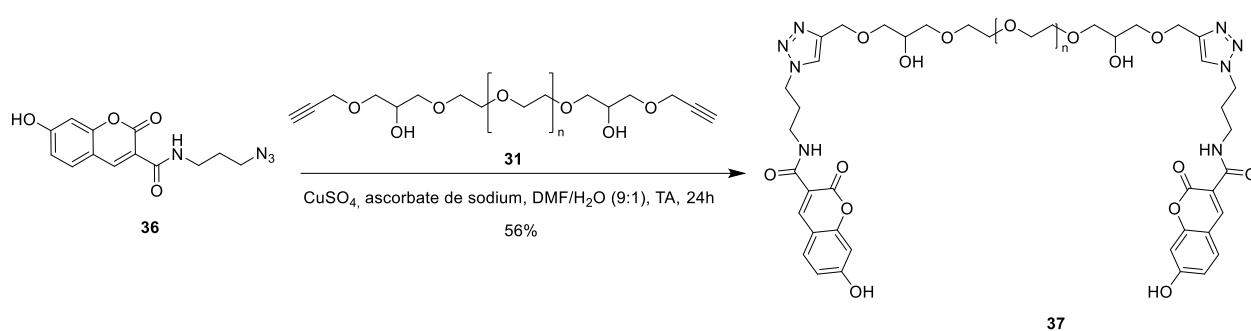


Schéma 27 : Synthèse de la sonde coumarine finale

3.3 Synthèse de la sonde chlorocoumarine

En raison des problèmes de solubilité rencontrés avec la sonde coumarine **36**, une stratégie de synthèse différente a été mise en place pour la sonde chlorocoumarine. La coumarine a ainsi été synthétisée de manière à intégrer le groupement azido comme substituant du cycle aromatique sans bras espaceur¹²⁵.

Le fluorophore chlorocoumarine a ainsi été synthétisé à partir de l'aldéhyde **4** par réaction avec le N-acétylglycine dans l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre. Cette étape permet à la fois la cyclisation et la protection des fonctions alcool et amine. Ces fonctions sont ensuite déprotégées et l'amine est transformée en azoture pour donner directement le fluorophore **38** (Schéma 28). Cette sonde est obtenue avec un faible rendement de 13% (pour les trois étapes) qui n'a pas pu être optimisé, mais la facilité et la rapidité des différentes étapes viennent valider cette nouvelle voie de synthèse. De plus, le produit est obtenu propre par précipitation, ce qui résout les problèmes de solubilité et de purifications rencontrés précédemment.

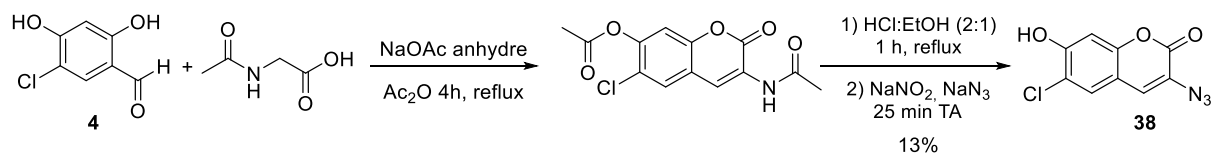


Schéma 28 : Synthèse du fluorophore chlorocoumarine

Les étapes suivantes sont identiques à celle de la sonde naphthalimide : la glycosylation du galactose et du mannose, le greffage du polymère et la déprotection du sucre. La glycosylation des deux sucres a été faite dans l'acétonitrile à 70°C et a conduit à la formation des produits **39** et **40**. Une partie de ces sondes a été déprotégée pour donner les sondes finales **41** et **42** (Schéma 29).

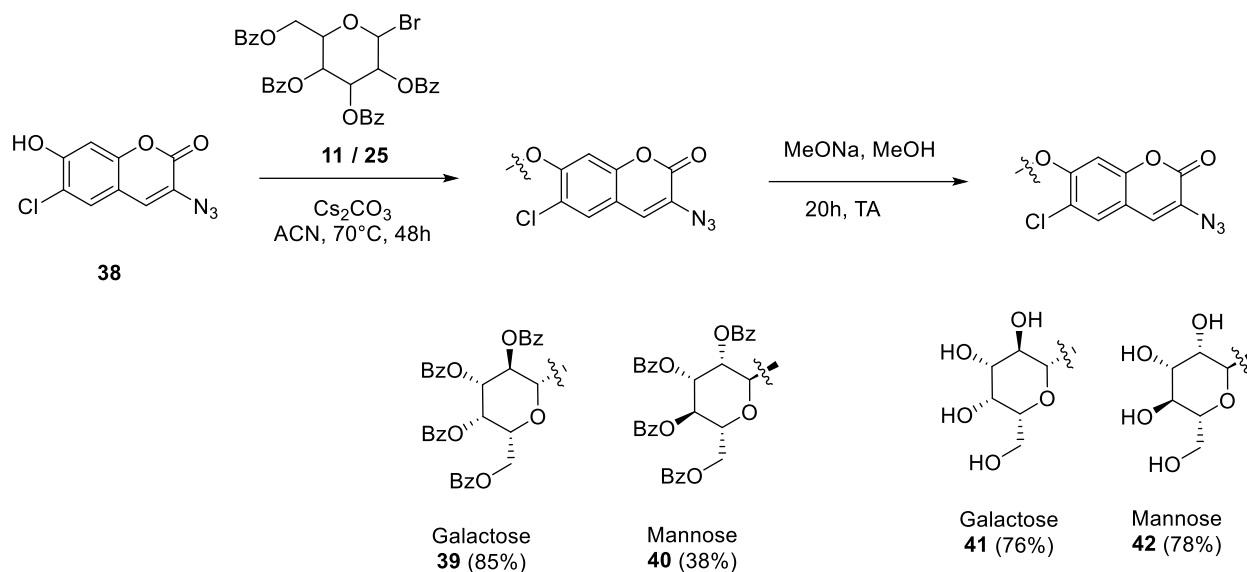


Schéma 29 : Réaction de glycosylation du fluorophore chlorocoumarine

Le reste des sondes **39** et **40** a été greffé au PEG dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 30).

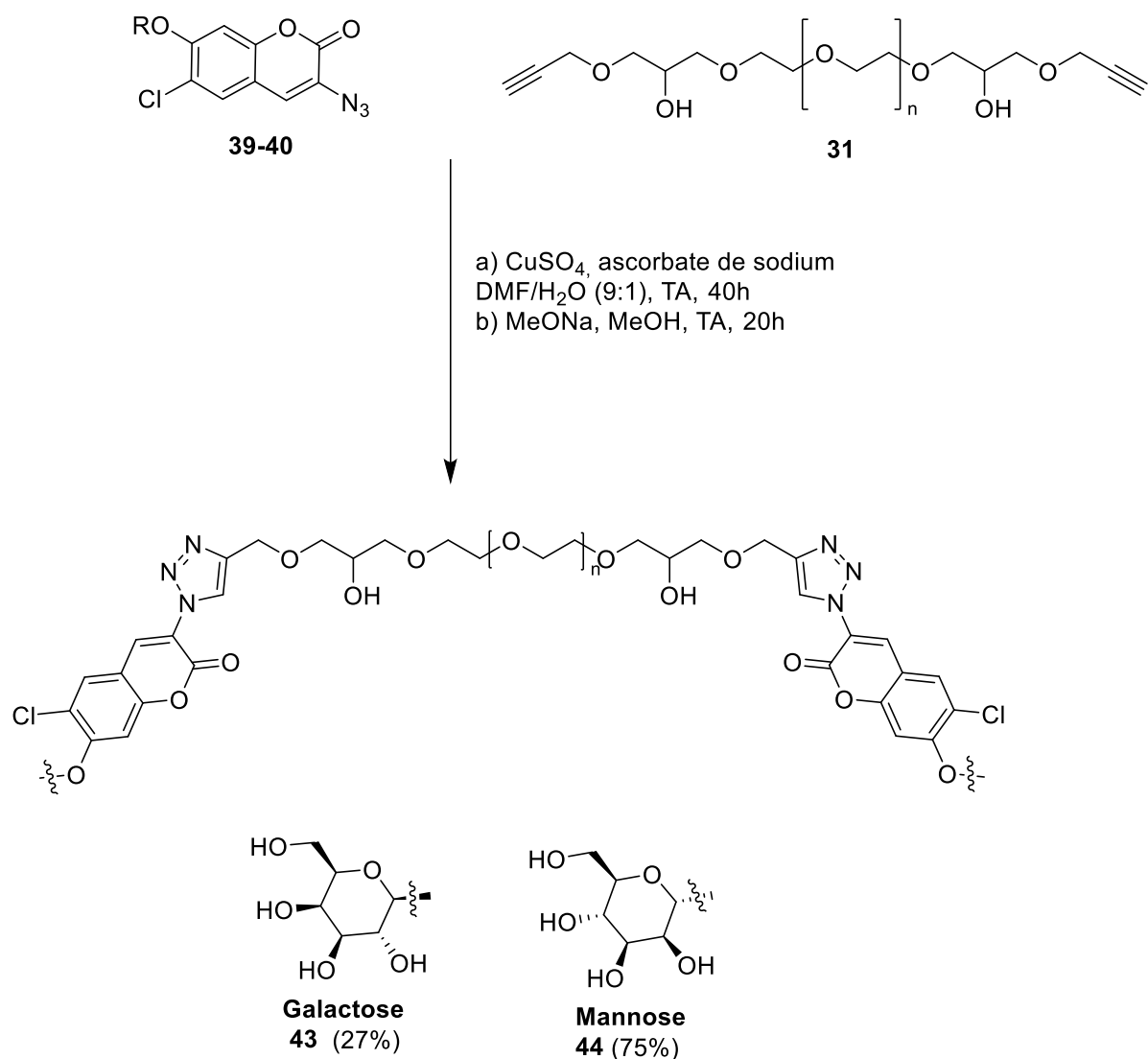


Schéma 30 : Couplage par chimie click et déprotection du sucre pour la sonde chlorocoumarine

Le greffage de l'alcool polyvinyle a également été testé avec la sonde coumarine 41 dont le galactose avait été déprotégé auparavant. Ainsi 25 équivalents de sonde ont été mis en réaction avec 1 équivalent de polymère **32** dans les conditions habituelles. La sonde finale **45** a été obtenue après purification par exclusion stérique avec un rendement de 64% (Schéma 31).

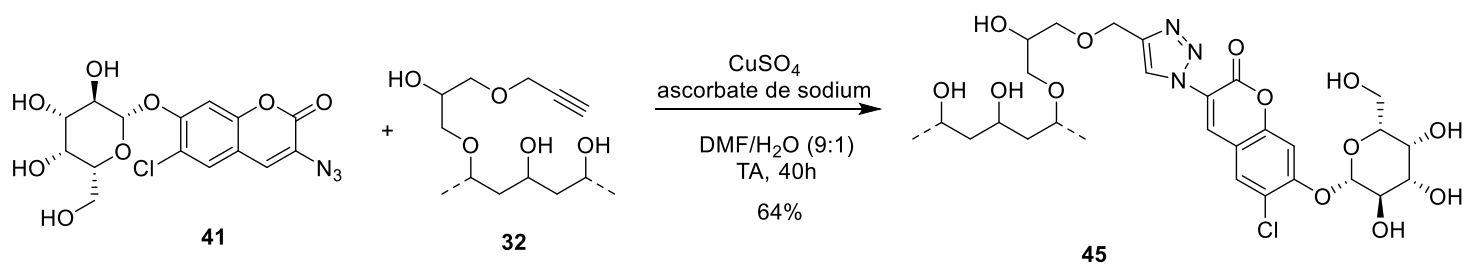


Schéma 31 : Greffage du PVA sur la sonde chlorocoumarine

Enfin, le dernier composé à préparer pour terminer la série de sondes chlorocoumarine a été la sonde pH. Le PEG a donc été greffé à la sonde **38** possédant sa fonction phénol libre (Schéma 32).

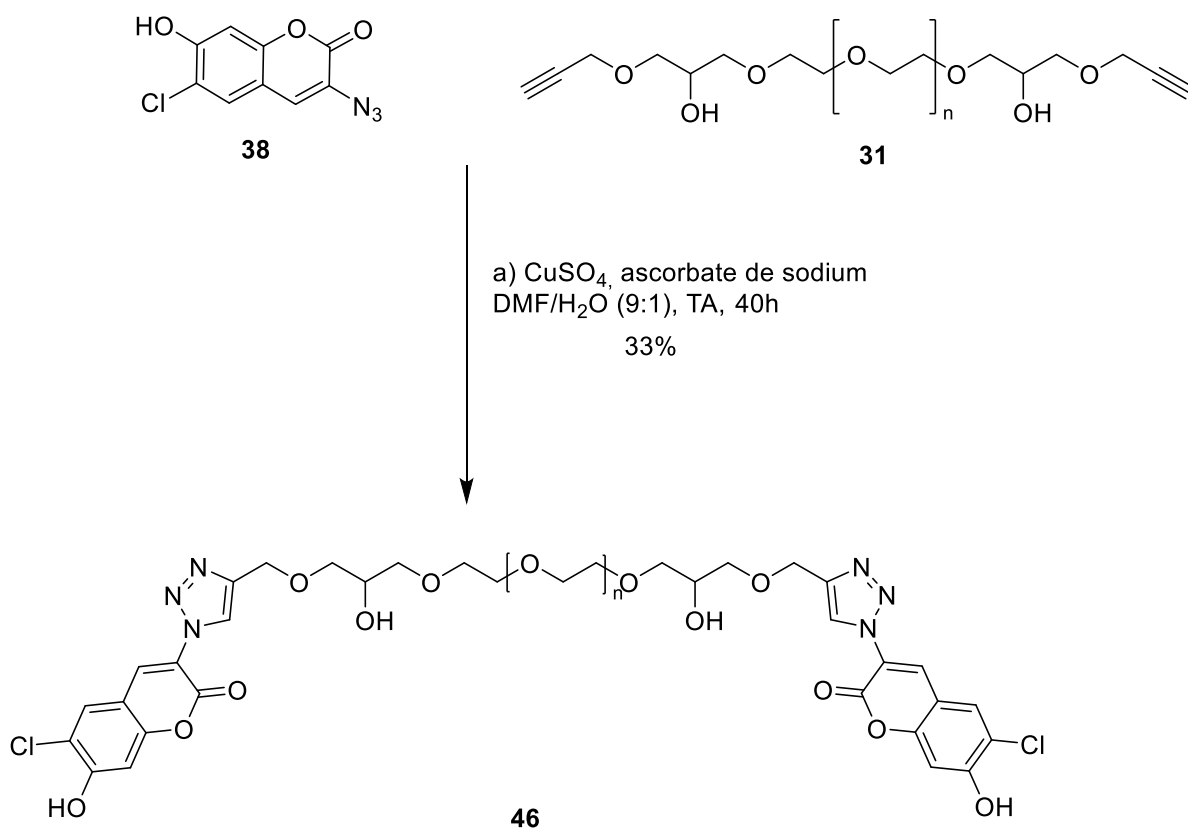


Schéma 32 : Dernière étape de la synthèse de la sonde pH chlorocoumarine

IV. Synthèse de la sonde cyanine

4.1 Synthèse de la sonde pH cyanine

La sonde cyanine est composée de deux parties : une partie indolénine à laquelle sera greffée une chaîne se terminant par un azoture afin de conserver la stratégie click pour l'ajout du polymère et une deuxième partie naphthalène qui possède le groupement phénol (Schéma 33). Ce naphthalène possède également une fonction aldéhyde permettant de coupler les deux motifs par une réaction de Knoevenagel.

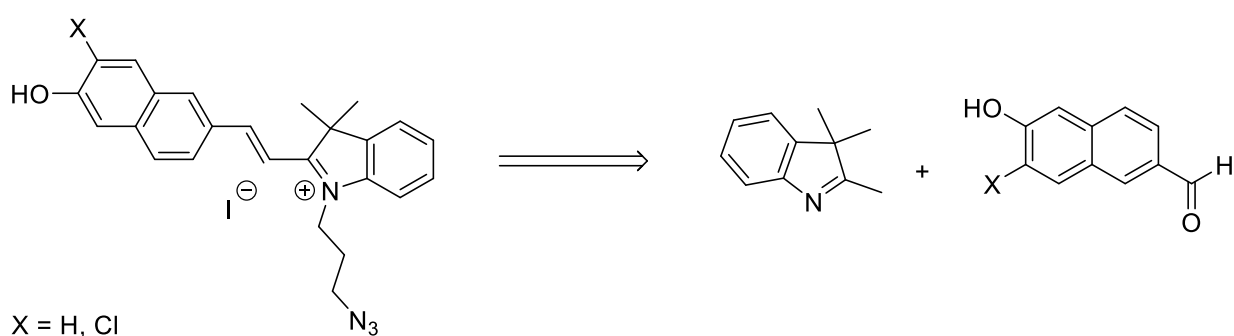


Schéma 33 : Rétrosynthèse de la sonde cyanine

La première étape de la synthèse constitue à la préparation du motif indolénine. Pour cela, une chaîne 1-azido-3-iodopropane a tout d'abord été préparée à partir de 1-chloro-3-iodopropane (Schéma 34)¹²⁶. L'iode a dans un premier temps été substitué par l'azoture par réaction d'azoture de sodium dans le DMF. Puis le chlore a été substitué par un iode par réaction de l'iodure de sodium dans l'acétone à 60°C. Le bras **47** a ainsi été obtenu avec un rendement de 61%.

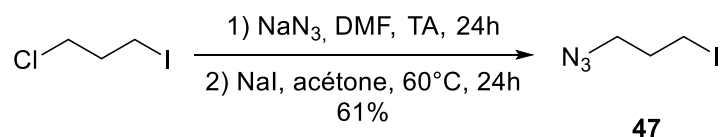


Schéma 34 : Préparation du 1-azido-3-iodopropane

La chaîne **47** a ensuite été couplée à l'indolénine par reflux dans l'acétonitrile pour donner le motif **48** dans un rendement de 63% (Schéma 35)¹²⁷.

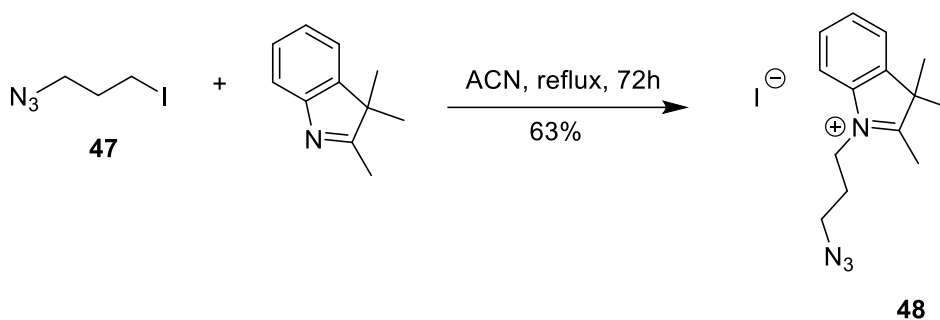


Schéma 35 : Synthèse du motif indolénine

Le motif naphthalène possédant un proton en ortho du phénol est commercial tandis que la version chlorée a dû être préparée. Pour cela, la même méthode que pour la sonde coumarine a été employée. Le 6-hydroxy -2-naphtaldéhyde a été mis en réaction avec 1 eq de NCS dans le chloroforme en présence d'une quantité catalytique d'acide chlorhydrique pour donner la molécule **49** avec un rendement de 82% (Schéma 36). Les analyses RMN ^1H , ^{13}C et HMBC ont confirmé que la position chlorée a bien été la position 5 souhaitée en ortho du phénol.

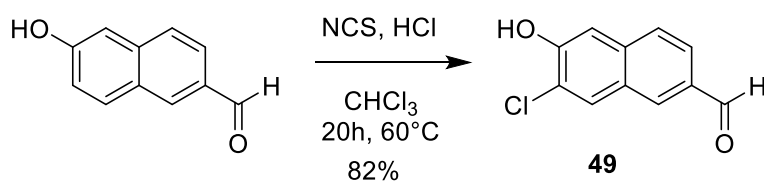


Schéma 36 : Chloration du 6-hydroxy -2-naphtaldéhyde

Les deux motifs ainsi préparés ont été couplés par réaction de condensation de Knoevenagel (Schéma 37)¹²⁸. La réaction a été réalisée dans l'éthanol à reflux en présence de pyridine agissant comme base en quantité catalytique. Les cyanines **50** et **51** sont ainsi obtenues avec de bons rendements de respectivement 90% et 74%.

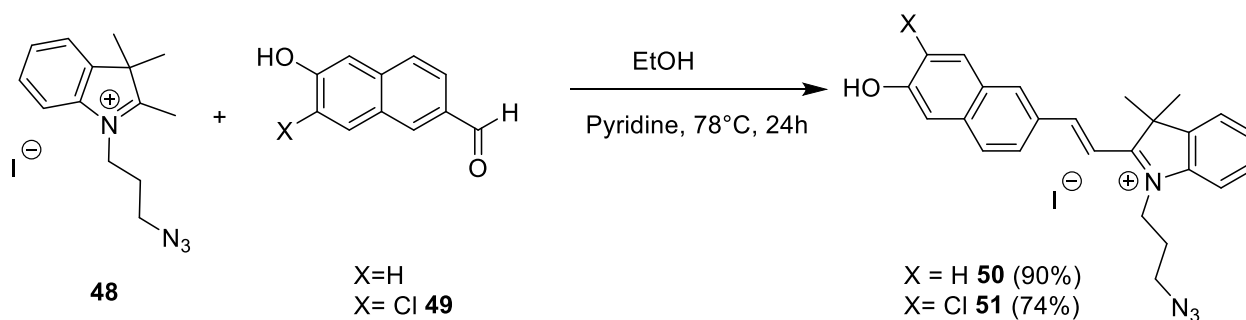


Schéma 37 : Réaction de Knoevenagel entre la partie indolénine et la partie naphtalène

Enfin, les fluorophores **50** et **51** ont été greffés au PEG **31** par réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire (Schéma 38) pour donner les sondes pH cyanine **52** et chlorocyanine **53**.

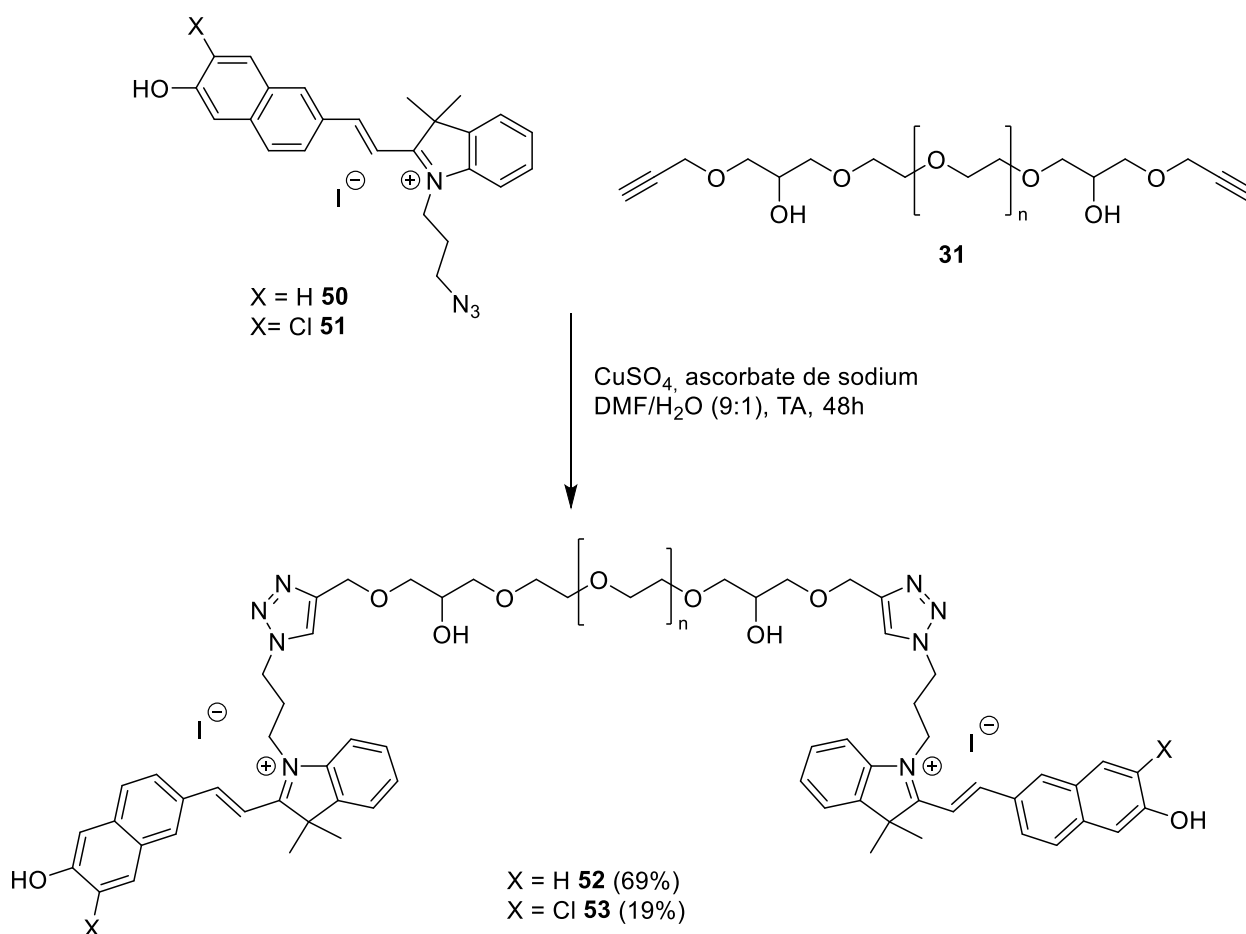


Schéma 38 : Greffage des fluorophores 50 et 51 sur le PEG 31

4.2 Glycosylation du fluorophore cyanine

Plusieurs essais ont été réalisés pour glycosyler les sondes cyanine et chlorocyanine. Tout d'abord, la glycosylation du galactose a été faite directement sur les naphthalènes avant la condensation de Knoevenagel. La glycosylation a été effectuée dans des conditions similaires à celles réalisées précédemment (Schéma 39).

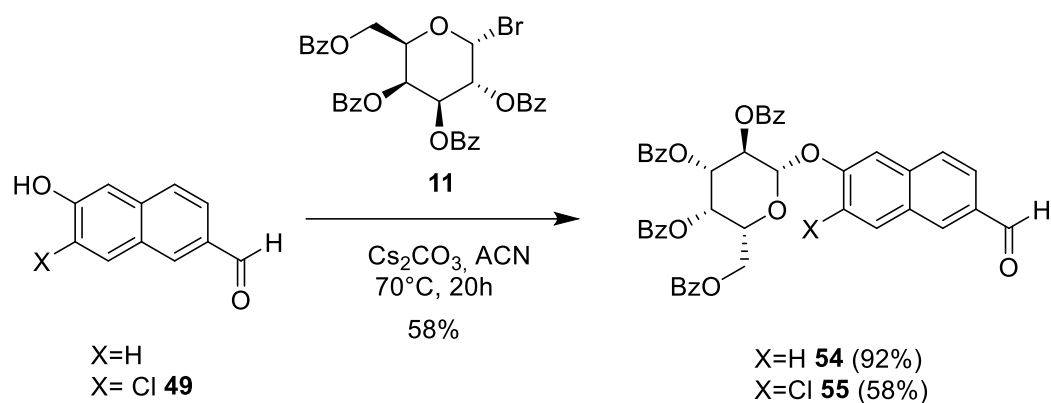


Schéma 39 : Glycosylation du galactose sur le naphthalène

La condensation de Knoevenagel a été une première fois testée entre le naphthalène **54** et l'indolénine **48** dans les mêmes conditions que pour la sonde pH (Schéma 40). Un produit a été obtenu à l'issue de la purification, mais il s'agit d'un produit de dégradation, la masse molaire du produit obtenu étant plus faible que celle du produit attendu. De plus, les conditions de déprotection du sucre dans l'étape suivante risquent de provoquer la réaction de rétro- Knoevenagel.

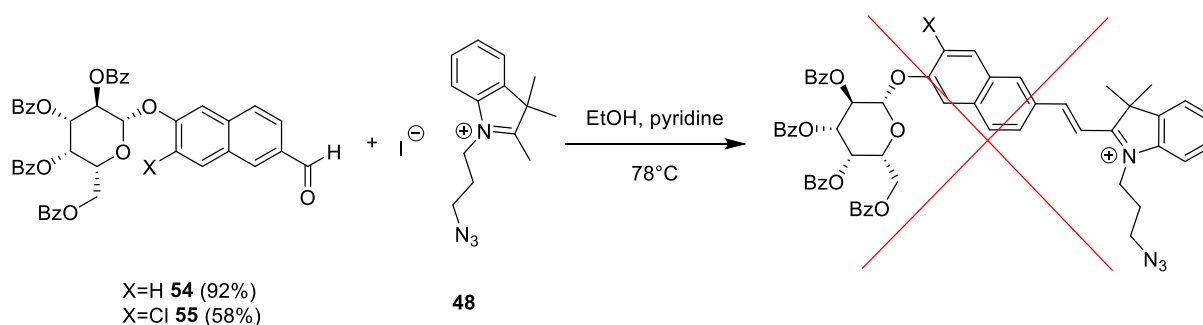


Schéma 40 : Premier essai de condensation de Knoevenagel

Un deuxième essai avec le sucre préalablement déprotégé a donc été tenté (Schéma 41). Encore, une fois le produit obtenu n'a pas été celui attendu : la RMN montre la présence

de la sonde cyanine, mais les signaux correspondant aux sucres sont absents montrant une perte du galactose.

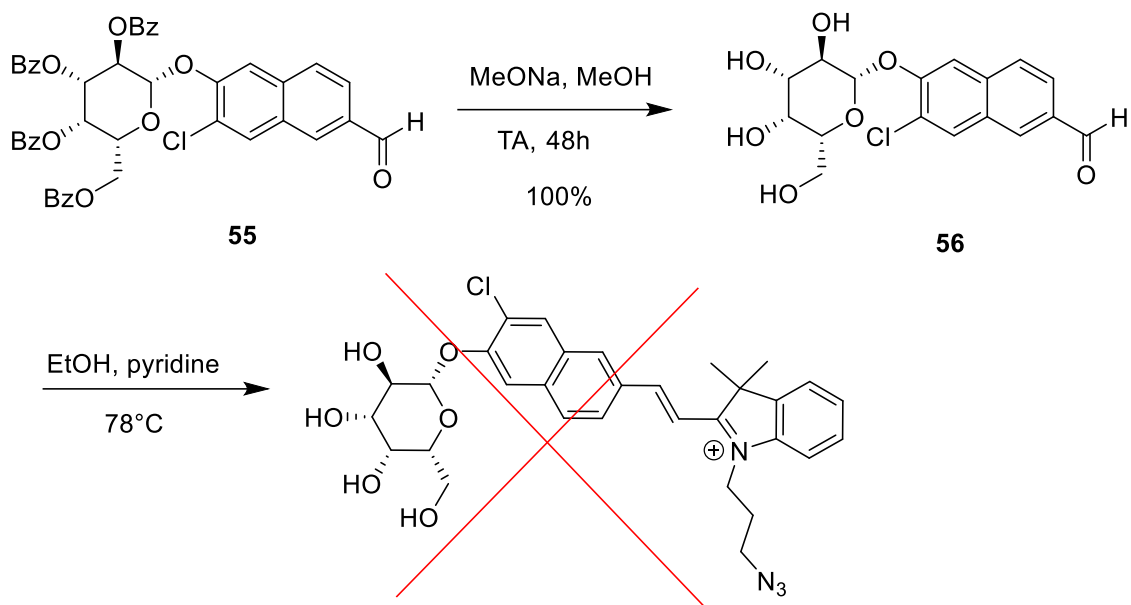


Schéma 41 : Deuxième essai de condensation de Knoevenagel avec sucre déprotégé

Un dernier essai consistant à faire la réaction de glycosylation après la condensation de Knoevenagel a été tenté (Schéma 42). Le produit souhaité semble avoir été obtenu d'après le suivi par CCM, cependant il s'est dégradé durant l'étape de purification.

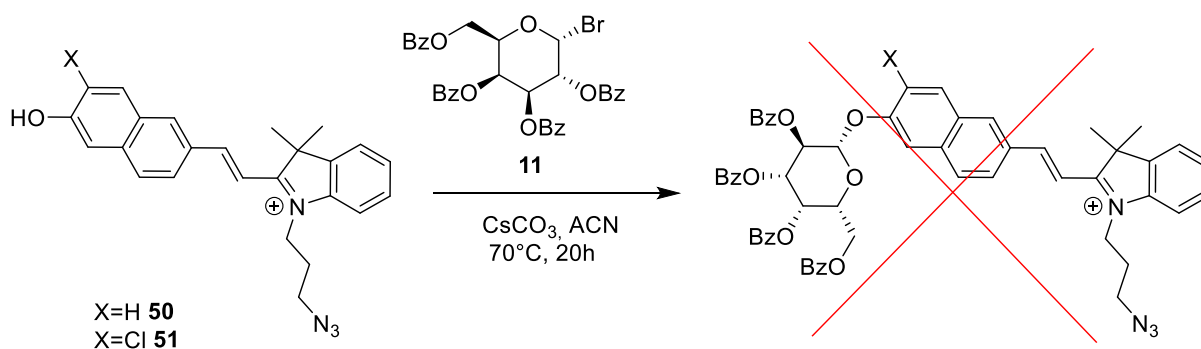


Schéma 42 : Troisième essai de condensation de Knoevenagel

Aucun essai n'a donc été concluant pour la glycosylation de la sonde cyanine qui sera donc uniquement utilisée pour la suite en tant que sonde pH.

Cinq sondes au total ont donc été synthétisées pour étudier l'activité pH ou glycosidase des bactéries. La deuxième partie de ce projet consiste à déterminer le pKa de ces sondes ainsi que leurs propriétés physico-chimiques (longueurs d'onde d'excitation et d'émission, coefficients d'extinction molaire et rendements quantique).

Chapitre 3. Caractérisations physico-chimiques des sondes pH et glycosidases

I. Introduction à la fluorescence

Depuis une dizaine d'années, notre compréhension des systèmes biologiques a fortement augmenté grâce à l'amélioration des techniques de visualisation et de quantification des signaux émis par les molécules. Chaque molécule organique est capable d'absorber la lumière en interagissant avec un ou plusieurs photons, lors du processus d'absorption. La fluorescence, à l'instar de la phosphorescence, est induite par un phénomène d'émission d'un photon dans une molécule à l'état excité.

Le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 34)¹²⁹ propose une représentation des niveaux d'énergie et des sauts entre ces niveaux expliquant ces phénomènes de luminescence. Ainsi l'absorption de photons provoque le passage des électrons de la molécule à l'état excité. La molécule peut alors passer par divers processus compétitifs pour revenir à l'état fondamental. Les molécules organiques se désexcitent généralement de manière non radiative, sans émission de photon. Certaines molécules possédant une liberté vibrationnelle réduite émettent quant à elles un photon en repassant à l'état fondamental : c'est le phénomène de fluorescence¹³⁰.

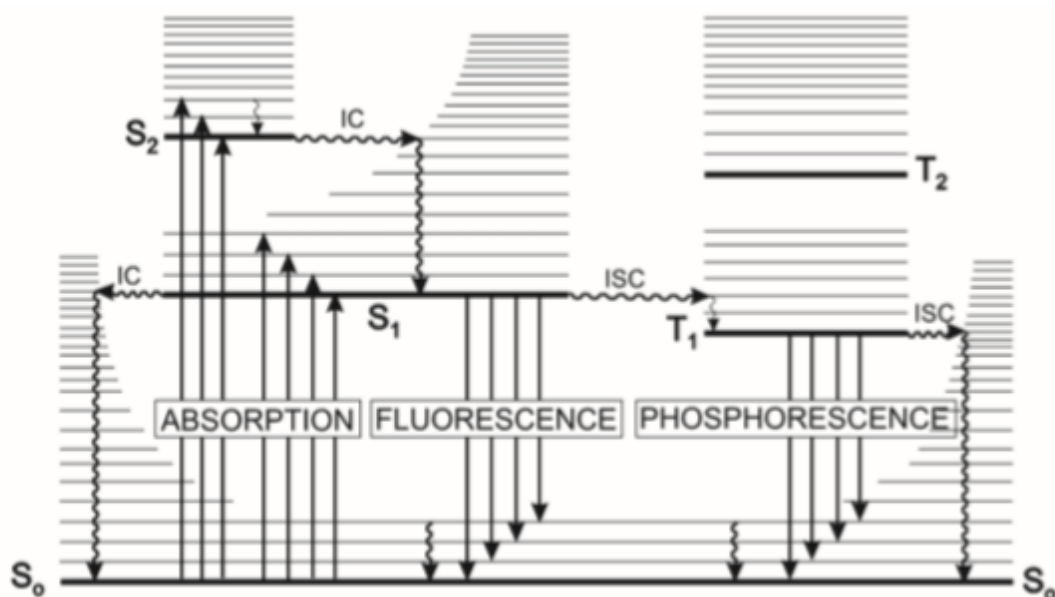


Figure 34 : Diagramme de Perrin-Jablonski

La fluorescence se traduit par une réémission de la lumière dans des longueurs d'onde plus élevées que le rayon incident (excitation), car le photon émis par la molécule est de plus faible énergie que celui absorbé¹³¹. Le décalage entre ces deux longueurs d'onde est appelé déplacement de Stokes. La capacité d'une molécule en solution à absorber de la lumière se traduit par une décroissance exponentielle du faisceau incident et se traduit selon la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \ell \varepsilon C$$

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert

avec :

- $A(\lambda)$: Absorbance à une longueur d'onde λ
- I_0 : Intensité du faisceau incident
- I : Intensité du faisceau transmis
- ℓ : Trajet optique
- ε : Coefficient d'absorption molaire
- C : Concentration

L'efficacité de la fluorescence est caractérisée par le rendement quantique Φ qui peut être défini comme le ratio entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés.

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Équation 1: Rendement quantique de fluorescence

avec :

- Φ : rendement quantique de fluorescence
- k_r : constante de vitesse de désexcitation radiative
- k_{nr} : constante de vitesse de désexcitation non-radiative

Dans ce chapitre, les pKa des sondes pH dont la synthèse a été développée dans le chapitre 2 seront déterminés grâce aux courbes d'excitation et d'émission en fonction du pH. Les

caractéristiques physico-chimiques tels que le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique des différentes sondes seront également déterminés.

II. Fonctionnement des sondes pH

Comme cela a été vu précédemment, le pH joue un rôle important dans la croissance bactérienne et les bactéries elles-mêmes modifient le pH de leur environnement par leurs activités métaboliques. Le pH est donc un moyen de contrôle de divers mécanismes biologiques, car une variation de la concentration en ions H^+ peut moduler l'activité enzymatique et contrôler de nombreux processus physiologiques¹³².

Le développement de la fluorescence a permis le suivi du pH en milieu biologique avec une meilleure résolution que les méthodes alors utilisées et sans toxicité pour les cellules. Ces sondes se basent sur la protonation et la déprotonation d'une fonction chimique, ce qui modifie les propriétés spectroscopiques de la molécule sensible à la concentration de protons dans le milieu¹³³. Plusieurs sondes pH ont été développées ces dernières années et possèdent dans la plupart des cas un phénol comme groupe sensible, c'est-à-dire déprotonnable¹³⁴.

Ainsi, bien que le pKa d'une fonction phénol soit aux alentours de 9, il est possible de modifier structurellement la molécule de manière à ce que son pKa atteigne des valeurs proches du pH physiologique. De plus, le groupement hydroxyl est un faible groupe électrodonneur, alors que la forme phénoxyde enrichit le système grâce à sa charge négative qui peut se délocaliser le long des cycles aromatiques. Le phénol et le phénolate posséderont de fait des caractéristiques très différentes en absorption et en émission.

Les sondes pH développées dans ce travail sont des sondes ratiométriques. Elles possèdent deux longueurs d'onde d'excitation différentes - l'une correspondant à la forme acide et l'autre à la forme basique - pour une seule longueur d'onde d'émission. En effet, la présence ou l'absence d'une charge délocalisable induit l'obtention de niveaux

d'énergie différents donnant au phénol et au phénolate deux absorptions distinctes. Néanmoins, la forme acide, une fois excitée, devient très acide et se déprotone spontanément, ce qui explique l'apparition d'une seule émission correspondant à celle de la forme basique.

III. Détermination du pKa des sondes pH

Le pKa des différentes sondes synthétisées dans le chapitre 1 ont été déterminés pour savoir si les sondes sont compatibles avec le milieu biologique qui sera utilisée pour le suivi de l'activité glycosidase des bactéries. Ainsi, les sondes devront avoir un pKa inférieur à 6 pour pouvoir être utilisée en tant que sondes glycosidases.

Les mesures des spectres d'émission et d'excitation ont été réalisées à différents pH dans une solution de tampon universel à une concentration de 10^{-4} M en fluorophore. Le tampon universel aussi appelé tampon de Britton–Robinson¹³⁵ est un tampon dont le pH peut être ajusté en fonction des besoins de pH=2 à pH=12. Il est constitué d'un mélange d'acides de pKa couvrant le domaine 2-12 de sorte que le changement de pH est approximativement proportionnel à la quantité de base ajoutée. Les trois acides utilisés sont H_3BO_3 , H_3PO_4 et CH_3COOH .

3.1 Sonde naphthalimide

Les spectres d'excitation et d'émission de la sonde naphthalimide en fonction du pH (Figure 35) confirment bien l'effet ratiométrique de la sonde. Le spectre du haut indique la présence de deux longueurs d'onde d'excitation distinctes correspondant aux formes acides et basiques : 368 nm et 446 nm. En bas, les deux spectres montrent une longueur d'onde d'émission identique à 560 nm pour les formes acides et basiques. De plus, sur le spectre de gauche, excité à 368 nm, l'intensité de l'émission augmente avec le pH tandis que pour celui de droite, excité à 446 nm, l'intensité de l'émission diminue avec le pH. Cela permet de confirmer que $\lambda_{exc} = 368$ nm correspond à la forme acide et $\lambda_{exc} = 446$ nm à la forme basique.

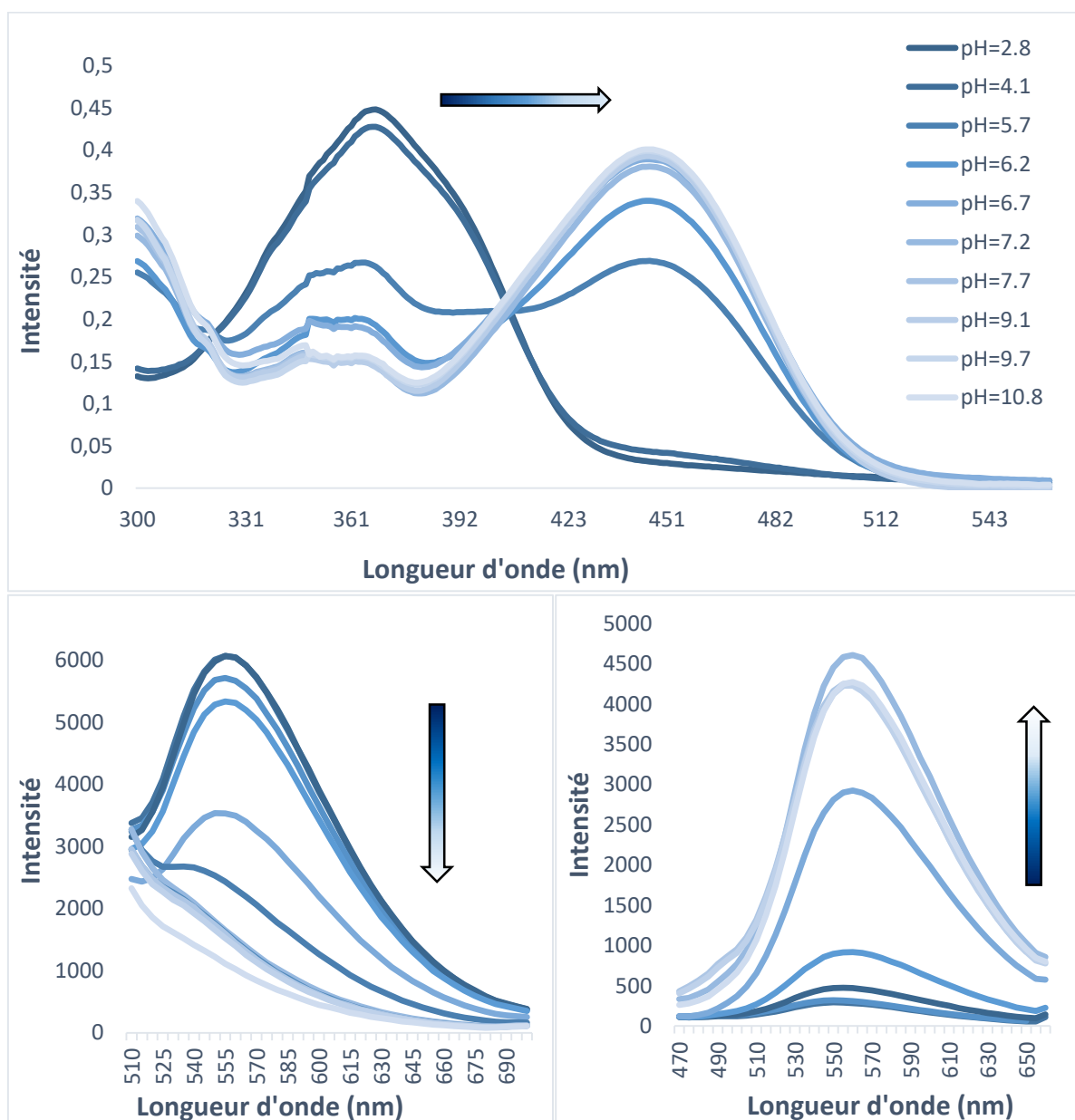


Figure 35 : Haut - Spectre d'absorption en fonction du pH. Bas gauche - Spectre d'émission de la forme acide en fonction du pH ($\lambda_{exc}=368$ nm). Bas droite - Spectre d'émission de la forme basique en fonction du pH ($\lambda_{exc} = 446$ nm)

En traçant l'évolution d'intensité maximale des deux courbes d'émission en fonction du pH, on obtient deux nouvelles courbes. Le pKa expérimental correspond alors à la demie-vague pour les deux courbes¹³⁶ (Figure 36). Ainsi, le pKa obtenu expérimentalement est de 5,6, ce qui indique que la sonde naphthalimide est bien utilisable comme sonde glycosidase.

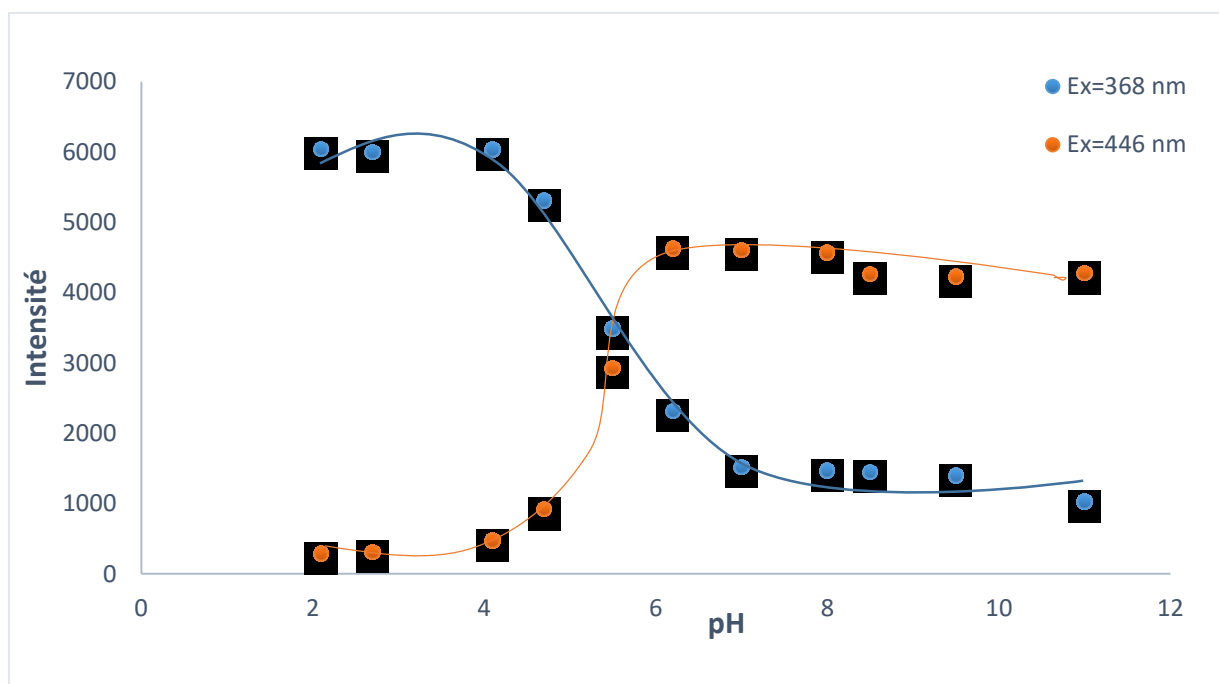


Figure 36 : Evolution de l'intensité maximale des courbes d'émission des formes acides et basique en fonction du pH

Une autre méthode plus précise a également été utilisée pour vérifier cette valeur. La courbe $\log((F-F_{\text{max}})/(F_{\text{min}}-F))$ en fonction du pH a été tracée pour chaque forme. La régression linéaire de la droite obtenue coupe l'axe des ordonnées en un point correspondant au pK_a^{137} . La courbe $\log((F-F_{\text{max}})/(F_{\text{min}}-F))$ en fonction du pH pour la forme basique présentée en Figure 37 indique un pK_a de 5,5. Le même résultat est obtenu lorsqu'on trace la droite correspondant à la forme acide.

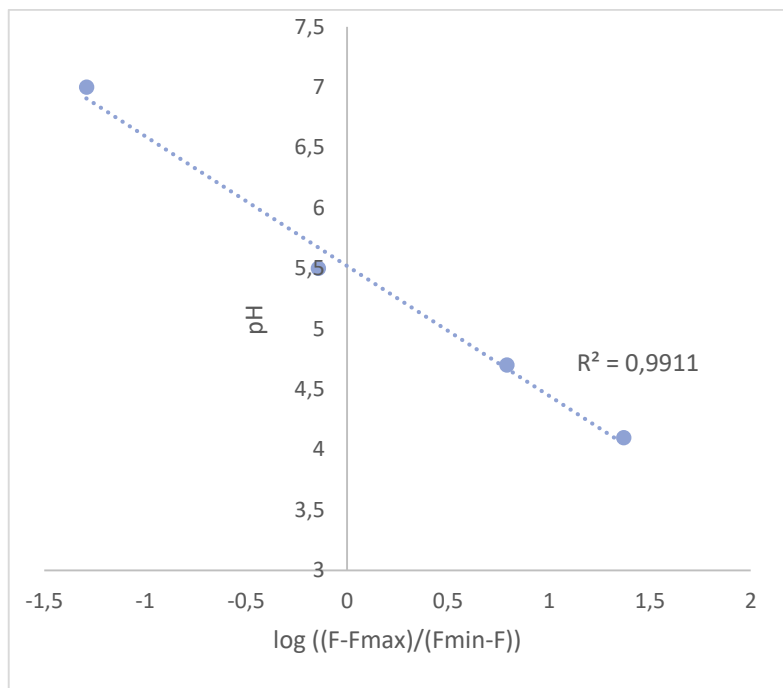
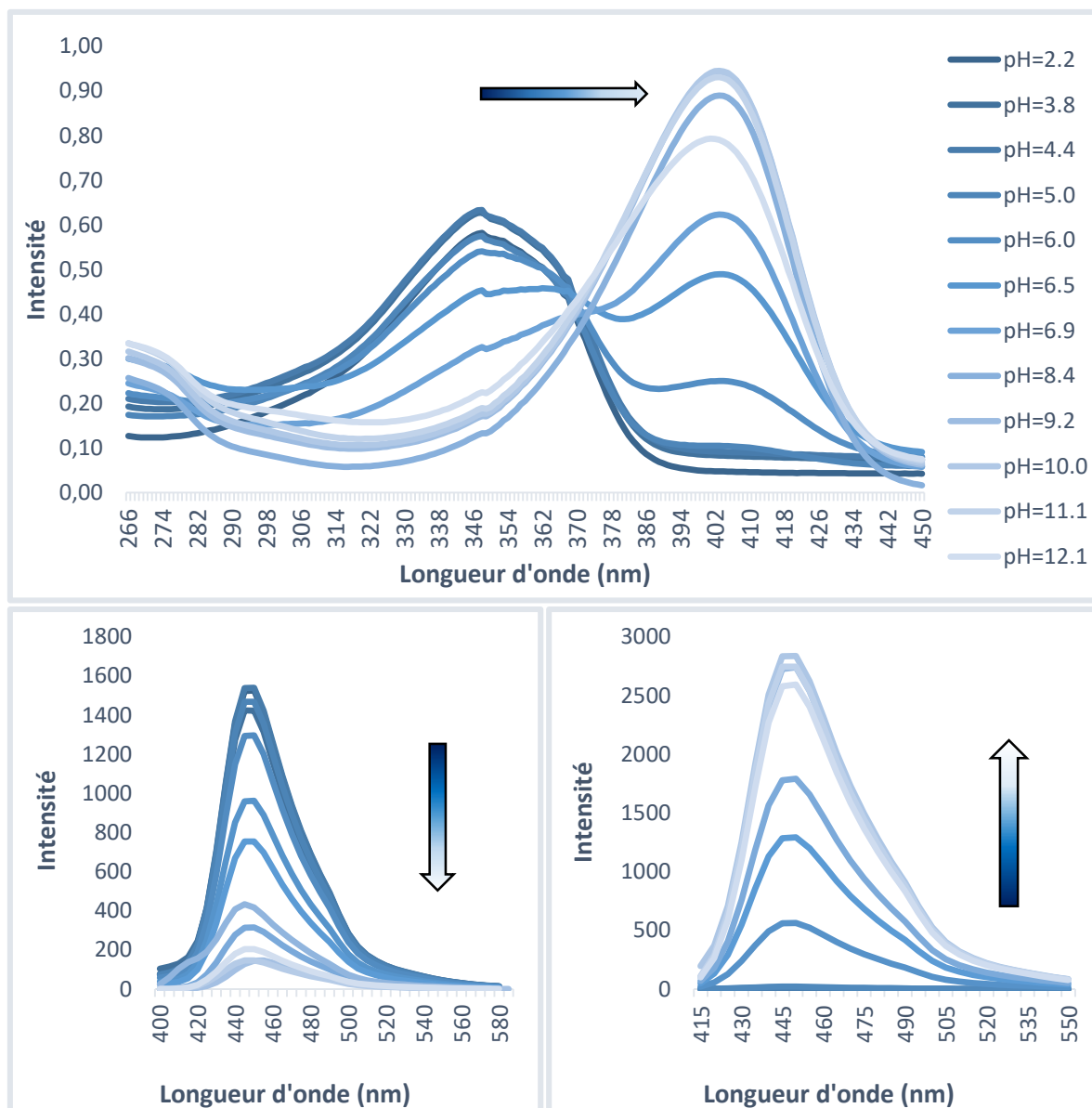


Figure 37 : Régression linéaire de la courbe $\log((F-F_{\max})/(F_{\min}-F))$ en fonction du pH pour la forme basique

3.2 Sonde coumarine

D'après les spectres d'excitation et d'émission en fonction du pH (Figure 38), les longueurs d'onde d'excitation pour la sonde coumarine sont 347 nm et 403 nm et la longueur d'onde d'émission est 450 nm.



En traçant l'évolution d'intensité maximale des deux courbes d'émission en fonction du pH (Figure 39), le pKa obtenu pour la sonde coumarine est de 6,4.

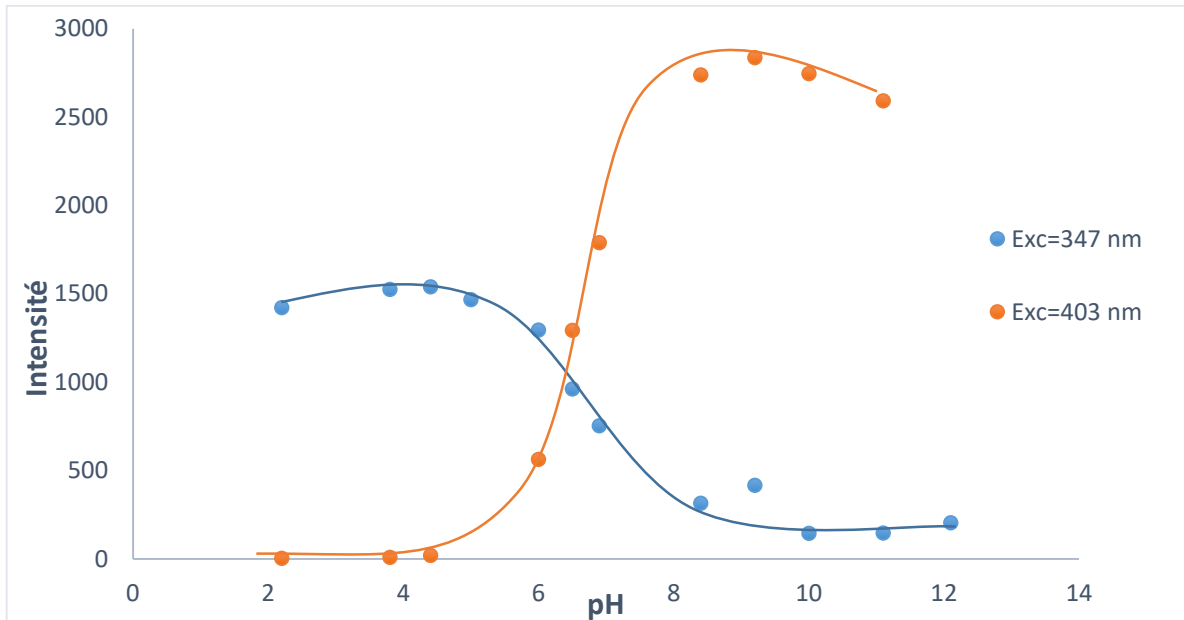


Figure 39 : Evolution de l'intensité maximale des courbes d'émission des formes acides et basique en fonction du pH

En utilisant la deuxième méthode (Figure 40), le pKa trouvé est de 6,6, ce qui confirme que la coumarine sera employée comme sonde pH.

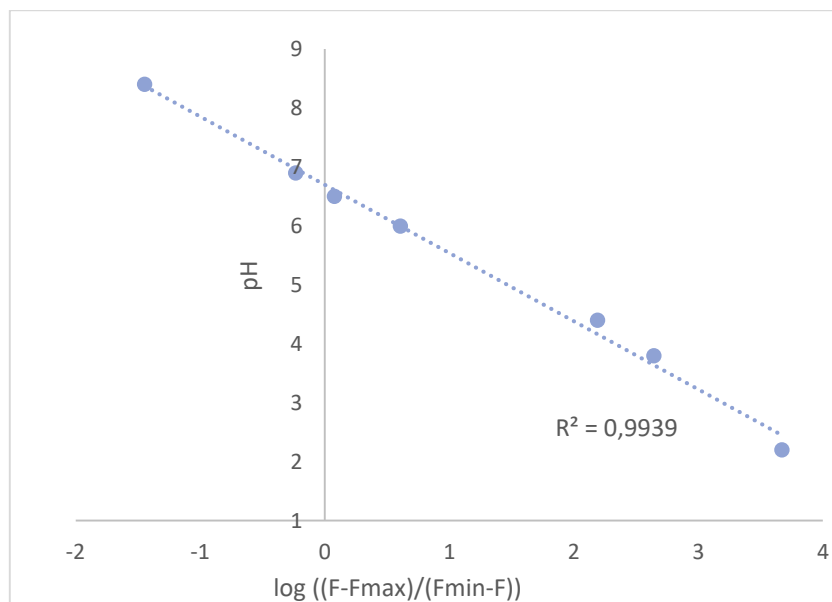


Figure 40 : Régression linéaire de la courbe $\log((F-F_{max})/(F_{min}-F))$ en fonction du pH pour la forme basique

3.3 Sonde chlorocoumarine

D'après les spectres d'excitation et d'émission en fonction du pH (Figure 41), les longueurs d'onde d'excitation pour la sonde chlorocoumarine sont quasiment identiques à celle de la coumarine soit 346 nm et 397 nm et la longueur d'onde d'émission est 475 nm.

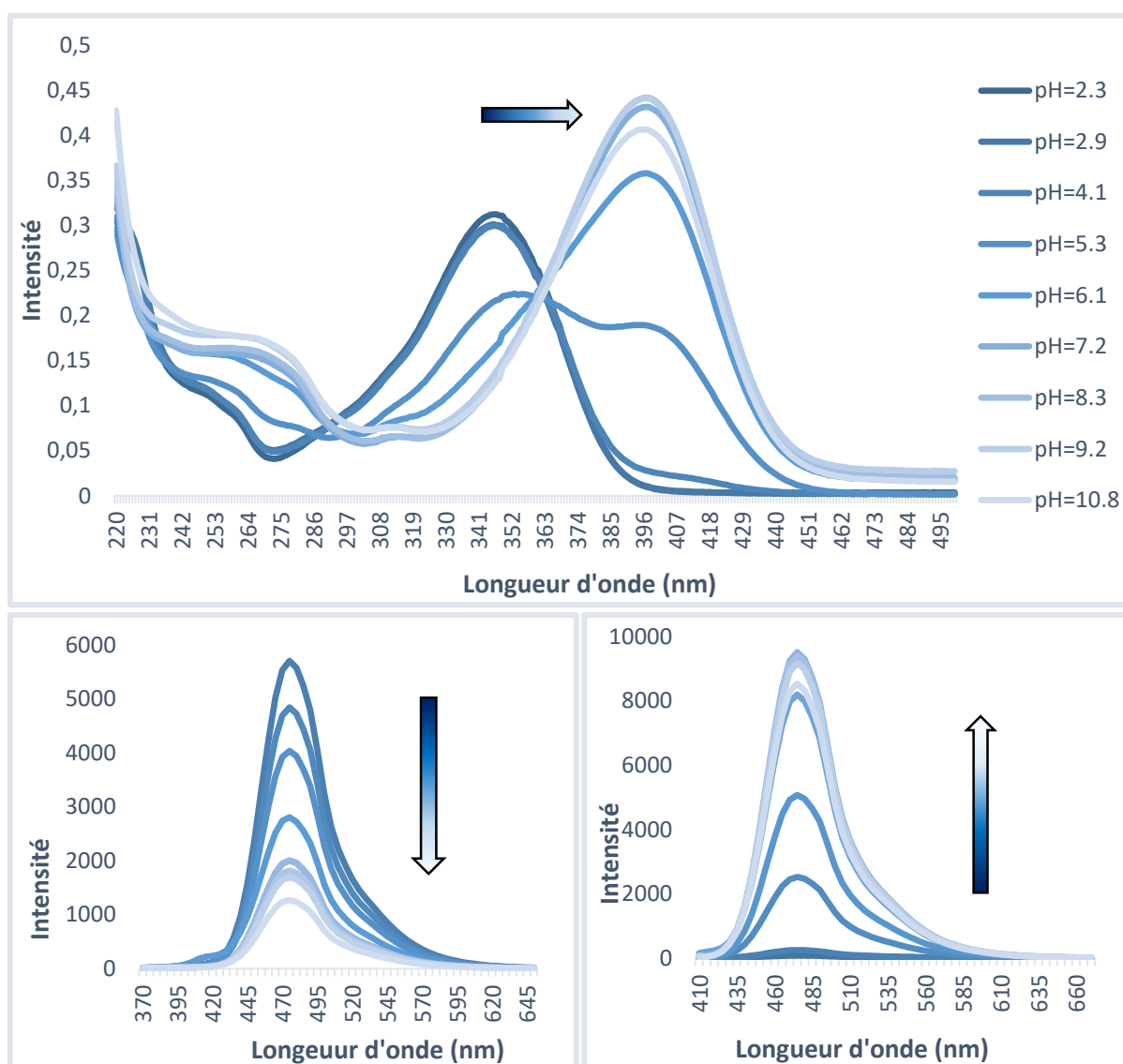


Figure 41 : Haut - Spectre d'absorption en fonction du pH. Bas gauche - Spectre d'émission de la forme acide en fonction du pH ($\lambda_{exc} = 346$ nm). Bas droite - Spectre d'émission de la forme basique en fonction du pH ($\lambda_{exc} = 397$ nm)

Concernant le pKa, les deux méthodes utilisées ont donné une valeur de 5,5 (Figure 42). L'ajout du chlore sur la molécule a donc bien permis d'abaisser d'environ un point de pKa et la sonde chlorocoumarine sera donc bien utilisée comme sonde glycosidase.

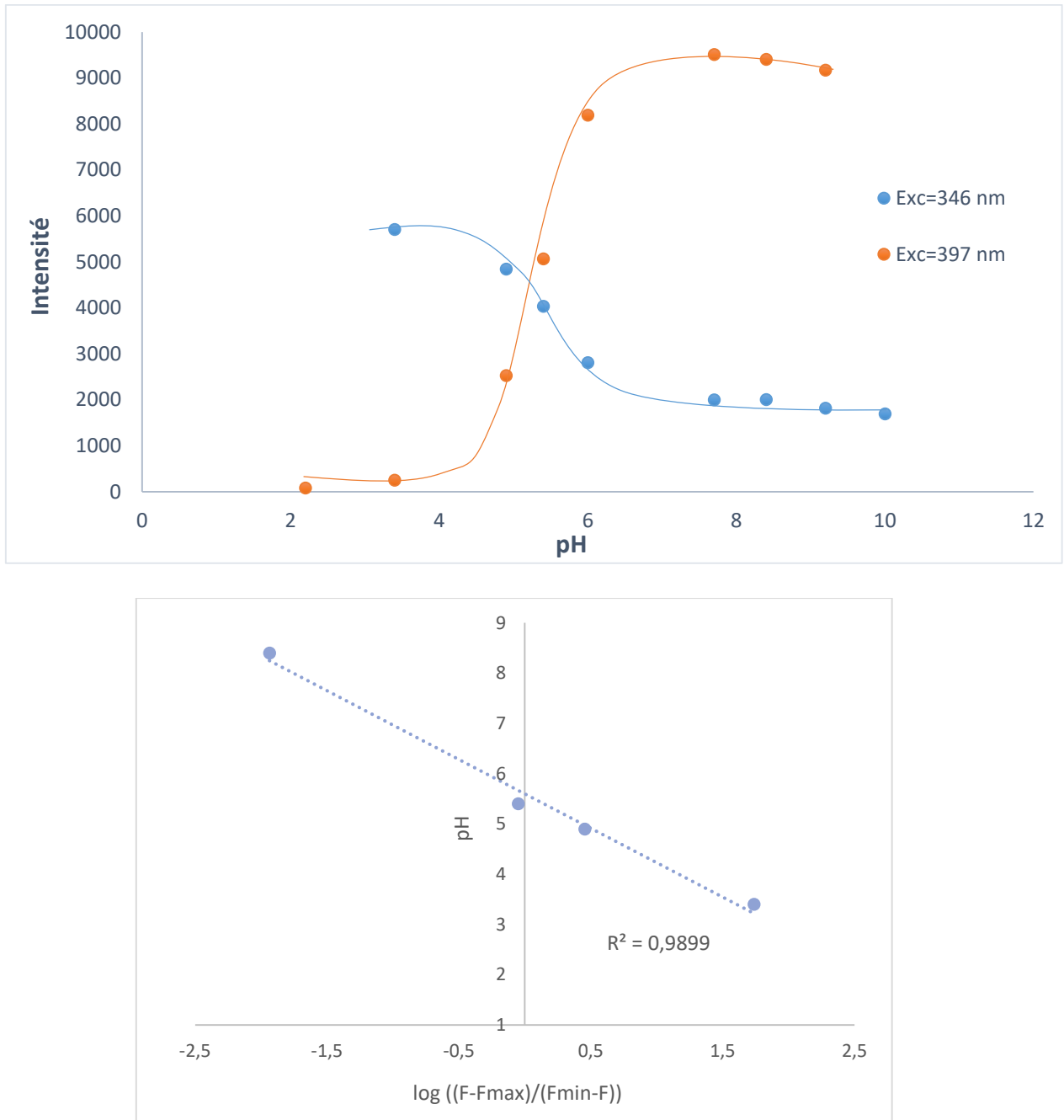
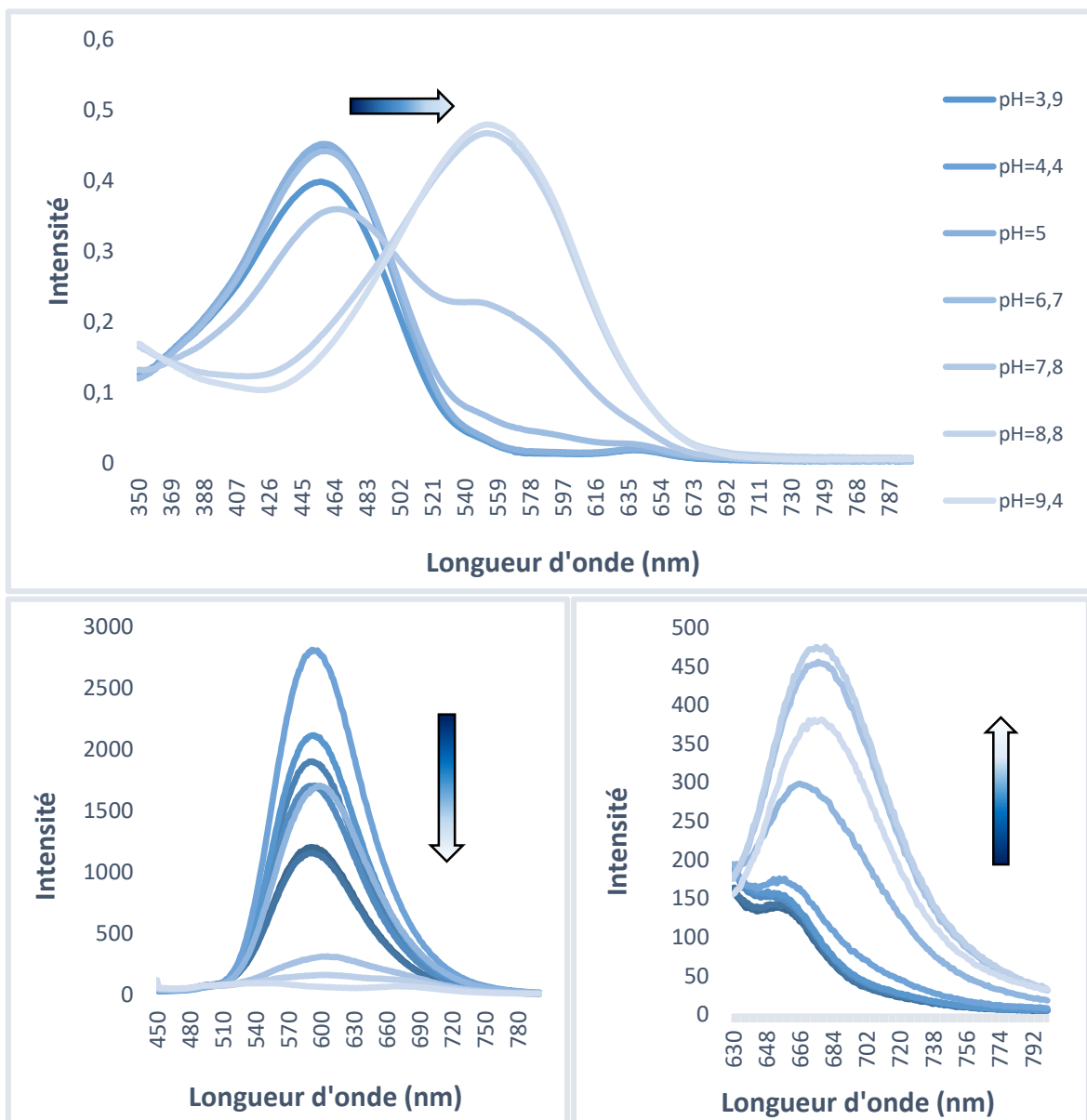


Figure 42 : Haut - Evolution de l'intensité maximale des courbes d'émission des formes acides et basique en fonction du pH. Bas - Régression linéaire de la courbe $\log((F-F_{max})/(F_{min}-F))$ en fonction du pH pour la forme basique

3.4 Sonde cyanine

La sonde cyanine est un peu différente des précédentes, puisqu'en plus des deux longueurs d'onde d'excitation correspondant aux formes acide et basique, elle possède également, deux longueurs d'onde d'émission comme on peut le voir sur les spectres de la Figure 43. Cette sonde a pour longueur d'onde d'excitation 446 nm pour la forme acide et 554 nm pour la forme basique et émet à 600 nm sous forme acide et 680 nm sous forme basique.



Du fait de cette particularité, la détermination du pKa a été réalisée avec la seconde méthode (Figure 44) qui donne une valeur de 8,0. La sonde cyanine a donc un pKa trop élevé pour pouvoir être utilisée comme sonde glycosidase.

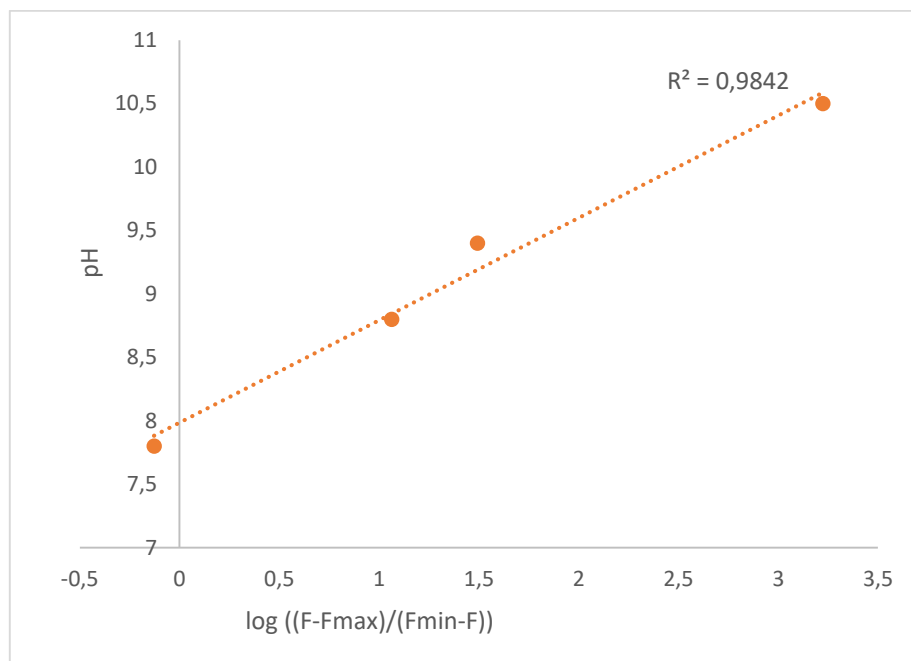


Figure 44 : Régression linéaire de la courbe $\log((F-F_{\max})/(F_{\min}-F))$ en fonction du pH pour la forme acide

3.5 Sonde chlorocyanine

Les longueurs d'onde d'excitation de la sonde chlorocyanine sont de 443 nm pour la forme acide et de 536 nm en forme basique. La forme acide émet à 573 nm et la forme basique à 690 nm (Figure 45).

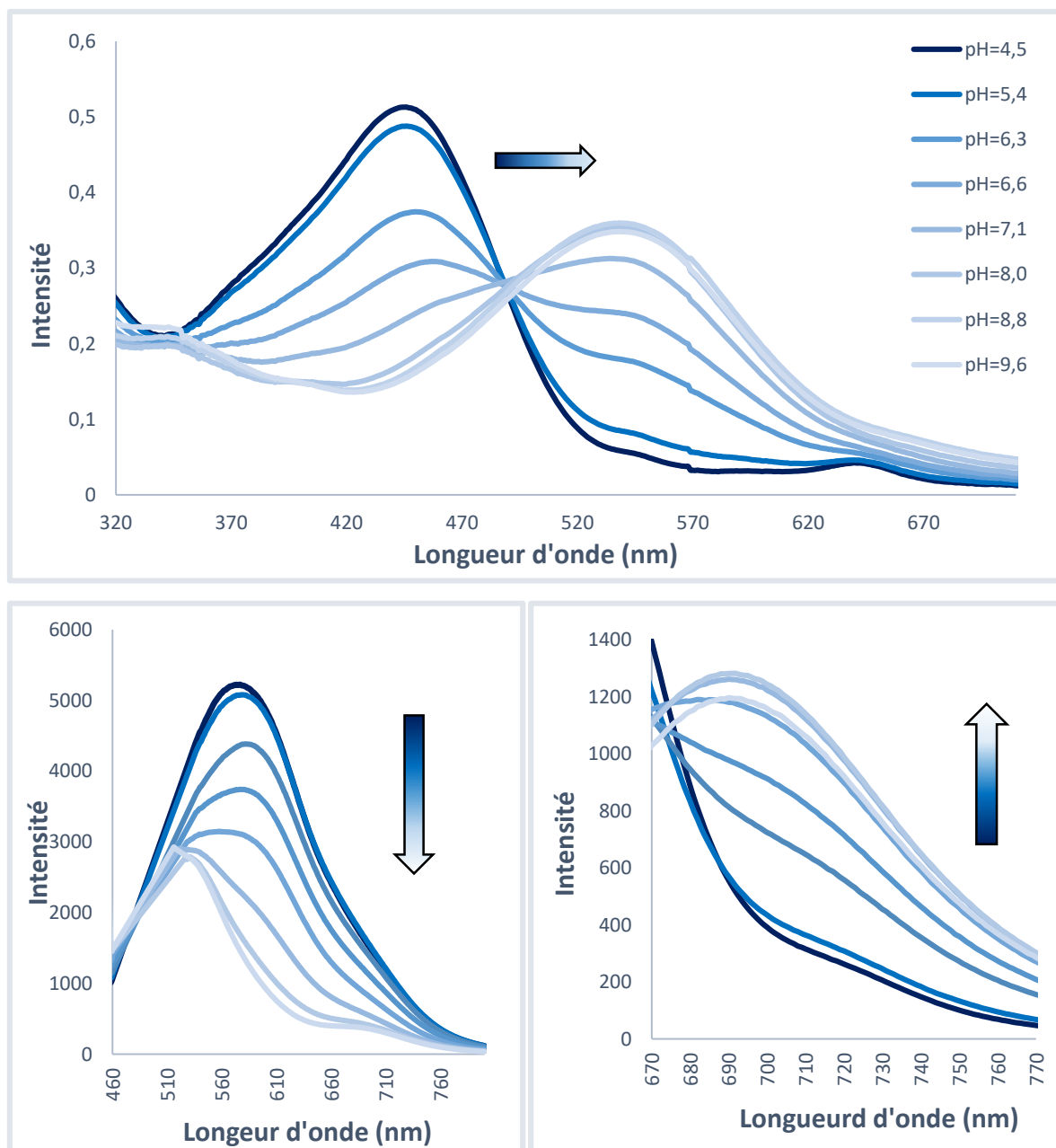


Figure 45 : Haut - Spectre d'absorption en fonction du pH. Bas gauche - Spectre d'émission de la forme acide en fonction du pH ($\lambda_{exc} = 443 \text{ nm}$). Bas droite - Spectre d'émission de la forme basique en fonction du pH ($\lambda_{exc} = 536 \text{ nm}$)

Pour cette sonde, on trouve un pKa de 6,6 (Figure 46), ce qui est encore trop élevé pour pouvoir l'utiliser en tant que sonde glycosidase. Elle pourra cependant bien être utilisée comme sonde pH.

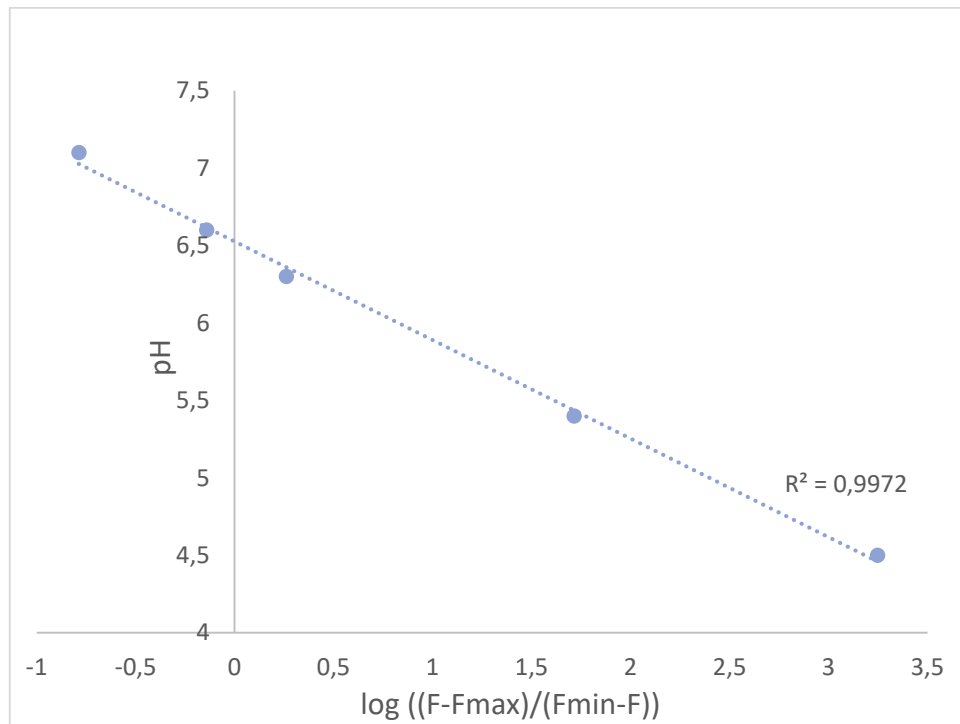


Figure 46 : Régression linéaire de la courbe $\log((F-F_{\max})/(F_{\min}-F))$ en fonction du pH pour la forme basique

IV. Caractéristiques physico-chimiques des sondes

4.1 Fluorescence des sondes glycosidases

Deux sondes ont donc été sélectionnées en fonction de leur pKa pour suivre l'activité glycosidase : le naphthalimide et la chlorocoumarine. La fluorescence de ces deux sondes lorsqu'elles sont liées au sucre a été mesurée.

Les essais de fluorescence ont été réalisés dans une solution tampon de PBS 1X à une concentration de 50 μM . La Figure 47 donne les spectres d'excitation et d'émission des sondes chlorocoumarines **43** (sonde greffée au PEG et au galactose) et **44** (sonde greffée au PEG et au mannose). Lorsque le phénol de la sonde est lié au sucre, la sonde n'est plus dépendante du pH et il n'y a donc qu'une seule longueur d'onde d'excitation. La valeur de la longueur d'onde d'excitation obtenue ici est de 338 nm, ce qui correspond à la même valeur que l'excitation de la sonde pH sous sa forme acide. La longueur d'onde d'émission est quant à elle de 412 nm soit plus basse que celle de la sonde pH (475 nm).

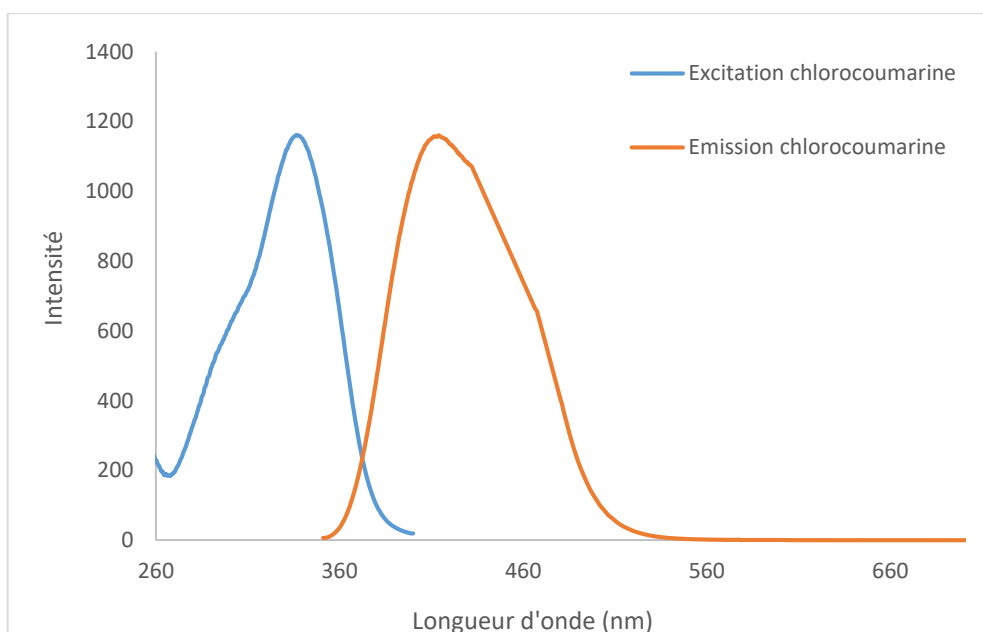


Figure 47 : Spectres d'émission et d'excitation des chlorocoumarines **43** et **44** ($\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 412 \text{ nm}$) dans une solution tampon PBS 1X à une concentration de 50 μM

Les essais de fluorescence pour les sondes naphthalimides **33** (sonde greffée au PEG et au galactose) et **34** (sonde greffée au PEG et au mannose) ont été réalisés dans les mêmes conditions à 50 μ . Les sondes 33 et 34 présentent des courbes identiques (Figure 48). La longueur d'onde d'excitation de ces sondes est identique à celle de la sonde pH sous sa forme acide (368 nm). La longueur d'onde d'émission est quant à elle plus basse que celle de la sonde pH : 450 nm pour la sonde avec le sucre comparativement à 560 nm pour la sonde pH).

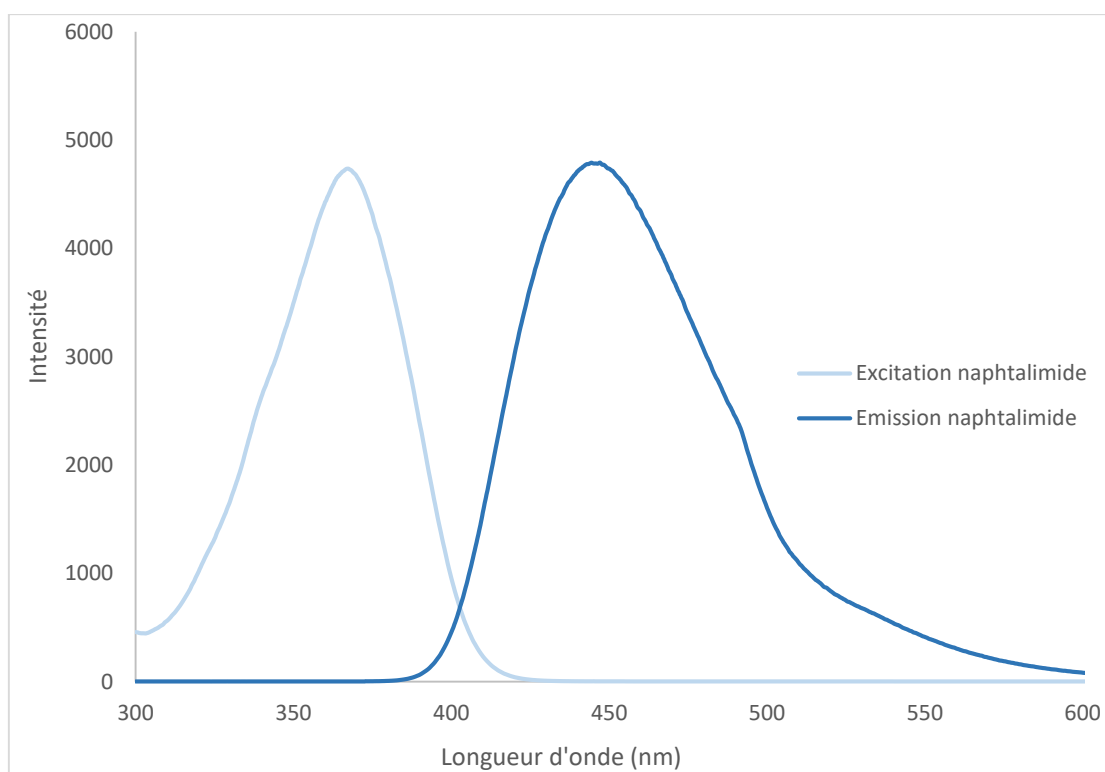


Figure 48 : Spectres d'émission et d'excitation des sondes naphthalimide **33** et **34** ($\lambda_{exc} = 368$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm) dans une solution tampon PBS 1X à une concentration de 50 μ M

4.2 Détermination des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques

Les coefficients d'extinction molaire ont été réalisés à partir des sondes pH non greffées au polymère à la fois dans leur forme acide et dans leur forme basique dans une solution tampon Britton-Robinson (à pH=2,5 pour la forme acide et à pH=10 pour la forme basique) et 1% de méthanol. Les spectres détaillés sont disponibles en annexe 1. Les rendements quantiques ont été déterminés dans les mêmes conditions en utilisant la fluorescéine comme référence de la sonde naphthalimide et la quinine sulfate comme référence pour les coumarines. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 5.

Sonde	Coefficient d'extinction molaire (ϵ)		Rendement Quantique (Φ)	
	pH acide	pH basique	pH acide	pH basique
Naphtalimide	10 000	9 300	0,02	0,03
Coumarine	22 300	29 000	0,82	1
Chlorocoumarine	14 500	31 800	1	1
Cyanine	6 900	12 900	/	/
Chlorocyanine	16 900	11 300	/	/

Tableau 5 : Coefficients d'extinction molaire et rendements quantiques des différentes sondes pH pour leur forme acide et basique mesurés dans une solution tampon Britton-Robinson à pH 2,5 et à pH 10

Les résultats sont cohérents comparativement aux données de la littérature¹³⁸. Les sondes naphthalimide et cyanine présente un rendement quantique faible comparativement à la coumarine. Les rendements quantiques des sondes cyanine et chlorocyanine n'ont pas été mesurés, car ils sont trop faibles comparativement à la référence communément utilisée, la rhodamine 6G qui a un rendement quantique de 95% dans l'éthanol. La fluorescence de ces deux sondes est particulièrement faible en milieu basique. Elles ne semblent donc pas parfaitement adaptées en tant que sondes fluorogéniques ou sondes pH pour les futures expériences en présence des bactéries. Cependant, elles pourraient être développées pour des tests colorimétriques puisque, en solution, elles passent d'une teinte jaune en milieu acide à une teinte violette en milieu basique (Figure 49).



Figure 49 : Sonde cyanine diluée à 50 μM dans une solution tampon Britton Robinson à $\text{pH}=2,5$ à gauche et à $\text{pH}=10$ à droite.

Toutes les données obtenues dans cette partie permettront d'adapter les manipulations en milieu microbiologique en termes de longueurs d'onde, de concentrations ainsi que ce qui concerne le réglage du gain du fluorimètre. Seules les sondes naphthalimide et chlorocoumarine pourront être utilisées en tant que sondes glycosidases. Le prochain chapitre est consacré donc à l'étude de l'activité pH et glycosidase des sondes en milieu microbiologique.

Chapitre 4. Études de l'activité pH et glycosidase des sondes en milieu microbiologique

I. Étude de l'activité pH des bactéries *Escherichia coli* en plaque 96 puits

1.1 Méthode expérimentale

Les différentes sondes pH développées dans le chapitre 2 ont été testées en milieu microbiologique afin montrer leur capacité à étudier l'influence des bactéries sur l'acidité du milieu. Les essais ont été réalisés sur des bactéries *Escherichia coli* de souche UMN026 qui sera le modèle de bactéries de type Gram négatif utilisé tout au long de ce manuscrit. Les bactéries *Escherichia coli* sont aérobies facultatives, elles peuvent donc aussi bien se développer en présence et absence de dioxygène. Il s'agit d'un des microorganismes le plus utilisé et étudié en recherche grâce à son développement rapide et sa grande capacité d'adaptation. La souche UMN026 est celle responsable des infections urinaires et présente une résistance à de nombreux antibiotiques¹³⁹.

Les bactéries ont été cultivées dans un milieu M9. Il s'agit d'un milieu minimum communément utilisé avec les bactéries *Escherichia coli*. Il est composé de sels minimaux, de casaminoacides (mélange d'acides aminés et de peptides issus de la caséine à 1 g/L), de sulfate de magnésium (0,24 g/L) et d'un sucre (10 mM) dont la nature sera précisée pour chaque expérience. Pour les essais de cette première partie le sucre utilisé est du lactose. Pour rappel, la structure des sondes utilisées pour ces essais est donnée en Figure 50. Les sondes coumarine **37** et chlorocoumarine **46** ont été introduites à une concentration de 1 μM (le gain du fluorimètre ayant été diminué de 100 à 60) et la sonde naphthalimide **35** à une concentration de 10 μM dû à son rendement quantique plus faible. Les sondes ont été diluées dans une solution tamponnée de PBS à pH=7,5.

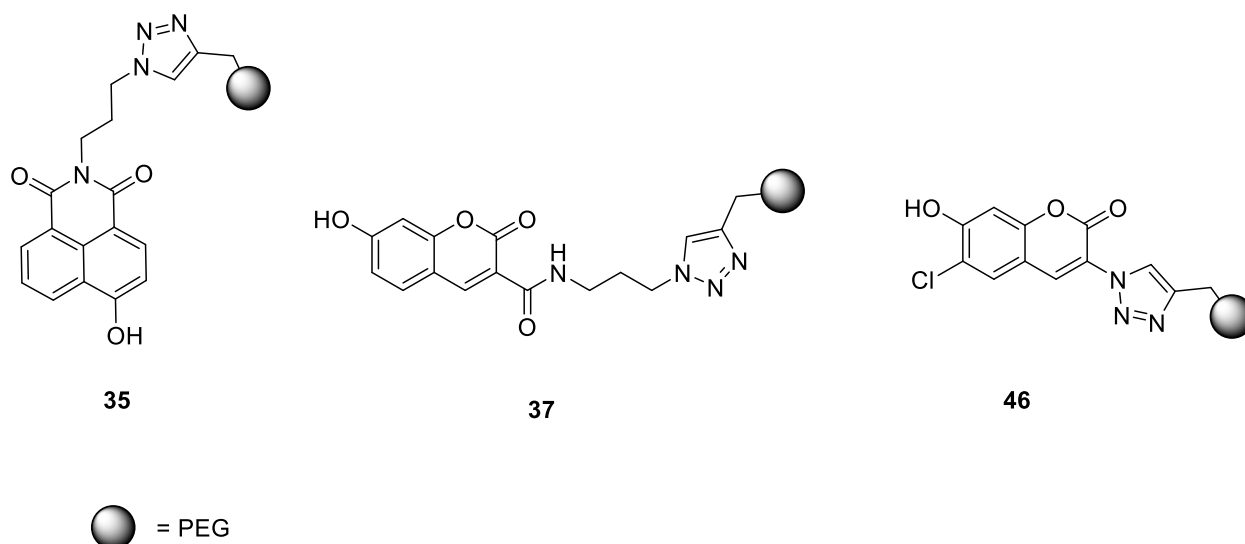


Figure 50 : Structure des sondes utilisées pour le suivi du pH du milieu microbiologique

1.2 Résultats et discussion

La Figure 51 montre le suivi de la fluorescence de la forme basique de la sonde naphthalimide **35** (λ_{ex} = 446 nm ; λ_{em} =560 nm) sans bactéries (courbe grise) et avec les bactéries (courbe bleue). La courbe rouge correspond à l'autofluorescence des bactéries (sans ajout de sonde). On observe une diminution de la fluorescence de la sonde à partir de 24 heures qui coïncide avec l'augmentation de l'autofluorescence des bactéries et donc avec le début de la croissance exponentielle des bactéries. Celles-ci étant dans un milieu minimum, il est normal d'observer un temps de latence assez long avant le début de leur croissance correspondant au temps nécessaire pour qu'elles s'adaptent au milieu.

La diminution de la fluorescence indique une diminution de la forme basique de la sonde et donc sa protonation correspondant à une diminution du pH du milieu. Ces résultats sont bien en accord avec la littérature et le fait que le catabolisme des sucres par les bactéries induit une diminution du pH, comme indiqué dans le chapitre 1. La mesure du pH après 45 heures d'incubation confirme également ces résultats puisque le pH a diminué de 7,5 à 6.

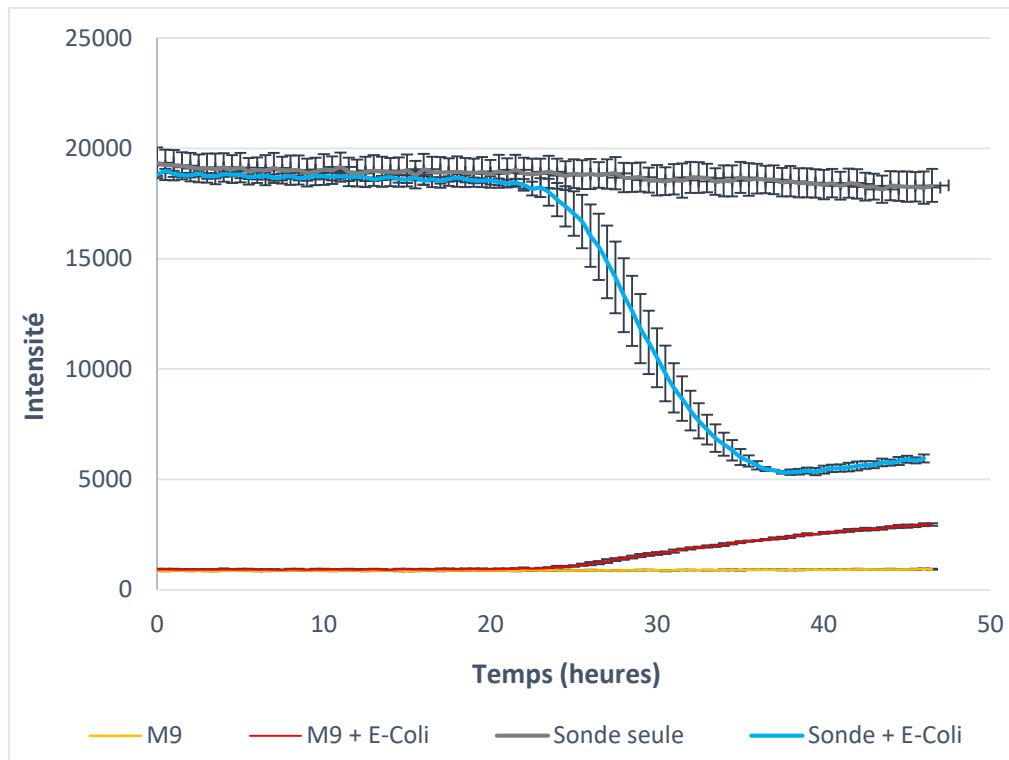


Figure 51 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc} = 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$) de la sonde pH naphthalimide **35** à $10 \mu\text{M}$ dans le PBS avec et sans bactéries *Escherichia coli* (courbes bleue et grise). Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 lactose. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 46 heures. L'auto fluorescence des bactéries est donnée par la courbe rouge et le milieu M9 sans bactéries par la courbe jaune.

Ces résultats peuvent également être appuyés en regardant l'évolution de la fluorescence pour la forme acide de la sonde ($\lambda_{exc} = 368 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$) disponible dans la Figure 52. On observe ici l'effet inverse, c'est-à-dire une augmentation de la fluorescence à partir de 24 heures correspondant à l'augmentation de la concentration de la forme protonée de la sonde.

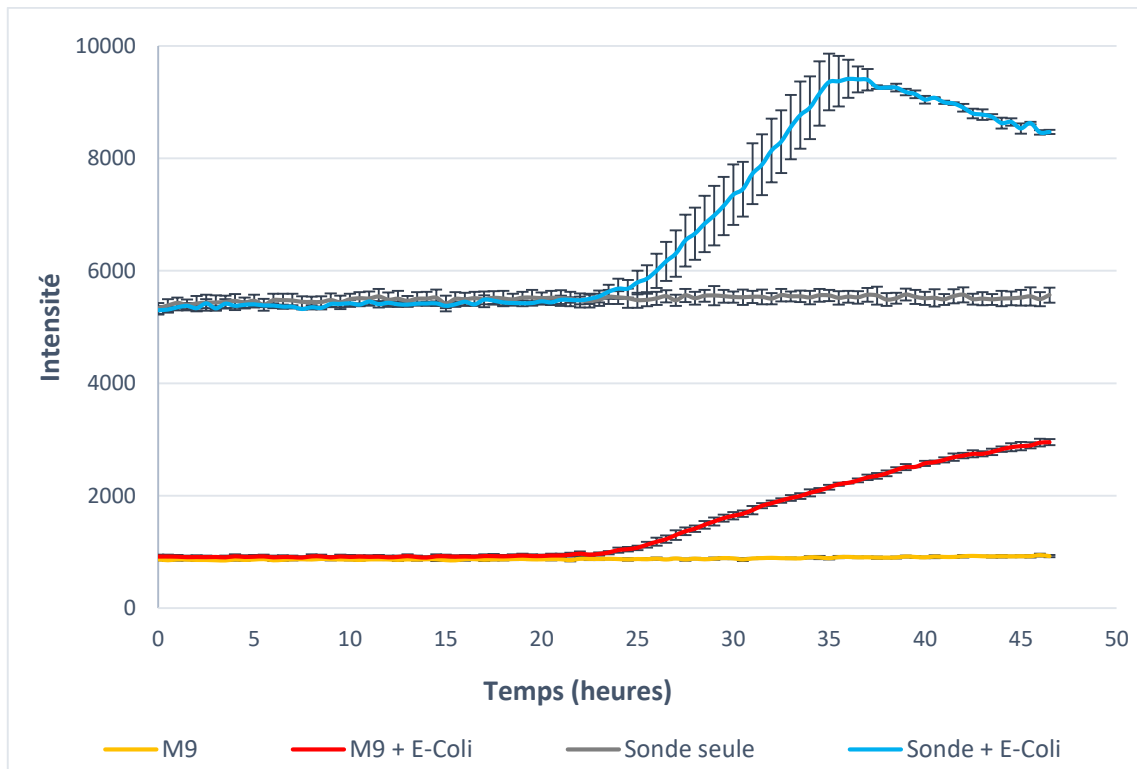


Figure 52 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 368 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) de la sonde pH naphthalimide 35 à $10 \mu\text{M}$ dans le PBS avec et sans bactéries *Escherichia coli* (courbes bleue et grise). Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 lactose. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 46 heures. L'autofluorescence des bactéries est donnée par la courbe rouge et le milieu M9 sans bactéries par la courbe jaune.

Pour chacune des formes, la fluorescence semble se stabiliser à partir de 35 heures. Cela correspond à la fin de la croissance exponentielle des bactéries et au début de la phase stationnaire. Les bactéries ont consommé tout le sucre présent dans le milieu et le pH n'évolue plus. Cela est confirmé par la courbe de croissance des bactéries mesurée grâce à l'absorbance à 700 nm correspondant à la densité optique de bactéries dans le milieu et donnée en Figure 53. Ce graphique montre la croissance des bactéries seules et des bactéries en présence de sonde et confirme le fait que la sonde ne soit pas toxique pour les bactéries.

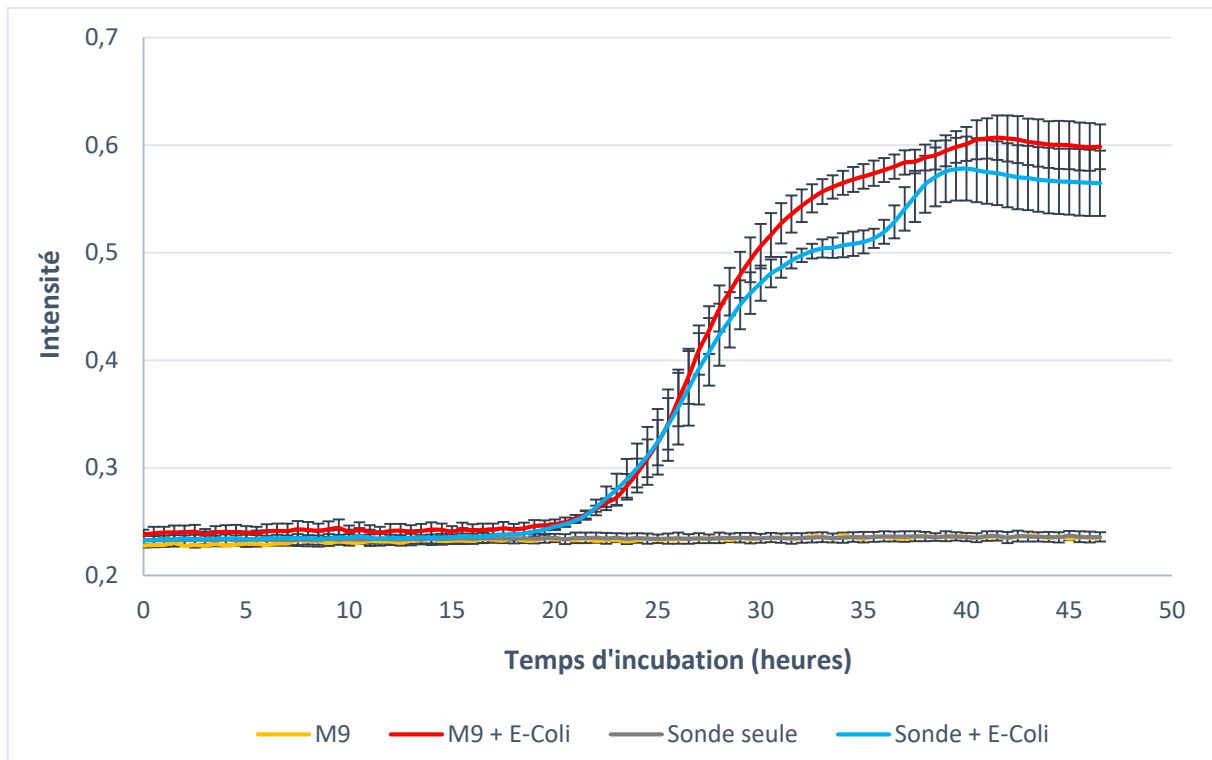


Figure 53 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) au cours du temps des bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 lactose, seules et en présence de sonde pH naphthalimide **35** à 10 μ M dans le PBS. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 46 heures.

Les exemples montrés ici sont ceux de la sonde naphthalimide **35**, mais des résultats similaires ont été obtenus avec les sondes coumarine **37** et chlorocoumarine **46**. La sonde cyanine **52** ne peut pas être utilisée pour suivre l'activité pH des bactéries *Escherichia coli* étant donné que son pKa est plus élevé que le pH initial du milieu (7,5). Les conditions de manipulation de la sonde pH chlorocyanine **53** doivent quant à eux être optimisées.

II. Études enzymatiques

Avant de tester les sondes glycosidases en milieu biologique contenant les bactéries, l'activité glycosidase a été étudiée par cinétique enzymatique directement avec l'enzyme β -galactosidase 132,4 U/mg achetée chez Sigma-Aldrich, issue de bactéries *Escherichia coli*. Les sondes mannosidases ont également été testées avec l'enzyme α -mannosidase à 15 U/mg issue de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) également achetée chez Sigma-Aldrich.

1.1 Enzyme β -galactosidase

1.1.1 Test ONPG

Pour vérifier l'activité des enzymes β -galactosidases, un test colorimétrique caractéristique a été réalisé. Il s'agit du test ONPG utilisé couramment pour la détection d'enzymes β -galactosidases. Un substrat synthétique incolore, l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG), est mis en contact avec l'enzyme qui, en coupant la liaison glycosidique, va libérer de l'ortho-nitro-phénol (ONP), une substance jaune qui absorbe à 420 nm (Schéma 43)¹⁴⁰.

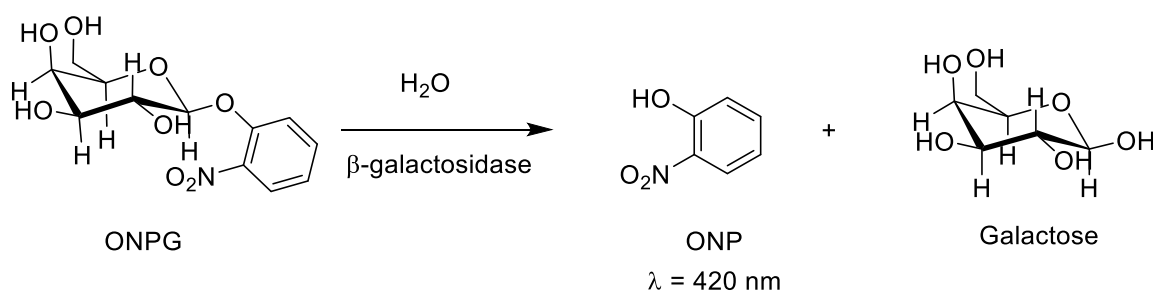


Schéma 43 : Équation de réaction de l'hydrolyse de l'ONPG par la β -galactosidase

Le suivi de l'absorbance de l'ONP au cours du temps à différentes concentrations en enzyme (de 1 à 5 U/mL) a été réalisé pour suivre la cinétique de la réaction et établir la concentration d'enzyme optimale à utiliser (Figure 54). Les mesures ont été faites à partir de 4 mM d'ONPG dans un tampon phosphate à 37°C à pH=7,5.

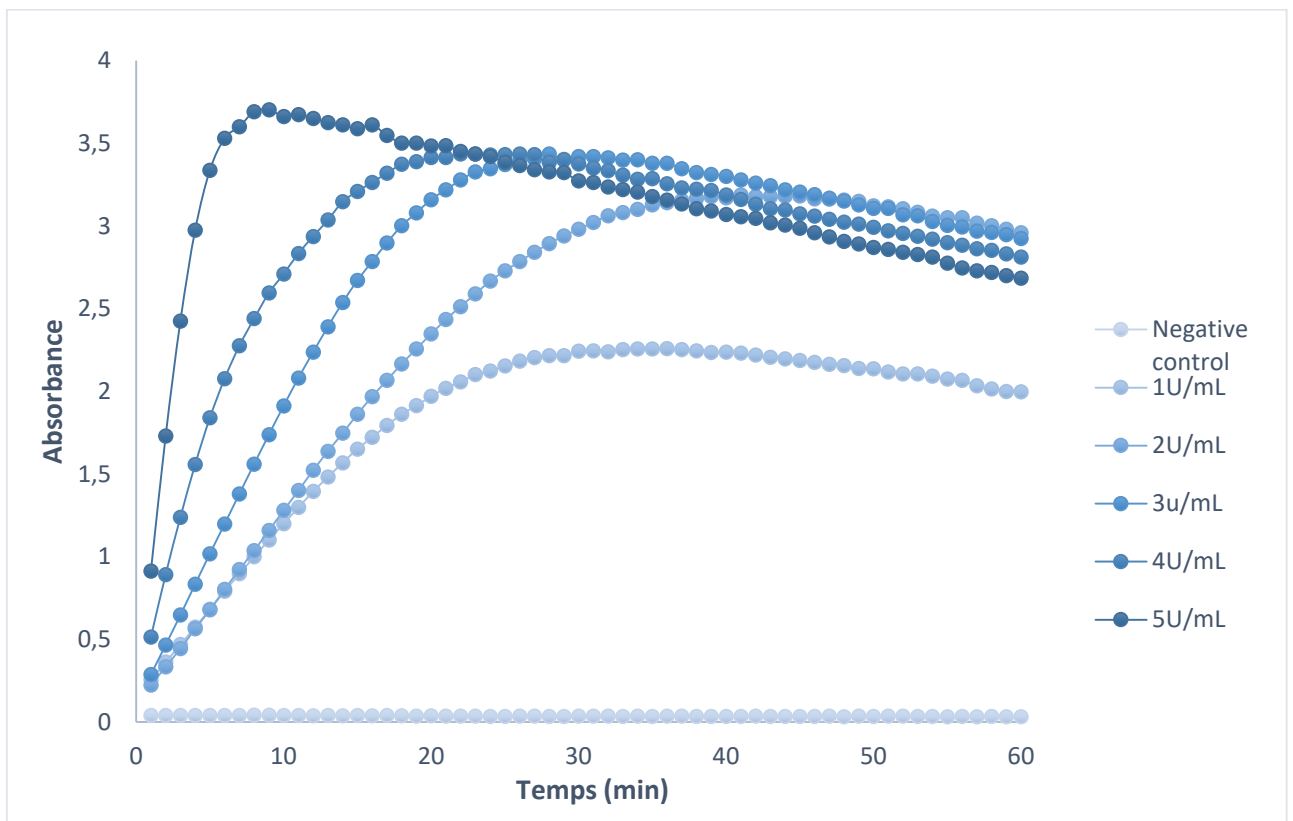


Figure 54 : Suivi cinétique de la formation de l'ONP à différentes concentrations en enzyme β -galactosidase, par mesure de l'absorbance à 420 nm. Chaque point a été mesuré à une minute d'intervalle pendant une durée totale d'une heure.

Cette étude montre l'efficacité de l'enzyme à hydrolyser la molécule ONPG. De plus, on observe une forte augmentation de la vitesse d'hydrolyse lorsqu'on augmente la concentration en enzyme. De plus, une concentration en enzymes de 1 U/mL n'est pas suffisante pour hydrolyser la totalité de la molécule, le plateau de formation de l'ONP ayant été atteint à partir de 2 U/mL (l'absorbance étant proportionnelle à la concentration de molécules d'ONP présentes dans le milieu).

1.1.2 Cinétique enzymatique des sondes galactosidases

L'activité de la sonde chlorocoumarine **43** et de la sonde naphthalimide **33** (sondes greffées au PEG) a été testée avec l'enzyme β -galactosidase.

Les cinétiques ont été réalisées comme précédemment à différentes concentrations en enzyme (de 0 U/mL à 5 U/mL). La Figure 55 montre l'évolution de la fluorescence de la sonde chlorocoumarine au cours du temps. On observe bien une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la concentration en enzymes, ce qui prouve l'efficacité de la sonde en tant que sonde galactosidase. À 0 U/mL en enzymes, la fluorescence n'évolue pas, mais n'est pas non plus nulle, ce qui indique la présence de sonde non liée au galactose dans le milieu de départ correspondant à une perte de sucre lors de la dernière étape de synthèse et qui n'a pas pu être retirée lors de l'étape de purification. Aucune perte de sucre spontanée n'est observée au cours de l'expérience.

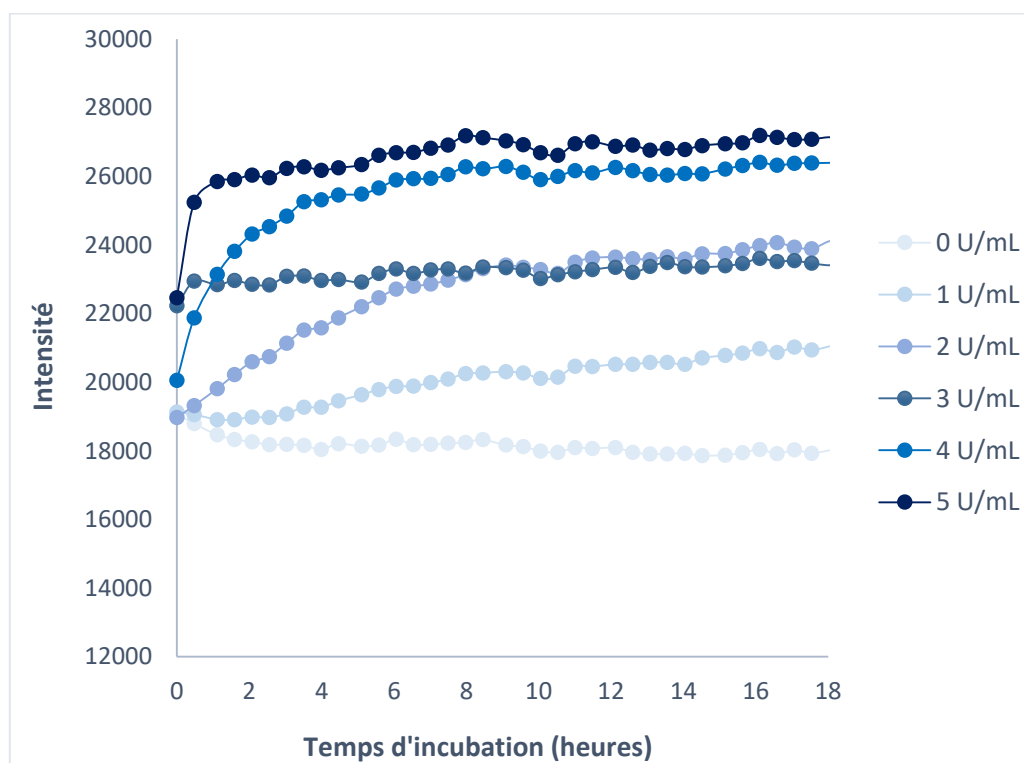


Figure 55 : Suivi cinétique de la fluorescence ($\lambda_{exc}= 397 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=475 \text{ nm}$) de la sonde chlorocoumarine 43 à différentes concentrations en enzyme β -galactosidase. Chaque point a été mesuré à trente secondes d'intervalle pendant une durée totale de dix-huit heures. La fluorescence a été mesurée pour une excitation de 397 nm et une émission de 475 nm.

Les résultats pour la sonde naphthalimide sont donnés dans la Figure 56. À 0 U/mL, aucune fluorescence n'est détectée, celle-ci apparaît avec l'ajout de l'enzyme proportionnellement à la concentration. Comme la chlorocoumarine, la sonde naphthalimide est donc également efficace pour suivre l'activité galactosidase.

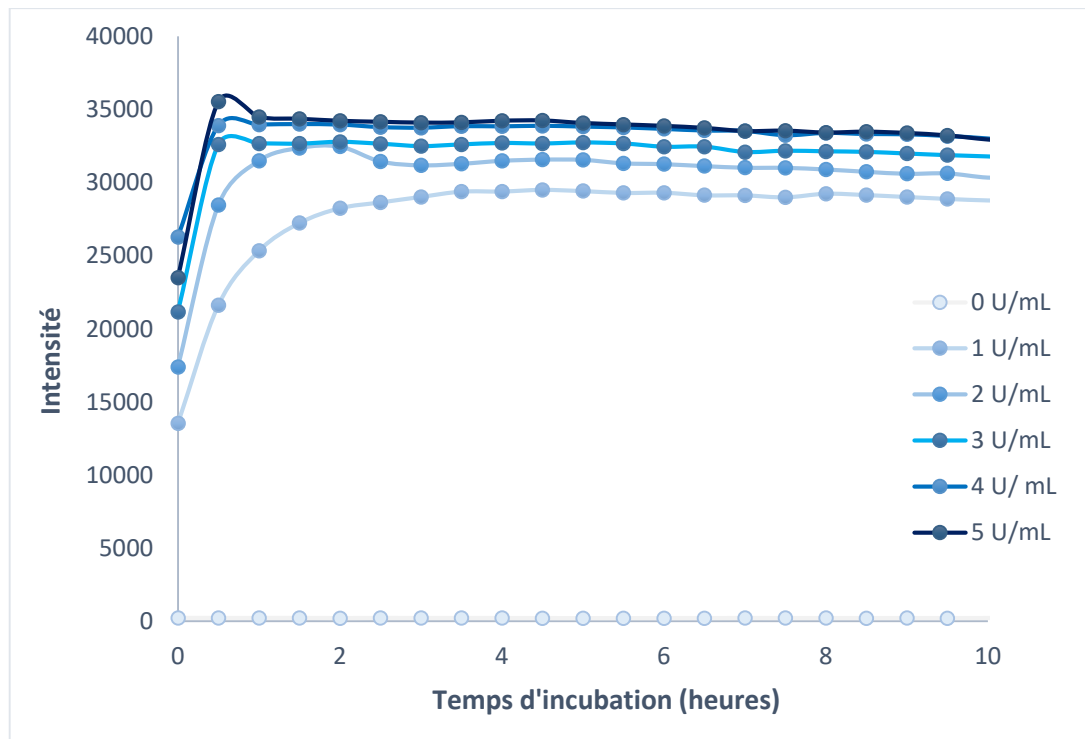


Figure 56 : Suivi cinétique de la fluorescence ($\lambda_{exc}= 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) de la sonde naphthalimide 33 à différentes concentrations en enzyme β -galactosidase. Chaque point a été mesuré à trente secondes d'intervalle pendant une durée totale de dix heures. La fluorescence a été mesurée pour une excitation de 446 nm et une émission de 560 nm.

Les deux sondes pourront donc par la suite être testées avec les bactéries sécrétant la β -galactosidase.

1.2 Enzyme α -mannosidase

L'activité des sondes chlorocoumarine **44** et naphthalimide **34** possédant un mannose à la place du galactose a également été testée.

Les cinétiques ont été réalisées comme précédemment, en mettant en contact chacune des sondes avec une enzyme α -mannosidase issue de *Canavalia ensiformis* obtenue commercialement chez Sigma-Aldrich à 23 U/mg. La Figure 57 montre les résultats de la cinétique pour la sonde chlorocoumarine. Comme précédemment, la fluorescence est bien induite avec l'ajout d'enzyme, ce qui prouve l'activité mannosidase de cette sonde.

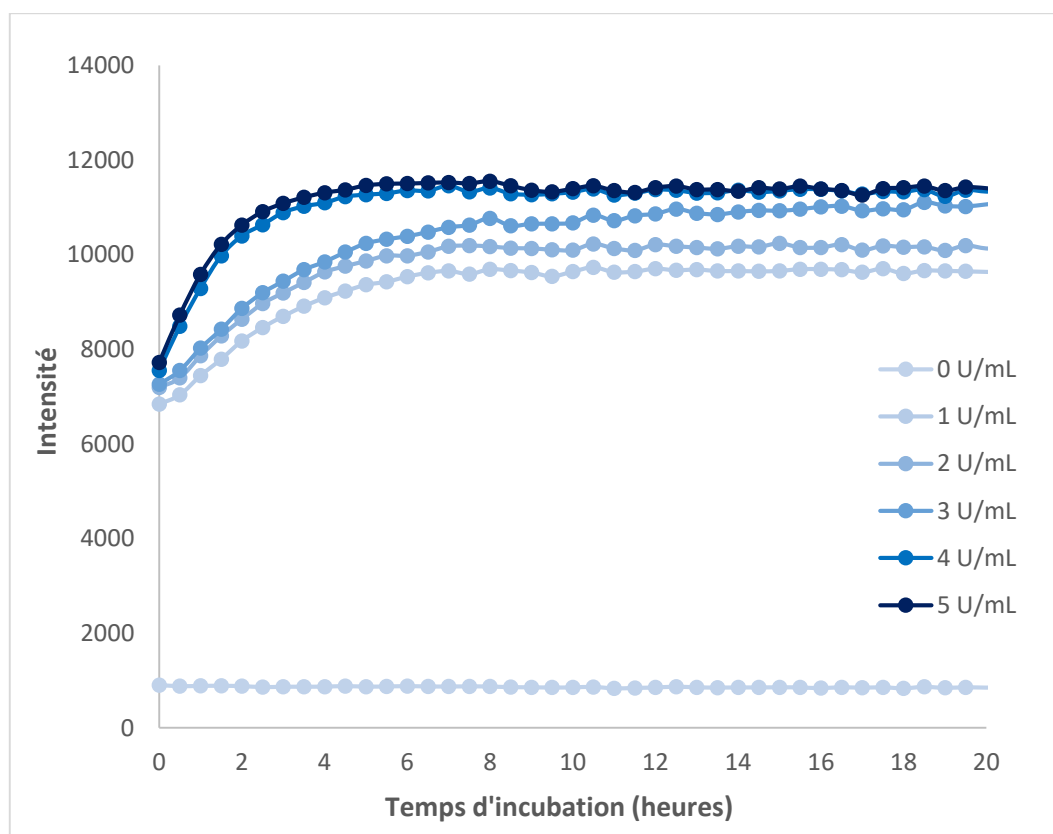


Figure 57 : Suivi cinétique de la fluorescence ($\lambda_{exc}=397\text{ nm}$; $\lambda_{em}=475\text{ nm}$) de la sonde chlorocoumarine 44 à différentes concentrations en enzyme α -mannosidase. Chaque point a été mesuré à trente secondes d'intervalle pendant une durée totale de vingt heures. La fluorescence a été mesurée pour une excitation de 397 nm et une émission de 475 nm.

Les résultats sont identiques pour la sonde naphthalimide et sont donnés en Figure 58.

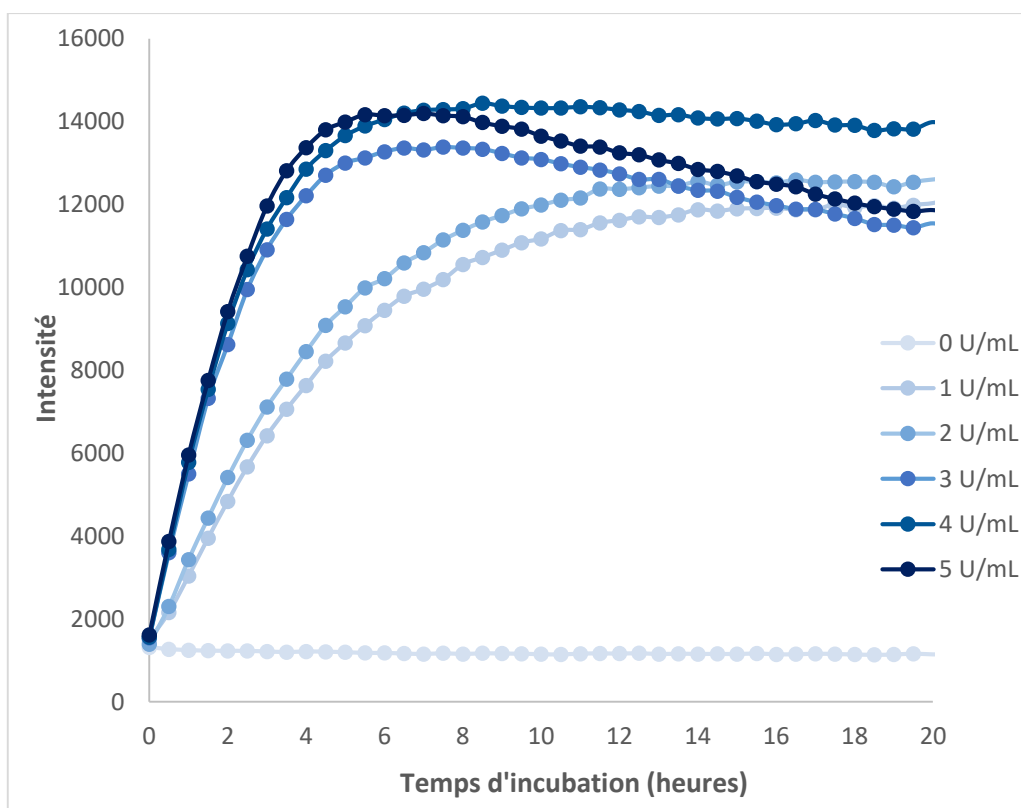


Figure 58 : Suivi cinétique de la fluorescence ($\lambda_{exc}= 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) de la sonde naphthalimide **34** à différentes concentrations en enzyme α -mannosidase. Chaque point a été mesuré à trente secondes d'intervalle pendant une durée totale de vingt heures. La fluorescence a été mesurée pour une excitation de 446 nm et une émission de 560 nm.

Les deux sondes mannosidases pourront donc bien être utilisées en tant que témoin négatif de l'activité galactosidase pour le ciblage de l'activité α -mannosidase.

III. Étude de l'activité galactosidase des bactéries *Escherichia coli* en plaque 96 puits

3.1 Opéron lactose

Les connaissances concernant le lien entre l'information génétique, l'environnement et le phénotype exprimé chez les procaryotes ont été marquées par les découvertes sur la régulation génétique de la synthèse des protéines par Jacques Monod et François Jacob, ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 1965¹⁴¹. Ils ont notamment mis en évidence l'existence d'un opéron lactose chez les bactéries telles que *Escherichia coli*, une unité génétique qui intervient dans le transport et le métabolisme des β -galactosides tels que le lactose.

L'opéron lactose possède deux gènes essentiels qui entrent en jeu dans le catabolisme des β -galactosides :

- Le gène *lacZ* codant l'enzyme β -galactosidase capable d'hydrolyser la liaison β 1-4 osidique des β -galactosides.
- Le gène *lacY* codant l'enzyme lactose perméase permettant le passage des β -galactosides à travers la membrane bactérienne contre le gradient de concentration.

Lorsqu'aucun β -galactosides n'est présent dans le milieu, un gène répresseur va bloquer l'expression de l'opéron lactose afin d'éviter la production d'enzymes inutiles nécessitant de l'énergie. L'opéron lactose est donc qualifié d'inductible, car il n'est exprimé qu'en présence de β -galactosides dans le milieu¹⁴².

Les essais de suivi de l'activité β -galactosidase devront donc se faire dans un milieu contenant du lactose afin d'induire la production de l'enzyme par les bactéries. Un milieu contenant du galactose ou du glucose entraîneront un blocage de l'opéron lactose des bactéries puisque ces deux sucres suivent des voies cataboliques propres nécessitant moins d'énergie.

3.2 Étude des sondes galactosidases en milieu microbiologique

3.2.1 Méthode expérimentale

Afin d'exprimer l'opéron lactose, les bactéries *Escherichia coli* ont été cultivées dans un milieu M9 contenant 10 mM de lactose. Les casaminoacides ont été supprimés du milieu afin de ne pas créer de compétition entre eux et le lactose et leur absence ne sera pas un frein pour la croissance des bactéries. Les différentes sondes utilisées pour le suivi de l'activité sont décrites en Figure 59 : chaque expérience a été réalisée en comparant la sonde galactosidase greffée au polymère (composés **33**, **43** et **45**) avec la sonde sans le polymère (composés **29** et **41**).

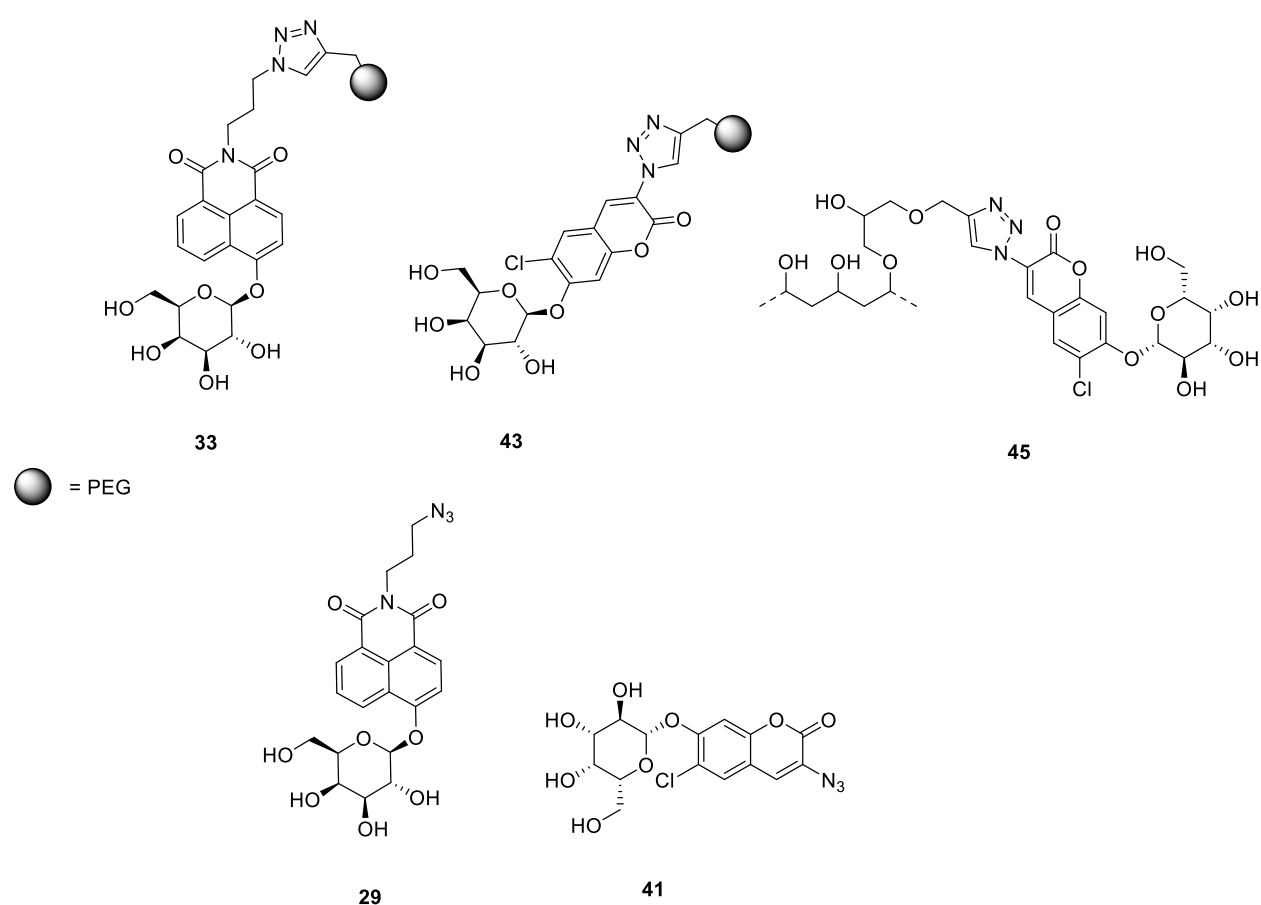


Figure 59 : Structure des sondes utilisées pour le suivi de l'activité galactosidase des bactéries *Escherichia coli*

Les sondes ont été préparées à partir de solution mère à 1 mM dans une solution tampon de PBS à pH=7,5, puis ont été diluées à la concentration souhaitée dans le milieu utilisé pour la culture bactérienne. Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer la concentration optimale en sonde. Afin que l'autofluorescence des bactéries puisse être

négligée, la concentration retenue est de 200 μM (le gain du fluorimètre étant réglé à 60). Chaque essai a été réalisé en plaque 96 puits et chaque condition répétée sous forme de triplicats.

Le suivi de fluorescence a été réalisé aux longueurs d'onde correspondant à la forme basique des sondes : $\lambda_{\text{exc}} = 446 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ pour la sonde naphthalimide et $\lambda_{\text{exc}} = 397 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$ pour la chlorocoumarine. La croissance des bactéries a également été mesurée par un spectre d'absorbance à 700 nm.

3.2.2 Activité de la sonde naphthalimide

Le suivi de fluorescence des sondes naphthalimide **29** et **33** disponible en Figure 60 montre une augmentation significative de la fluorescence des deux sondes en présence de bactéries *Escherichia coli* à partir de 20 heures. Cela prouve que le milieu utilisé est bien idéal pour la sécrétion de l'enzyme β -galactosidase et que les groupements galactose des sondes sont bien hydrolysés par l'enzyme. Cependant, on observe une courte période précédant cette augmentation pendant laquelle la fluorescence diminue, surtout visible pour la sonde **33**. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées quant à cette perte de fluorescence. Il est possible que des traces de sondes ayant perdu le galactose soient présentes dans le milieu et agissent en tant que sondes pH. La diminution du pH expliquerait donc cette diminution comme cela a été vu précédemment. Cela expliquerait également pourquoi la fluorescence de départ de la sonde sans les bactéries n'est pas nulle. Une autre hypothèse consisterait à penser que l'augmentation de la densité optique des bactéries troublerait le signal de fluorescence.

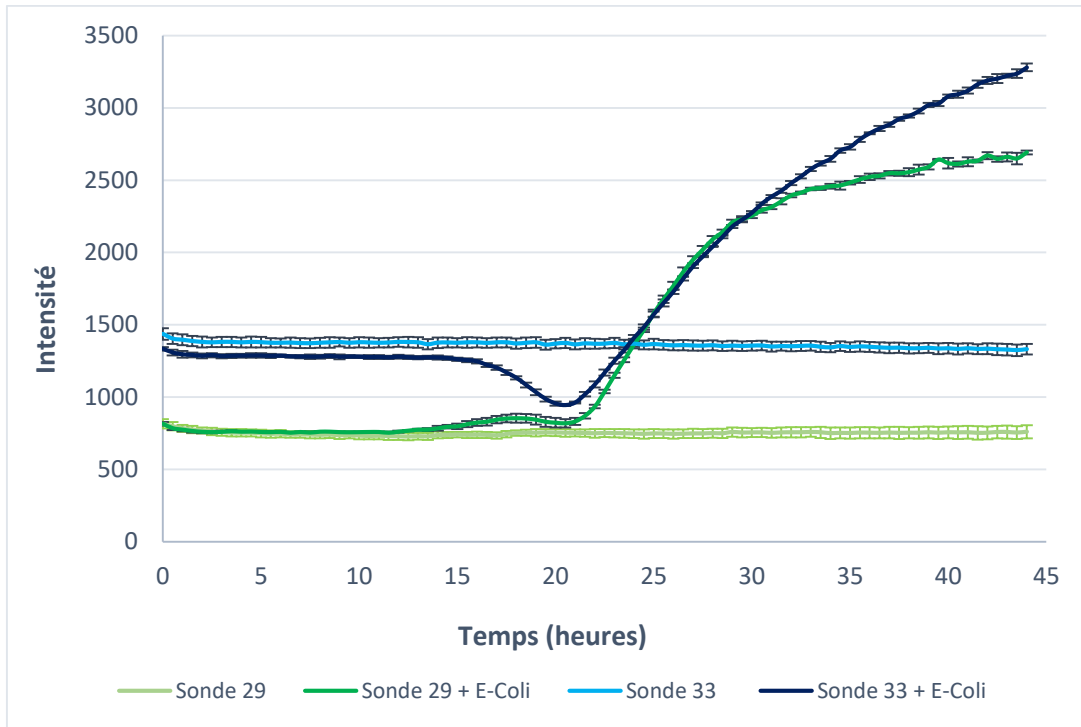


Figure 60 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) des sondes **29** (sonde naphthalimide non couplée au polymère) et **33** (sonde naphthalimide couplée au PEG) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de lactose et les sondes ont été introduites à $200 \mu\text{M}$. L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

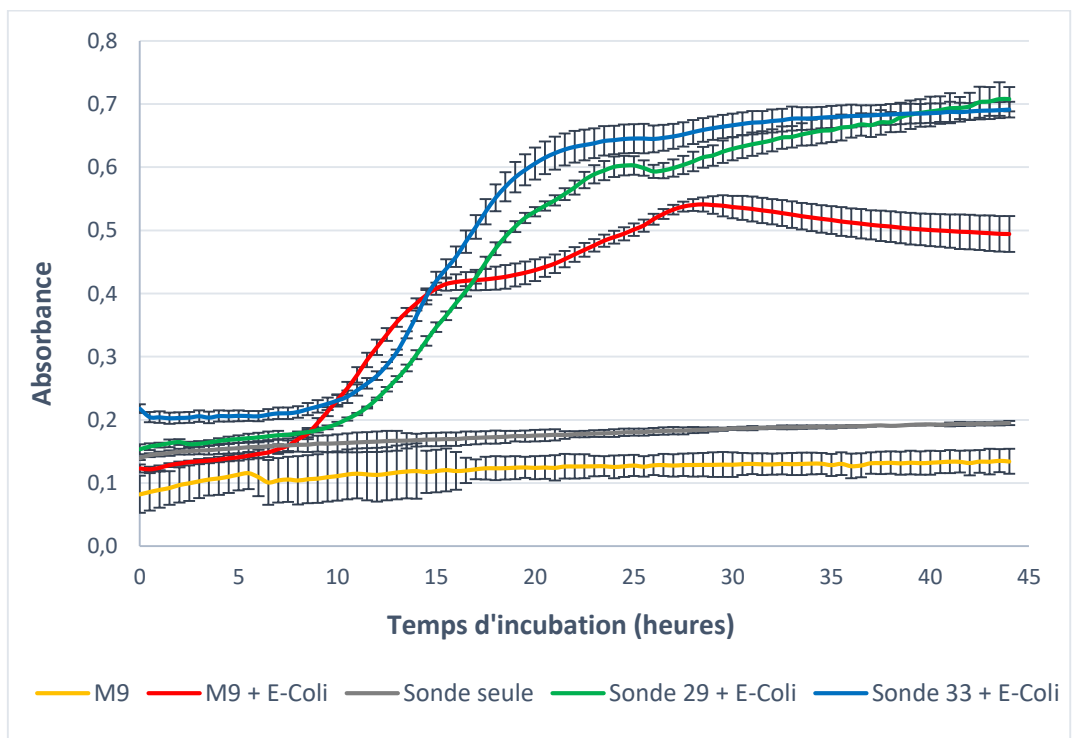


Figure 61 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) au cours du temps des bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 lactose, seules et en présence de sondes naphthalimide **29** et **33** à $200 \mu\text{M}$. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

En comparant les courbes de croissance des bactéries seules et en présence des sondes disponible dans La Figure 61, on observe qu'aucune des deux sondes n'a causé de toxicité chez les bactéries. La densité optique finale obtenue est plus élevée (0,7) en présence de sonde qu'en leur absence (0,5), ce qui confirme le fait que les groupements galactose des sondes sont bien hydrolysés et participent à la croissance des bactéries.

En présence de sondes, la croissance exponentielle des bactéries a lieu entre 8 heures et 20 heures d'incubation. L'augmentation de la fluorescence des sondes ne démarre qu'à partir de 20 heures soit à partir du moment où les bactéries entrent dans leur phase stationnaire de croissance. Cela semble indiquer que l'hydrolyse du galactose ne se fait qu'une fois tout le lactose consommé. Le lactose semble en effet être le nutriment limitant de la croissance bactérienne, cette hypothèse sera vérifiée par la suite.

L'augmentation de fluorescence est à peu près équivalente pour la forme greffée au polymère et la forme non greffée, L'expérience est menée jusqu'à 45 heures et la fluorescence continue d'augmenter, car même si la croissance des bactéries est en phase stationnaire, il reste des enzymes dans le milieu. De plus, la totalité de la sonde galactosidase est loin d'avoir été convertie en sonde pH au bout de 45 heures d'incubation si on s'en réfère aux tests enzymatiques réalisés précédemment.

3.2.3 Activité de la sonde chlorocoumarine

Le suivi de fluorescence pour les sondes chlorocoumarine 41 et 43 est donné en Figure 62 et la croissance des bactéries en Figure 63. Les mêmes observations que pour la sonde naphthalimide peuvent être déduites des différentes courbes. La diminution de fluorescence est toujours présente entre 15 et 20 heures surtout pour la sonde 41, puis la fluorescence augmente jusqu'à la fin de l'expérience. De plus, les sondes chlorocoumarine 41 et 43 ne présente aucune toxicité pour les bactéries.

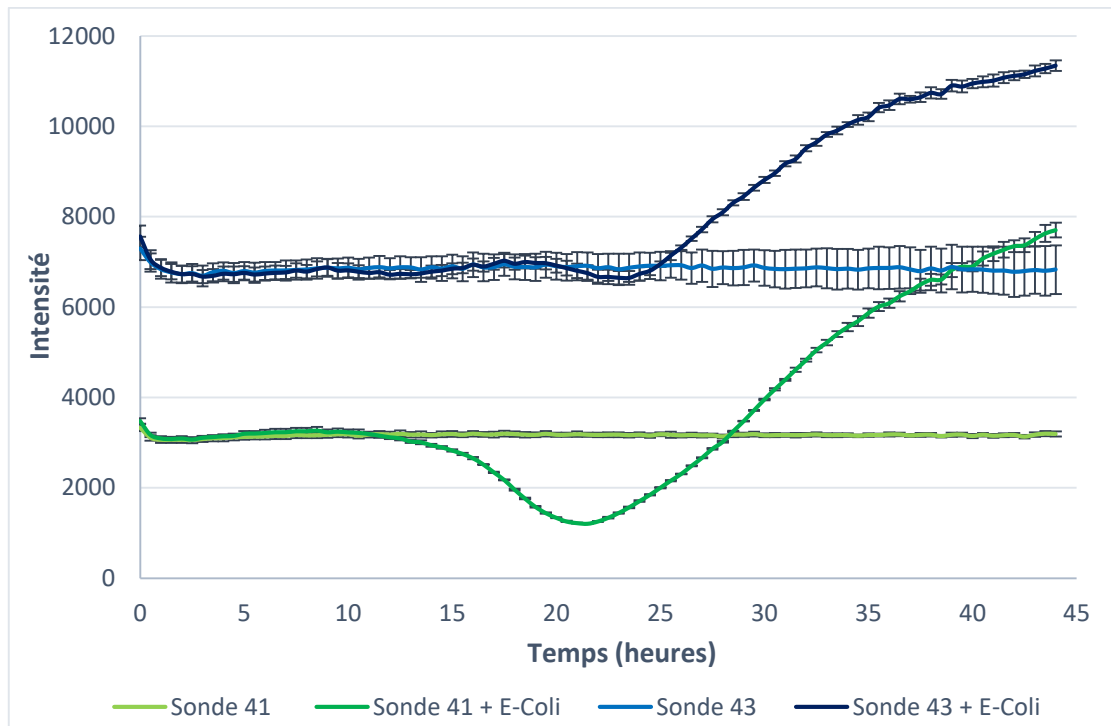


Figure 62 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 397 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=475 \text{ nm}$) des sondes **41** (sonde chlorocoumarine non couplée au polymère) et **43** (sonde chlorocoumarine couplée au PEG) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de lactose et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

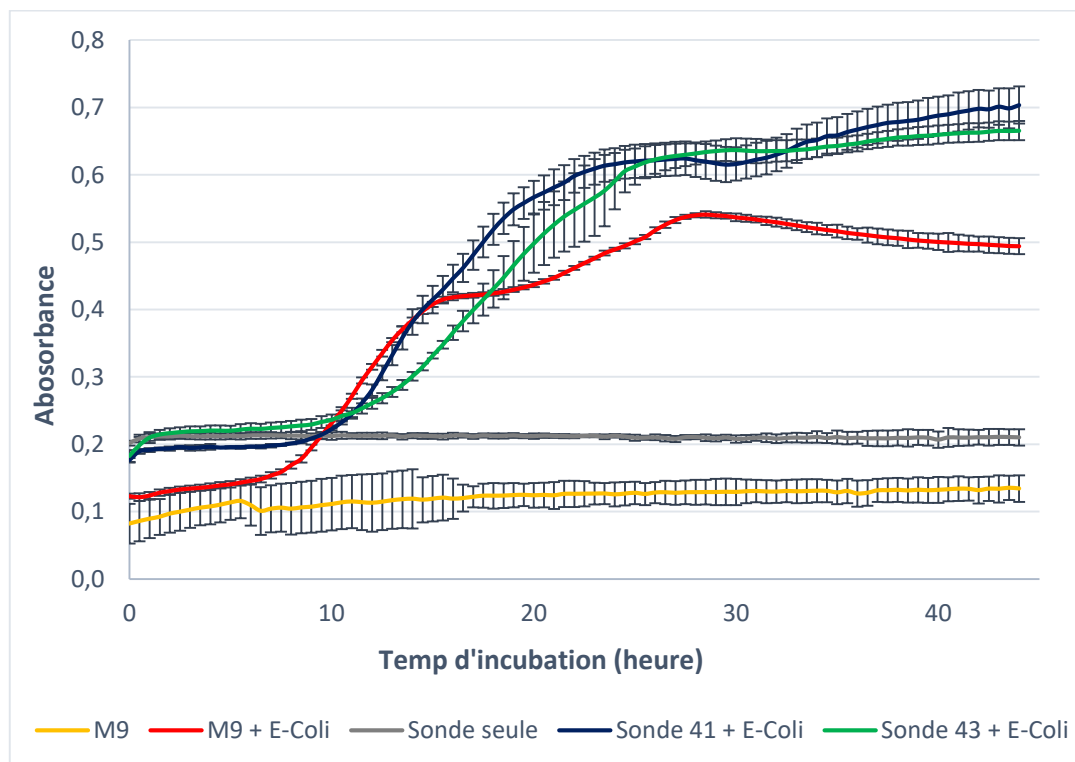


Figure 63 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) au cours du temps des bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 lactose, seules et en présence de sondes chlorocoumarine **41** et **43** à 200 μM . Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

La fluorescence initiale sans présence de bactéries est assez élevée comparativement à la sonde naphthalimide. Cela s'explique par le fait que, comme vu dans le chapitre 3, la longueur d'onde d'émission de la sonde avec le galactose est de 388 nm et déborde à 397 nm, longueur d'onde où la molécule a été excitée pour cette expérience. Il conviendrait donc pour le suivi de fluorescence de ne pas exciter au maximum d'absorption de la forme basique de la molécule, mais de se décaler vers de plus hautes longueurs d'onde afin de sortir de la zone d'excitation de la sonde sucrée.

La sonde chlorocoumarine greffée au PVA **45** a également été testée avec les bactéries *Escherichia coli* à 50 μM et à 100 μM . Pour cette expérience, la sonde a été introduite sur des bactéries déjà en phase de croissance et avec un inoculum plus élevé. L'expérience a ainsi pu être menée sur un temps plus court (22 heures). Le suivi de fluorescence de la sonde **45** est disponible en Figure 64 et la croissance des bactéries en Figure 65.

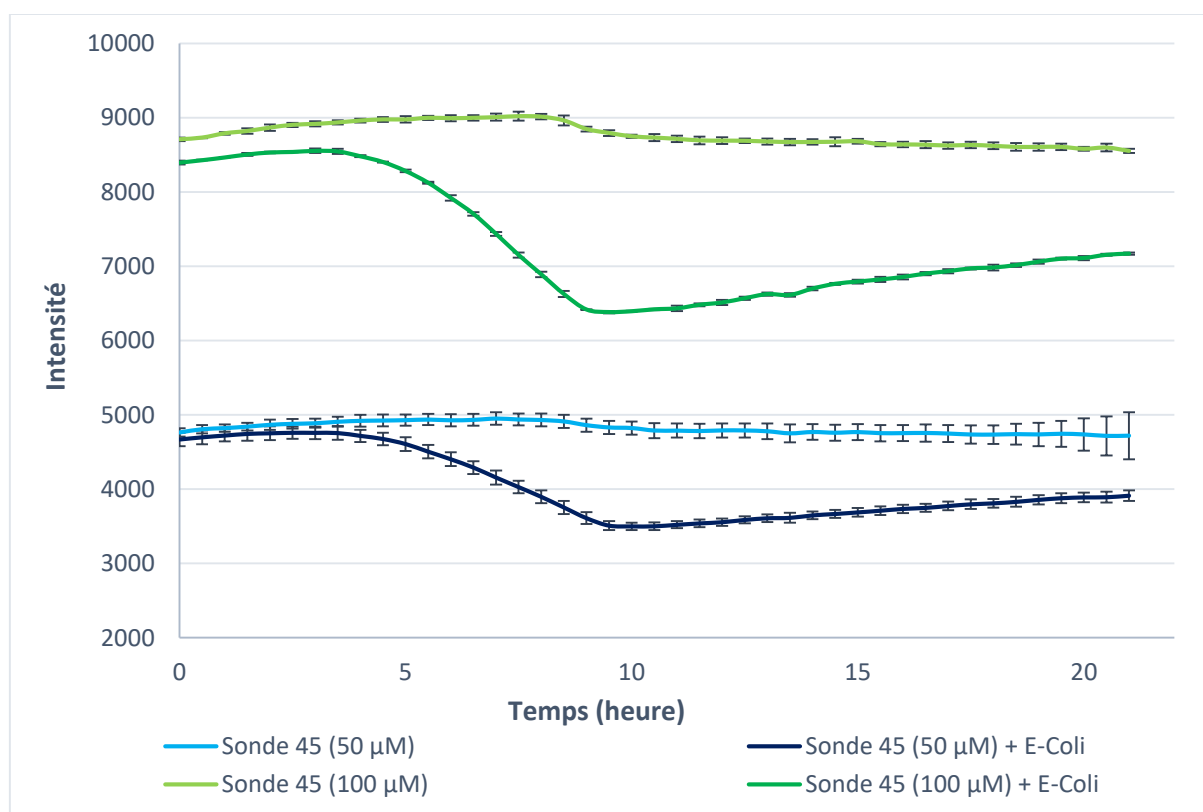


Figure 64 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 397 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=475 \text{ nm}$) de la sonde **45** (sonde chlorocoumarine couplée au PVA) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de lactose et les sondes ont été introduites à 50 μM et 100 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 22 heures.

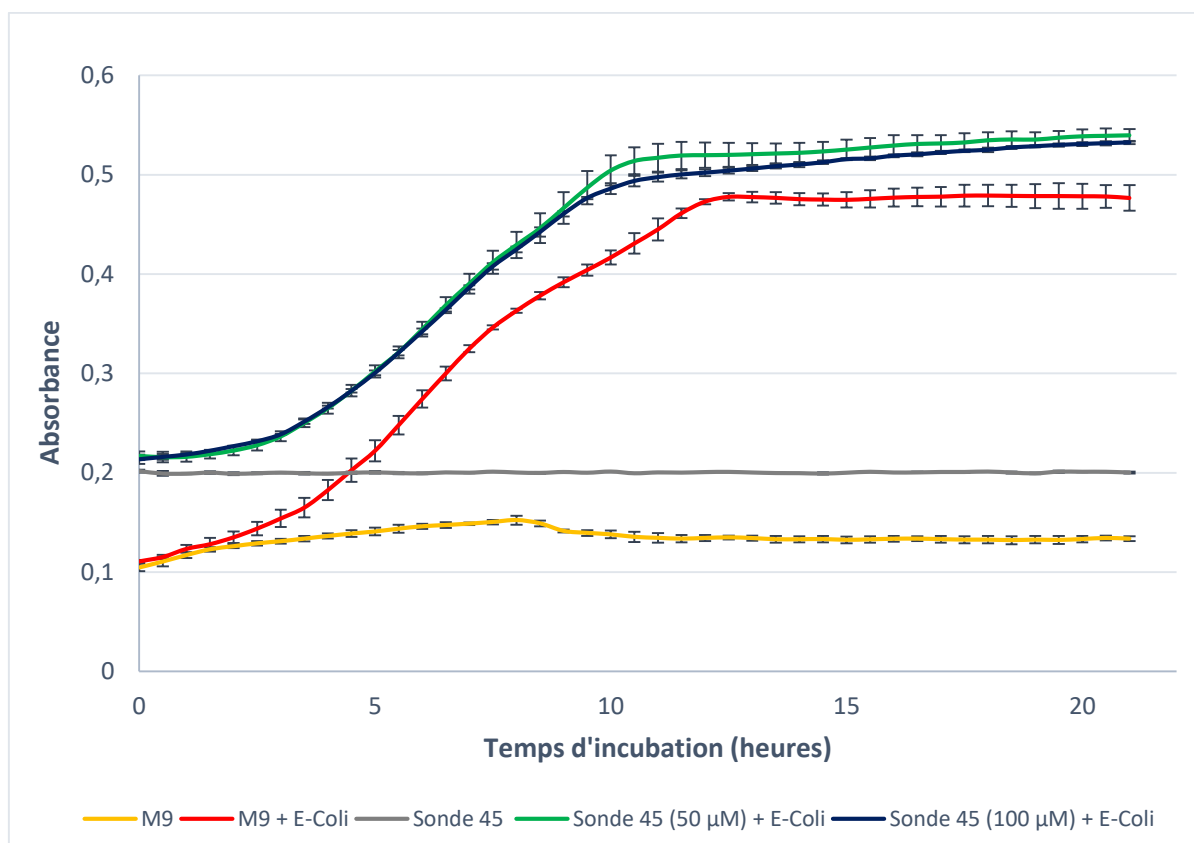


Figure 65 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) au cours du temps des bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 lactose, seules et en présence de sonde chlorocoumarine 45 à 50 μM et à 100 μM . Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 22 heures.

On n'observe aucune activité de la sonde chlorocoumarine greffée au PVA aux deux concentrations testées. Les sondes se comportent de la même manière que les sondes pH. Les courbes de croissance de bactéries en présence de la sonde montrent une croissance normale des bactéries. La densité optique mesurée est légèrement plus élevée avec les sondes que pour les bactéries seules, ils semblent donc bien y avoir une interaction entre la sonde et les bactéries, mais cela ne se reflète pas sur le suivi en fluorescence.

3.2.4 Modification de la concentration en lactose

Afin de comprendre la diminution de fluorescence et d'établir si elle a un lien avec le pH du milieu, des milieux M9 avec différentes concentrations en lactose ont été préparés : 1 mM, 5 mM, 10 mM (concentration de référence), 25 mM et 50 mM. Le pH a été mesuré dans chaque milieu après 65 heures d'incubation des bactéries *Escherichia coli* et les résultats ont été reportés dans le Tableau 6.

Concentration en lactose	1 mM	5 mM	10 mM	25 mM	50 mM
<i>pH de départ</i>	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
<i>pH après 65 heures d'incubation</i>	7	6,5	6	4,8	4,8

Tableau 6 : Influence de la concentration en lactose sur le pH d'un milieu M9 après 65 heures d'incubation des bactéries *Escherichia coli*

Entre 1 et 25 mM, on observe une diminution croissante du pH jusqu'à une valeur de 4,8. Cela montre que la concentration en lactose était bien le facteur limitant des expériences menées précédemment à 10 mM. À 50 mM, le pH est identique qu'à 25 mM, ce qui montre que le lactose n'est plus consommé entièrement à cette concentration et qu'il y a un autre facteur limitant la croissance des bactéries qui peut être le pH ou la concentration en azote.

Le suivi de fluorescence des sondes naphthalimide et chlorocoumarine à 200 μ M ont également été mesurées pour ces différentes concentrations en lactose. La Figure 66 montre l'évolution de la fluorescence de la sonde **33** (sonde naphthalimide couplée au polymère) dans des milieux M9 contenant 1 mM, 5 mM et 25 mM en lactose. À 1 et 5 mM en lactose, la perte de fluorescence observée précédemment a disparu, ce qui prouve que l'effet du pH était bien responsable de ce phénomène. L'augmentation de fluorescence démarre quelques heures plus tôt à 1 mM qu'à 5 mM, ce qui semble logique étant donné que le lactose est plus rapidement consommé. L'augmentation de fluorescence est également moins forte lorsqu'on diminue la concentration en lactose (comparativement

aux courbes précédentes à 10 mM), ce qui montre que moins d'enzymes ont été sécrétées. À partir de 25 mM, on retrouve la forte diminution de la fluorescence des sondes, elle n'est cependant pas suivie par une augmentation de fluorescence, mais par une stabilisation.

La croissance des bactéries à chaque concentration, en présence et en absence de sonde **33** est donnée en Figure 67. À 1 mM, la croissance des bactéries sans sonde est très aléatoire, les bactéries ayant du mal à s'adapter à un milieu aussi pauvre en sucre. Dans certains puits, les bactéries n'ont pas du tout poussé et dans d'autres la croissance a été fortement retardée. Ce phénomène ne s'observe pas lorsque la sonde est présente dans le milieu à 1mM en lactose. Pour chaque puits, la croissance des bactéries est normale et non retardée par rapport aux autres courbes. De manière générale, la densité optique de bactéries est bien proportionnelle au taux de lactose présent dans le milieu. Cependant, on observe assez peu de variations à 5 mM et 25 mM en absence de sonde, ce qui prouve qu'à 25 mM, les bactéries n'ont pas consommé tout le lactose disponible.

À 25 mM en présence de sonde **33**, la densité optique finale est bien plus élevée qu'en absence de sonde. Cela laisse penser qu'une partie du galactose a bien été hydrolysée par les bactéries contrairement à ce que peut laisser croire le suivi de fluorescence. Cependant, la compétition entre diminution du pH et hydrolyse du sucre peut expliquer la stabilisation de la fluorescence. À 50 mM, que ce soit avec ou sans sonde, les courbes de croissance des bactéries sont identiques à celles à 25 mM sans la sonde, ce qui indique que le galactose n'a pas du tout été hydrolysé par les bactéries dans ces conditions.

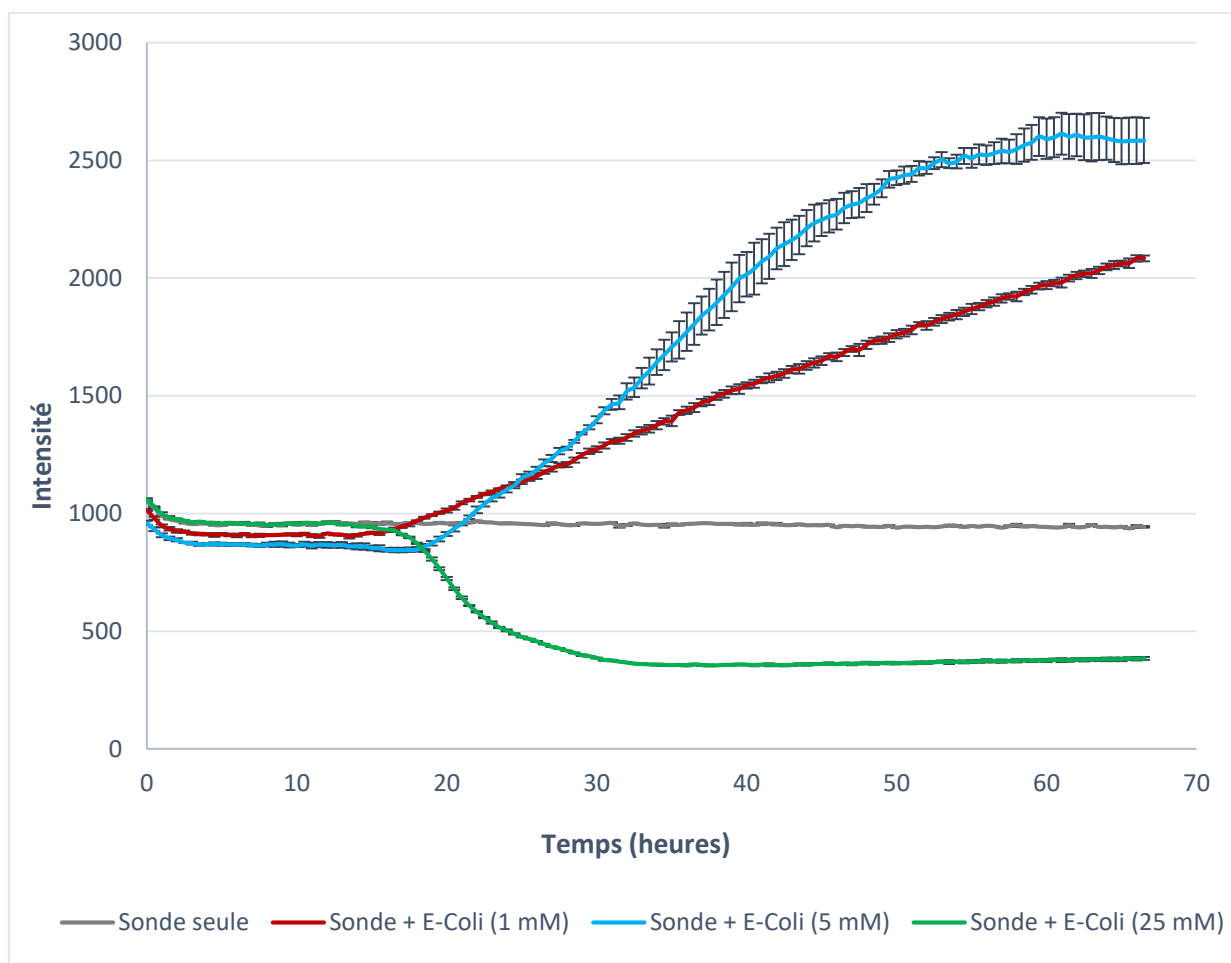


Figure 66 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) de la sondes **33** (sonde naphthalimide couplée au polymère) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant différentes concentrations en lactose (1 mM, 5 mM, et 25 mM) et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'auto fluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 65 heures.

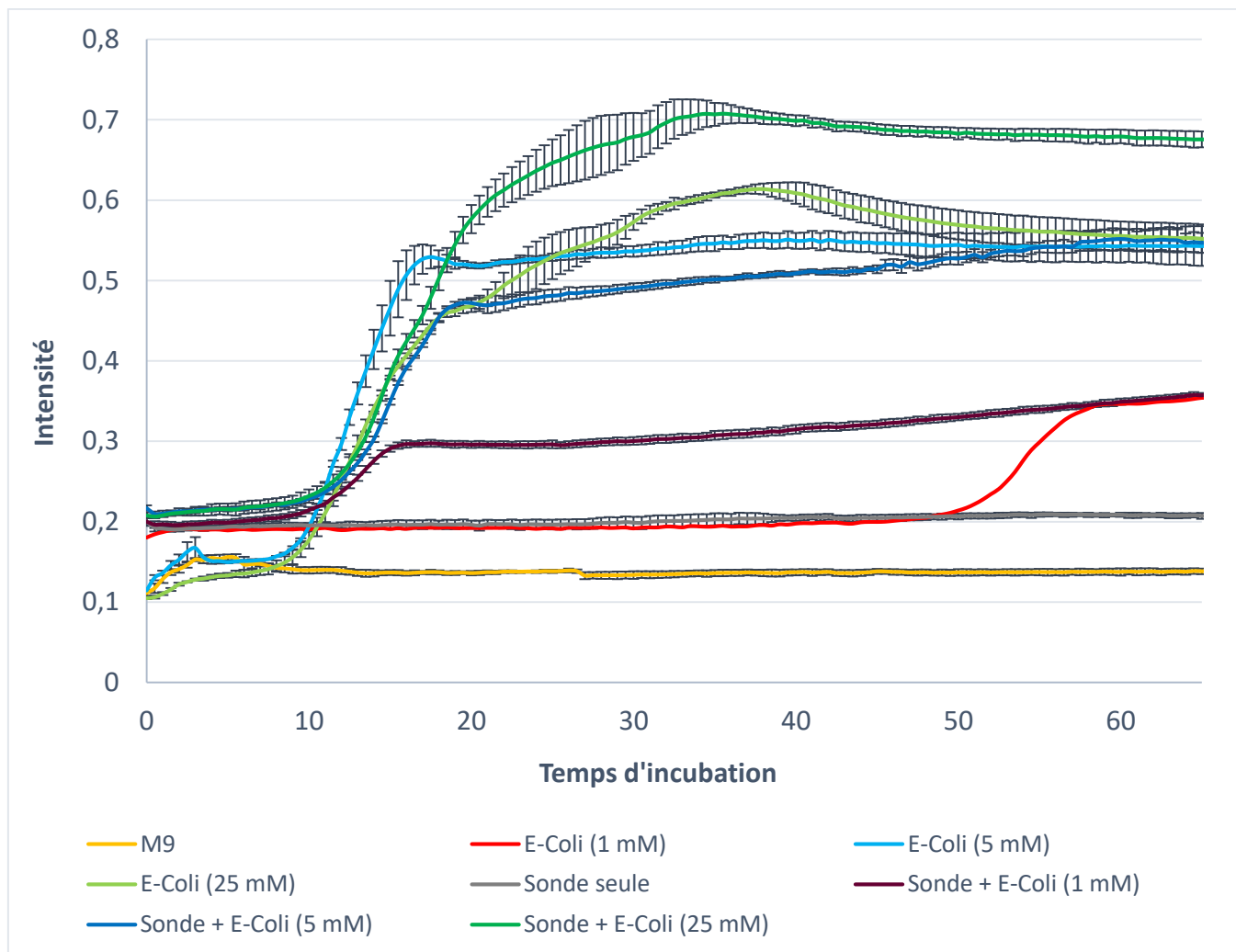


Figure 67 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) au cours du temps des bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 lactose à différentes concentrations (1, 5 et 25 mM), seules et en présence de sondes naphthalimide **33** à 200 μ M. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 65 heures.

Le suivi de fluorescence pour la sonde chlorocoumarine **43** (sonde greffée au polymère) est donné en Figure 68 et la croissance des bactéries en Figure 69. L'allure des différentes courbes est de manière générale identique à celle de la sonde naphthalimide 33 et on peut donc en tirer les mêmes conclusions.

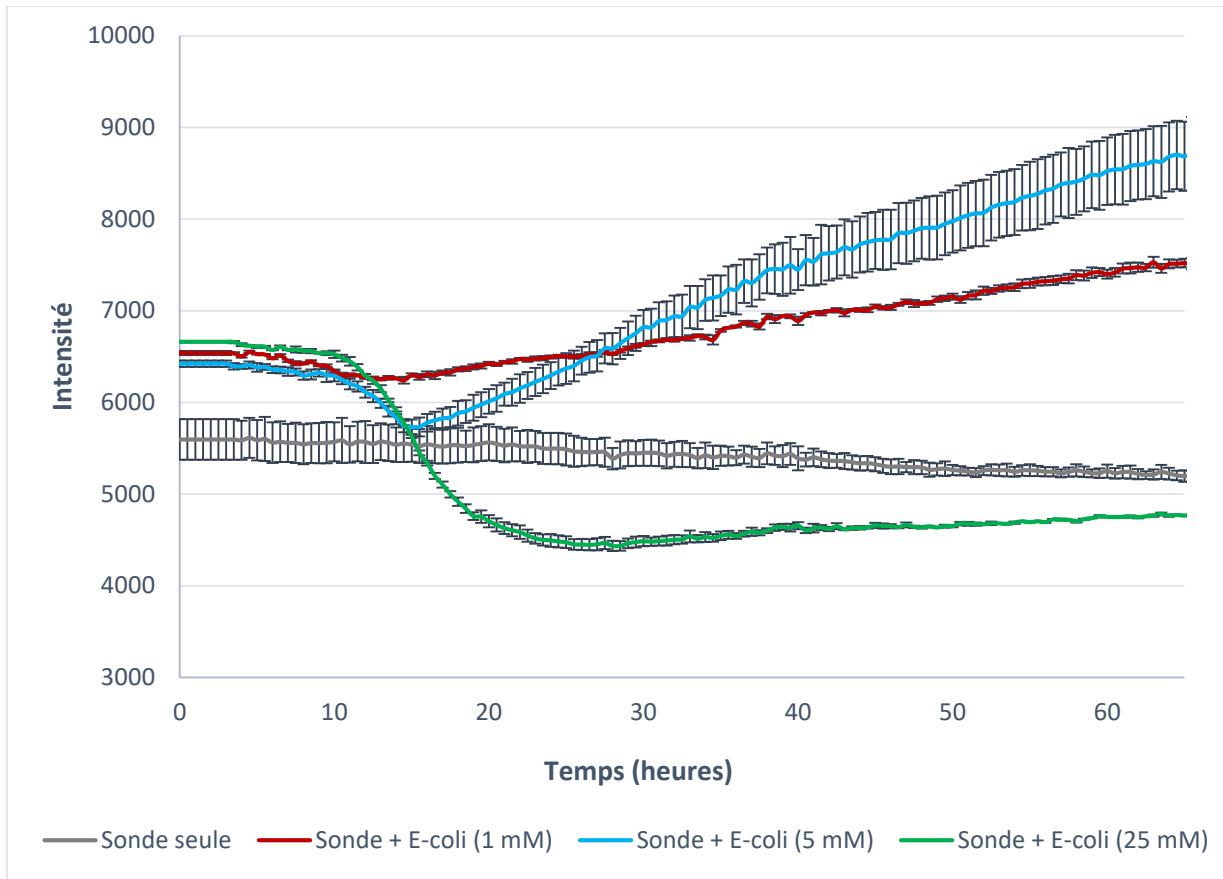


Figure 68 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 397 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=475 \text{ nm}$) de la sonde **43** (sonde chlorocoumarine couplée au polymère) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant différentes concentrations en lactose (1 mM, 5 mM, et 25 mM) et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 65 heures.

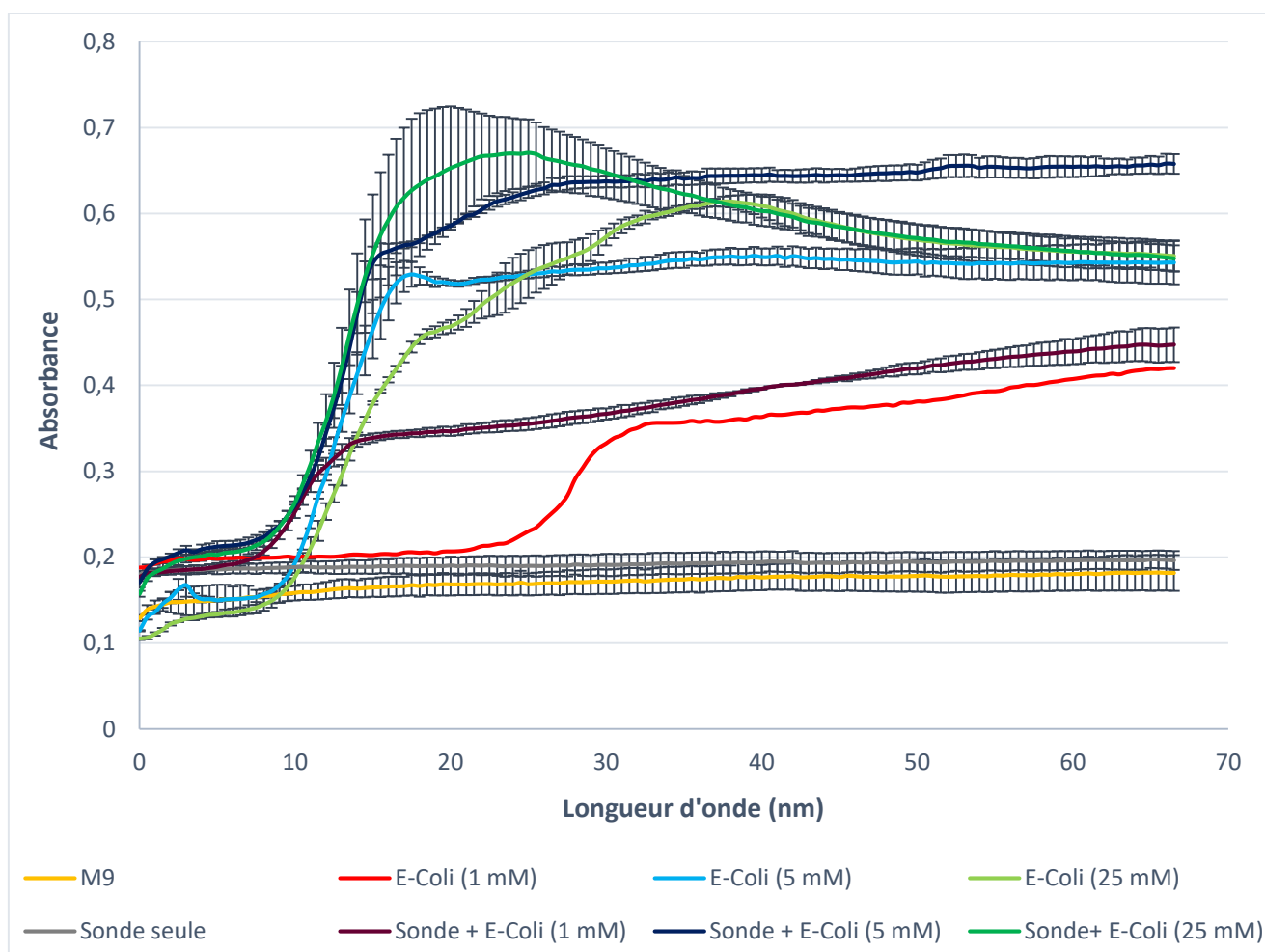


Figure 69 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) au cours du temps des bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 lactose à différentes concentrations (1, 5 et 25 mM), seules et en présence de sondes naphthalimide **43** à 200 μ M. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 65 heures.

Au regard des différentes expériences menées dans cette partie, on peut conclure que les meilleures conditions pour étudier l'activité galactosidase des bactéries *Escherichia coli* est d'introduire 200 μ M de sondes dans un milieu M9 avec du lactose à 5 mM.

3.2.5 Étude de l'influence du polymère

Afin de mieux comprendre le devenir des sondes non greffées au polymère après clivage du sucre par les bactéries, une expérience de filtration a été menée. Les sondes naphthalimide **29** et **33** ont été incubées pendant 40 heures avec les bactéries *Escherichia*

coli, puis ont été filtrées afin d'éliminer les bactéries. La fluorescence du filtrat a été mesurée et comparée avec la fluorescence obtenue avant filtration. La fluorescence des sondes non incubée avec la bactérie a également été mesurée avant et après filtration. Les résultats de cette expérience sont donnés dans la Figure 70.

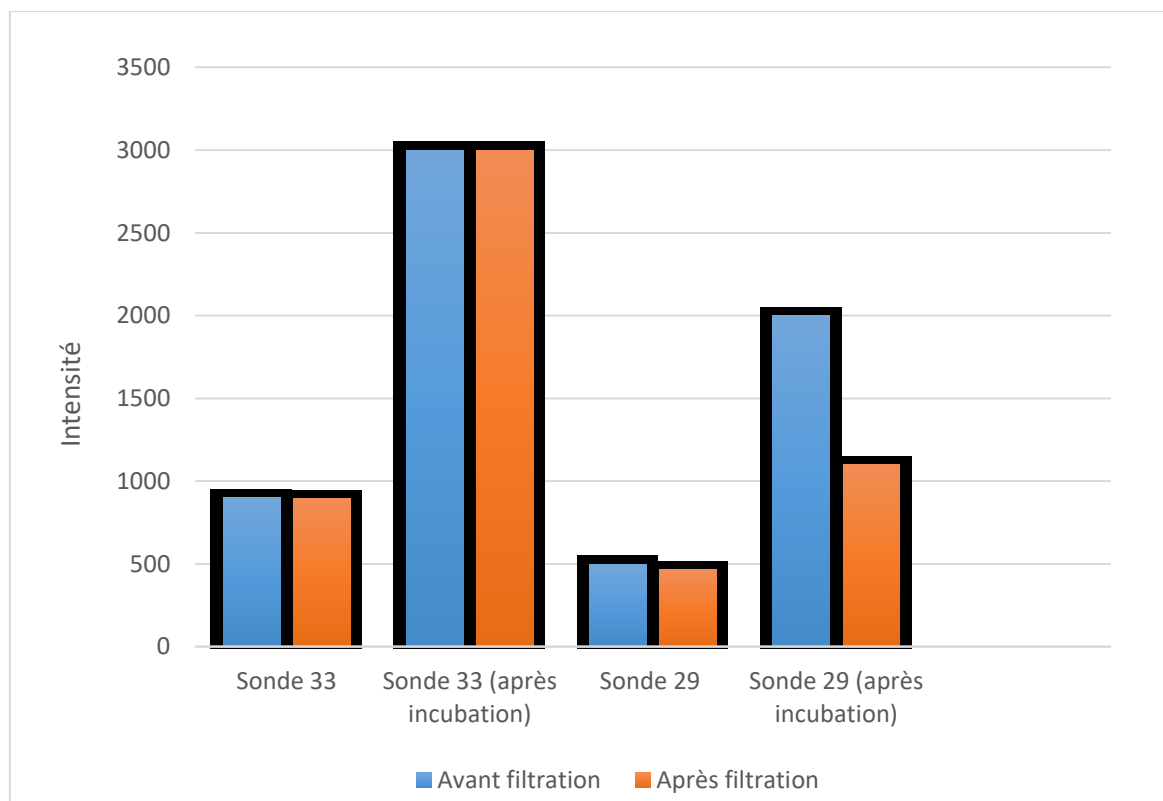


Figure 70 : Comparaison de la fluorescence des sondes naphtalimide 29 et 33 avant et après filtration sans incubation et après 40 heures d'incubation avec les bactéries *Escherichia coli*.

La sonde naphtalimide **33** greffée au polymère ne montre aucune évolution de fluorescence avant et après filtration que ce soit sans incubation ou après 40 heures d'incubation avec les bactéries. Le polymère remplit donc bien son rôle et permet à la sonde de rester soluble dans le milieu après clivage du sucre. La sonde naphtalimide **29** non greffée au polymère présente quant à elle une nette diminution de sa fluorescence après filtration dans le cas où elle a été incubée avec les bactéries. Cela peut signifier que la sonde ait simplement précipité dans le milieu et ait été retenue par le filtre. Il est également possible que la sonde ait traversé la membrane bactérienne et ait été éliminée avec les bactéries.

Même si aucune toxicité apparente n'est détectée avec la sonde non greffée au polymère, cette expérience prouve l'intérêt de celui-ci. Il est possible que le fait que l'expérience soit réalisée en milieu basique et donc que la sonde soit déprotonée limite sa précipitation et donc sa potentielle toxicité. Il est également possible que la toxicité soit masquée par le fait que les bactéries soient déjà en phase de croissance stationnaire lorsqu'elles commencent à digérer le galactose des sondes. En comparant la fluorescence obtenue après 40 heures d'incubation avec les bactéries et celle obtenue dans les tests enzymatiques, il est évident qu'une quantité très limitée de sonde a été clivée après 40 heures d'incubation avec les bactéries. Il est donc possible que cette quantité de sonde libre dans le milieu soit trop faible pour faire apparaître une toxicité marquante chez les bactéries.

3.3 Contrôle négatif

3.3.1 Modification du milieu

Plusieurs expériences ont été menées en tant que contrôle négatif et ainsi prouver que l'augmentation de la fluorescence observée précédemment est bien due à l'hydrolyse des galactoses par les enzymes β -galactosidases.

La première expérience consistait à remplacer le lactose du milieu par du glucose à 10 mM (les autres conditions restant inchangées). En milieu glucose, l'opéron lactose des bactéries *Escherichia coli* sera désactivée et les bactéries ne devraient donc pas sécréter l'enzyme β -galactosidase.

La Figure 71 donne le suivi de fluorescence des sondes naphthalimide **29** et **33**, et la Figure 72 celui des sondes chlorocoumarine **41** et **43**. L'allure des différentes courbes est comparable à celle des courbes pH pour la forme basique. On observe la diminution de fluorescence dû au Ph, mais elle n'est pas suivie par la forte augmentation présente en milieu M9 lactose. Une très légère augmentation est visible à partir de 28 heures, mais qui est comparable à celle visible pour les sondes pH. On peut déduire que les modifications

de fluorescence observées dans ces conditions ne résultent qu'à l'effet du pH et que les bactéries ne sécrètent pas l'enzyme β -galactosidase dans ce milieu.

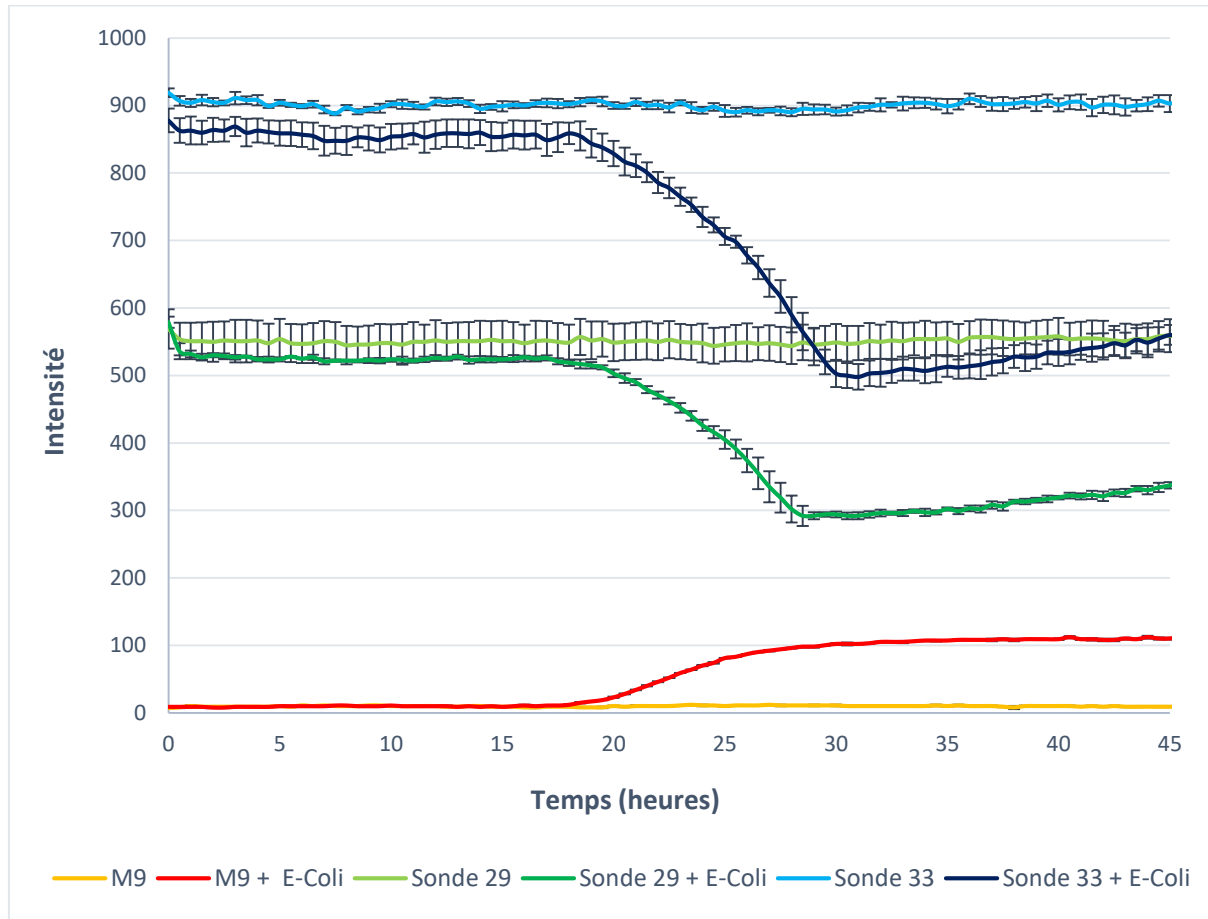


Figure 71 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) des sondes **29** (sonde naphthalimide non couplée au polymère) et **33** (sonde naphthalimide couplée au polymère) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de glucose et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

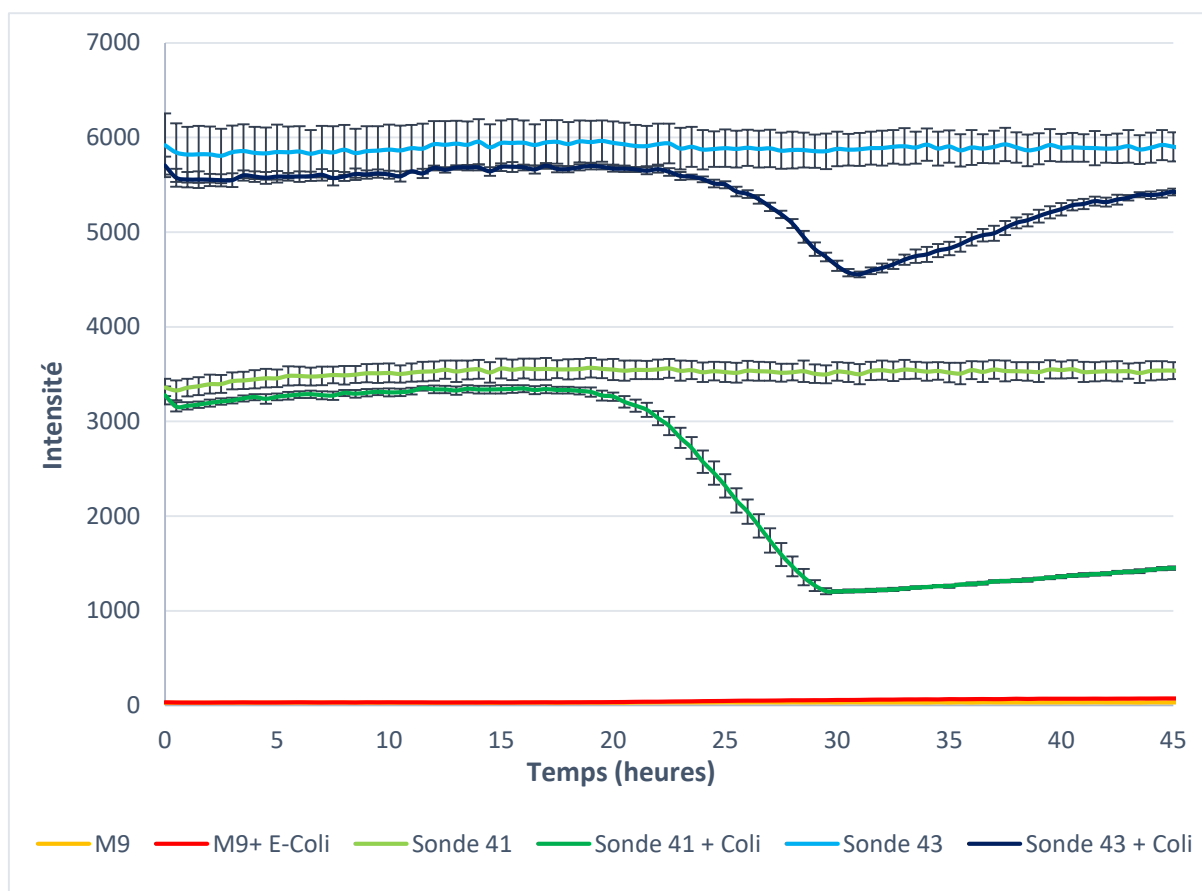


Figure 72 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 397 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=475 \text{ nm}$) des sondes **41** (sonde chlorocoumarine non couplée au polymère) et **43** (sonde chlorocoumarine couplée au polymère) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de glucose et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

3.3.2 Utilisation des sondes mannosidases

Les sondes sur lesquelles ont été greffées un mannose ont également été utilisées pour le contrôle négatif. Ces tests ont été réalisés dans un milieu M9 contenant du lactose à 10 mM. De cette manière, les bactéries sécrèteront l'enzyme β -galactosidase, qui ne devraient pas reconnaître les sondes. Les sondes **34** et **44** (sondes naphthalimide et chlorocoumarine liées au PEG) ont été introduites à une concentration de 200 μM .

La Figure 73 donne le suivi de fluorescence pour la sonde **34** et la Figure 74 celui de la sonde **44**. Dans chaque cas, l'allure des courbes est comparable aux précédentes dans le

milieu M9 glucose. L'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible pour les deux sondes indiquant qu'il y a moins de sonde ayant perdu le mannose dans le milieu, la liaison glycosidique devant être plus stable dans ce cas.

Ces résultats confirment l'absence de réactivité entre enzymes β -galactosidases et les sondes mannosidases.

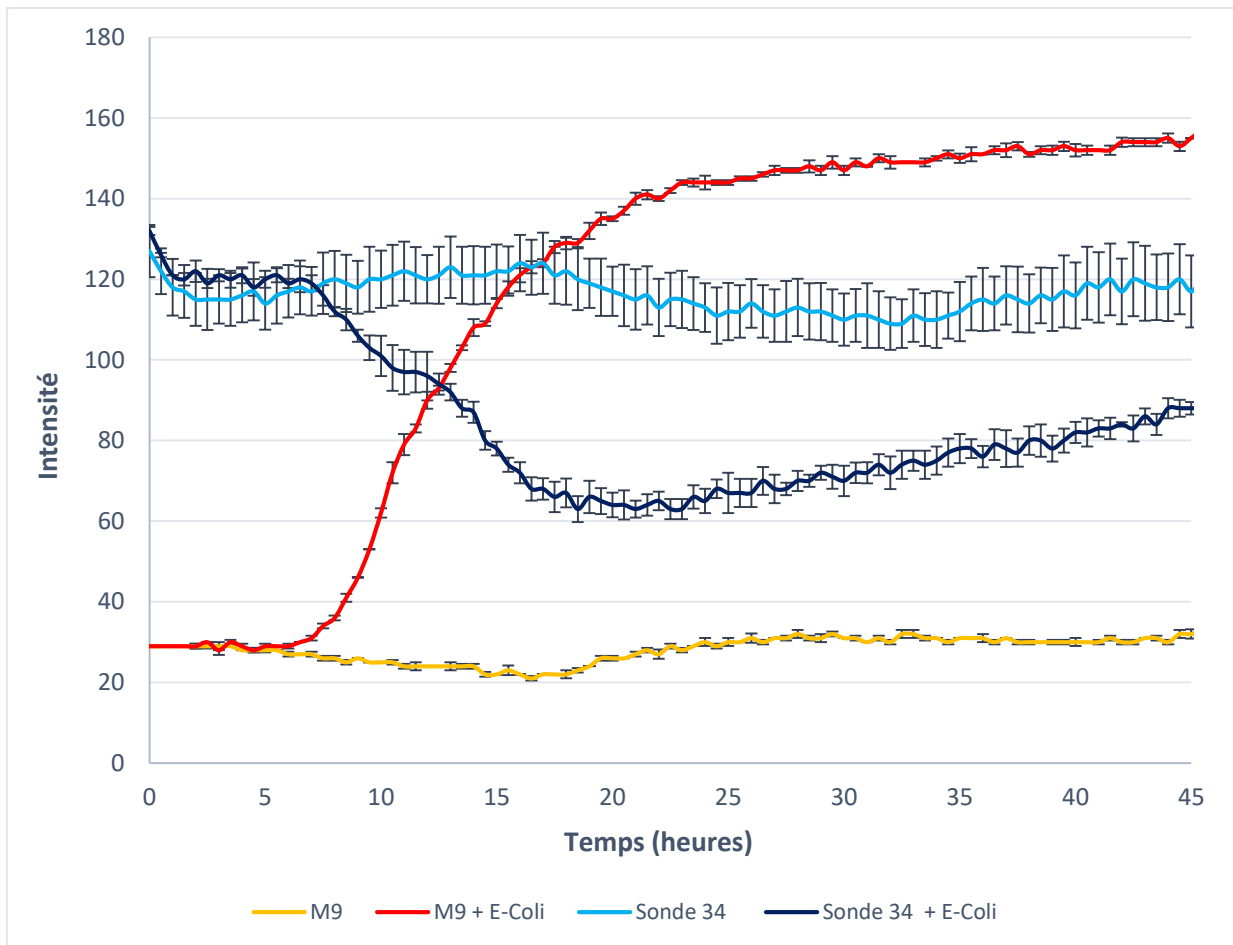


Figure 73 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}=446\text{ nm}$; $\lambda_{em}=560\text{ nm}$) de la sonde **34** (sonde naphthalimide mannosidase couplée au polymère) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de lactose et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

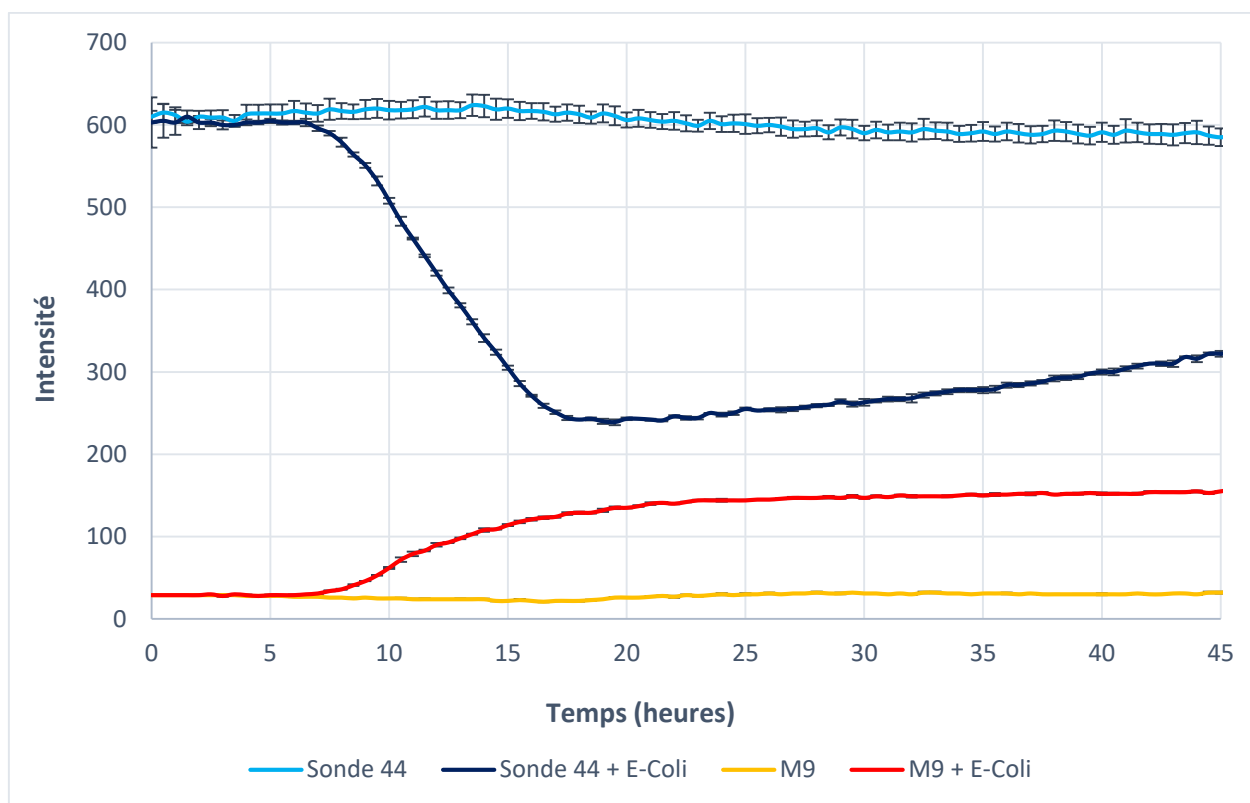


Figure 74 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}=397\text{ nm}$; $\lambda_{em}=475\text{ nm}$) de la sondes **44** (sonde chlorocoumarine mannosidase couplée au polymère) au cours du temps en présence et en absence des bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 contenant 10 mM de lactose et les sondes ont été introduites à 200 μM . L'autofluorescence des bactéries a été soustraite des courbes. Chaque point a été réalisé à 30 minutes d'intervalle pendant une durée totale de 45 heures.

Les sondes ont donc prouvé leur efficacité en plaque 96 puits pour suivre l'activité galactosidase d'une population macroscopique de bactéries. Pour aller plus loin dans l'objectif de ce travail, la prochaine étape vise à étudier cette activité sur des cellules individuelles grâce à la technique de la millifluidique digitale. Cependant, seule la sonde naphthalimide pourra être utilisée pour cette dernière partie étant donné que l'appareil de millifluidique ne possède pas encore les filtres nécessaires pour le suivi de la fluorescence de la sonde chlorocoumarine.

IV. Étude de l'activité galactosidase des bactéries *Escherichia coli* en milieu millifluidique

4.1 Le choix de la millifluidique digitale

La microfluidique qui peut être caractérisée comme l'étude et la manipulation de fluides s'écoulant dans des canaux de taille micrométrique¹⁴³ a connu un large essor à partir des années 2000.

Cette technique offre de nombreux avantages, notamment dans les domaines de la chimie et de la biologie. La miniaturisation dans la manipulation des fluides permet la réduction de la taille des prélèvements et des volumes morts, ce qui trouve son intérêt dans les domaines analytiques¹⁴⁴. La microfluidique peut également offrir la possibilité de la parallélisation des analyses, permettant de réaliser un grand nombre d'expériences sur une plage de temps réduite. Mais, ce qui sera exploitée pour ce travail est avant tout la possibilité d'isoler et d'analyser individuellement les cellules. Grâce à cette technique, l'information chimique et biochimique ne sera plus réduite à une moyenne sur l'ensemble d'une population macroscopique, mais deviendra disponible pour chaque cellule¹⁴⁵. Les avantages de la compartimentalisation de processus biologiques dans des gouttes d'émulsion ont été mis en avant par Tawfik et Griffiths en 1998¹⁴⁶. Depuis, l'utilisation de gouttes agissant comme mini-réacteurs parallélisés grâce à l'utilisation de deux phases immiscibles a été largement développée et rentre dans ce qu'on appelle la microfluidique digitale. La phrase extérieure permet de sceller et de maîtriser la composition des gouttes et ainsi de les rendre indépendantes les unes des autres.

Néanmoins, malgré tous les avantages qu'offre la microfluidique, c'est la technique millifluidique qui sera plus adaptée à la culture de microorganismes. L'augmentation du volume des bioréacteurs permet de réaliser des expériences moins contraignantes notamment pour une utilisation en routine. De plus, la taille de la population de bactéries observable est proportionnelle au volume du réacteur. Un environnement miniaturisé associé à une agitation faible favoriseront alors le développement de biofilms¹⁴⁷. La technique millifluidique permet de s'affranchir de ces problèmes tout en conservant les

mêmes particularités et avantages à l'échelle de la centaine de nanolitres dans des réacteurs allant jusqu'à 1 mm de diamètre¹⁴⁸. De précédentes études ont montré que la croissance des bactéries lors de leur incubation en goutte ne diffère pas de celle d'une population macroscopique¹⁴⁷.

4.2 Suivi de la sonde naphthalimide en milieu millifluidique

Les meilleures conditions obtenues dans la partie précédente ont été retenues pour les tests en milieu millifluidique. Les bactéries *Escherichia Coli* ont été cultivées dans un milieu M9 contenant 5 mM de lactose. Les sondes naphthalimide **29** et **33** ont été introduites dans le milieu à la concentration de 200 μ M.

La phase continue constituée d'hydrofluoroéther (HFE 7500) a été choisie de manière à limiter les fuites de molécules hors de la phase dispersée. L'huile utilisée est le 3-éthoxyperfluoro(2-méthylhexane) commercialisée par 3MTM, dont la formule est représentée en Figure 75. Au total, 160 gouttes ont été formées durant cette expérience.

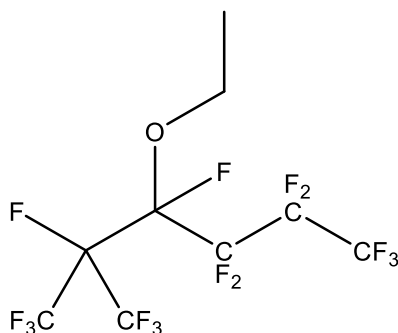


Figure 75 : Formule développée de l'huile constituant la phase continue

La Figure 76 donne les courbes de fluorescence obtenues après 30 heures d'incubation pour chaque goutte formée. Pour chaque paramètre, les courbes ont une allure homogène assez similaire à ce qui a été observé précédemment en plaque 96 puits. L'augmentation de fluorescence des gouttes contenant les bactéries et la sonde est bien visible à partir de 14 heures. L'autofluorescence des bactéries est toujours bien négligeable face à l'augmentation de fluorescence des sondes.

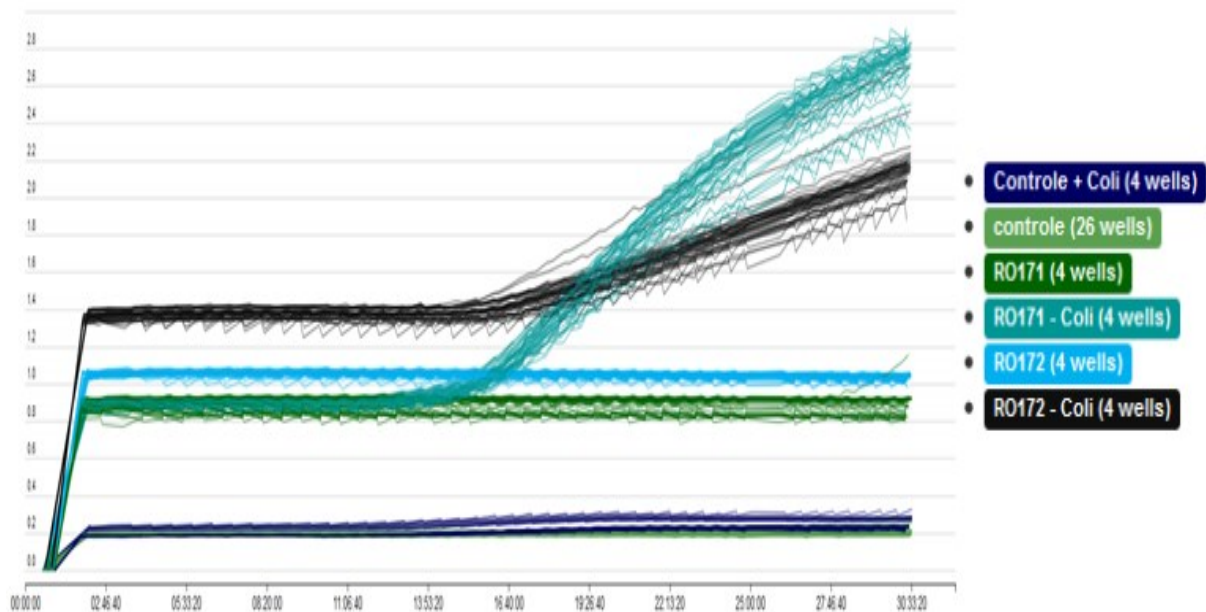


Figure 76 : Suivi de la fluorescence de la sonde naphthalimide 29 (courbe vert foncé pour la sonde seule et courbe turquoise pour la sonde avec *Escherichia coli*) et 33 (courbe bleue pour la sonde seule et courbe noire pour la sonde avec *Escherichia coli*) pendant 30 heures. La courbe bleu foncé donne l'auto fluorescence des bactéries.

Les courbes de croissance des bactéries sont données dans la Figure 77. Pour chaque paramètre, la croissance des bactéries commence à partir de huit heures soit légèrement plus tôt que l'augmentation de fluorescence des sondes. Le même phénomène avait été observé en plaque 96 puits et montre que dans ces conditions, les bactéries semblent également consommer le lactose avant la sonde.

En présence de sonde, les courbes de croissance atteignent plus rapidement un plateau comparativement aux courbes caractérisant les bactéries seules. Il est peu probable que cela soit un marqueur de toxicité des sondes pour les bactéries étant donné que la croissance ne démarre pas de manière décalée dans le temps. Ce phénomène laisse supposer que moins de bactéries ont poussé à l'intérieur de gouttes, mais il est plus probable qu'il provienne simplement de la méthode de détection. En microfluidique, la croissance des bactéries n'est plus mesurée par l'absorbance à 700 nm, mais par la détection de la lumière diffusée. La présence des sondes peut modifier le phénomène de diffusion et entraîner cette diminution du signal observable sur les courbes de croissance de bactéries en présence de sonde.

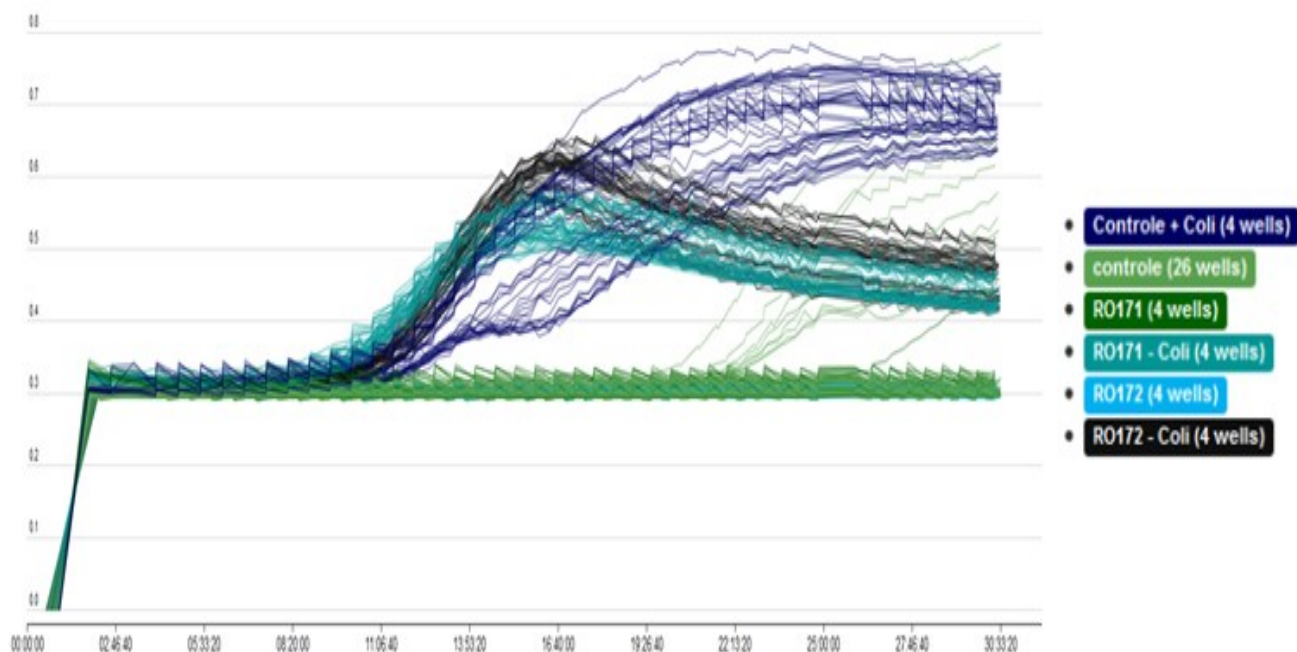


Figure 77 : Suivi de la croissance des bactéries seules (courbe bleu foncé) et en présence de sonde 29 (courbe turquoise) et 33 (courbe noire) pendant 30 heures dans chaque goutte.

Mis à part le problème de diffusion pour le suivi de la croissance des bactéries en présence de sondes, ces expériences ont bien donné les résultats escomptés et montrent la possibilité de suivre l'activité galactosidase en milieu millifluidique sans apparente toxicité pour les bactéries. Des études plus poussées quant à l'avantage de la présence du polymère sur les sondes devront être réalisées dans un travail ultérieur.

Chapitre 5. Synthèse et activités biologiques de sondes amphiphiles

I. Introduction

La sonde naphthalimide synthétisée dans le chapitre 2 a été utilisée une nouvelle fois afin de développer des sondes amphiphiles capables de marquer la membrane cellulaire. Ces sondes sont qualifiées d'amphiphiles, car elles possèdent une partie hydrophobe qui va se loger dans la partie lipidique de la membrane cellulaire et une partie hydrophile qui va rester dans le milieu extérieur. De cette manière, la sonde ne devrait pas pénétrer totalement à l'intérieur de la cellule et donc limiter toute toxicité. Le but de ces sondes est de développer une nouvelle méthode du suivi de la croissance des bactéries par la fluorescence et de visualiser les cellules par microscopie à différentes couleurs. Les sondes sont très solubles dans l'eau, puisqu'elles sont couplées à un polymère hydrosoluble (PEG), et y sont éteintes. Elles vont s'allumer au fur et à mesure de leur intégration dans les compartiments lipidiques (membranes)

Plusieurs exemples de sondes amphiphiles sont disponibles dans la littérature que ce soit pour l'étude des membranes d'organismes procaryotes ou eucaryotes. Les avantages recherchés pour ce type de sondes sont de pouvoir les incorporer dans une cellule intacte sans perturber la membrane cytoplasmique ni interférer avec l'activité mesurée. De plus, ces sondes peuvent être modulées afin de cibler des structures cellulaires spécifiques. Dans le cas d'une utilisation sur les bactéries, ces sondes peuvent être employées à n'importe quelle étape de la croissance bactérienne¹⁵².

L'une des sondes amphiphiles les plus utilisées est la FM4-64 (Figure 78) qui a une émission dans le rouge vers 640 nm¹⁵³. Cette sonde est communément employée pour étudier l'endocytose, l'activité des vésicules cytoplasmiques et l'organisation des organites chez les cellules eucaryotes^{154, 155}.

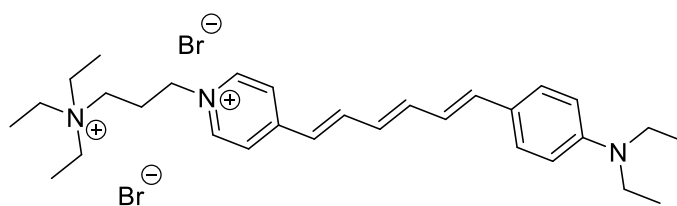


Figure 78 : Structure de la sonde amphiphile FM4-64

Dans le cas de cellules procaryotes, les sondes amphiphiles sont très utilisées pour obtenir des informations sur l'état physiologique des microorganismes soumis à des conditions environnementales diverses¹⁵⁶. Une famille de sondes fluorescentes communément employées sont les dérivés du diphenylhexatriene (DPH) tels que le TMA-DPH ou le DPH-PA (Figure 79)¹⁵². Ces sondes qui émettent vers 430 nm sont particulièrement utilisées pour étudier la fluidité membranaire et l'influence de la température sur celle-ci^{157, 158}.

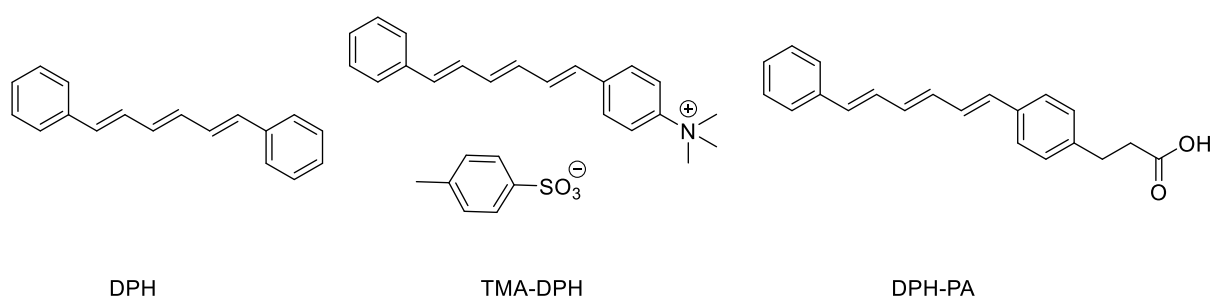


Figure 79 : Structures des sondes DPH, TMA-DPH, et DPH-PA

Dans ce chapitre, deux sondes seront présentées, l'une émettant dans le bleu et l'autre dans le vert et dont la structure est donnée en Figure 80. Plus précisément, la synthèse, les caractérisations physico-chimiques et l'activité biologique de ces sondes seront décrites dans ce chapitre.

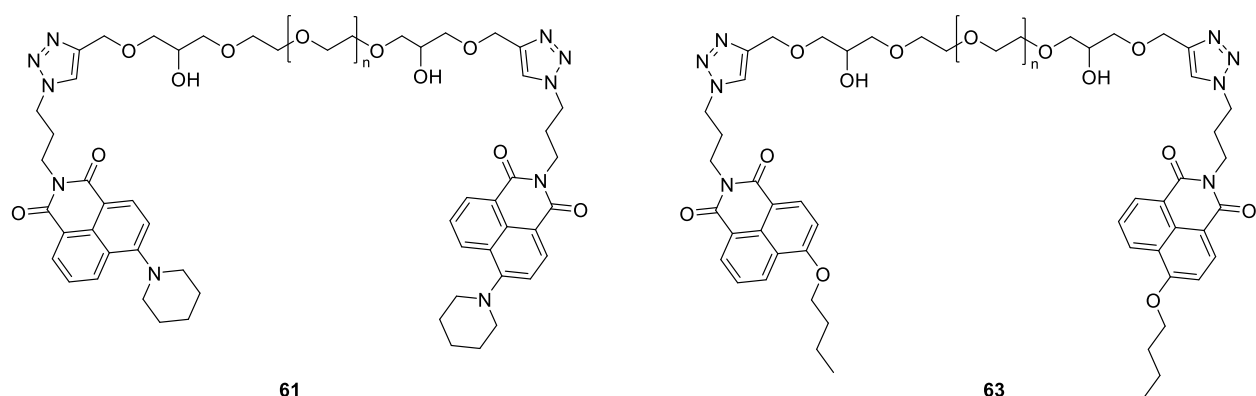


Figure 80 : Sondes amphiphiles sélectionnées

II. Synthèse des sondes amphiphiles

Les deux sondes amphiphiles ont été synthétisées à partir du composé **21**. Le phénol de la sonde pH naphthalimide est remplacé par un groupement pipéridine pour la sonde verte et butoxy pour la sonde bleue. Les sondes sont ensuite greffées au PEG **31** qui correspond à la partie hydrophile de la molécule.

La voie de synthèse de la sonde verte est décrite dans le Schéma 44. La première étape consiste à chauffer à 100°C la sonde **21** dans la pipéridine. Le produit **60** est obtenu avec un rendement de 82% puis est couplé de chaque côté du PEG **31** par réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire. La sonde finale **61** est ainsi obtenue avec 85% de rendement.

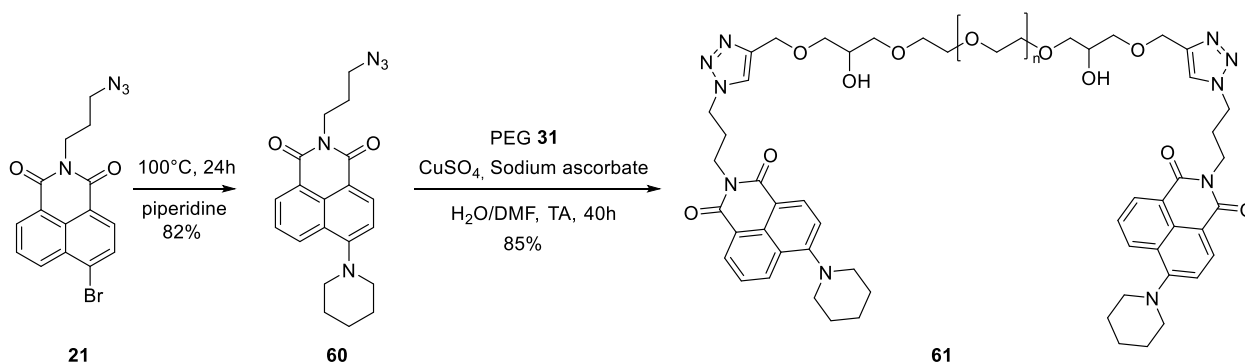


Schéma 44 : Voie de synthèse de la sonde amphiphile verte

Le schéma de synthèse de la sonde bleue est donné dans le Schéma 45. Le composé **21** est chauffé à reflux pendant 20 heures dans une solution de butanol - butanolate de sodium. Le produit **62** est ainsi obtenu avec un rendement de 68% puis est greffé au PEG **31** pour donner la sonde bleue finale **63** avec un rendement de 51%.

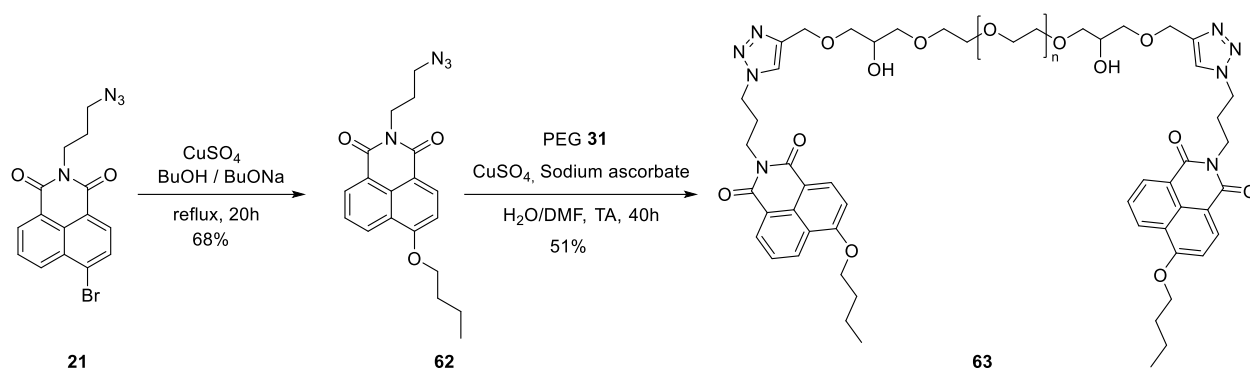


Schéma 45 : Voie de synthèse de la sonde amphiphile bleue

III. Caractérisations physico-chimiques des sondes amphiphiles

Les spectres d'excitation et d'émission de la sonde **61** (Figure 81) et de la sonde **63** (Figure 82) ont été mesurés à 50 μM dans le méthanol. En effet, comme prévu, la fluorescence des deux sondes est éteinte dans l'eau et s'allume dans les solvants tels que le méthanol.

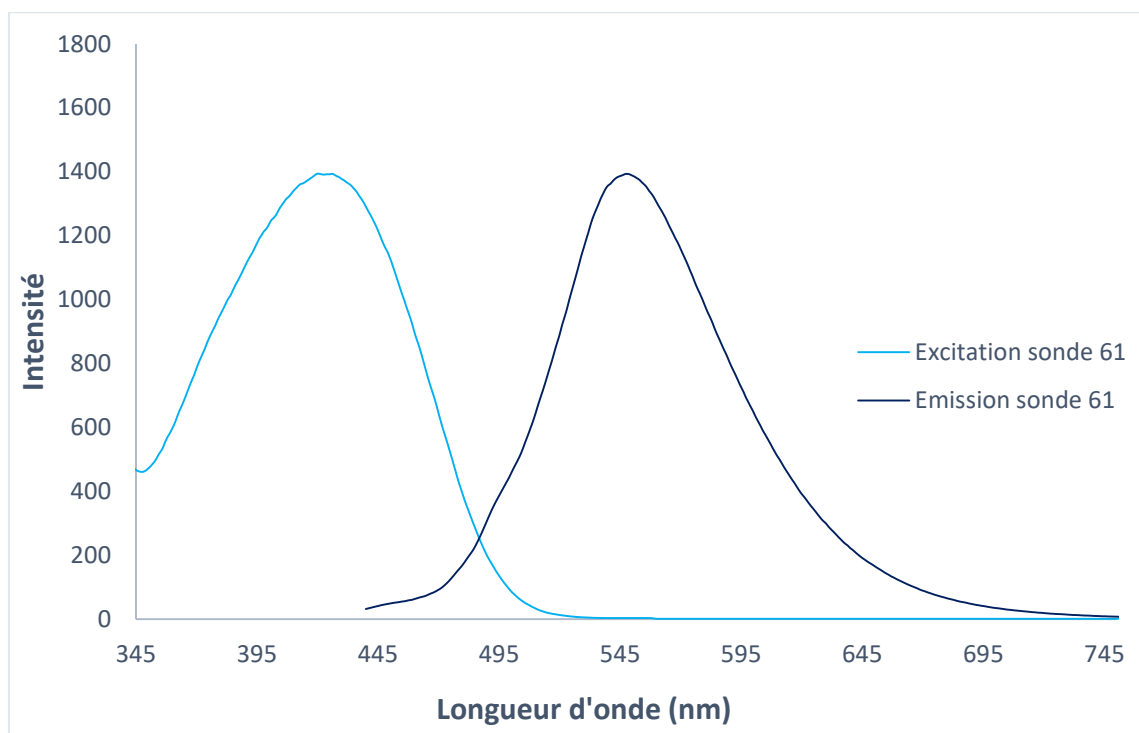


Figure 81 : Spectre d'excitation ($\lambda_{em}=550\text{ nm}$) et d'émission ($\lambda_{exc}=420\text{ nm}$) de la sonde amphiphile **61** à 50 μM dans le méthanol.

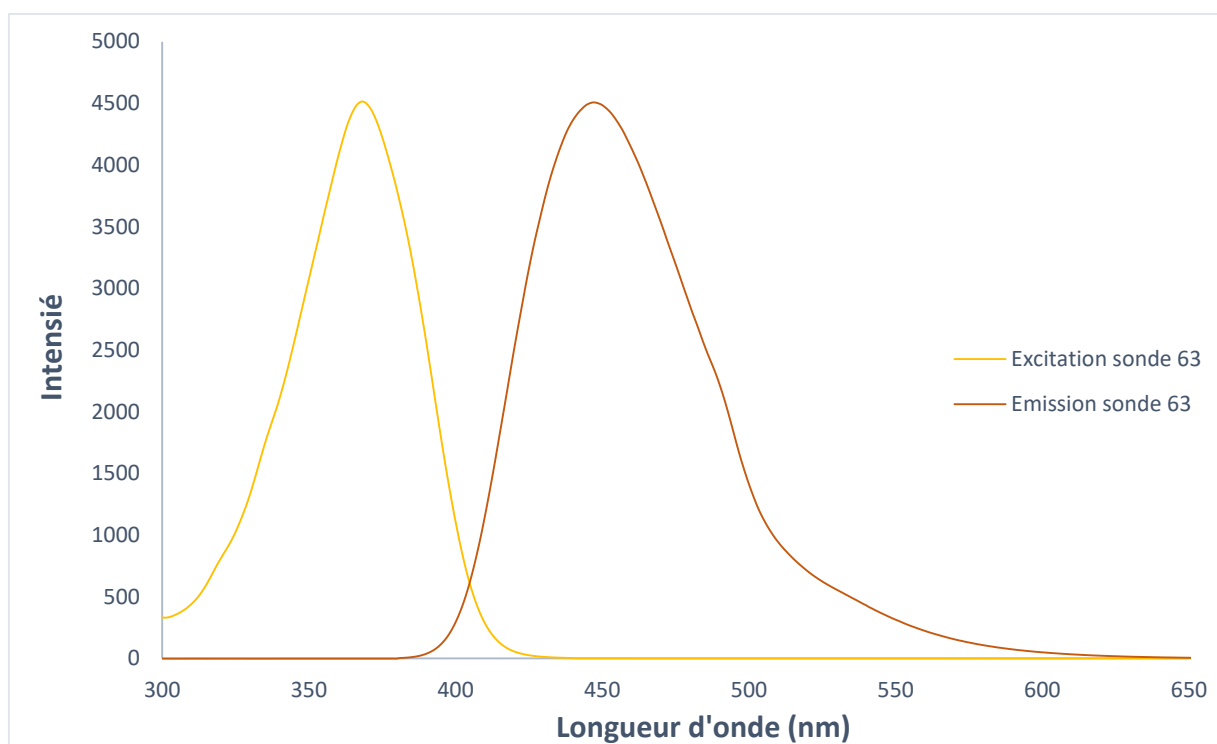


Figure 82 : Spectre d'excitation ($\lambda_{em}=450$ nm) et d'émission ($\lambda_{exc}=370$ nm) de la sonde amphiphile 63 à 50 μ M dans le méthanol.

Le Tableau 7 récapitule les différentes propriétés physico-chimiques des deux sondes amphiphiles.

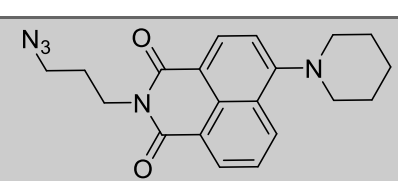
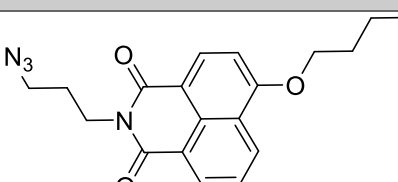
Sonde	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission	Coefficient d'extinction molaire (ϵ)	Rendement quantique (Φ)
 <p>60</p>	420 nm	550 nm	9 600	0,01
 <p>62</p>	370 nm	450 nm	13 900	0,9

Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques des sondes amphiphiles. Les mesures ont été réalisées dans le méthanol. Les rendements quantiques ont été mesurés avec comme référence la fluorescéine pour la sonde **61** et la quinine sulfate pour la sonde **63**.

IV. Activité biologique des sondes amphiphiles

4.1 Sonde amphiphile verte 61

4.1.1 Etude de toxicité

La sonde **61** a été incubée en présence de bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 glucose afin de tester sa toxicité sur des bactéries à Gram négatif.

La Figure 83 montre le suivi de la croissance des bactéries en présence de sonde **61** mesurée grâce à l'absorbance à 700 nm. La sonde a été testée à des concentrations de 100 μM et 200 μM . La croissance des bactéries semble légèrement décalée en présence de sonde si on compare les deux courbes bleues à la courbe rouge représentant la croissance des bactéries seules, ce qui peut signifier une légère toxicité de la sonde. Cependant, la densité optique finale obtenue est identique avec et sans sonde donc les bactéries ont réussi à s'adapter à la présence de sonde.

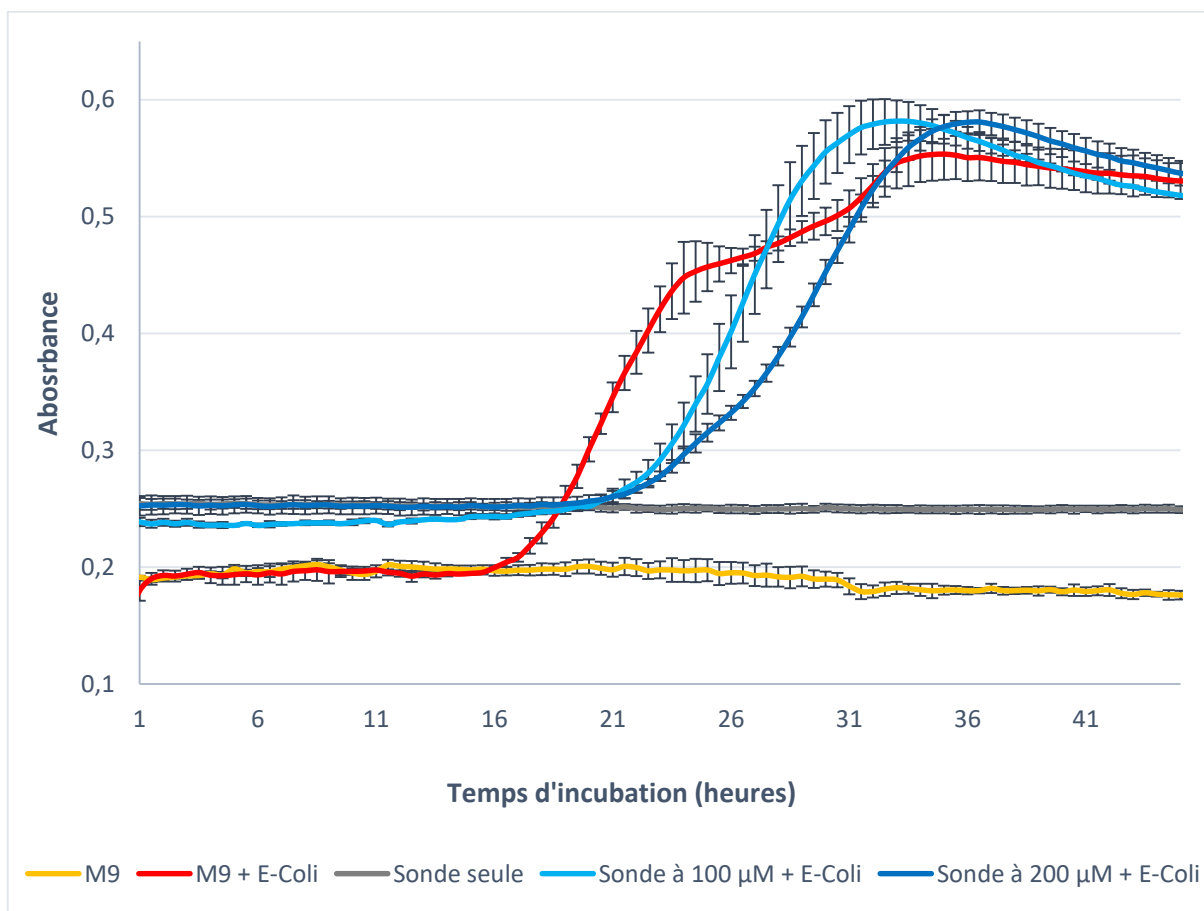


Figure 83 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) des bactéries *Escherichia coli* en présence de la sonde 61 à différentes concentrations (de 100 μM à 200 μM) pendant 45 heures.

La sonde **61** a également été incubée avec des bactéries *Bacillus* dans les mêmes conditions que précédemment afin de tester sa toxicité sur des bactéries à Gram positif. Le suivi de la croissance de ces bactéries en présence de sonde à 100 μM et 200 μM est donné en Figure 84.

Cette fois-ci, on remarque que la présence de sonde a entraîné une forte toxicité pour bactéries. À 100 μM en sonde, très peu de bactéries ont réussi à pousser et à 200 μM la courbe se confond avec celle de la sonde seule, ce qui signifie qu'aucune bactérie n'a pu pousser.

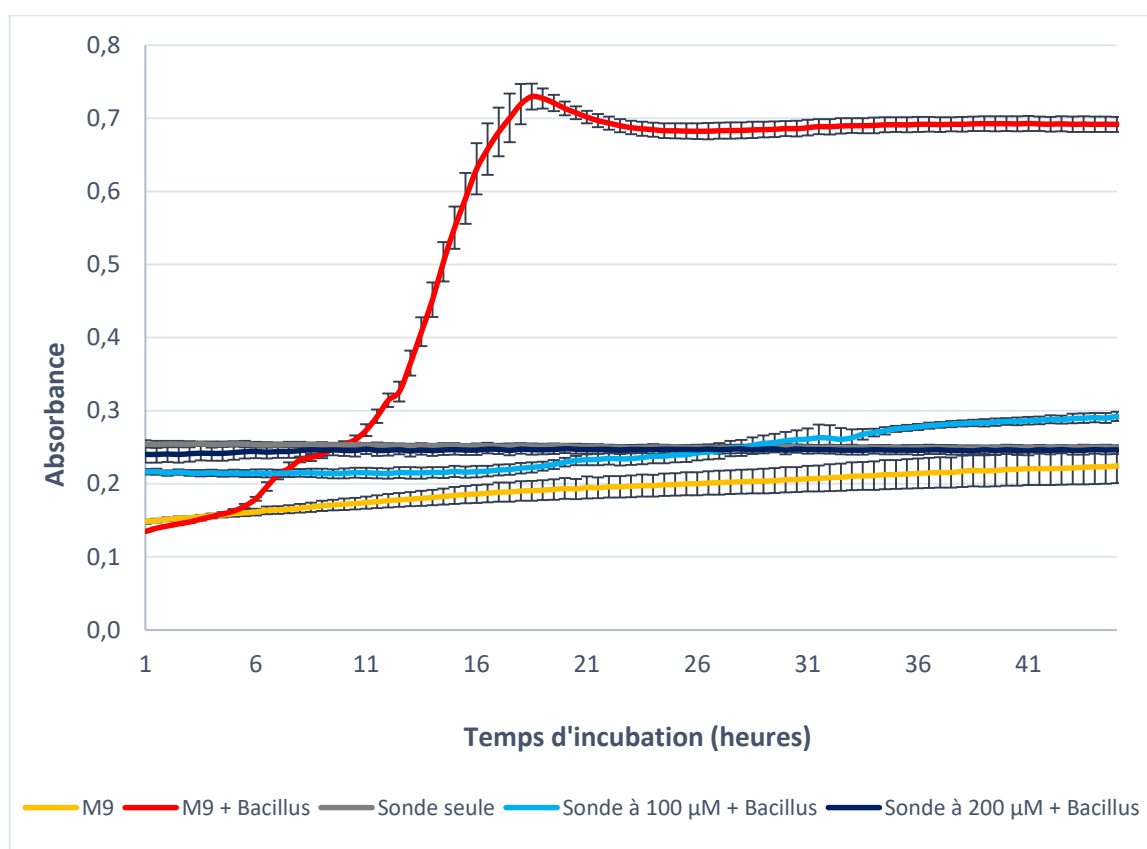


Figure 84 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) des bactéries *Bacillus* en présence de la sonde 61 à différentes concentrations (de 100 μM à 200 μM) pendant 45 heures.

La toxicité des sondes amphiphiles sur les bactéries à Gram positif s'explique par la différence de composition de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif discutée en chapitre 1. Ainsi, les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de membrane externe sur laquelle la sonde pourrait se fixer et qui pourrait protéger la

bactérie. La sonde a donc pu traverser la couche de peptidoglycane et détruire l'intégrité membranaire des bactéries. Néanmoins, les essais ont été réalisés à haute concentration, et les sondes pourront être utilisées sur les bactéries à Gram positif à de plus de faibles concentrations sans entraîner de toxicité pour les essais de microscopie.

Le dernier essai de toxicité a consisté à incuber les bactéries en présence de sonde **60** (sonde verte non greffée au polymère) afin d'étudier l'intérêt du polymère pour ce type de sondes. Les essais ont été réalisés sur les bactéries *Escherichia coli* dans un milieu M9 glucose. Trois concentrations de sonde ont été testées : 50, 100 et 200 μM . La croissance des bactéries dans ces conditions est donnée dans la Figure 85. Les trois courbes bleues montrent que les sondes ont eu une toxicité croissante selon leur concentration pour les bactéries. À 200 μM en sonde, les bactéries n'ont pas du tout poussé.

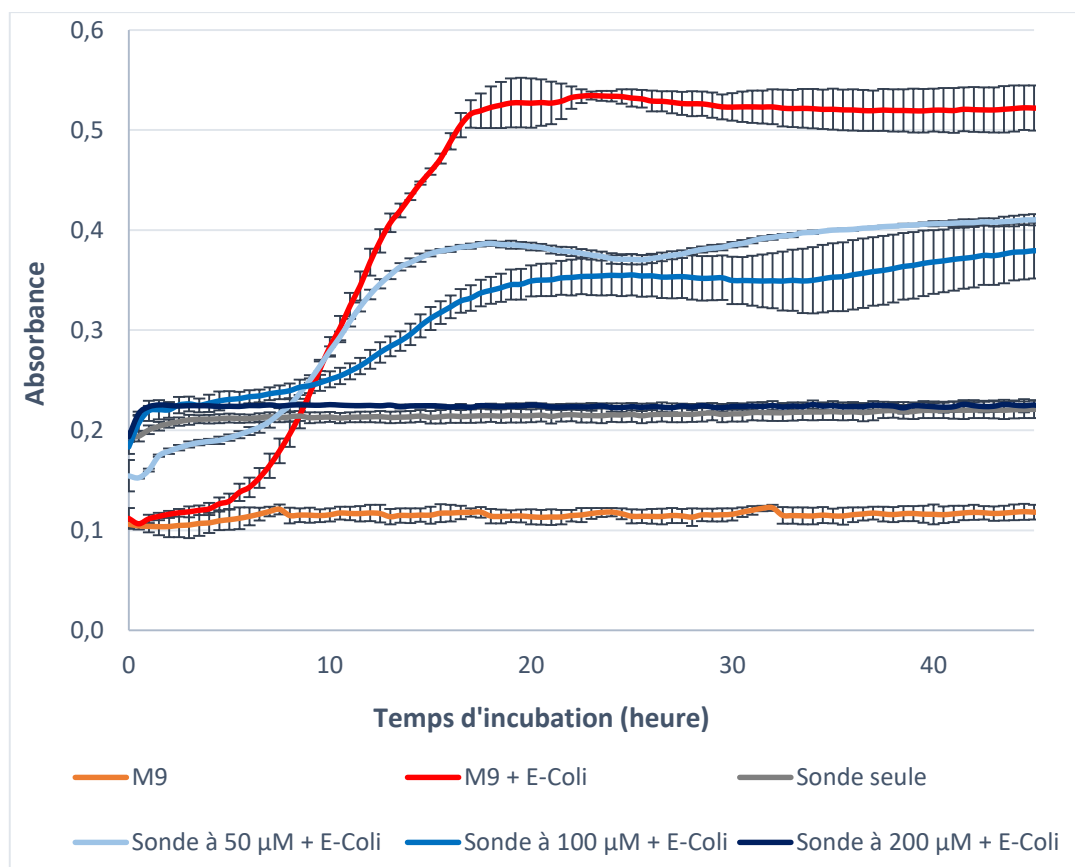


Figure 85 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) des bactéries *Escherichia coli* en présence de la sonde 60 (sonde verte non greffée au polymère) à différentes concentrations (de 50 μM à 200 μM) pendant 45 heures.

Ce test confirme l'importance de l'ajout d'un polymère aux sondes et ainsi la nécessité de créer des sondes amphiphiles pour marquer la membrane bactérienne. Sans le polymère, les sondes semblent capables de traverser la paroi des bactéries, ce qui engendre une toxicité. Le polymère hydrosoluble permet de maintenir une partie de la sonde dans le milieu extérieur dans le cas des bactéries à Gram négatif tout en permettant à la partie hydrophobe de la molécule de marquer la membrane externe sans induire une forte toxicité.

4.1.2 Suivi de la fluorescence des bactéries

La fluorescence de la sonde verte **61** (λ_{exc} = 420 nm et λ_{em} =550 nm) en présence de bactéries *Escherichia coli* au cours du temps a été mesurée à différentes concentrations. Une concentration assez élevée en sonde était nécessaire afin de pouvoir suivre l'augmentation des bactéries au cours du temps : une quantité de sonde libre était nécessaire dans le milieu pour marquer les nouvelles bactéries issues des différentes divisions cellulaires. La concentration optimale retenue a été de 100 μ M et les courbes de fluorescence sont disponibles en Figure 86.

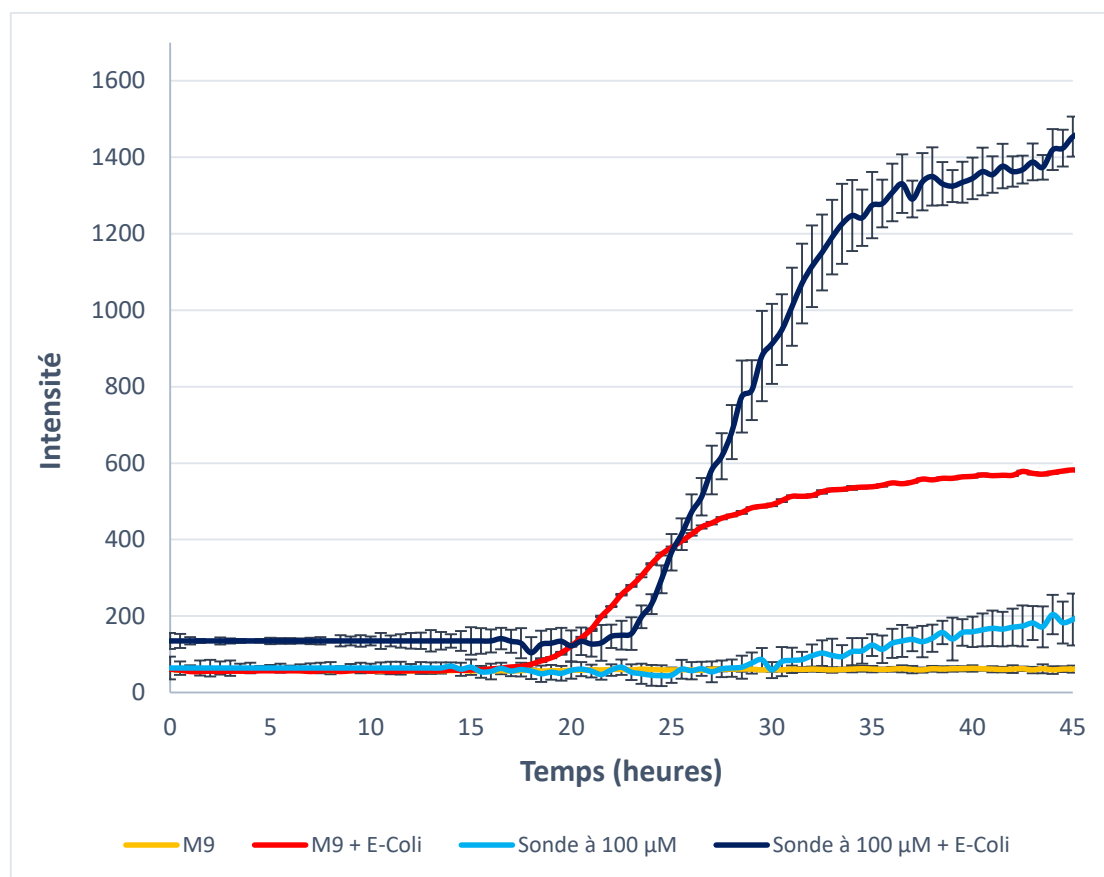


Figure 86 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 420 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=550 \text{ nm}$) des bactéries seules et des bactéries en présence de sonde verte à $100 \mu\text{M}$ dans un milieu M9 glucose pendant 45 heures.

La courbe rouge correspond à l'autofluorescence des bactéries et la courbe bleu foncé à la fluorescence de la sonde en présence de bactéries. On observe un gain de fluorescence en présence de sonde par rapport à l'autofluorescence des bactéries, ce qui montre son efficacité à suivre la croissance des bactéries. Il y a cependant un petit décalage entre les deux courbes, l'augmentation de la fluorescence de la sonde commençant légèrement après l'autofluorescence des bactéries. Ce décalage n'est pas surprenant puisqu'il a également été observé sur les courbes de croissance des bactéries de la Figure 87 et confirme le fait, qu'en présence de sonde, la croissance exponentielle des bactéries a été légèrement retardée.

4.2 Sonde amphiphile bleue 63

La sonde bleue **63** a également été testée dans les mêmes conditions que la sonde amphiphile **61** en présence de bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus*.

La Figure 87 montre le suivi de la croissance des bactéries *Escherichia coli* au cours du temps mesurée grâce à l'absorbance à 700 nm en présence de sonde **63**. La courbe rouge représente la croissance des bactéries seules dans le milieu M9 glucose. Les courbes bleues correspondent à la croissance des bactéries en présence de sonde à différentes concentrations : 50 μM , 100 μM et 200 μM . Quelle que soit la concentration testée, la sonde **63** n'entraîne aucune toxicité pour les bactéries. Les courbes des bactéries en présence de sonde ont la même allure que la courbe correspondant aux bactéries seules et on ne retrouve pas le décalage observé précédemment.

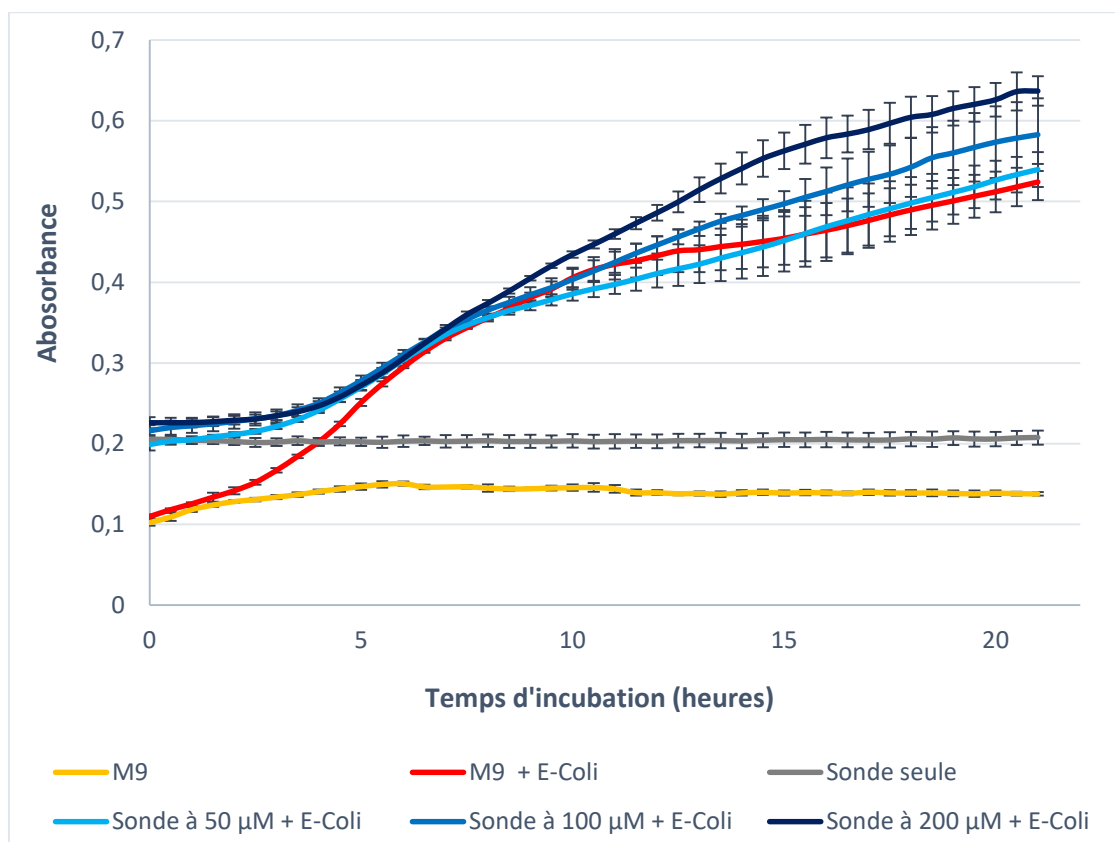


Figure 87 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) des bactéries *Escherichia coli* en présence de la sonde **63** à différentes concentrations (de 50 μM à 200 μM) pendant 22 heures. .

La Figure 88 correspond à la croissance des bactéries *Bacillus* en présence de sonde **63** en milieu M9 glucose. De façon assez étonnante, on ne remarque cette fois-ci aucune toxicité de la sonde pour ces bactéries à Gram positif quelle que soit la concentration (de 50 μM à 200 μM).

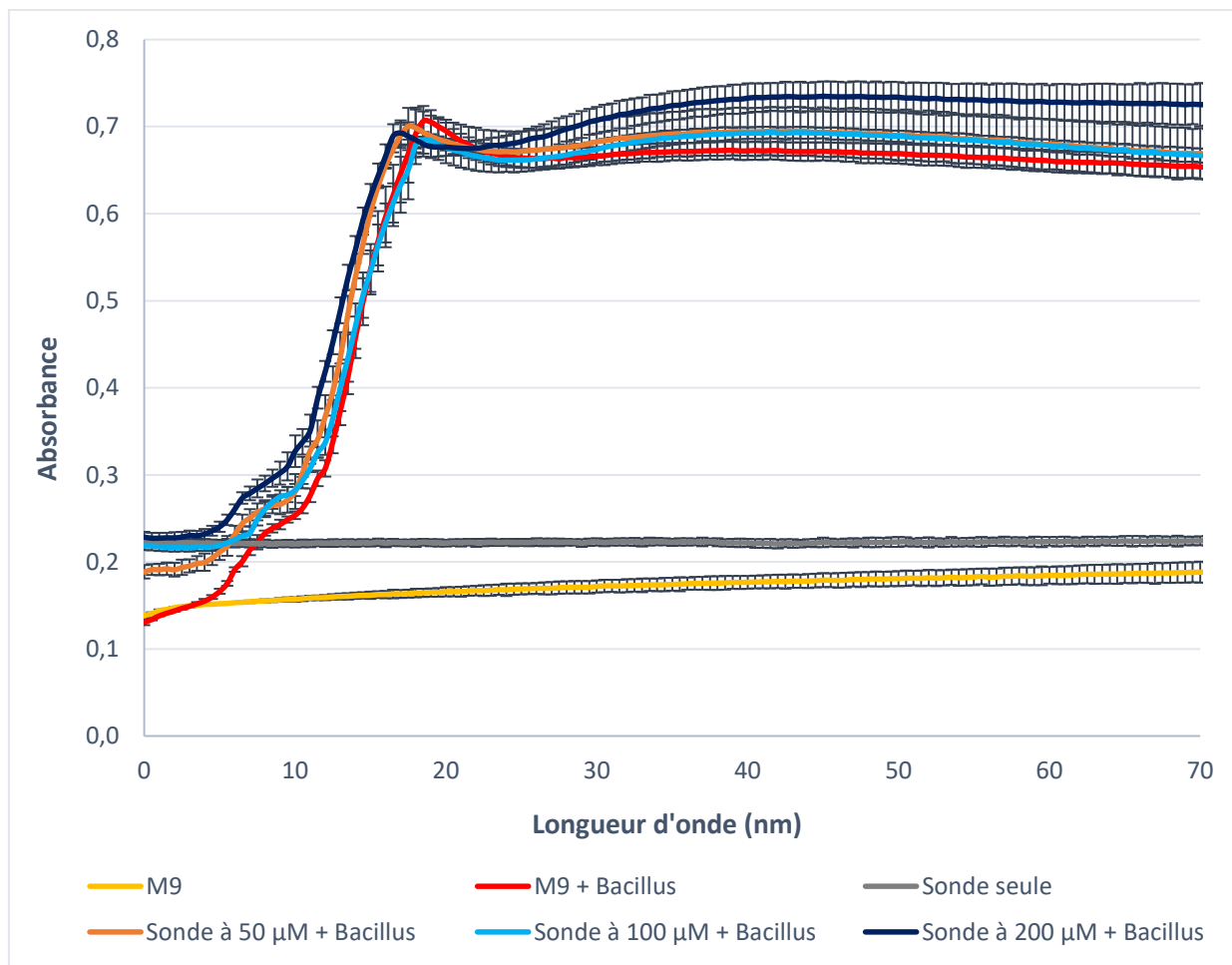


Figure 88 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) des bactéries *Bacillus* en présence de la sonde **62** à différentes concentrations (de 50 μM à 200 μM) pendant 70 heures.

La sonde **62** correspondant au fluorophore bleu sans polymère a également été testée avec les bactéries *Escherichia coli*. La croissance des bactéries en présence de cette sonde est disponible en Figure 89. Une nouvelle fois, aucune toxicité n'a pu être démontrée dans ces conditions, contrairement à la sonde verte **60** équivalente.

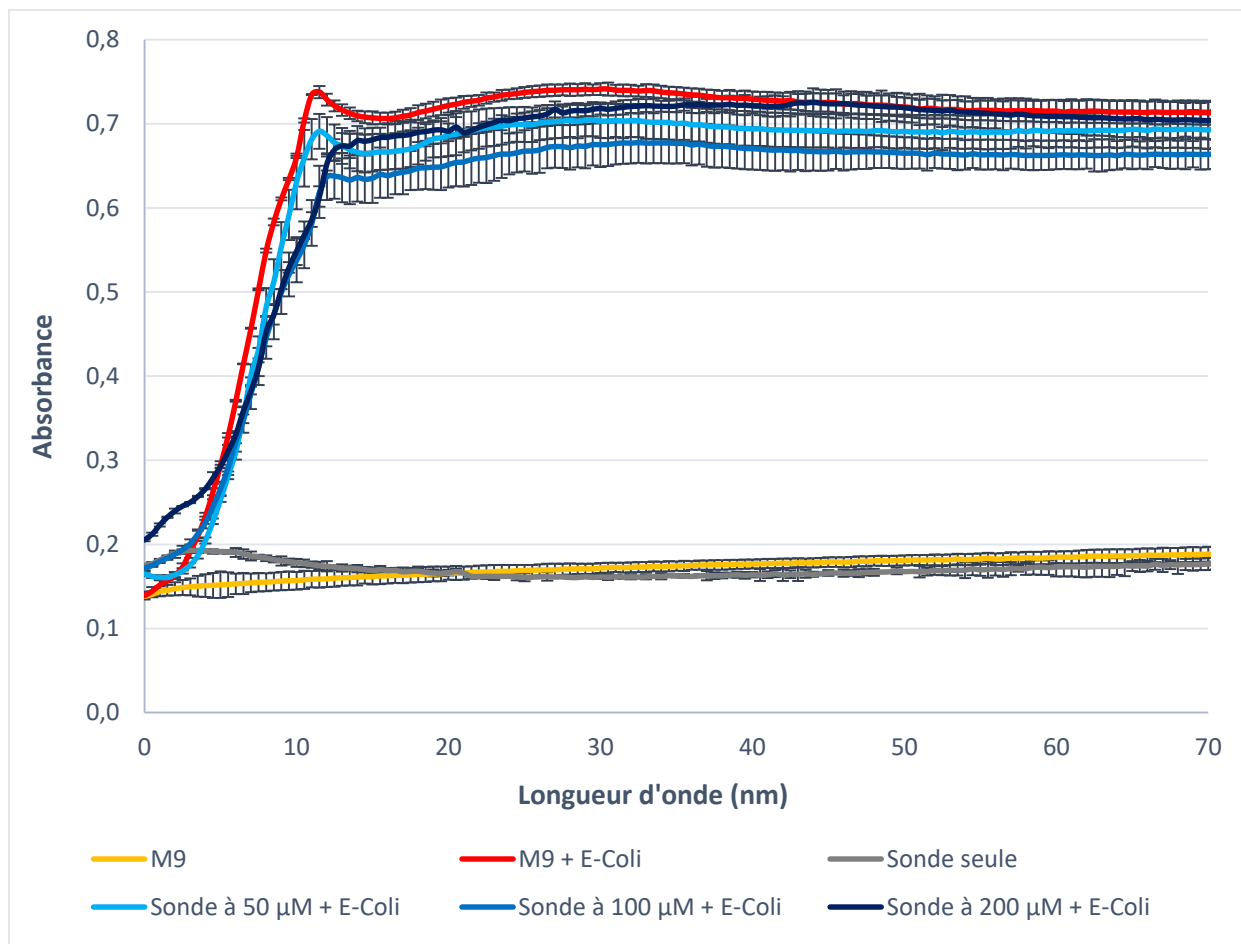


Figure 89 : Mesure de la densité optique (absorbance à 700 nm) des bactéries *Escherichia coli* en présence de la sonde **62** (sonde bleue non greffée au polymère) à différentes concentrations (de 50 μM à 200 μM) pendant 70 heures.

La fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) de la sonde amphiphile **63** en présence des bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus* a également été mesurée à des concentrations allant de 1 μM à 200 μM . Contrairement à la sonde **61**, aucune augmentation de fluorescence n'a pu être mesurée quelle que soit la condition testée. La sonde **63** ne semble pas marquer les membranes des bactéries, ce qui explique également pourquoi elle n'a montré aucune toxicité. On peut donc conclure que la chaîne butoxy ne rend pas le fluorophore assez hydrophobe pour cette activité et il serait intéressant pour la suite de synthétiser une sonde possédant une chaîne carbonée plus longue, par exemple de type octyl, afin de remédier à ce problème.

4.3 Étude des sondes amphiphiles en microscopie

Les études de microscopie ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Jean-Pierre Grill, le Dr. Luisa De Sordi et Garance Coquant au centre de recherche Saint-Antoine.

4.3.1 Essai de visualisation en microscopie optique

Des bactéries *Escherichia coli* (bactéries à Gram négatif) et des bactéries *Streptococcus Thermophilus* (bactéries à Gram positif) ont été observées par microscopie optique en présence des sondes **61** et **63**. Quelques minutes d'incubation ont été suffisantes pour procéder à l'expérience, les sondes amphiphiles marquant les cellules très rapidement. En présence de sonde **63**, les bactéries n'étaient quasiment pas distinguables du bruit de fond, ce qui confirme l'hypothèse que cette sonde n'est pas adaptée pour une utilisation en tant que sonde membrane.

Les images prises en microscopie optique après incubation des bactéries avec la sonde **61** sont données en Figure 90. La sonde permet une bonne visualisation des deux espèces de bactéries. On observe que les bactéries *Streptococcus Thermophilus* se regroupent sous forme de filaments.

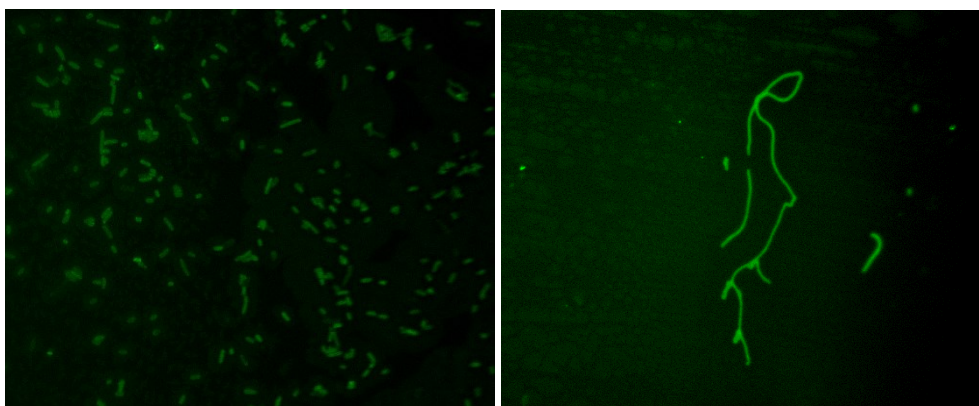
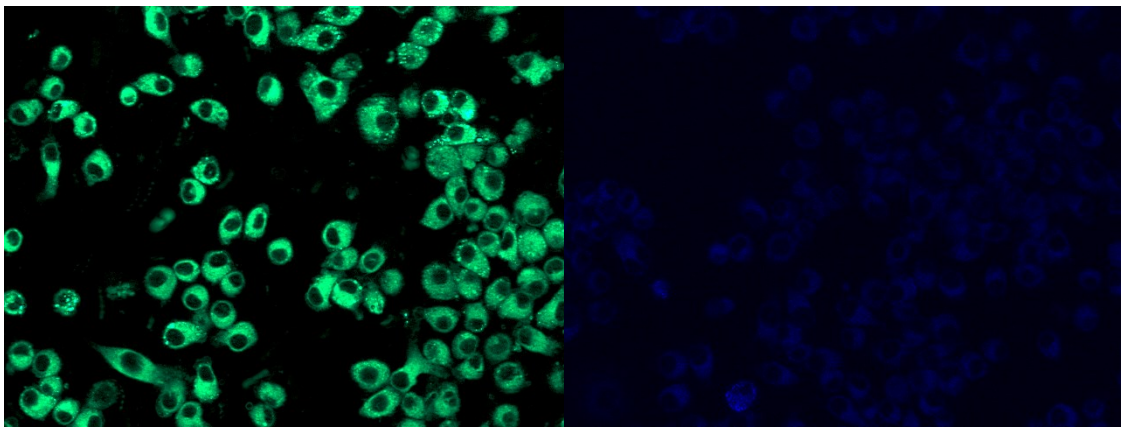


Figure 90 : Image des bactéries *Escherichia coli* (à gauche) et *Streptococcus Thermophilus* (à droite) incubées quelques minutes avec la sonde **61**, prise par microscopie optique.

Une lignée cellulaire de macrophages murins (RAW-267.7) a également été incubée en présence des sonde **61** et **63**, puis visualisée par microscopie optique (Figure 91). Les résultats sont similaires aux précédents : seuls la sonde **61** permet une bonne visualisation des cellules. De plus, cette sonde ne semble pas marquer uniquement la membrane externe des cellules, mais il est difficile avec cette seule expérience de connaître la localisation cellulaire précise de la sonde.

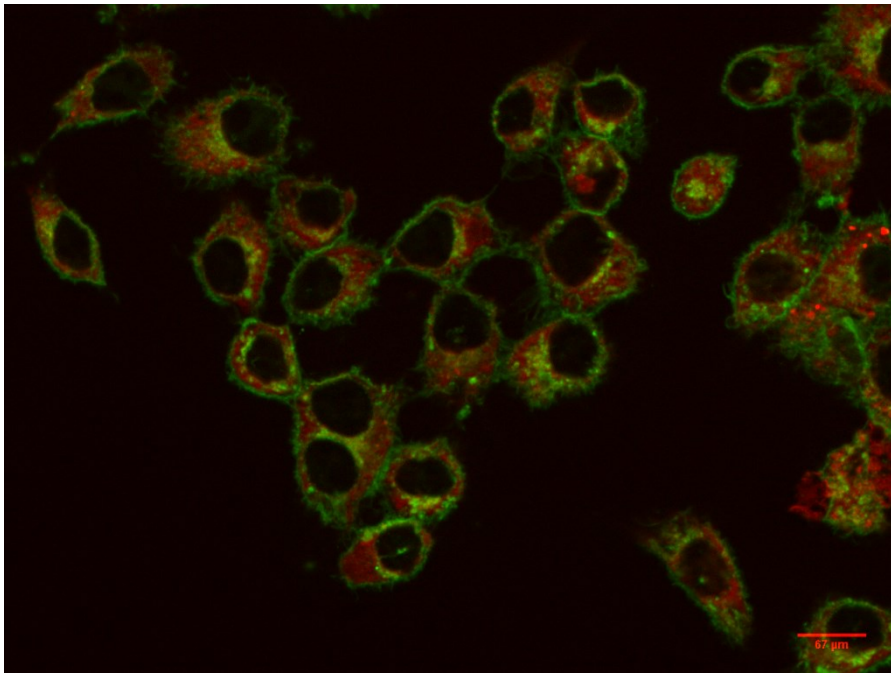


*Figure 91 : Image d'une lignée cellulaire de macrophages murins (RAW-264.7) incubée pendant 10 minutes avec la sonde **61** (à gauche) et la sonde **63** (à droite)*

4.3.2 Caractérisation de la localisation cellulaire des sondes amphiphiles

Afin de mieux comprendre la distribution cellulaire de la sonde **63**, une expérience de colocalisation en présence d'un marqueur membranaire usuel, la WGA, a été menée. La WGA est une lectine de blé couramment utilisée en biologie cellulaire qui permet de marquer spécifiquement la membrane plasmique et l'appareil de Golgi de cellules fixées ou vivantes. Elle se lie à des oligosaccharides de surface possédant à leur extrémité un N-acétylglucosamine ou un acide sialique¹⁵⁹. Cette lectine peut être marquée par de la fluorescéine ou de la tétraméthylrhodamine et est commercialement disponible¹⁶⁰. Dans cette étude, la WGA utilisée est marquée avec de la rhodamine pour la différencier de la sonde amphiphile **63** dont la fluorescence est dans le vert.

Le cliché disponible en Figure 92 a été obtenu après incubation de la sonde **63** pendant 10 minutes avec des cellules RAW-264.7 fixées. Une hétérogénéité de répartition est identifiable entre la sonde **63** et la WGA dans le compartiment cellulaire. Il est difficile d'établir un modèle de répartition de la sonde **63** qui n'est vraisemblablement pas adaptée à la microscopie sur cellules fixées. De nouveaux essais en microscopie confocale sur cellules vivantes devront être réalisés pour déterminer la localisation cellulaire précise des sondes amphiphiles.



*Figure 92 : Cellules RAW-264.7 observées par microscopie optique. Les cellules ont été fixées avec du PFA 4% puis perméabilisées avec du triton. Elles ont ensuite été incubées pendant 10 min à 37 °C en présence de sonde amphiphile **63** (10 µM) et de WGA (0,02 mg.mL⁻¹). La fluorescence de la sonde **63** est présentée en vert et celle de la lectine en rouge.*

Chapitre 6. Synthèse et activités électrochimiques et biologiques de sondes d'oxydation

I. Introduction

Ce chapitre est consacré à la description de la synthèse et de l'activité de sondes fluorogéniques capables de détecter l'oxydation d'un milieu. Le développement de ce type de sonde permet de mettre en évidence la présence de stress oxydant qui se traduit par un dérèglement de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) associé à une réponse cellulaire insuffisante qui conduit à l'apparition de nombreuses pathologies¹⁶¹. Les espèces réactives de l'oxygène sont difficiles à étudier du fait de leur courte durée de vie et du grand nombre d'antioxydants présents in vivo avec lesquels ils peuvent réagir et les sondes fluorescentes représentent un outil privilégié pour remédier à ce problème¹⁶².

L'une des difficultés majeures dans la recherche de nouvelles sonde d'oxydation est de développer des sondes agissant de manière spécifique sur les ERO¹⁶³. Les ERO sont une vaste famille de molécules comprenant les radicaux libres (radical superoxide $O_2^{\cdot-}$, radical hydroperoxyle HO_2^{\cdot} , radical hydroxyle HO^{\cdot} , radical peroxyde ROO^{\cdot} et radical alkoxyde RO^{\cdot}) et des molécules sans radicaux agissant comme agent d'oxydation ou qui se convertissent facilement en radicaux (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , oxygène singulet O_2 et acide hypochloreux $HOCl$)¹⁶⁴. Chaque espèce d'ERO joue un rôle spécifique au sein de la cellule et pouvoir étudier de manière spécifique leur mode d'action est un enjeu important.

Dans ce chapitre, la sonde étudiée sera développée à partir des structures des sondes préparées dans le chapitre 2 pour l'activité glycosidase. Le sucre sera remplacé par un para-aminophénol de manière à libérer le phénol par le mécanisme de O-déarylation décrit en Figure 93¹⁶³.

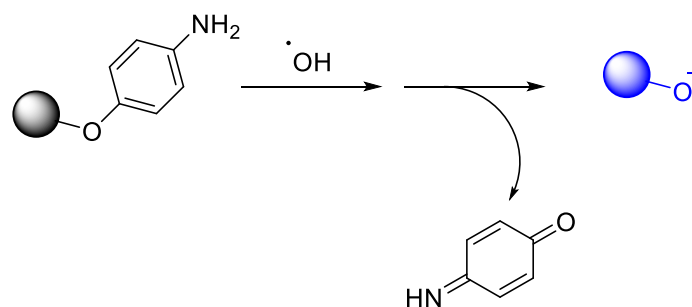


Figure 93 : Principe de la sonde d'oxydation

Plusieurs sondes de ce type sont décrites dans la littérature. La sonde la plus connue est la sonde APF (Figure 94), un dérivé non fluorescent de la fluorescéine. Celle-ci est libérée après la réaction de O-déarylation. Cette sonde est capable de révéler le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton. Elle réagit également en présence d'acide hypochloreux, mais n'est pas activée par les autres espèces réactives de l'oxygène. La sonde HPF dont le groupement amine a été remplacé par un alcool fonctionne sur le même principe, mais détecte uniquement le radical hydroxyl¹⁶².

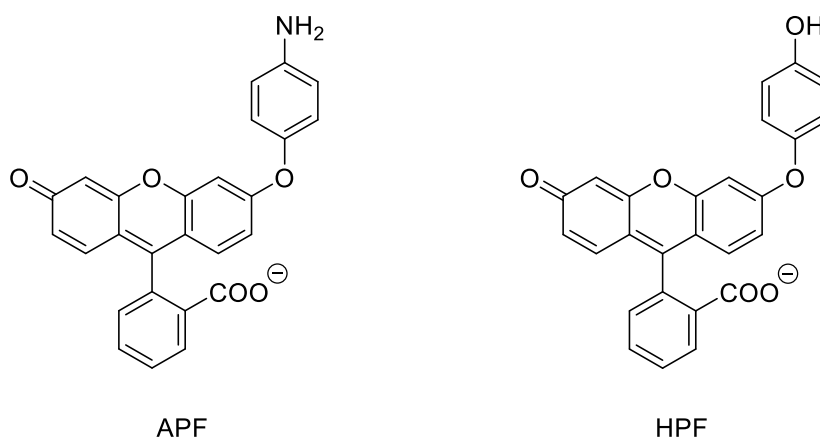


Figure 94 : Structures des sondes APF et HPF

II. Synthèse

2.1 Première stratégie de synthèse

La première stratégie de synthèse envisagée consiste à faire réagir le groupement phénol sur le 1-fluoro-4-nitrobenzène, puis à réduire le nitro en amine (Schéma 46).

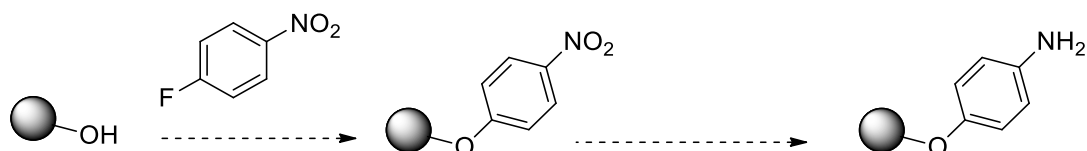


Schéma 46 : Première stratégie de synthèse

Plusieurs essais ont été réalisés à partir des sondes coumarine **7**, chlorocoumarine **8** et naphthalimide **6** possédant la fonction acide protégée en ester méthylique et sont regroupés dans le Tableau 8.

Sonde	Réactifs et conditions	Rendement	Observations
 8	DIEA, CH ₂ Cl ₂ TA, 20h ¹⁶⁵	0%	Sonde de départ
 8	K ₂ CO ₃ , DMF anhydre, 80°C, 20h ¹⁶⁶	0%	Produit d'ouverture de la coumarine et sonde de départ
 7	K ₂ CO ₃ , DMF anhydre, 120°C, 24h	6%	Bon produit (64) et produit d'ouverture de la coumarine

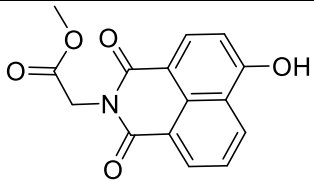
 6	Cs_2CO_3 , DMF anhydre, 90°C, 22h	8%	Bon produit (65) et produit d'ouverture du naphthalimide
---	---	----	--

Tableau 8 : Différents essais effectués pour la première stratégie de synthèse

Quelles que soient les conditions utilisées, les produits souhaités n'ont pas été formés ou ont été obtenus avec des rendements très faibles. Les conditions basiques nécessaires à cette réaction ne conviennent pas aux différentes sondes dont le cycle aromatique s'ouvre. Pour la coumarine, il a également été envisagé de faire réagir le 1-fluoro-4-nitrobenzène directement sur l'aldéhyde de départ et de ne former la coumarine que dans un second temps (Schéma 47).

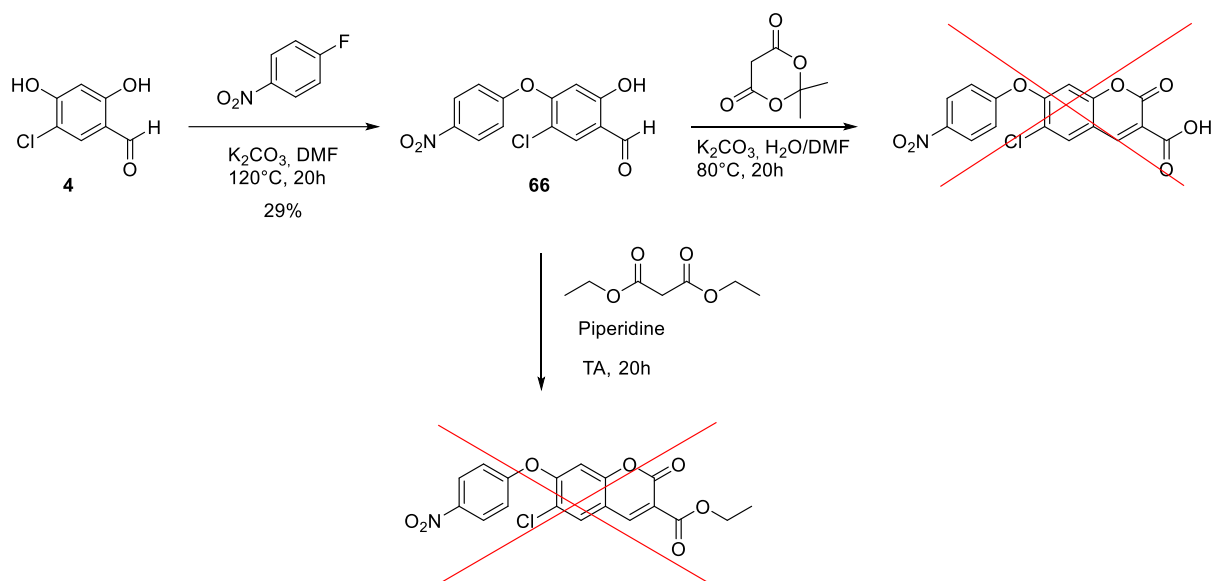


Schéma 47 : Première stratégie de synthèse à partir de l'aldéhyde 4

Le para-nitrobenzène a ainsi pu être couplé à l'aldéhyde avec un rendement assez faible, mais amélioré par rapport aux essais précédents (29%) et suffisant pour réaliser l'étape suivante¹⁶⁷. Malheureusement, la formation de la chlorocoumarine n'a pas fonctionné que ce soit en faisant réagir l'aldéhyde avec l'acide de Meldrum ou avec le malonate de

diéthyle¹⁰⁸. L'utilisation de coumarine ou de chlorocoumarine en tant que sonde d'oxydation a donc été abandonnée pour se concentrer sur la sonde naphthalimide.

La quantité formée de produit **65** a été suffisante pour faire des essais de réduction du nitro. Plusieurs essais ont été effectués et sont récapitulés dans le Tableau 9.

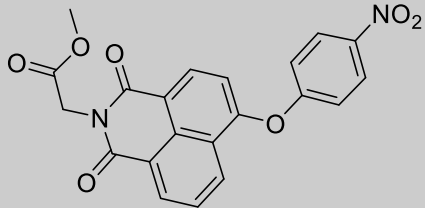
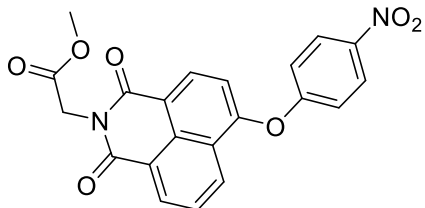
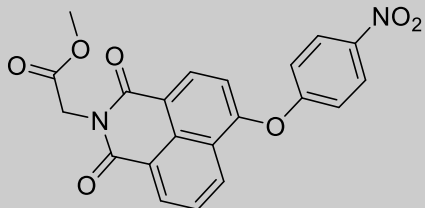
Sonde	Réactifs et conditions	Rendement	Observations
 <p>65</p>	Zn (2 eq), NH ₄ Cl (2 eq), EtOH/H ₂ O (1:1) TA, 3h ¹⁶⁸	0%	Sonde de départ
 <p>65</p>	H ₂ , Pd/C, EtOH, 3h	0%	Sonde de départ
 <p>65</p>	Zn, NH ₄ Cl (large excès), MeOH, TA, 3h	0%	Apparition du bon produit sur CCM, mais dégradation lors de la purification

Tableau 9 : Essai de réduction du groupement nitro en amine

Aucune des conditions utilisées n'a conduit à l'obtention du produit souhaité. La faible solubilité de la sonde **65** dans l'éthanol ne lui a pas permis de réagir dans les deux premières conditions. La troisième condition a semblé être meilleure, mais l'amine formée n'était pas assez stable pour l'étape de purification.

Une deuxième stratégie de synthèse permettant de s'affranchir de l'étape de réduction et de la purification du produit final a donc été testée.

2.2 Deuxième stratégie de synthèse

La deuxième stratégie de synthèse consiste à faire réagir directement le 4-amino-phénol dont la fonction amine aura été protégée par un groupement Boc sur le brome de la sonde naphthalimide **1** (Schéma 48).

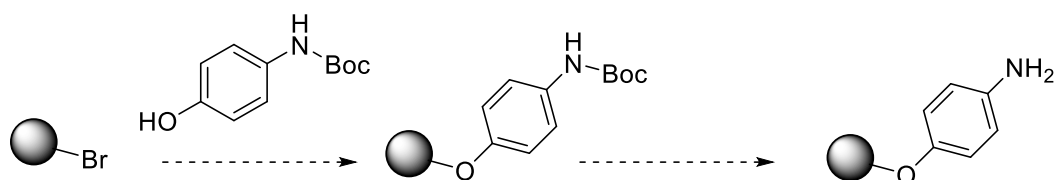


Schéma 48 : Deuxième stratégie de synthèse

La protection de l'amine du 4-amino-phénol a été réalisée sans difficulté et le produit **67** a été obtenu dans un rendement quantitatif (Schéma 49)¹⁶³.

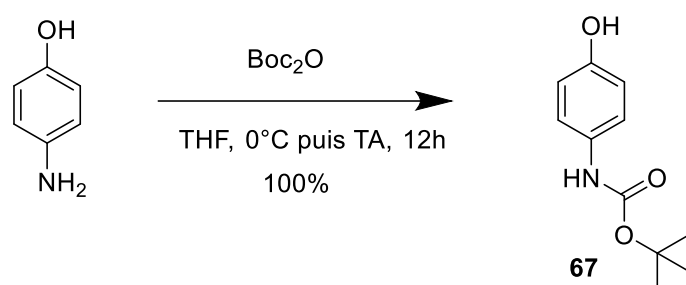


Schéma 49 : Protection du 4-amino-phénol par un groupement Boc

Les mêmes conditions que celles du chapitre 2 ont été utilisées pour substituer le brome par le phénol du composé **1**. La sonde **68** a ainsi été obtenue dans un rendement de 17% puis l'amine a été déprotégée en présence de TFA pour donner la sonde finale **69** (Schéma 50).

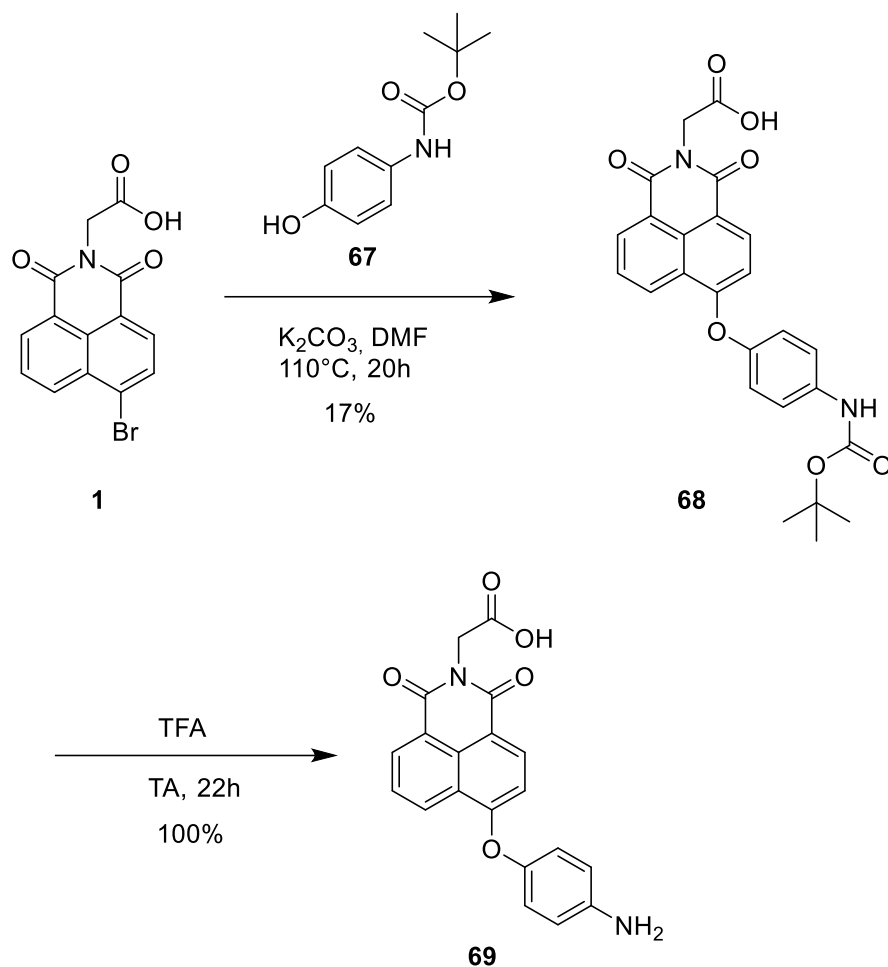


Schéma 50 : Voie de synthèse conduisant à la sonde finale souhaitée

La sonde finale **69** obtenue ne possède pas de polymère hydrosoluble, mais une fonction acide libre permettant d'augmenter sa solubilité dans l'eau. De plus, l'ajout de 1% de DMSO compatible aux milieux biologiques permettra de la solubiliser. Cette première version de sonde d'oxydation est donc suffisante pour réaliser les premières études électrochimiques et biologiques.

III. Étude électrochimique

Ce travail a été effectué en collaboration avec le Dr. Olivier Buriez (DR, CNRS), électrochimiste moléculaire au département de chimie de l'École Normale Supérieure de Paris dans l'équipe « *Physical and Biological Chemistry of Living Matter* » attachée au Laboratoire Pasteur.

3.1 Voltamétrie cyclique

3.1.1 Principe

La voltamétrie cyclique est une méthode électrochimique consistant à mesurer le courant émis par une réaction de réduction ou d'oxydation d'espèces électroactives sous l'effet d'une variation cyclique de potentiel qui a lieu à une électrode de travail¹⁶⁹. Le potentiel appliqué au système varie linéairement entre des bornes prédéfinies et la réponse faradique est mesurée à l'aide d'un potentiostat. Dès qu'une des bornes est atteinte, le sens de balayage de potentiel est inversé et la même fenêtre de potentiel est balayée dans l'autre sens à la même vitesse de balayage. Quand le potentiel de l'électrode de travail devient suffisamment oxydant (dans le cas d'une espèce oxydable), le courant (anodique) croît au fur et à mesure du balayage traduisant une consommation du substrat au voisinage de l'électrode. Puis, le courant atteint un pic et diminue par la suite. Ce maximum de courant est dû à l'épuisement de l'espèce électroactive à la surface de l'électrode qui diffuse, de la solution vers l'électrode. Après le pic, le courant est donc contrôlé par la vitesse de diffusion de l'espèce, de la solution vers la surface de l'électrode et décroît en $1/t^{1/2}$. Si l'espèce électrogénérée est stable chimiquement, celle-ci peut alors être retransformée en sa forme initiale au fur et à mesure que le potentiel revient vers sa valeur initiale (balayage retour). Si cette courbe intensité-potentiel retour a la même allure que la courbe aller on dira que le voltamogramme est totalement réversible. Lorsque l'espèce créée n'est pas suffisamment stable dans la gamme de temps étudiée, la courbe retour n'existe pas ; on parle alors de voltamogramme irréversible.

Un montage classique de voltamétrie cyclique se base sur un système à trois électrodes qui sont immergées dans l'électrolyte étudié (Figure 95)¹⁷⁰. L'électrode de travail (fil

métallique sertis dans une gaine de verre dégageant la section droite du fil pour la mise en contact avec la solution) est le siège des réactions électrochimiques qui vont avoir lieu en fonction du potentiel qui lui est appliqué. Une seconde électrode (appelée contre-électrode ou électrode auxiliaire) permet de fermer le circuit électrique. En général, la réaction se déroulant à la contre électrode (oxydation/réduction du solvant/électrolyte support) ne perturbe pas celle ayant lieu à l'électrode de travail. Afin de s'affranchir de cette possibilité (notamment lors d'électrolyses préparatives), l'électrode auxiliaire peut être isolée de l'électrode de travail à l'aide d'un verre fritté. Une telle isolation évite que des sous-produits générés au niveau de l'électrode auxiliaire ne « contaminent » la solution principale. Enfin une électrode de référence permet d'imposer un potentiel précisément défini à l'électrode de travail à l'aide d'un potentiostat.

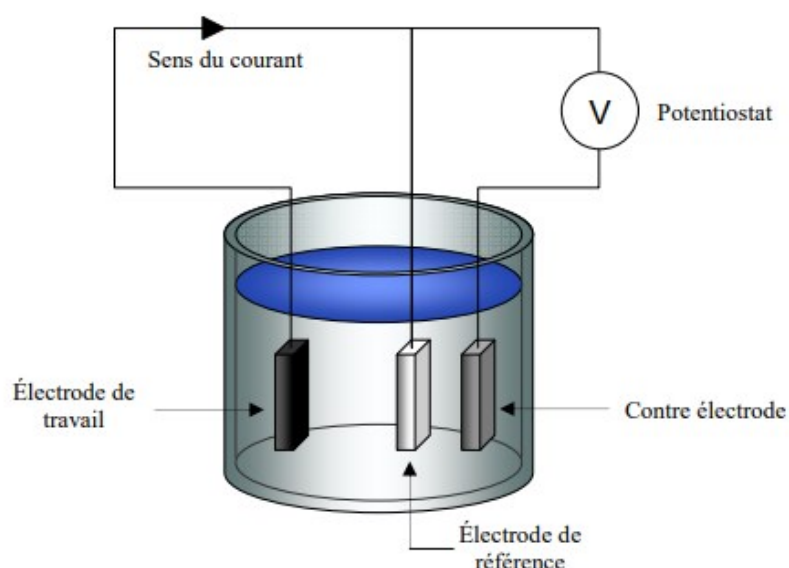


Figure 95 : Schéma d'un montage à trois électrodes. Le sens du courant dépend du type de réaction : oxydation ou réduction.

3.1.2 Expérience

Les études réalisées par voltamétrie cyclique ont été effectués dans l'acétonitrile anhydre auquel a été ajouté 0.1 M de tétrabutylammonium tétrafluoroborate (TBA.BF₄) qui joue le rôle d'électrolyte support qui permet d'augmenter la conductivité du milieu. Le montage (Figure 96) est composé des trois électrodes : l'électrode de travail (fil de platine de 0,5 mm de diamètre), l'électrode de référence (calomel saturé en chlorure de potassium) et

la contre électrode (grille d'or). Les expériences ont été réalisées sous atmosphère inerte (argon) afin d'éviter toute réaction possible entre l'oxygène de l'air et les espèces électrogénérées.

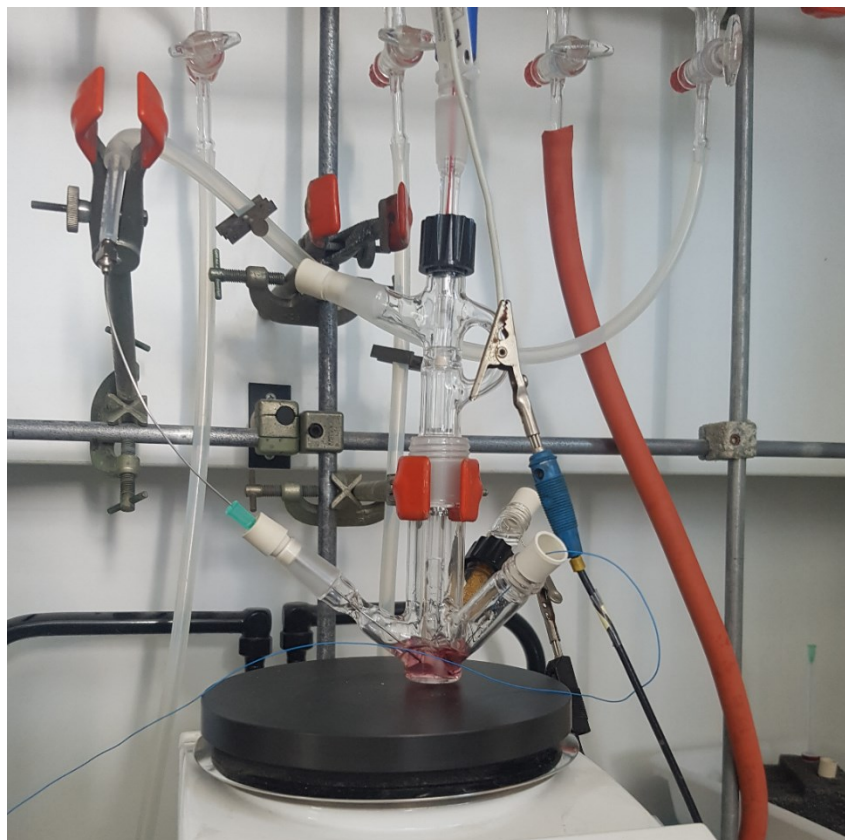


Figure 96 : Photographie du montage de voltamétrie cyclique

La sonde **69** a été solubilisée à une concentration de 2 mM dans l'acétonitrile et la mesure de son potentiel d'oxydation a été réalisée dans un premier temps en milieu anhydre, puis après l'ajout de 200 μL d' H_2O dans une gamme de potentiel de $-0,05$ à $1,1$ V, à une vitesse de balayage de 100 mV/s (Figure 97).

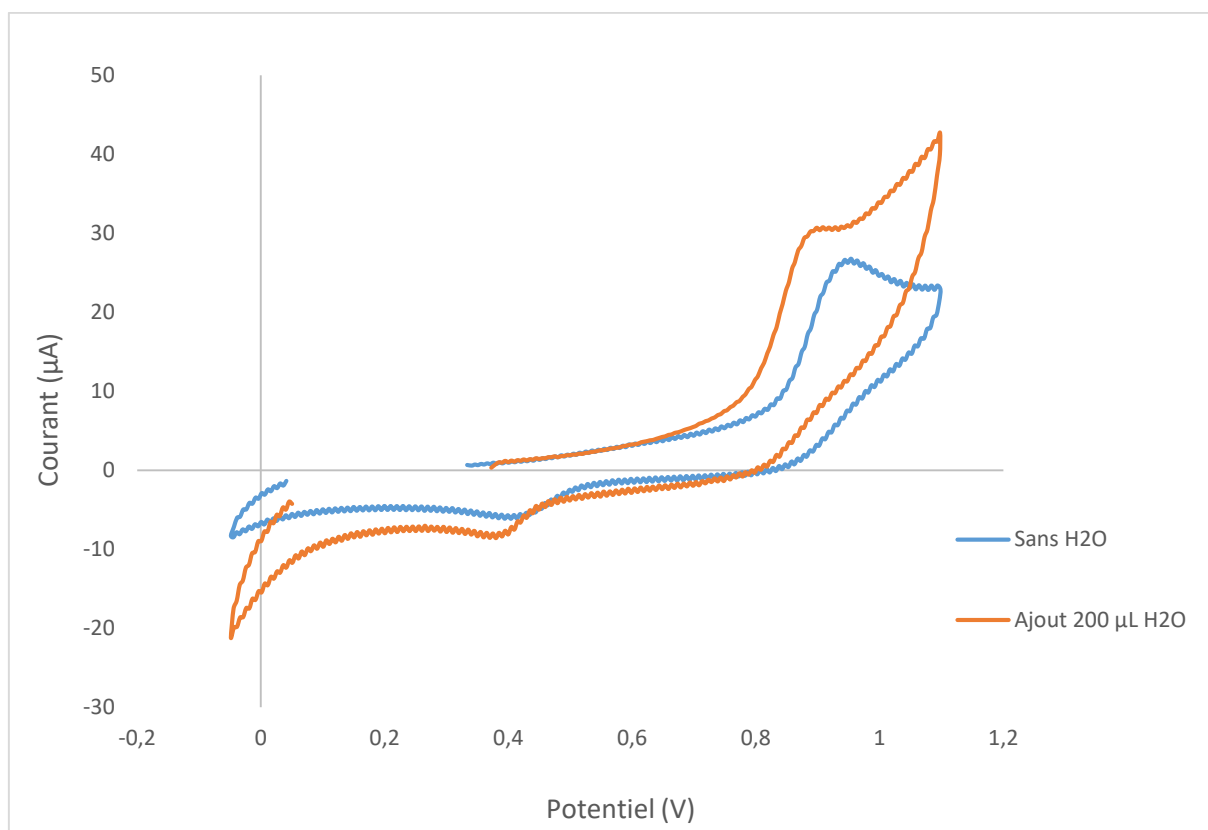


Figure 97 : Voltammogramme de la sonde 69 en absence d'eau (courbe bleu) et après ajout de 200 μL d'eau (courbe orange) de -0,05 à 1,1 V à 100 mV/s

D'après l'étude du voltammogramme réalisée en milieu anhydre (courbe bleue), la sonde s'oxyde à $\pm 0,96$ V/ECS. Après l'ajout de 200 μL d'eau correspondant à 5% du volume total de la solution (courbe orange), le potentiel d'oxydation de la sonde est décalé de 40 mV vers des potentiels moins positifs (à $\pm 0,92$ V/ECS), ce qui montre que la présence d'eau facilite la réaction d'oxydation de la sonde. D'autres essais ont montré que l'ajout d'une plus grande quantité d'eau n'influence pas davantage la valeur du potentiel d'oxydation. De plus, dans les deux cas, la vague d'oxydation obtenue est irréversible indiquant la présence d'une étape chimique après l'étape d'oxydation de la sonde. Par ailleurs, sur le balayage retour, on peut observer une petite vague qui pourrait correspondre à la réduction d'une espèce issue de cette réaction chimique.

3.2 Électrolyse à potentiel imposé

3.2.1 Principe

La détermination du potentiel d'oxydation de la sonde nous a permis de réaliser ensuite une électrolyse préparative en choisissant le potentiel d'action le plus adapté. Contrairement à la voltamétrie cyclique qui est une technique analytique ne modifiant pas la solution de départ, l'objectif d'une électrolyse préparative est d'oxyder (ou de réduire) toute l'espèce de départ afin d'analyser le(s) produit(s) générés. Pour ce faire, une électrode de travail de très grande surface est utilisée.

3.2.2 Expérience

L'électrolyse de la sonde **69** a été réalisée dans des conditions similaires à celles de la voltamétrie cyclique. L'électrode de travail composée d'un fil de platine micrométrique en voltamétrie cyclique a été remplacée par une électrode composée de deux grilles de platine centimétriques. La sonde a été dissoute à une concentration de 2 mM dans une solution d'acétonitrile contenant 5 % d'eau et 0.1 M de TBA.BF₄. Un potentiel de 1,1 V a été imposé pendant deux heures trente à température ambiante, ce qui a permis de passer 238 mC et de convertir 24 % de la sonde de départ. Un changement de couleur quasiment instantané a été observé dès le début de l'électrolyse, la solution passant d'une couleur jaune à une couleur rose/rouge de plus en plus foncé (Figure 98).

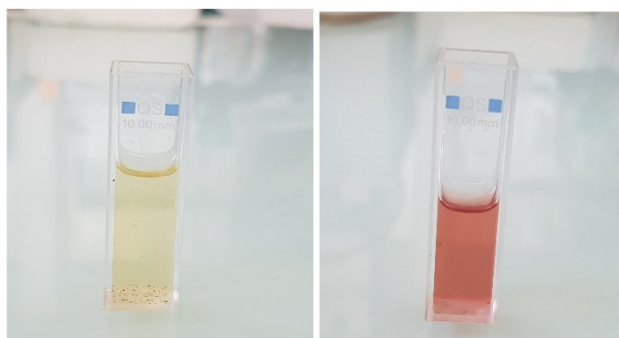


Figure 98 : Changement de couleur du milieu - À gauche : coloration jaune avant électrolyse - À droite : coloration rouge après l'électrolyse

Après l'électrolyse, un voltamogramme a été réalisé dans la même gamme de potentiel que précédemment (-0,05 à 1,1 V) à une vitesse de balayage de 100 mV/s (Figure 99) afin d'analyser la solution. La vague correspondant au potentiel d'oxydation de la sonde (à 0,92 V) a disparu ou se confond avec le bruit de fond, ce qui montre que l'électrolyse a été efficace et qu'une grande partie de la sonde a bien été consommée.

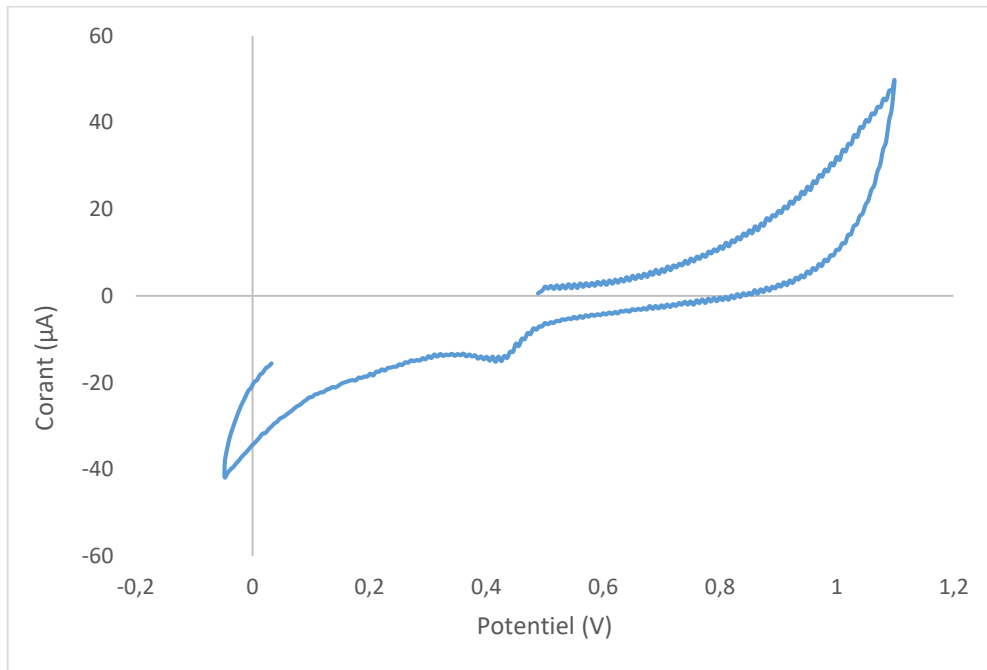


Figure 99 : Voltamogramme après l'électrolyse de la sonde 69 de -0.05 à 1.1 V à 100 mV/s

Une étude en fluorescence de la sonde avant et après électrolyse a été réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm (Figure 100).

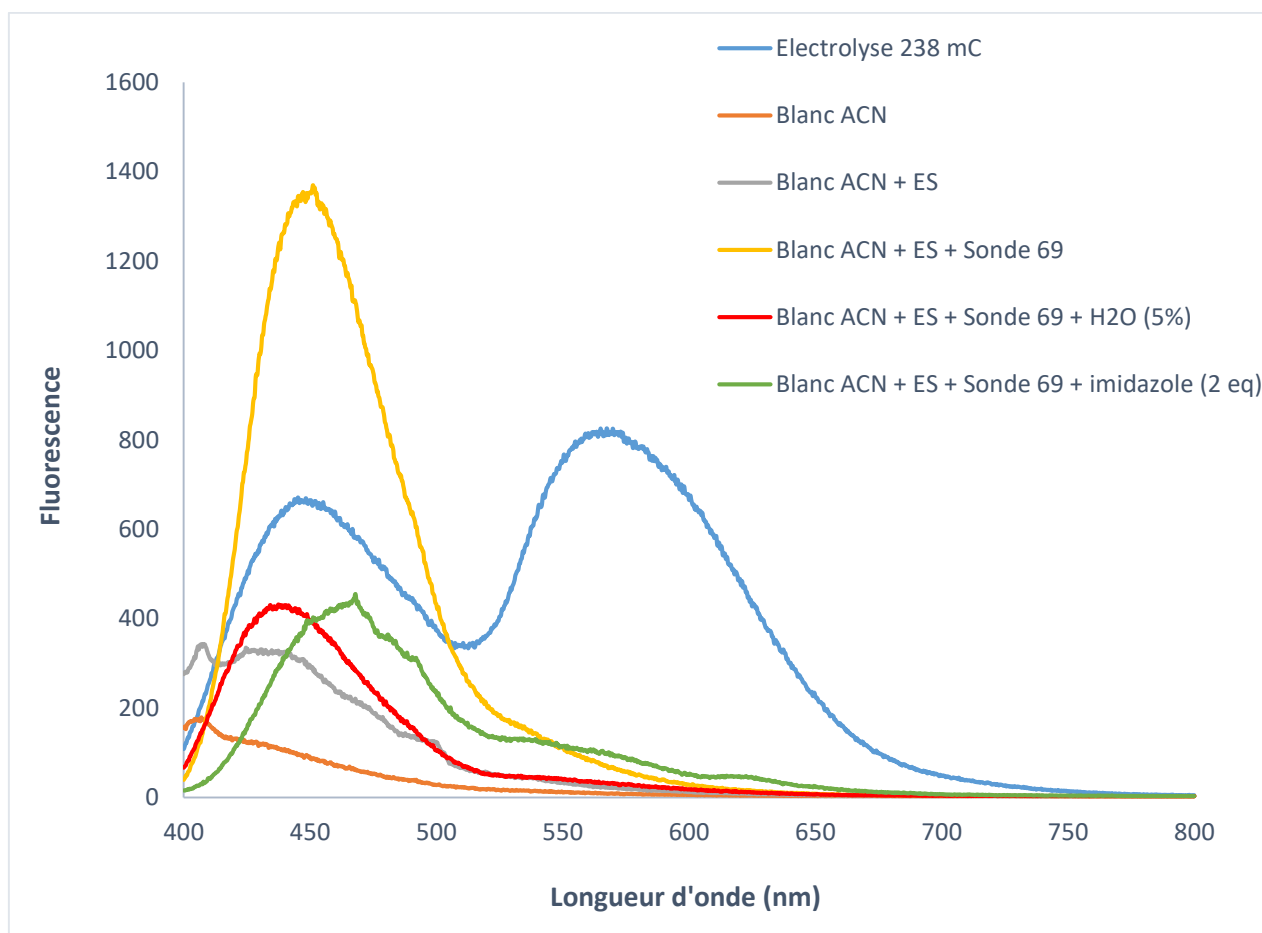


Figure 100 : Courbes de fluorescence ($\lambda_{exc}=360\text{ nm}$) avant et après électrolyse de la sonde 69

Plusieurs mesures de blancs ont été réalisées : mesure de l'acétonitrile anhydre seul (courbe orange) ; mesure de l'acétonitrile anhydre contenant l'électrolyte support (courbe grise) ; mesure de l'acétonitrile anhydre contenant l'électrolyte support et la sonde (courbe jaune). Cette dernière courbe met en évidence une forte émission de la sonde à 450 nm ce qui correspond à la fluorescence de la sonde lorsque la fonction amine est sous sa forme protonnée NH_3^+ . C'est la forme effectivement observée puisque la sonde est sous forme de sel de TFA. L'ajout de 5% d'eau montre une forte diminution de la fluorescence à 450 nm (courbe rouge). L'eau agit ainsi en tant que base et permet à l'amine de repasser sous sa forme neutre, ce qui a pour effet de quencher la fluorescence. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus en voltamétrie cyclique et plus particulièrement le fait que 5% d'eau suffisent à faciliter la réaction d'oxydation puisque l'amine doit être sous sa forme neutre pour pouvoir être oxydé. Le même phénomène est observable lors de l'ajout d'une autre base telle que l'imidazole (courbe verte).

L'étude des courbes avant électrolyse montre également une absence de fluorescence de la sonde à 560 nm. Cette fluorescence apparaît après l'électrolyse (courbe bleue) et correspond à la fluorescence du phénol sous sa forme acide (Figure 108).

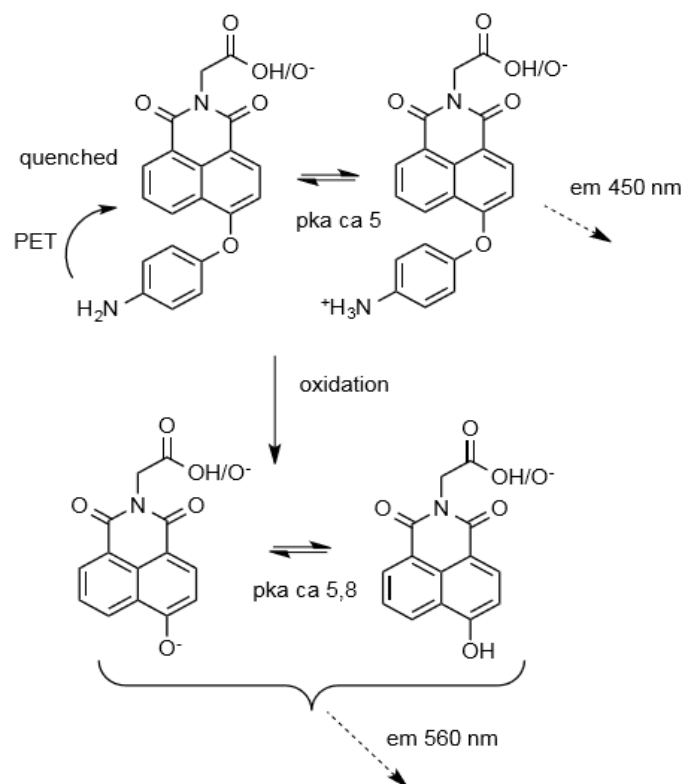


Figure 101 : Différentes formes de la sonde 69 avant et après l'électrolyse

IV. Activité biologique

La sonde **69** a été testée en présence de bactéries *Escherichia coli*. Les bactéries ont été cultivées dans un milieu M9 lactose. La sonde a d'abord été solubilisée dans le DMSO puis diluée à 10 μ M dans le milieu M9 lactose (concentration finale en DMSO inférieure à 1 %).

La fluorescence des bactéries seules et en présence de sondes est donnée en Figure 102. La courbe de fluorescence de la sonde **69** en présence de bactéries est superposable à la courbe d'autofluorescence des bactéries, ce qui montre qu'aucune activité influant sur l'oxydation du milieu n'a pu être détectée. Ces résultats ne sont pas surprenants étant

donné que les bactéries *Escherichia coli* ne sont pas connues pour libérer d'espèces réactives de l'oxygène dans le milieu extracellulaire.

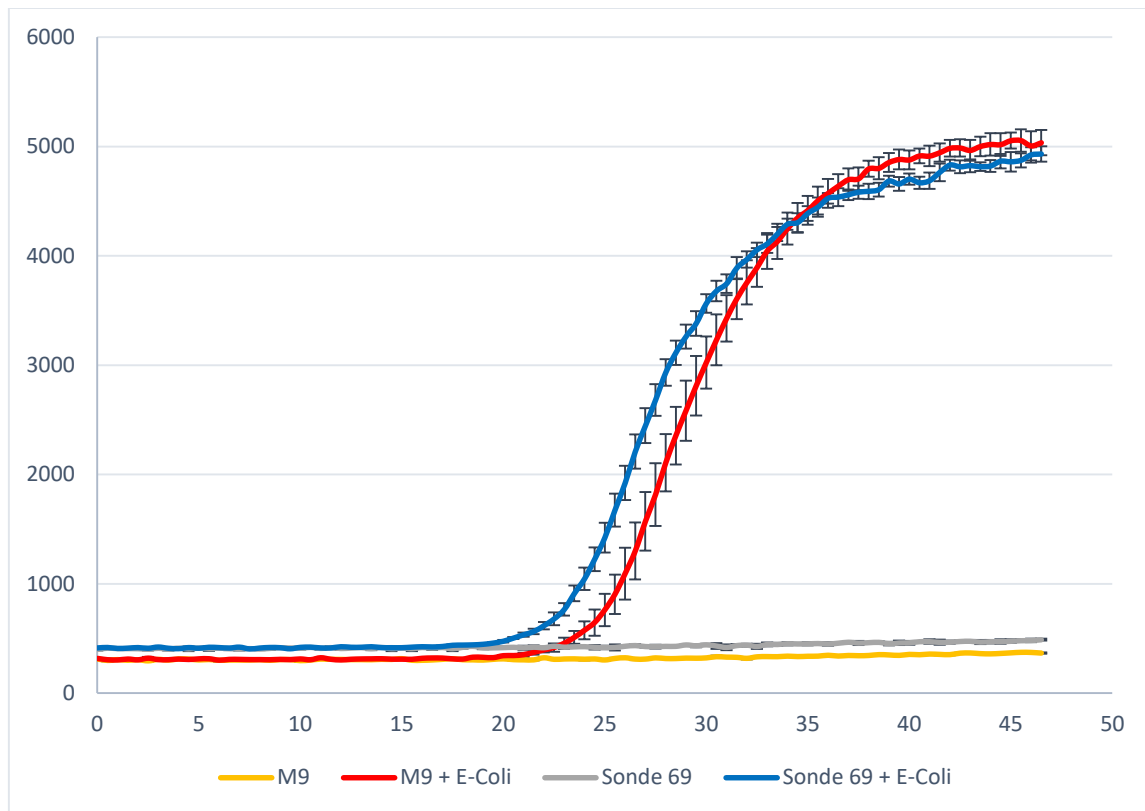


Figure 102 : Suivi de fluorescence ($\lambda_{exc}= 446 \text{ nm}$; $\lambda_{em}=560 \text{ nm}$) des bactéries seules et des bactéries en présence de sonde 69 dans un milieu M9 lactose pendant 45 heures.

Seul ce premier essai préliminaire a pu être mené avec la sonde **69**. Pour continuer ce projet, il serait intéressant de la tester la sonde avec des bactéries soumises à un stress oxydatif ou sur des cellules de type cellules cancéreuses ou macrophages.

Une autre perspective de ce projet serait d'améliorer la structure de la sonde en lui intégrant un polymère de type PEG, pour rester dans la continuité des différentes sondes synthétisées dans ce travail de thèse. La toxicité de la sonde sur les bactéries à haute concentration n'a pas été étudiée et elle n'est donc pas à exclure. De plus, l'introduction d'un polymère permettrait de résoudre des problèmes de solubilité de la sonde et de s'affranchir de l'utilisation de DMSO.

Conclusion générale et perspectives

La fluorescence est un outil privilégié pour l'étude de l'hétérogénéité des bactéries. Grâce à sa grande sensibilité, cette technique permet de cibler toutes sortes d'activités et de sites cellulaires⁴⁸ et d'étudier les caractères taxonomiques⁴⁹ ou physiologiques des bactéries.

I. Développement de nouvelles sondes fluorogéniques pour le suivi de l'activité glycosidase

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé de nouvelles sondes fluorogéniques permettant d'étudier la physiologie des bactéries et plus particulièrement leurs activités enzymatiques extracellulaires. Le design de ces sondes a été choisi de manière à les rendre compatible à une approche millifluidique, un dispositif qui permet l'étude de la diversité phénotypique au sein d'une population de microorganismes. Les sondes sélectionnées dans ce projet sont des sondes ratiométriques dont la fluorescence dépend de la protonation d'un groupement phénol. Elles possèdent donc deux formes, une forme acide et une forme basique qui se traduisent par deux longueurs d'onde d'excitation distinctes, mais une même fluorescence. Le phénol est d'abord lié à un groupement spécifique clivable par les enzymes bactériennes. Le clivage de ce groupement entraîne la libération de la fluorescence correspondant à la forme basique de la sonde. Afin de limiter la toxicité de la sonde et de ses produits de dégradation, un polymère hydrosoluble et non métabolisable de type PEG ou PVA a été greffé au fluorophore. L'activité β -galactosidase caractéristique des bactéries *Escherichia coli* a été choisie comme modèle d'étude pour ce travail et le groupement clivable choisi a donc été un galactose. Un deuxième sucre a également été choisi pour mener un contrôle négatif : le mannose.

La première partie de la thèse a consisté en la synthèse des différentes sondes. Deux voies de synthèse ont été étudiées reposant sur la méthode de greffage du polymère. Finalement une stratégie de chimie click a été retenue et cinq sondes ont été synthétisées représentant différentes couleurs du spectre d'émission : le bleu pour la coumarine et la chlorocoumarine, le vert pour le naphthalimide et le rouge pour la cyanine et la

chlorocyanine. L'étude des propriétés physico-chimiques et la détermination du pKa des sondes a mis en évidence le fait que seules les sondes naphthalimide et chlorocoumarine sont adaptées à l'étude de l'activité galactosidase. Les autres sondes, exceptée la sonde cyanine dont le pKa trop élevé n'était pas compatible avec le pH du milieu microbiologique, sont utilisables comme sondes pH. Néanmoins, les sondes cyanines et chlorocyanine présentent une fluorescence très faible notamment en milieu basique et ne sont donc pas adaptées à une utilisation en tant que sondes fluorogéniques. Elles pourraient cependant convenir pour le développement de tests colorimétriques.

La deuxième partie du projet réalisée à l'ESPCI en collaboration avec le Dr Jean Baudry s'est focalisée sur l'étude de l'activité galactosidase des bactéries *Escherichia coli* grâce aux sondes synthétisées précédemment. Des essais préliminaires en plaque 96 puits ont été effectués afin de trouver les conditions optimales pour l'étude en milieu liquide.

La question du milieu de culture des bactéries a été la première à être posée. Pour activer la production de l'enzyme β -galactosidase, la nécessité de favoriser l'expression de l'opéron lactose a rapidement été mise en évidence. Le milieu choisi a donc été un milieu minimum de type M9 contenant 10 mM de lactose. Comme prévu, les sondes pH ont montré une diminution du pH proportionnelle à la quantité de sucre présente dans le milieu. Cependant, nous n'avions pas anticipé le fait que cette diminution du pH puisse troubler le signal de fluorescence des sondes galactosidases. En effet, la présence dans le milieu d'une faible quantité de sonde possédant leur fonction phénol libre a entraîné une diminution du signal de fluorescence compensée par la suite par la détection de l'activité galactosidase des bactéries. Ces résultats montrent que les sondes développées répondent bien au but recherché, le suivi de l'activité enzymatique des bactéries, mais ils étaient difficilement compréhensibles et présentables du fait de cette diminution de fluorescence. La modification de la concentration en lactose du milieu a permis de résoudre ce problème en contrôlant la diminution de pH, mais aussi d'apporter d'autres informations.

En effet, en comparant les courbes de croissance des bactéries mesurée grâce à l'absorbance à 700 nm et les courbes de fluorescence, un décalage systématique était observable entre le début de la croissance des bactéries et le début de l'augmentation de fluorescence des sondes. La fluorescence des sondes ne semble ainsi être libérée que lorsque les bactéries arrivent à leur phase stationnaire de croissance. Ces résultats laissent supposer que le lactose du milieu est préférentiellement digéré par les bactéries et qu'elles ne clivent le galactose des sondes que lorsque la quantité en lactose devient limitée. Ces suppositions sont renforcées par le fait que lorsqu'on augmente la quantité de lactose de manière à ce que celui-ci ne soit plus un facteur limitant de la croissance bactérienne, aucune augmentation de la fluorescence n'est observée. Ces expériences ont permis d'optimiser la concentration de sondes à utiliser ainsi que la composition du milieu.

L'intérêt de la présence du polymère lié de manière covalente aux sondes fluorescente n'a pas pu être démontré en se basant sur les études de toxicité. En effet, aucun signe de toxicité pour les bactéries *Escherichia coli* n'a été détecté avec les différentes sondes glycosidases à des concentrations allant jusqu'à 200µM. La question du devenir des sondes non greffées au polymère après clivage du sucre par les enzymes demeure donc. Une diminution de l'intensité de fluorescence, uniquement dans le cas des sondes non liées au polymère, a été identifiée après filtration des bactéries ayant été incubées pendant 40 heures dans le milieu en présence des sondes. Cela prouve l'efficacité du polymère pour maintenir en solution le produit de la sonde après clivage. Sans le polymère, le produit du clivage a été retenu sur le filtre soit parce qu'il a précipité, soit parce qu'il a pu pénétrer à l'intérieur de bactéries et ait été éliminé en même temps qu'elles. Des recherches plus poussées devront être menées pour mieux comprendre l'action des sondes non greffées au polymère après clivage du sucre. En effet, même si aucune toxicité n'a pu être détectée, il est possible qu'elle soit en réalité masquée par différents paramètres.

Dans ce travail, nous avons choisi de greffer les sondes sur deux types de polymère : un PEG de masse molaire 1 000 et un PVA de masse molaire 10 000. Si les résultats ont été concluants avec le premier, cela n'a pas été le cas avec le deuxième. Assez peu

d'investigations ont été menées pour comprendre l'origine du problème. Dû à la méthode de synthèse, le de nombreux sites propargyliques libres sont présents sur le polymère et il pourrait être intéressant de les masquer par réaction de chimie click avec un réactif de type 3-azidopropanol.

Les tests en plaque 96 puits ont montré l'efficacité des deux sondes fluorogéniques testées pour suivre l'activité galactosidase des bactéries. La sonde naphthalimide a donc pu être testées en milieu millifluidique. La sonde chlorocoumarine n'a pas été testée, car l'appareil ne possédait pas les filtres de fluorescence nécessaire. La croissance et le suivi de l'activité galactosidase ont été mesurés dans 160 gouttes d'eau dans l'huile fluorée et ont montré des résultats similaires à ceux obtenus précédemment. Ce travail de thèse a donc bien permis de développer de nouvelles sondes fluorescentes compatibles avec le milieu millifluidique pour suivre l'activité glycosidase des bactéries. Cependant, même si la sonde naphthalimide présente de bons premiers résultats, son rendement quantique reste très faible et il pourrait être intéressant de développer une sonde qui fluoresce dans le vert présentant une plus grande intensité de fluorescence. Il serait par exemple possible de modifier la structure de la chlorocoumarine de manière à ce qu'elle émette dans le vert.

Pour continuer ce projet, de nouveaux essais en milieu millifluidique devront être réalisés pour suivre l'activité galactosidase, mais également l'activité pH. Des essais sur d'autres types de bactéries sécrétant l'enzyme β -galactosidase pourront être effectués. Un exemple de suivi de l'activité d'une bactérie de type Gram positif tel que *Streptococcus Thermophilus* serait intéressant. Afin de ne pas être limité par le choix du milieu de culture, il serait envisageable d'ajouter de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), un composé qui permet d'activer l'opéron lactose dans n'importe quel type de milieu. Pour aller plus loin dans le projet, il serait également intéressant de l'étendre à d'autres activités glycosidases. Des sondes mannosidases ont été synthétisées et ont servi uniquement en tant que témoin négatif dans cette thèse, mais pourraient être employées pour le suivi de l'activité mannosidase. La partie correspondant au sucre pourrait également être modifiée afin de cibler d'autres activités enzymatiques.

II. Développement de sondes fluorogéniques amphiphiles pour le marquage des membranes

La sonde naphthalimide développée précédemment a été reprise et légèrement modifiée afin de pouvoir être utilisée pour d'autres applications. Le sucre a ainsi été remplacé par un groupement de type pipéridine ou butoxy qui permettent à la fin d'apporter de l'hydrophobicité au fluorophore et de contrôler sa longueur d'onde d'émission. De cette manière, à partir nous avons pu synthétiser une sonde émettant dans le bleu et une autre émettant dans le vert. Le fluorophore a également été greffé au polymère de type PEG afin de lui conférer un caractère amphiphile. Ce type de sonde a été développé afin de marquer la membrane cellulaire, ce qui permet de suivre la croissance des bactéries en fluorescence et de faire de la microscopie sur cellules vivantes. En effet, ces sondes sont très peu fluorescentes en milieu aqueux et deviennent fortement fluorescentes dans les milieux lipidiques.

L'incubation de la sonde amphiphile verte à 100 et 200 μM en présence de bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus* a montré une toxicité uniquement pour les bactéries *Bacillus* qui sont à Gram positif. Cette toxicité s'explique par la différence de paroi cellulaire entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Néanmoins, cette toxicité apparaît à haute concentration, et il est possible d'employer la sonde à faible concentration pour des essais de microscopie. Le fluorophore vert non greffé au polymère a quant à lui montré une forte toxicité pour les deux types de bactéries, ce qui montre l'intérêt du polymère pour cette application et sa capacité à maintenir la sonde dans le milieu extracellulaire. Le but de cette application n'étant que de marquer la membrane externe des bactéries.

Les essais de fluorescence ont montré un gain de fluorescence entre l'autofluorescence des bactéries et le signal de la sonde verte en présence de bactéries *Escherichia coli*, ce qui montre l'efficacité de la sonde pour cette application. Cependant, ces résultats n'ont pas été obtenus avec la sonde bleue qui ne semble pas marquer la membrane bactérienne. Contrairement à la sonde verte, elle n'entraîne aucune toxicité pour les deux espèces de bactéries avec ou sans polymère, ce qui montre qu'elle ne semble avoir aucune interaction avec les bactéries.

Les essais de microscopie ont confirmé cette hypothèse puisque les bactéries ne se démarquent pas du bruit de fond lorsqu'elles sont incubées avec la sonde bleue. La sonde verte permet bien quant à elle la visualisation des bactéries en microscopie. La microscopie de cellules de macrophages murins (RAW-264.7) a également présenté de bons résultats. La question qui reste en suspens est de savoir de manière précise quels sites cellulaires sont marqués par la sonde. Une expérience de colocalisation avec la WGA a été menée, mais n'a pas permis d'élucider ce point. De nouveaux essais en microscopie confocale devront être menés pour établir un modèle de répartition de la sonde.

Dans cette partie, nous avons donc développé deux sondes à partir de la sonde naphthalimide, une sonde dont la fluorescence est dans le vert et qui présente de bons résultats et une sonde dont la fluorescence est dans le bleu qui ne semble malheureusement pas assez hydrophobe pour cette activité. Cette sonde pourrait être modifiée en lui intégrant une chaîne carbonée plus longue, de type octyl. Dans la continuité de ces essais, il serait également intéressant de développer une sonde qui fluorescence dans le rouge. La Figure 103 donne une proposition de structure d'une sonde rouge développée à partir du fluorophore naphthalimide lié à un groupement de type méthoxynaphtalène¹⁷¹.

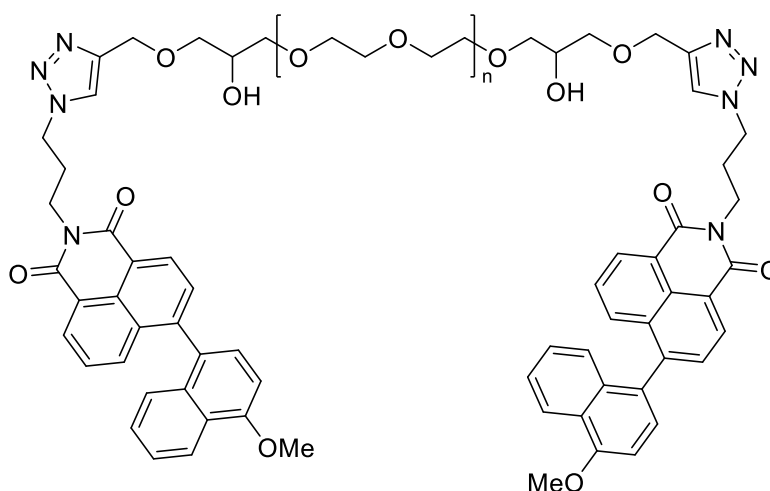


Figure 103 : Proposition de sonde amphiphile rouge

III. Développement de sondes d'oxydation

Une troisième application a été étudiée à partir des sondes développées précédemment : des sondes capables de détecter l'oxydation d'un milieu extracellulaire. Pour cela, le sucre a été remplacé par un groupement para-aminophénol qui réagit en présence d'oxydation par un mécanisme de O-déarylation entraînant le phénol et donc la fluorescence de la sonde. Ce type de sonde est utilisée pour détecter la présence d'espèces réactives de l'oxygène et plus particulièrement le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton.

Des essais de synthèse à partir de coumarine et de naphthalimide ont été, mais seule la sonde naphthalimide a pu être utilisée pour une première génération de sonde d'oxydation. L'activité électrochimique de cette sonde a été étudiée par voltamétrie cyclique et nous avons ainsi pu évaluer que la sonde s'oxyde à $\pm 0,96$ V/ECS. De plus cette étude a montré que la libération du phénol est facilitée en présence d'eau. En effet, l'étude de fluorescence de la sonde a mis en évidence le fait la fonction amine du para-aminophénol est initialement sous sa forme protonnée NH_3^+ . L'ajout de 5% d'eau agissant en tant que base permet à l'amine de repasser sous sa forme neutre, forme qui réagira en présence d'ERO. Après électrolyse de la sonde, on observe bien l'apparition de fluorescence à 560 nm, ce qui montre l'efficacité de cette sonde.

Elle n'a malheureusement pas encore pu être testée en milieu biologique. La suite de ce projet consisterait donc à la tester en présence de bactéries ou de cellules produisant des ERO de type radical hydroxyle. La structure de la sonde pourrait également être améliorée. En effet, celle-ci n'est que peu soluble en milieu aqueux et sa toxicité n'a pas été étudiée. L'ajout d'un polymère de type PEG à l'image des sondes développées précédemment pourrait donc ici aussi être une possibilité intéressante.

Experimental part

General methods

All solvents and chemicals were purchased from Sigma Aldrich and TCI and used without further purification. Air or water sensitive reactions were performed under a dry atmosphere of argon. Deionized water was obtained from a Aquatron A400 Water Purification system. Column chromatography was performed using silica gel Armen Spot 2 with 0.040–0.063 μm . TLC analysis were performed on Silica Gel 60 F₂₅₄ (E. Merck) and were revealed under UV lamp at 254 nm and/or with colored indicator. Steric exclusion chromatography was performed using ÄKTA start system with SEPHADEX G-15 or SEPHADEX G-25 column. Micro-waves reaction was performed using Anton Paar Monowave 50.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AM 250, AM 400 instruments, operating at a ¹H frequency of 300 MHz. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) using solvent residual signals as the reference and coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). High Resolution Mass Spectra (HRMS) were recorded at the Institut Parisien de Chimie Moléculaire (FR 2769) of Sorbonne Université (electrospray source). MALDI-TOF spectra were recorded at the Institut de Biologie Paris-Seine (Paris, France) using the Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer instrument. Optical rotations were measured with a Jasco P-2000 Polarimeter. FT-IR spectra were recorded at room temperature using a Perkin-Elmer spectrometer in the wavenumber range of 400-4000 cm^{-1} . Surface tension was determined with a Krüss DSA30 drop shape analyzer.

Luminescence measurements

Absorption and emission spectra were measured under atmospheric conditions using commercial instruments. Absorption spectra were taken using an Agilent Cary 300 UV-Vis spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were obtained using a Jasco FP-8300 Spectrofluorometer.

Molar attenuation coefficients (ϵ) were calculated according Beer-Lambert law. For pH probes, stock solutions were prepared at 1 mM in Britton-Robinson buffer at desired pH (pH=2.5 for acid form and pH=10 for basic form) containing 1% MeOH as co-solvent. For amphiphilic probes, stock solutions were prepared at 1 mM in MeOH and for fluorinated probes stock solutions were prepared at 1 mM in HFE. Absorbance spectra were measured for 1-50 μ M concentration range

Quantum Yields (Φ) of the dyes were determined relative to the reference dyes Fluorescein and Quinine sulfate which have a fluorescence quantum yield of $\Phi=0.79$ and $\Phi=0.54$ respectively employing established procedures¹⁷². For pH probes, Quantum Yields was measured in Britton-Robinson buffer at desired pH (pH=2.5 for acid form and pH=10 for basic form). For amphiphilic probes Quantum Yields was measured in MeOH.

Electrochemistry

Cyclic voltammetry measurements were obtained on a Metrohm AUTOLAB potentiostat (PGSTAT302N).

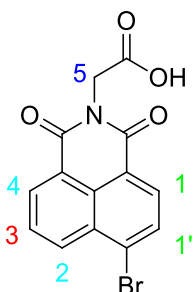
Electrolysis of probe **69** was performed as follow: The electrochemical apparatus contained two platinum railings working electrode, a gold wire counter electrode, and a saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode (0.241 V + SCE = normal hydrogen electrode). After each electrode had been polished and conditioned, probe 69 in 10 mL of ACN and 200 μ L of water (2 mM) containing TBA.BF₄ (0.1 M) was chemically adsorbed on the platinum surface for 2 h 30. Cyclic voltammetry was collected at room temperature.

Imaging

Fluorescent images of bacteria and cells were recorded with a Zeiss Axio Imager 2 microscope using a Zeiss 100x objective.

Synthetic protocols and characterizations

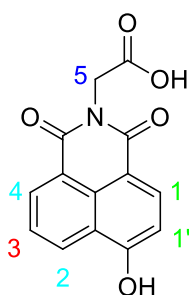
4-bromo-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (1) [CAS 53497-33-9]



4-bromo-1,8-naphthalic anhydride (7 g, 25.6 mmol, 1 eq) was put with glycine (2.8 g, 38.1 mmol, 1.5 eq) in 63 mL of DMF and 32 mL of acetic acid at 115°C during 3 hours. The hot reaction mixture was allowed to cool slowly, followed by adding water to precipitate the crude. The product was filtered and dried on vacuum to give a weak yellow powder (8.5 g, 100% yield) used without further purification.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.58 (dd, $J = 7.3, 5.2$ Hz, 2H, H4 and H1), 8.42 – 8.19 (m, 2H, H2 and H3), 8.05 – 7.98 (m, 1H, H1'), 4.70 (s, 2H, H5).

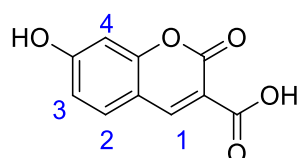
4-hydroxy-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (2) [CAS 42359-50-2]



To a solution of 4-bromo-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (5 g, 15.0 mmol, 1eq) in 85 mL of H_2O was added NaOH (4.2 g, 105.1 mmol, 7 eq). The mixture was stirred at reflux during 12 hours. Then, the mixture was acidified until pH=1 with HCl 1M to precipitate the crude. The product was filtered and dried on vacuum to give an orange powder (3.2 g, 79% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.00 (s, 1H, COOH), 12.05 (s, 1H, OH), 8.60 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H, H4), 8.57 – 8.46 (m, 1H, H1), 8.40 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H2), 7.87 – 7.73 (m, 1H, H3), 7.28 – 7.18 (m, 1H, H1'), 4.71 (s, 2H, H5).

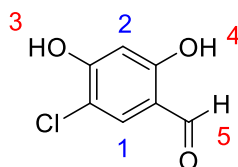
7-hydroxycoumarin 3-carboxylic acid (3) [CAS 779-27-1]



An oven-dried flask was charged with 2,4-dihydroxybenzaldehyde (3 g, 21.72 mmol, 1 eq), Meldrum's acid (3.13 g, 21.72 mmol, 1 eq), distilled water (120 mL) and K_2CO_3 (600 mg, 4.34 mmol, 0.2 eq). The whole mixture was stirred vigorously at room temperature for 20 hours to complete the conversion. Upon completion, the resulting solution was acidified with HCl 1M, when solid mass precipitated out, filtered off, and thoroughly washed with water to obtain pure product of 7-hydroxycoumarin 3-carboxylic acid (4.22 g, 94% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.66 (s, 1H, H1), 7.73 (d, J =8.6 Hz, 1H, H2), 6.83 (d, J =8.5 Hz, 1H, H3), 6.73 (s, 1H, H4).

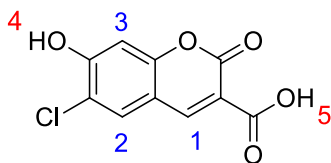
5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldehyde (4) [CAS 131088-02-3]



To a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (7 g, 50.68 mmol, 1 eq) in chloroform (225 mL) was added N-chlorosuccinimide (6.8 mg, 50.68 mmol, 1 eq) and the resulting mixture was stirred 1 hour at 60°C. HCl conc (910 μL) was added carefully and stirring was continued 20 hours. The mixture was washed with H_2O and brine. The organic layers were collected, dried over MgSO_4 and concentrated. The beige powder obtained (8 g, 92% yield) was used without further purification.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.39 (s, 1H, H3), 10.87 (s, 1H, H4), 9.98 (s, 1H, H5), 7.60 (s, 1H, H1), 6.59 (s, 1H, H2).

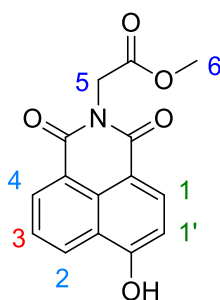
4-chloro-coumarine-3-carboxylic acid (5) [CAS 183736-74-5]



An oven-dried flask was charged with 2,4-dihydroxybenzaldehyde (1.1 g, 6.25 mmol, 1 eq), Meldrum's acid (900 mg, 6.25 mmol, 1 eq), distilled water (120 mL) and K_2CO_3 (170 mg, 1.25 mmol, 0.2 eq). The whole mixture was stirred vigorously at room temperature for 15 hours to complete the conversion. Upon completion, the resulting solution was acidified with chilled acid-water, when solid mass precipitated out, filtered off, and thoroughly washed with water to obtain pure product of 4-chloro-coumarine-3-carboxylic acid (1.4 g, 92% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.04 (s, 1H, H5), 11.88 (s, 1H, H4), 8.66 (s, 1H, H1), 8.01 (s, 1H, H2), 6.91 (s, 1H, H3).

methyl 2-(6-hydroxy-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate (6)
[CAS 42359-51-3]

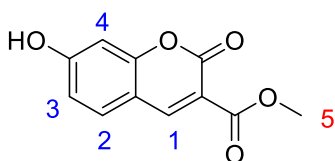


To a solution of 4-hydroxy-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (1g, 3.69 mmol, 1 eq) in 20 mL of MeOH was added dropwise at 0°C SOCl_2 (400 μL , 5.53 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred at room temperature during 24 hours. The product was concentrated in vacuo and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated solution of NaHCO_3 aq and with saturated solution of NaCl aq. The organic layers were collected,

dried over MgSO_4 and concentrated. The crude was purified with cyclohexane/acetone (7:3) as eluent to give an orange powder (425 mg, 40% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.06 (s, 1H, -OH), 8.78-8.21 (m, 3H, H1 and H4), 7.82 (dd, $J=8.2, 7.4$ Hz, 1H, H3), 7.20 (d, $J= 8.2$ Hz, 1H, H1'), 4.82 (s, 2H, H5), 3.70 (s, 3H, H6).

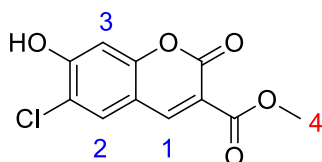
methyl 7-hydroxy-2-oxo-chromene-3-carboxylate (7) [CAS 86788-49-0]



To a solution of 7-hydroxycoumarine 3-carboxylic acid (206 mg, 1 mmol, 1 eq) in 5 mL of MeOH was added dropwise at 0°C SOCl_2 (110 μL , 1.5 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred at room temperature during 24 hours. The product was concentrated in vacuo and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated solution of NaHCO_3 aq and with saturated solution of NaCl aq. The organic layers were collected, dried over MgSO_4 and concentrated. The crude was a beige powder (160 mg, 72% yield) used for the next step without further purification.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.11 (s, 1H, OH), 8.71 (s, 1H, H1), 7.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H2), 6.85 (dd, $J = 8.6$, 1H, H3), 6.73 (s, 1H, H4), 3.80 (s, 3H, H5).

methyl 6-chloro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (8) [CAS 1142173-46-3]



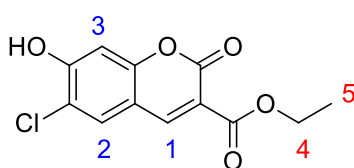
To a solution of 4-chloro-coumarine-3-carboxylic acid (1.37 g, 5.7 mmol, 1 eq) in 20 mL of MeOH was added dropwise at 0°C SOCl_2 (500 μL , 6.9 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred at room temperature during 24 hours. The product was concentrated in vacuo and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated solution of NaHCO_3 aq and with saturated solution of NaCl aq. The organic layers were collected,

dried over MgSO_4 and concentrated. The crude was a beige powder (2.3 g, 100% yield) used for the next step without further purification.

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.24 (s, 1H, H1), 7.51 (s, 1H, H2), 5.88 (s, 1H, H3), 3.68 (s, 3H, H4).

2H-1-Benzopyran-3-carboxylic acid, 6-chloro-7-hydroxy-2-oxo-, ethyl ester (9)

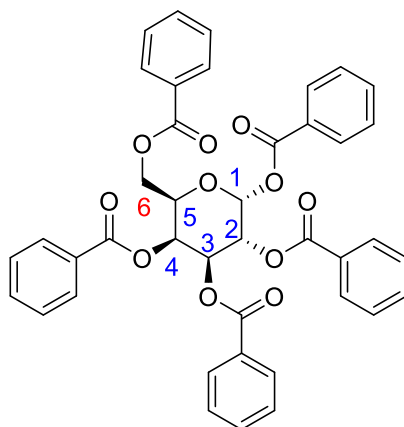
[CAS 155139-43-8]



To the round bottom flask, 2, 4-dihydroxybenzaldehyde (1.0 g, 5.8 mmol), diethylmalonate (1.6 g, 11.6 mmol) and catalytic quantity of pipyridine were added, then reaction mixture was stirred for 2 hours. The reaction mixture was poured into ice cold dilute hydrochloric acid, pale yellow coloured precipitate was filtered, washed with water and dried under vacuum gives ethyl 7- hydroxy coumarin-3-carboxylate (810 mg, 52% yield)

^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 9.62 (s, 1H, H1), 7.50 (s, 1H, H2), 6.34 (s, 1H, H3), 4.09 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H4), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H5).

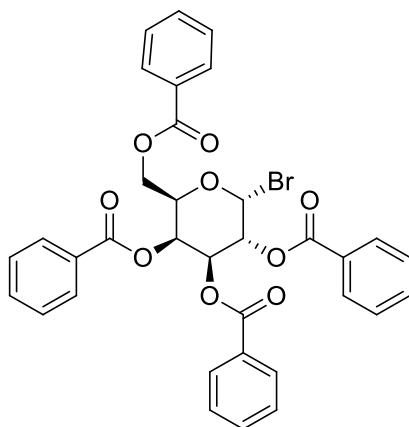
1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl- α -D-galactopyranose (10) [CAS 41545-55-5]



To a solution of D-galactose (10 g, 56 mmol, 1 eq) in Pyridine (130 mL) was added dropwise at 0°C benzoyl chloride (40 mL, 340 mmol, 6 eq). The mixture was stirred at room temperature during 2 hours. Then 20 mL of H₂O was added. After stirring another 30 minutes, the mixture was put on 500 mL of ice water. Dichloromethane was added and the solution was extracted. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude was recrystallized on ethanol to get the desired compound as a white powder (29.5 g, 75% yield).

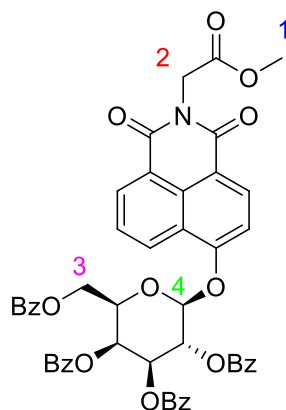
¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.15 – 7.15 (m, 25H, H ar.), 6.99 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1), 6.27 – 6.02 (m, 3H, H2, H3, H4), 4.88 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H6), 4.67 (dd, J = 11.3, 6.4 Hz, 1H, H6), 4.46 (dd, J = 11.3, 7.0 Hz, 1H, H5).

α -D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (11) [CAS 61198-88-7]



1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl-D-galactopyranose (3 g, 4.29 mmol, 1 eq) was dissolved in 20 mL of dichloromethane. A solution of 33% hydrobromic acid in glacial acetic acid (12 mL) was added at 0°C. The mixture was stirred 1 hour at 0°C and 1 hour at room temperature. The solvent was evaporated in vacuum and dichloromethane was added (100 mL). The mixture was neutralized with aqueous solution of NaHCO₃ sat. and the organic layer was washed with water (50 mL x3), aqueous solution of NaHCO₃ sat. (30 mL x3) and brine (30 mL x2). The organic layers were collected, dried and concentrated to give white powder used without purification for the next steps (3.1 g, 96% yield). NMR data are in agreement with the literature¹⁷³.

(2S,3R,4R,5S,6S)-2-((benzyloxy)methyl)-6-((2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl tetrabenzoate (12)

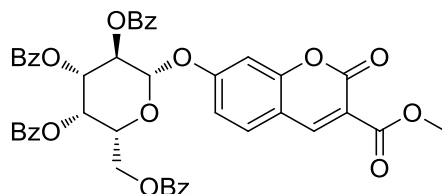


To a solution of methyl 2-(6-hydroxy-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate (430 mg, 0.88 mmol, 1 eq) in 15 mL of acetonitrile was added potassium carbonate (121 mg, 0.96 mmol, 1 eq) and α -D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (635 mg, 0.96 mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred at 70°C overnight. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography using a solution of cyclohexane/ethyl acetate (4:1 to 6:4) as eluent to give yellow powder (350 mg, 45% yield)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.18 – 7.27 (m, 25H, CH ar.), 6.33 (d, (d, J = 6.7 Hz, 1H, H4), 6.09 (s, 1H, CH galactose), 5.26 – 4.53 (m, 5H, CH galactose and H3), 3.69 (s, 2H, H2), 1.40 (s, 3H, H1).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 168.62 -157.84 (C=O, C ar.), 133.73-128.62 (C ar., CH ar.), 126.69 (CH ar.), 123.71 (C ar.), 121.83 (C ar.), 116.81 (C ar.), 109.58 (CH ar.), 99.50 (CH ar.), 72.56 (CH gal.), 71.14 (CH gal.), 69.40 (CH gal.), 67.88 (CH gal.), 62.32 (C3), 52.48 (CH gal.), 41.18 (C2), 26.92 (C1). ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₄₉H₃₇NO₁₄Na: 886.2106, found: 886.2119. $[\alpha]_D^{25} = 78$ (c 2, CHCl₃).

2H-1-Benzopyran-3-carboxylic acid, 7-((2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactopyranosyl)oxy)-2-oxo-, methyl ester (13)

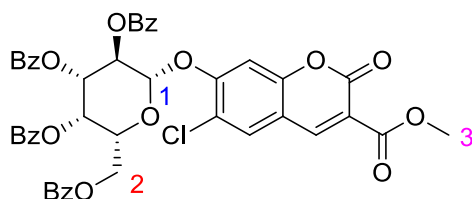


In a solution of methyl 7-hydroxy-2-oxo-chromene-3-carboxylate (250 mg, 1.14 mmol, 1.5 eq) in 10 mL of DMF was added potassium carbonate (320 mg, 2.28 mmol, 3 eq) and α-D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (500 mg, 0.76 mmol, 1 eq). The mixture was stirred at room temperature during 48 hours. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (4:1 to 3:2) as eluent to give white powder (150 mg, 25% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.11 – 7.21 (m, 24H, CH ar.), 6.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH galactose), 5.98 – 5.80 (m, 2H, CH galactose), 4.65 – 4.41 (m, 2H, CH galactose), 3.85 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂-OBz), 1.40 (s, 3H, O-CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.17-165.53 (C=O), 133.58-128.29 (CH ar., Car.), 69.57 (CH gal.), 69.30 (CH gal.), 68.03 (CH gal.), 66.83 (CH gal.), 62.44 (CH gal.), 26.93 (CH₃). ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₄₅H₃₅O₁₄: 799.2021, found: 799.2019. [α]_D²⁵ = 90 (*c* 2, CHCl₃).

2H-1-Benzopyran-3-carboxylic acid, 6-chloro-7-((2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactopyranosyl)oxy)-2-oxo-, methyl ester (14)

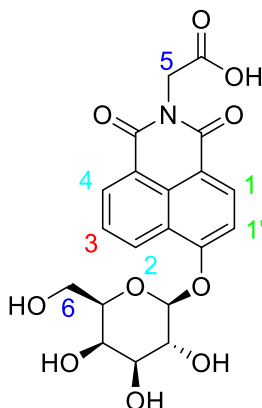


In a solution methyl 6-chloro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate of (600 mg, 2.36 mmol, 1 eq) in 20 mL of acetonitrile was added potassium carbonate (2.3 g, 7.09 mmol, 3 eq) and α-D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (1.6 g, 2.36 mmol, 1 eq). The mixture was stirred at room temperature during 24 hours. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified using cyclohexane/ethyl acetate (9:1 to 3:7) as eluent to give a white powder (250 mg, 13% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.23 – 7.28 (m, 23H, CH ar.), 6.73 (s, 1H, **H1**), 6.35 – 5.50 (m, 2H, CH galactose), 4.94 (s, 1H, CH galactose), 4.72 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH galactose), 3.85 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, **H2**), 1.40 (s, 3H, **H3**).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 171.23 (C=O), 165.95-165.44 (C=O, C ar.), 157.09 (C ar.), 156.04 (C ar.), 155.14 (C ar.), 147.92 (C ar.), 133.69-128.56 (CH ar.), 72.81 (CH galactose), 71.07 (CH gal.), 70.17 (CH gal.), 68.77 (CH gal.), 67.99 (CH gal.), 52.97 (**C2**), 26.93 (**C3**). ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₄₅H₃₃ClO₁₄Na: 855.1451, found: 855.1470. [α]_D²⁵ = 33 (*c* 2, CHCl₃).

2-(1,3-dioxo-6-(((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetic acid (15)



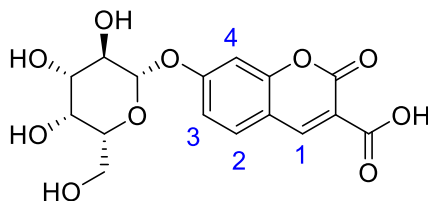
To a solution of **12** (516 mg, 0.6 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (10 mL) was added sodium (14 mg, 0.6 mmol, 1 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters. The crude product was dissolved in water (12 mL) and 12 mL of aq 10 M NaOH were added. The mixture was stirred at 50°C for 2 hours, cooled to room temperature, neutralized with IR 120 H⁺, and concentrated to give an orange solid (170 mg, 96% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.85 (s, 1H, **H4**), 8.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, **H2** and **H1**), 7.84 (s, 2H, **H1'** and **H3**), 6.68 – 5.77 (m, 4H, H gal.), 4.84 (d, *J* = 89.1 Hz, 1H, H gal.), 3.45 (s, 2H, **H6**), 2.79 – 2.61 (m, 2H, **H5**).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 175.46-169.17 (C=O, C ar.), 146.54 (CH ar.), 132.21 (CH ar.), 130.21 (CH ar.), 129.05 (CH ar.), 127.48 (CH ar.), 126.15-125.63 (CH), 115.37 (CH), 69.20 (**C6**), 26.38 (**C5**). [α]_D²⁵ = -31 (*c* 2, H₂O).

2H-1-Benzopyran-3-carboxylic acid, 7-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-oxo- (16)

[CAS 64664-99-9]

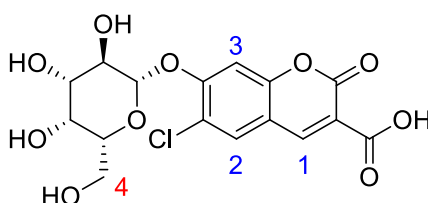


To a solution of **13** (250 mg, 0.3 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (50 mL) was added sodium (8 mg, 0.3 mmol, 1 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters. The crude product was dissolved in water (10 mL) and 10 mL of aq 10 M NaOH were added. The mixture was stirred at 50°C for 2 hours, cooled to room temperature, neutralized with IR 120 H⁺, and concentrated to give brown powder (150 mg, 90% yield).

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 8.00 – 7.79 (m, 2H, H1 and H2), 7.72-7.68 (m, 2H, H3 and H4), 3.91 – 3.46 - 2.30 (m, 7H, galactose).

2H-1-Benzopyran-3-carboxylic acid, 6-chloro-7-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-oxo- (17)

[CAS 441787-75-3]

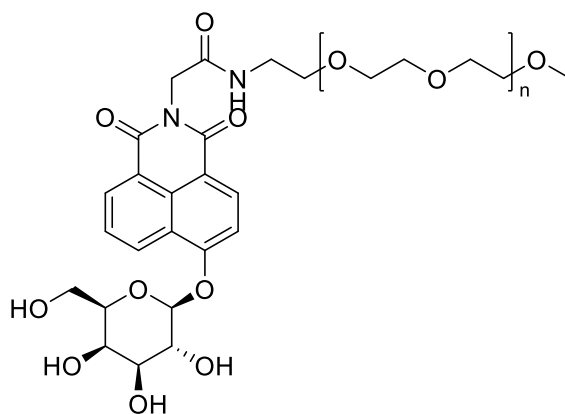


To a solution of **14** (393 mg, 0.47 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (60 mL) was added sodium (22 mg, 0.94 mmol, 2 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 20 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters. The crude product was dissolved in water (8 mL) and 8 mL of aq. 10 M NaOH were added. The mixture was stirred at 50°C for 3 hours, cooled to room temperature, neutralized with IR 120 H⁺, and concentrated to give a brown powder (180 mg, 95% yield).

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 8.01 (s, 1H, H1), 7.80 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H2 and H3), 4.75 – 2.04 (m, 7H, galactose).

^{13}C NMR (75 MHz, Methanol- d_4) δ 168.81 (C=O), 167.68 (C=O), 150.43 (C ar.), 133.48 (C ar.), 132.82 (CH ar.), 130.76 (CH ar.), 130.55 (C ar.), 129.49 (C ar.), 128.75 (C ar.), 127.13 (CH ar.), 72.14 (CH gal.), 71.45 (CH gal.), 71.42 (CH gal.), 71.03 (CH gal.), 70.16 (CH gal.), 35.47 (C4). MALDI-TOF MS: $m/z=402.03$ [$\text{M} + \text{K}^+$], calculated exact mass: 441.02. $[\alpha]_D^{25} = -49$ (c 2, H_2O).

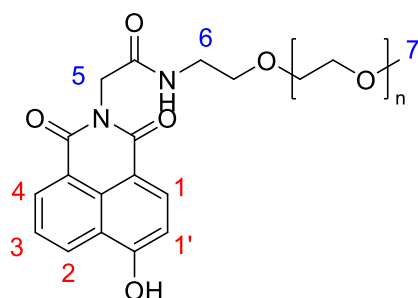
Naphtalimide galactosidase probe (18)



To a solution of **15** (140 mg, 0.24 mmol, 1.5 eq) in anhydrous dichloromethane (5 mL) was added 1-hydroxybenzotriazole (29 mg, 0.19 mmol, 1.2 eq) and (3-Dimethylaminopropyl)- N' -ethylcarbodiimide hydrochloride (37 mg, 0.19 mmol, 1.2 eq) under argon. The mixture was stirred two hours at room temperature then poly(ethylene glycol) methyl ether amine (120 mg, 0.16 mmol, 1 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature 48 hours. The solution is concentrated and the crude was dissolved in a minimum amount of water. The crude was purified by steric-exclusion chromatography to give an orange oil (36 mg, 20% yield).

IR (cm^{-1}): 3354, 2895, 1708, 1073.

Naphthalimide pH probe (19)

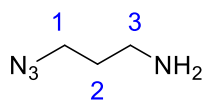


To a solution of 4-hydroxy-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (51 mg, 0.30 mmol, 1.5 eq) in anhydrous dichloromethane (5 mL) was added 1-hydroxybenzotriazole (37 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq) and (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (46 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq) under argon. The mixture was stirred two hours at room temperature then poly(ethylene glycol) methyl ether amine (150 mg, 0.20 mmol, 1 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature 48 hours. The solution is concentrated and the crude was dissolved in a minimum amount of water. The crude was purified by steric-exclusion chromatography to give an orange powder (43 mg, 20 % yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.55 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, **H4**), 8.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, **H1**), 7.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, **H2**), 7.75-7.66 (m, 1H, **H3**), 7.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, **H1**), 4.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, **H6**), 3.46 (m, 90H, PEG), 1.79 (s, 2H, **H5**), 1.14 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, **H7**).

IR (cm^{-1}): 3316, 2790, 1682, 1342, 1105.

1-azido-3-aminopropane (20) [CAS 88192-19-2]



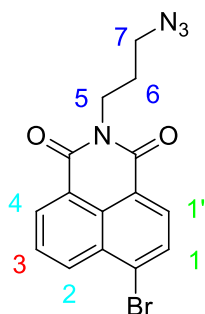
3-Bromopropylamine hydrobromide (3.2 g, 15 mmol) was added into a 150 mL round-bottom flask containing 100 mL of deionized water. Sodium azide (3.2 g, 50 mmol, 3.3 eq) were added into the solution. After stirring the reaction mixture at 80°C for 16 hours, about two-thirds of the solvent was removed by vacuum. The flask was then immersed into an ice-water bath, and diethyl ether (50 mL) and potassium hydroxide (4 g) was

added into the above solution. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 x 30 mL). The combined organic layers were dried over K₂CO₃ and concentrated to give clear yellow oil (1.4 g, 100% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 3.23 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H1), 2.68 – 2.61 (m, 2H, H3), 1.66-1.57 (m, 2H, H2), 0.93 (s, 2H, NH₂).

1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-bromo- (21)

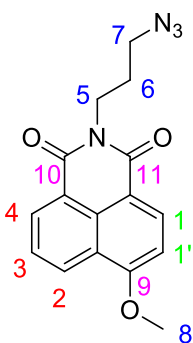
[CAS 1855867-83-2]



A solution of 4-bromo-1,8-naphthalic (3.9 g, 14.18 mmol, 1 eq) and 1-azido-3-aminopropane (2.1 g, 21.28 mmol, 1.5 eq) diluted in DMF / Acetic acid (2:1 195 mL) was stirred 18 hours at 115°C. Then the mixture was evaporated and the crude was purified by silica gel column chromatography using a solution of cyclohexane/ethyl acetate (100% to 60%) as eluent to give yellow powder (3.8 g, 75% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, H2 or H4), 8.47 (dd, *J* = 9.0, 1.2 Hz, 1H, H2 or H4), 8.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H; H1 or H1'), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H1 or H1'), 7.81 – 7.74 (m, 1H, H3), 4.23 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H5), 3.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H7), 2.01 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, H6).

1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-methoxy- (22)

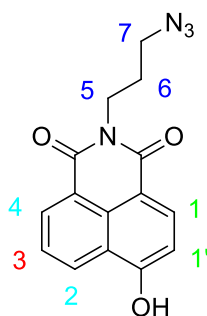


1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-bromo- (270 mg, 0.7 mmol, 1 eq), sodium methoxide (323 mg, 6.0 mmol, 8 eq) and copper sulfate (30 mg, 0.2 mmol, 0.25 eq) were mixed in dry methanol (10 mL). The reaction mixture was refluxed under argon for 12 hours. After cooling, the resulting mixture was filtered to give a yellow solid as a crude product. Then, the solid was washed with 1M hydrochloric acid and water to afford 113 mg of desired compound as a yellow solid in 49% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.53 – 8.43 (m, 3H, H2, H3, H4), 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H1 or H1'), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H1 or H1'), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H5), 4.09 (s, 3H, H8), 3.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H7), 2.08 – 1.95 (m, 2H, H6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.46 (C10 or C11), 163.85 (C10 or C11), 160.90 (C9), 133.56 (CH ar.), 131.60 (CH ar.), 129.28 (C ar.), 128.75 (CH ar.), 125.94 (CH ar.), 123.42 (C ar.), 122.12 (C ar.), 114.79 (C ar.), 105.24 (CH ar.), 56.28 (C8), 49.54 (C7), 37.71 (C5), 27.77 (C6). ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₆H₁₄N₄O₃Na: 333.0958, found: 333.0959

1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-hydroxy- (23)

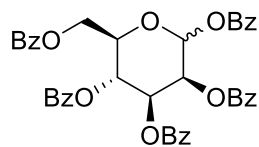


1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-methoxy- (500 mg, 1.4 mmol, 1 eq), CuSO₄·5H₂O (17 mg, 0.069 mmol, 0.05 eq), sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.1 eq) and potassium hydroxide (470 mg, 8.4 mmol, 6 eq) were mixed in DMSO/H₂O (v/v = 1:1, 4 mL). The mixture was stirred at 120°C for 3 days. After cooling to room temperature, carefully acidified with HCl 1M until pH = 2-3, the mixture was stirred for half hour. Then the precipitated was filtrated to afford the desired compound as a pale yellow solid in quantitative yield.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.90 (s, 1H, OH), 8.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H2 or H4), 8.46 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H2 or H4), 8.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H1 or H1'), 7.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H3), 7.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H1 or H1'), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H5), 3.51 – 3.39 (m, 2H, H7), 2.10 – 1.74 (m, 2H, H6).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163.83 (C=O), 163.13 (C=O), 160.31 (C-OH), 133.57 (CH ar.), 131.13 (CH ar.), 129.26 (C ar.), 128.91 (CH ar.), 125.59 (CH ar.), 122.39 -C ar.), 121.86 (C ar.), 112.62 (C ar.), 109.96 (CH ar.), 48.82 (C7), 37.14 (C5), 27.13 (C6). IR (cm⁻¹): 3147, 2086, 1686, 1340, 1082. ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₅H₁₂N₄O₃Na: 319.0802, found: 319.0803

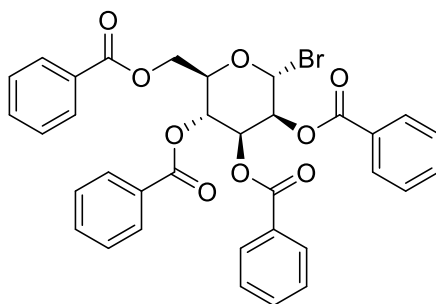
1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl-D-mannopyranose (24) [CAS 96996-90-6]



To a solution of D-mannose (5 g, 28 mmol, 1 eq) in Pyridine (65 mL) was added dropwise at 0°C benzoyl chloride (20 mL, 170 mmol, 6 eq). The mixture was stirred at room temperature during 2 hours. Then 20 mL of water was added. After stirring another 30 minutes, the mixture was put on 200 mL of ice water. Dichloromethane was added and the solution was extracted. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude was recrystallized in ethanol to get the desired compound as a white powder (12.4 g, 63 % yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.28 – 8.21 (m, 2H), 8.15 – 8.09 (m, 4H), 8.03 – 7.97 (m, 2H), 7.93 – 7.87 (m, 2H), 7.76 – 7.27 (m, 15H), 6.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.33 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.10 (dd, *J* = 10.3, 3.3 Hz, 1H), 5.95 (dd, *J* = 3.3, 2.0 Hz, 1H), 4.73 (dd, *J* = 12.1, 2.4 Hz, 1H), 4.68 – 4.50 (m, 2H).

α-D-Mannopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (25) [CAS 14218-30-5]

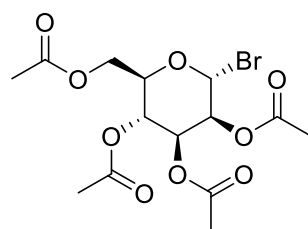


1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl-D-mannopyranose (6 g, 8.57 mmol, 1 eq) was dissolved in 40 mL of anhydrous dichloromethane. A solution of 33% hydrobromic acid in glacial acetic acid (25 mL) was added at 0°C. The mixture was stirred 1 hour at 0°C and 1 hour at room temperature. The solvent was evaporated in vacuum and dichloromethane was added (100 mL). The mixture was neutralized with aqueous solution of NaHCO₃ sat. and the organic layer was washed with water (50 mL x3), aqueous solution of NaHCO₃ sat. (30 mL

x3) and brine (30 mL x2). The organic layers were collected, dried and concentrated to give white powder used without purification for the next steps (5 g, 89% yield).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 – 8.09 (m, 2H), 8.07 – 7.97 (m, 4H), 7.90 – 7.81 (m, 2H), 7.65 – 7.51 (m, 3H), 7.49 – 7.34 (m, 7H), 7.26 (s, 2H), 6.60 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.35 – 6.20 (m, 2H), 5.92 (dd, $J = 2.8, 1.7$ Hz, 1H), 4.80 – 4.62 (m, 2H), 4.52 (dd, $J = 12.4, 3.7$ Hz, 1H).

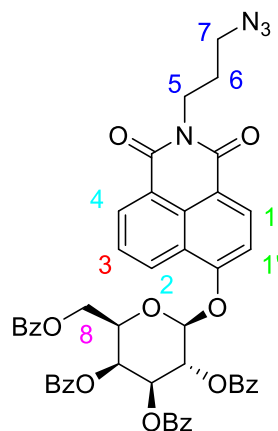
α -D-Mannopyranosyl bromide, 3,4,6-tetraacetate (**26**) [CAS 4026-32-8]



To a vigorously stirred solution of α -D-Mannose pentaacetate (10 g, 25.62 mmol, 1 eq) in dichloromethane (60 mL) a solution of 33% hydrobromic acid in glacial acetic acid (40 mL) at 0 °C was added carefully. The resulting solution was stirred for 1 hour at 0°C and 1 hour at room temperature. 100 mL of dichloromethane was added to dilute the solution. The mixture was neutralized with aqueous solution of NaHCO_3 sat. and the organic layer was washed with water (50 mL x3), aqueous solution of NaHCO_3 sat. (30 mL x3) and brine (30 mL x2). Filtration and evaporation gave the crude glycosyl bromide as a yellow oil. The recrystallization from ethanol yielded the pure bromide as white solid (9.5 g, 90 % yield).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.28 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 5.70 (dd, $J = 10.2, 3.4$ Hz, 1H), 5.43 (dd, $J = 3.4, 1.6$ Hz, 1H), 5.36 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.32 (dd, $J = 12.4, 4.8$ Hz, 1H), 4.21 (ddd, $J = 10.1, 4.6, 1.9$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 12.4, 2.2$ Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-((1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl))-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2H-galactopyranosyl-3,4,5-triyl tetrabenzoate (27)

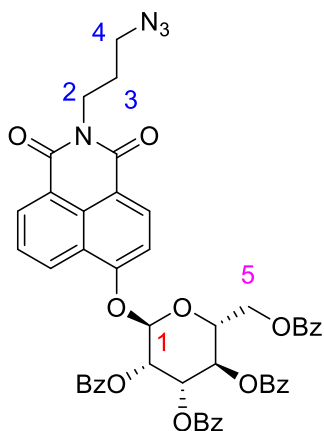


To a solution of 1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-hydroxy- (400 mg, 1.3 mmol, 1 eq) in 10 mL of acetonitrile was added cesium carbonate (2.6 g, 8.1 mmol, 6 eq) and α -D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (1.8 g, 2.7 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 70°C overnight. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography using a solution of cyclohexane/ethyl acetate (10:0 to 1:1) as eluent to give yellow powder (1 g, 85% yield)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.16 – 7.23 (m, 25H), 6.36 – 5.58 (m, 4H), 4.90 – 4.49 (m, 3H), 4.27-4.20 (m, 2H, **H5**), 3.43-3.38 (m, 2H, **H7**), 2.05 – 1.94 (m, 2H, **H6**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.87 (C=O), 165.83 (C=O), 134.23-133.42 (CH ar. and C ar.), 130.58-129.91 (-CH ar. and C ar.), 129.10-128.60 (-CH ar. and -C ar.), 72.89-68.31 (-CH gal.) 61.95 (**C8**) 49.79 (**C7**), 38.13 (**C5**), 27.77 (**C6**). ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₄₉H₃₈N₄O₁₂Na: 897.2378, found: 897.2382. $[\alpha]_D^{25} = 48$ (c 2, CHCl₃).

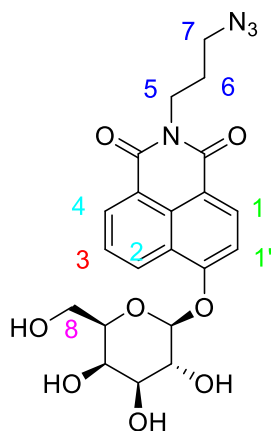
(2R,3R,4S,5S,6R)-2-((1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl))-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2H-mannopyranosyl-3,4,5-triyl tetra benzoate (28)



To a solution of 1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-hydroxy- (800 mg, 2.70 mmol, 1 eq) in 18 mL of acetonitrile was added cesium carbonate (3.5 g, 10.80 mmol, 4 eq) and α -D-mannopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetra benzoate (3.5 g, 5.40 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 70°C overnight. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography using a solution of cyclohexane/ethyl acetate (10:0 to 8:2) as eluent to give yellow powder (1.45 g, 61% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.79 – 7.28 (m, 25H), 6.39 – 5.83 (m, 3H), 4.86 – 4.42 (m, 4H), 4.40 – 4.20 (m, 2H, **H2**), 3.45 (t, *J* = 6.9, 2H, **H4**), 2.11 – 1.93 (m, 2H, **H3**). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.19-163.97 (C=O), 134.20-133.19 (C ar.), 130.32-128.44 (C ar., CH ar.), 91.53 (**C1**), 71.34 (CH man.), 70.15 (CH man.), 69.59 (CH man.), 66.34 (CH man.), 62.50 (**C5**), 49.60 (**C4**), 38.00 (**C2**), 27.05 (**C3**). ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₄₉H₃₈N₄O₁₂Na: 897.2378, found: 897.2378. $[\alpha]_D^{25} = -14$ (*c* 2, CHCl₃).

2-((1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl))-6 ((benzoyloxy)methyl) tetrahydro-2H-galactopyranosyl (29)

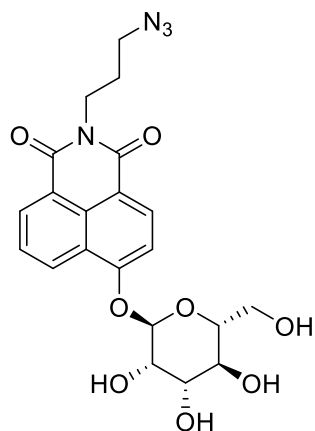


To a solution of (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl))-6 ((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2H-galactopyranosyl-3,4,5-triyl tetrabenzoate (400 mg, 0.46 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (50 mL) was added sodium (21 mg, 0.92 mmol, 2 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 23 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters and purified by steric exclusion to give the desired orange solid (60 mg, 28% yield).

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2 and H4), 7.48 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H3), 7.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H1 and H1'), 4.13 – 3.51 (m, 9H, H5, H8, H galactose), 3.35-3.27 (m, 2H, H7), 1.78-1.62 (m, 2H, H6).

MALDI-TOF MS: *m/z*=458.14 [M⁺ K⁺], calculated exact mass: 496.16. [α]_D²⁵ = - 46 (*c* 2, H₂O).

2-((1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl))-6 ((benzoyloxy)methyl) tetrahydro-2H-mannopyranosyl (30)

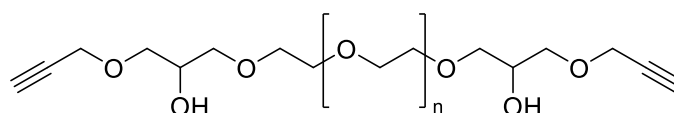


To a solution of (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl))-6 ((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2H-mannopyranosyl-3,4,5-triyl tetrabenzoate (770 mg, 0.88 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (85 mL) was added sodium (81 mg, 3.52 mmol, 4 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 23 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters and purified by preparative HPLC to give the desired yellow solid (153 mg, 38% yield).

¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.91 – 7.83 (m, 2H), 7.36 – 7.21 (m, 3H), 5.01 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.81 – 3.35 (m, 13H), 3.27 – 3.22 (m, 2H).

ESI-HRMS *m/z* [M⁺] calculated for C₂₁H₂₃N₄O₈: 459.150, found: 459.1511. [α]_D²⁵ = - 8 (*c* 2, H₂O).

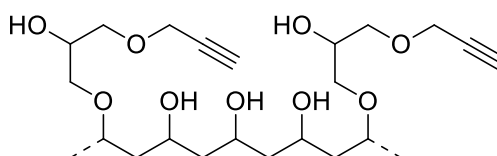
Alkyne-terminated poly(ethylene glycol) (31)



Polyéthylène glycol 1 000 (3 g, 3 mmol, 1 eq) was dissolved in 15 mL of aqueous solution 0.1 M NaOH. Then, glycidyl propargyl ether (3.6 g, 30 mmol, 10 eq) was added and the mixture was stirred at room temperature during few days monitored by TLC. Then the crude was purified by steric-exclusion chromatography and the solvent was evaporated to get the desired pale-yellow oil which crystallized at room temperature (3.1 g, 93% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 3.94 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.63 (s, 90H, CH₂ PEG), 3.39 (s, 1H), 2.15 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 71.72 (C alkyne), 69.58 (CH₂ PEG), 69.45 (CH₂), 68.44 (CH alkyne), 60.36 (CH₂), 58.09 (CH).

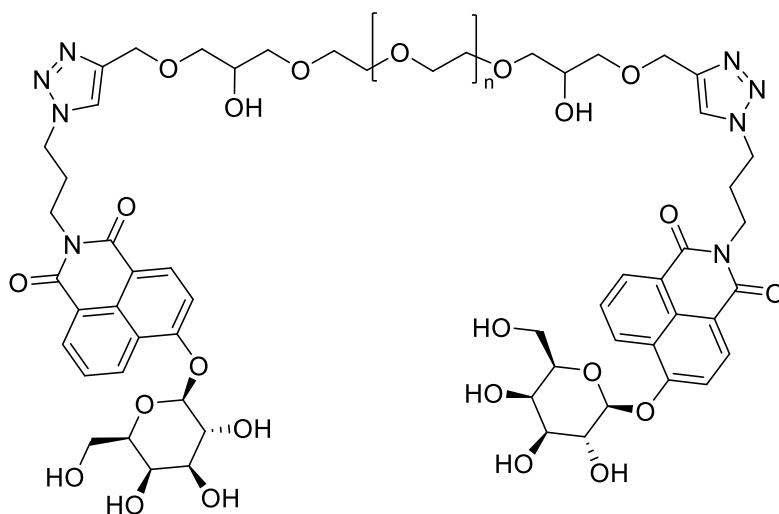
Propargyl-PVA (32)



Polyvinyl alcohol 10 000 (2 g, 0.15 mmol, 1 eq) was dissolved in 30 mL of aqueous solution 0.1 M NaOH at 35°C. Then, glycidyl propargyl ether (2 g, 15 mmol, 100 eq) was added and the mixture was stirred at 35°C during few days monitored by TLC. Then the crude was dialysed to give a beige solid (1.63 g, 90% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 4.66 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.20 (dd, J = 11.4, 3.5 Hz, 1H), 3.82 (s, 4H), 1.96-1.87 (m, 2H), 1.76 (s, 1H), 1.63-1.23 (m, 9H).

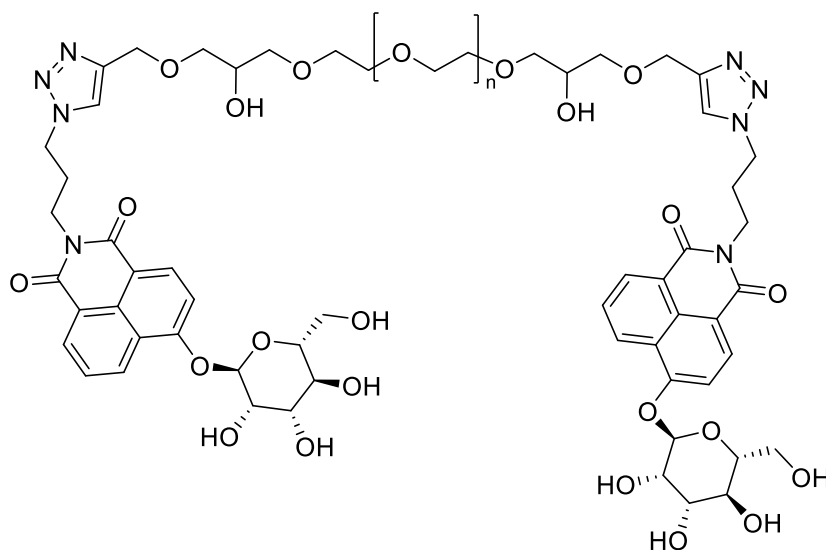
Galactosidase naphthalimide probe (33)



To a mixture of **27** (1.0 g, 1.10 mmol, 3 eq) and **31** (400 mg, 0.40 mmol, 1 eq) in DMF (72 mL) was added the mixture of CuSO₄ (35 mg, 0.13 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (50 mg, 0.15 mmol, 0.7 eq) dissolved on H₂O (8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated and the crude was dissolved in anhydrous methanol (100 mL). Sodium (51 mg, 2.20 mmol, 2 eq) was added under argon. The mixture was stirred at room temperature overnight, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The crude was purified by steric-exclusion chromatography and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (280 mg, 16% yield).

IR (cm⁻¹): 3419, 2882, 1694, 1341, 1145, 1104, 1060.

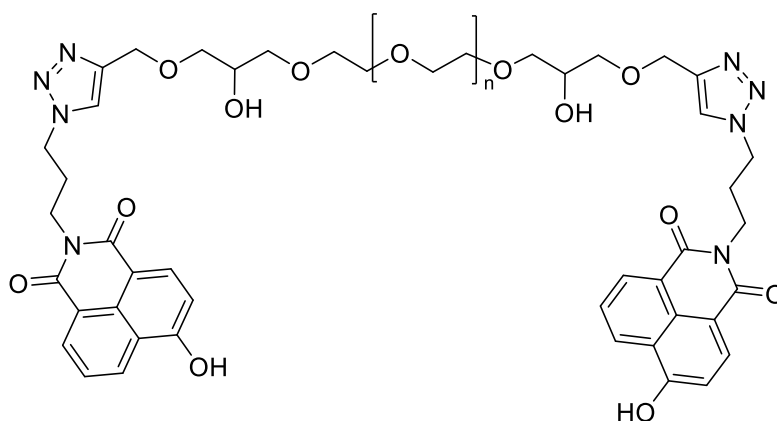
Mannosidase naphthalimide probe (34)



To a mixture of **28** (620 mg, 0.61 mmol, 2.2 eq) and **31** (350 mg, 0.32 mmol, 1 eq) in DMF (60 mL) was added the mixture of CuSO₄ (51 mg, 0.32 mmol, 1 eq) and sodium ascorbate (70 mg, 0.35 mmol, 1.1 eq) dissolved on H₂O (6 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated and the crude was dissolved in anhydrous methanol (70 mL). Sodium (40 mg, 1.74 mmol, 2 eq) was added under argon. The mixture was stirred at room temperature overnight, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The crude was purified by steric-exclusion chromatography (G15) and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (397 mg, 89% yield).

IR (cm⁻¹): 3424, 2883, 1657, 1341, 1146, 1102, 1059.

Naphthalimide pH probe (35)

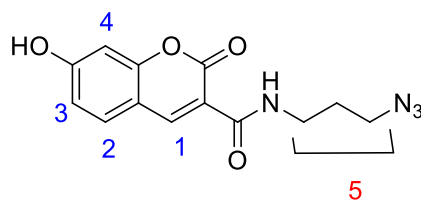


To a mixture of 1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-hydroxy- (100 mg, 0.3 mmol, 2 eq) and alkyne-terminated poly(ethylene glycol) (200 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in DMF (36 mL) was added the mixture of CuSO₄ (17 mg, 0.1 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (25 mg, 0.1 mmol, 0.7 eq) dissolved on H₂O (4 mL). The mixture was stirred at room temperature for 48 hours. Then the solvent was evaporated in vacuum and the crude was purified by steric-exclusion chromatography and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (125 mg, 58% yield).

IR (cm⁻¹): 3413, 2884, 1690, 1341, 1098.

2H-1-Benzopyran-3-carboxamide, N-(3-azidopropyl)-7-hydroxy-2-oxo- (36)

[CAS 1434001-60-1]

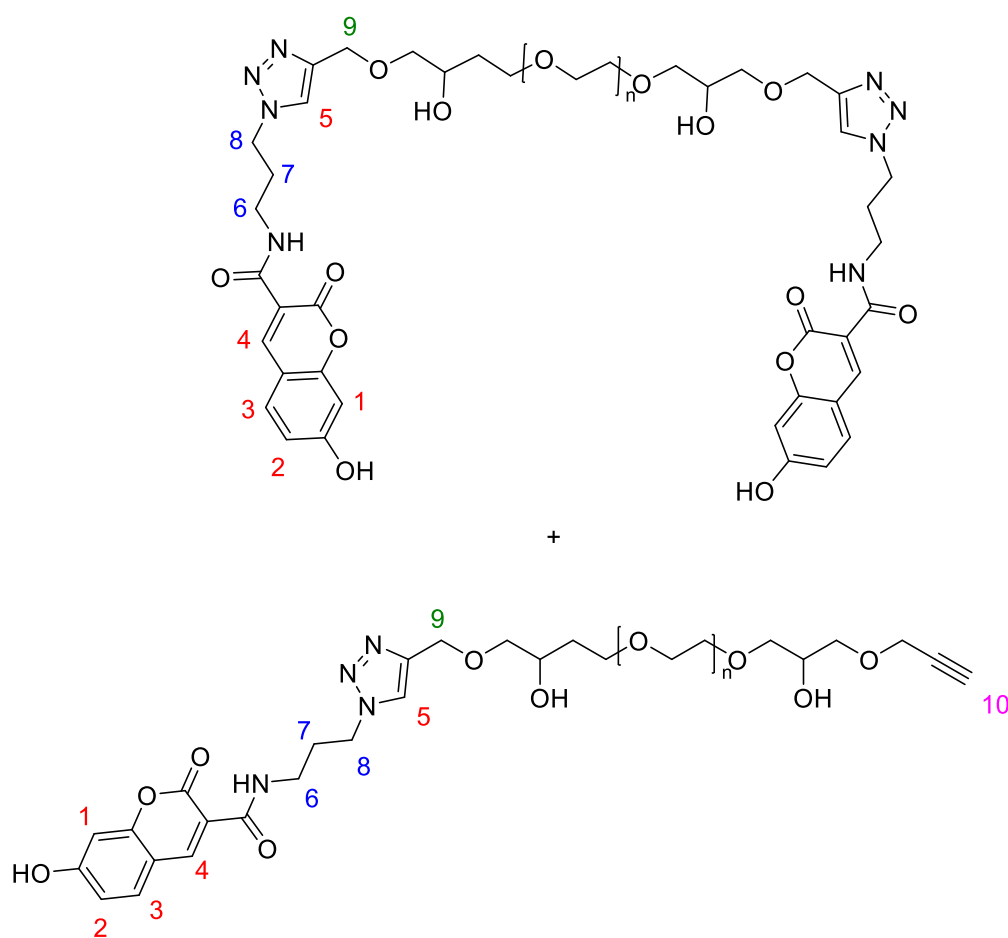


7-hydroxycoumarin 3-carboxylic acid (400 mg, 1.94 mmol, 1 eq) and 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (884 mg, 2.32 mmol, 1.2 eq) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, DIPEA (500 μ L, 2.91 mmol, 1.5 eq) was added and the whole mixture was stirred 1 hour at room temperature before addition of 1-azido-3-aminopropane (193 mg, 1.94 mmol, 1 eq). The mixture was stirred

48 hours at room temperature and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography using a mixture cyclohexane/ethyl acetate (2:3) as eluent to give beige powder (100 mg, 18% yield).

^1H NMR (300 MHz, Methanol- d_4) δ 9.11 (s, 1H, OH), 8.75 (s, 1H, H1), 7.67 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H2), 6.88 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H, H3), 6.77 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H4), 3.57 – 3.37 (m, 6H, H5).

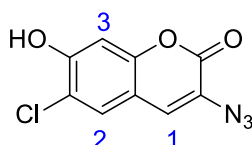
Coumarine pH probe (37)



To a mixture of 2H-1-Benzopyran-3-carboxamide, N-(3-azidopropyl)-7-hydroxy-2-oxo- (100 mg, 0.36 mmol, 2 eq) and Alkyne-terminated poly(ethylene glycol) (200 mg, 0.18 mmol, 1 eq) in DMF (45 mL) was added the mixture of CuSO_4 (27 mg, 0.11 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (30 mg, 0.13 mmol, 0.7 eq) dissolved on H_2O (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Then the solvent was evaporated in vacuum and the crude was purified by steric-exclusion chromatography. The residue was lyophilized to get the desired yellow solid (110 mg, 56% yield).

^1H NMR (300 MHz, Deuterium Oxide) δ 8.51 (s, 1H, H5), 7.97 (s, 1H, H4), 7.60-7.53 (m, 1H, H3), 6.84-6.77 (m, H2), 6.68 (s, H1), 4.96-4.78 (m, 2H, H9), 4.53-4.44 (m, 2H, H6), 3.62 (s, 276H, PEG), 3.17 – 2.97 (m, 2H, H8), 2.79 (s, 1H, H10), 2.26-2.17 (m, 2H, H7). IR (cm^{-1}): 3455, 2869, 1707, 1455, 1343, 1095.

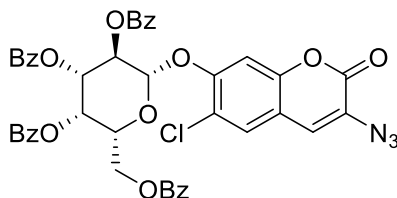
3-Azido-6-chloro-7-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one (38) [CAS 1352488-32-4]



A mixture of 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldehyde (2.65 g, 15.4 mmol, 1 eq), N-acetylglycine (1.8 g, 15.4 mmol, 1eq), anhydrous sodium acetate (46 mmol) in acetic anhydride (75 mL) was refluxed under stirring for 4 hours. The reaction mixture was poured onto ice to give a yellow precipitate. After filtration, the solid was refluxed in a solution of conc HCl and ethanol (2:1, 30 mL) for 1 hour, then ice water (40 mL) was added to dilute the solution. The solution was then cooled in an ice bath and NaNO₂ (2.13 g, 30.8 mmol, 2 eq) was added. The mixture was stirred for 10 minutes and NaN₃ (3.0 g, 46.2 mmol, 3 eq) was added in portions. After stirring another 15 minutes, the resulting precipitate was filtered off and dried under reduced pressure to afford a brown solid (475 mg, 13% yield). The product was pure enough for further reactions.

^1H NMR (300 MHz, Methanol-d₄) δ 7.54 (s, 1H, H1), 7.34 (s, 1H, H2), 6.86 (s, 1H, H3). IR (cm^{-1}): 3171, 2117, 1681, 1598, 1213.

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-((3-azido-6-chloro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)-6-((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2H-galactopyranosyl-3,4,5-triyl tetrabenzoate (39)

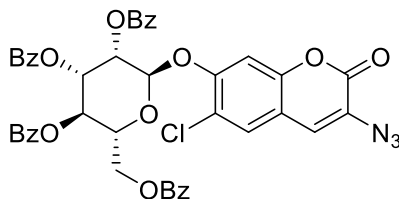


In a solution of 3-azido-4-chloro-7-hydroxycoumarin (800 mg, 3.38 mmol, 1 eq) in 25 mL of acetonitrile was added cesium carbonate (4.4 g, 12.60 mmol, 2 eq) and α -D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (4.4 g, 6.300 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 70°C during 17 hours. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified using cyclohexane/ethyl acetate (10:0 to 3:2) as eluent to give a white powder (2.35 g, 85% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.18 – 7.36 (m, 23H, CH ar.), 6.21 (dd, J = 10.2, 7.9 Hz, 1H, CH galactose), 6.11 (d, J = 3.1 Hz, 1H, CH galactose), 5.78 (dd, J = 10.3, 3.3 Hz, 1H, CH galactose), 5.44 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH galactose), 4.85 – 4.40 (m, 3H, CH galactose, CH₂-OBz).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 169.42 (C ar.), 166.08 (C ar.), 165.51 (C ar.), 165.15 (C ar.), 158.18 (C ar.), 153.23 (C ar.), 148.88 (C ar.), 133.43-128.49 (C ar., CH benzoate), 123.46 (C ar.), 121.87 (C ar.), 121.69 (C ar.), 116.14 (CH ar. coumarine), 106.14 (CH ar. coumarine), 100.88 (CH ar. coumarine), 72.54 (CH galactose), 71.18 (CH galactose), 68.84 (CH galactose), 67.94 (CH galactose), 62.73 (CH galactose), 24.71 (CH₂-OBz). MALDI-TOF MS: m/z =815.15 [M+ K⁺], calculated exact mass: 854.31. $[\alpha]_D^{25}$ = - 88 (c 2, CHCl₃).

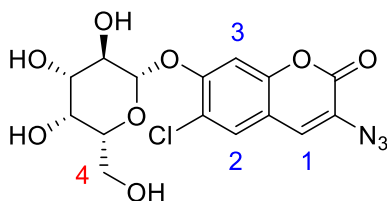
(2R,3R,4S,5S,6R)-2-((3-azido-6-chloro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)-6-((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2H-mannopyranosyl-3,4,5-triyl tetrabenzoate (40)



In a solution of 3-azido-4-chloro-7-hydroxycoumarin (870 mg, 3.67 mmol, 1 eq) in 25 mL of acetonitrile was added cesium carbonate (4.8 g, 14.68 mmol, 4 eq) and α -D-mannopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (4.8 g, 7.34 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 70°C during 24 hours. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified using cyclohexane/ethyl acetate (10:0 to 3:2) as eluent to give a white powder (1.14 g, 38% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.15 – 7.80 (m, 9H), 7.70 – 7.28 (m, 14H), 6.22 – 6.12 (m, 2H), 6.03 – 5.98 (m, 1H), 5.91 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.86 – 4.37 (m, 3H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.60, 169.61, 166.01, 165.64, 165.56, 165.51, 158.18, 151.75, 149.06, 133.59, 131.01 – 127.80, 123.50, 121.99, 121.38, 115.84, 104.79, 96.65, 70.51, 69.99, 69.89, 69.73, 66.58, 27.03. MALDI-TOF MS: *m/z*=815.15 [M+ K⁺], calculated exact mass: 854.16. $[\alpha]_D^{25}$ = 35 (*c* 2, CHCl₃).

2H-1-Benzopyran-3-azido, 6-chloro-7-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-oxo- (41)

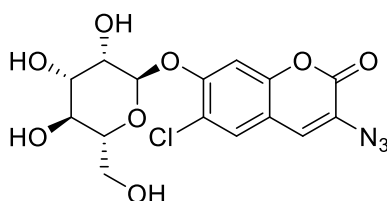


To a solution of (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((3-azido-6-chloro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)-6-((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl tribenzoate (220 mg, 0.27 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (40 mL) was added sodium (12 mg, 0.54 mmol, 2 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 20 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters. A brown powder was obtained (82 mg, 76% yield).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.05 (s, 1H, H1), 7.96 – 7.88 (m, 1H, H2), 7.69 – 7.61 (m, 1H, H3), 4.49 – 3.34 (m, 7H, H4 and H gal.).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 178.19 (C ar.), 169.85 (C ar.), 134.03 (C ar.), 131.80 (C ar.), 130.66 (C ar.), 129.43 (C ar.), 127.07 (CH ar.), 113.75 (CH ar.), 104.46 (CH ar.), 82.28 (CH gal.), 72.02 (CH gal.), 70.80 (CH gal.), 70.41 (CH gal.), 61.22 (CH gal.), 30.54 (C4). MALDI-TOF MS: m/z=399.04 [M+ K⁺], calculated exact mass: 439.06. [α]_D²⁵ = -101 (c 2 H₂O).

2H-1-Benzopyran-3-azido, 6-chloro-7-(α-D-mannopyranosyloxy)-2-oxo- (42)

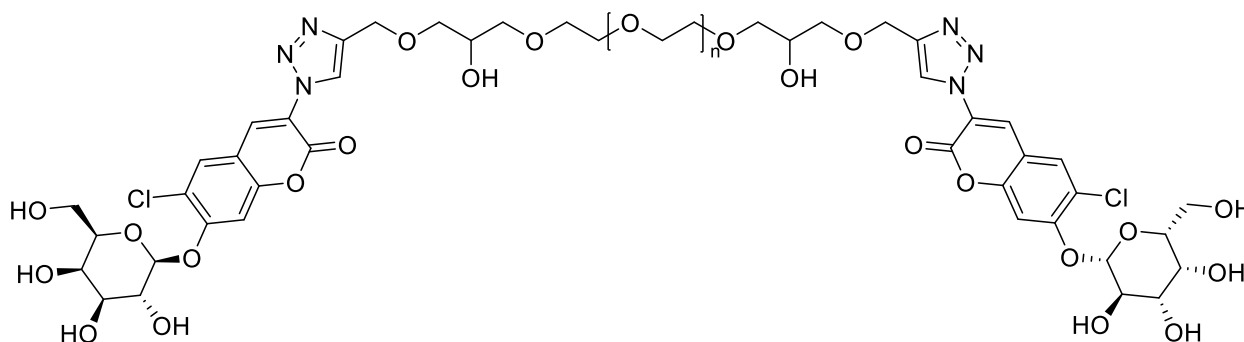


To a solution of (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((3-azido-6-chloro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)-6-((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2H-mannopyranosyl-3,4,5-triyl tetrabenzoate (500 mg, 0.61 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (60 mL) was added sodium (56 mg, 2.45 mmol, 4 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 40 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters and purified by preparative HPLC to give the desired orange solid (190 mg, 78% yield).

^1H NMR (300 MHz, Methanol- d_4) δ 8.55 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 4.12 (dd, $J = 3.4$, 1.9 Hz, 1H), 4.03 – 3.96 (m, 2H), 3.84 – 3.71 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, Methanol- d_4) δ 165.22, 152.59, 149.71, 127.79, 123.25, 120.18, 114.92, 104.18, 99.41, 80.21 (CH man.), 74.90 (CH man.), 70.93 (CH man.), 70.20 (CH man.), 66.74 (CH man.), 36.55. MALDI-TOF MS: $m/z=399.0469$ [$\text{M} + \text{H}^+$], calculated exact mass: 400.52. $[\alpha]_D^{25} = -14$ (c 2 H_2O).

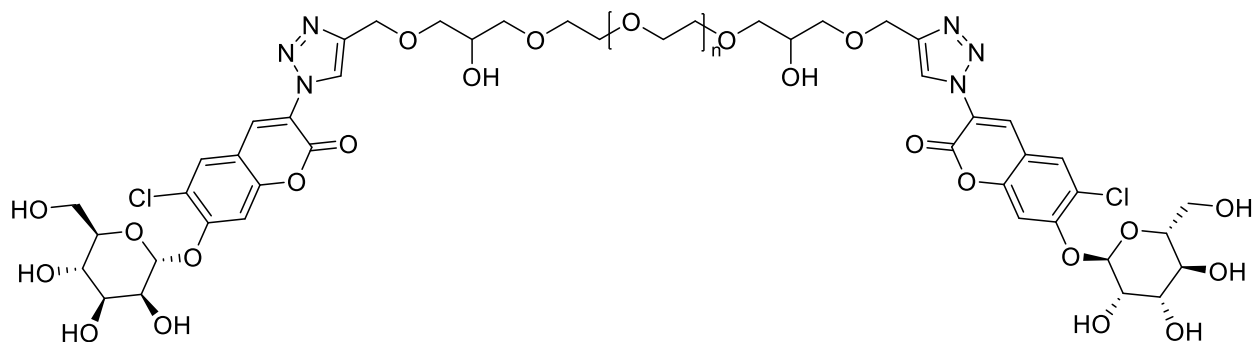
Galactosidase chlorocoumarine probe (43)



To a mixture of **39** (700 mg, 0.86 mmol, 2 eq) and **31** (430 mg, 0.43 mmol, 1 eq) in DMF (90 mL) was added the mixture of CuSO_4 (82 mg, 0.52 mmol, 1.2 eq) and sodium ascorbate (119 mg, 0.60 mmol, 1.4 eq) dissolved on H_2O (10 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated and the crude was dissolved in anhydrous methanol (100 mL). Sodium (40 mg, 1.74 mmol, 1.3 eq) was added under argon. The mixture was stirred at room temperature overnight, neutralized with IR 120 H^+ and concentrated. The crude was purified by steric-exclusion chromatography and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (350 mg, 27% yield).

IR (cm^{-1}): 3419, 2883, 1341, 1276, 1146, 1103.

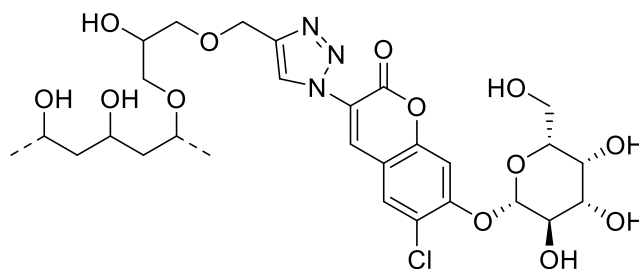
Mannosidase chlorocoumarine probe (44)



To a mixture of **40** (600 mg, 0.74 mmol, 2 eq) and **31** (400 mg, 0.36 mmol, 1 eq) in DMF (72 mL) was added the mixture of CuSO₄ (35 mg, 0.22 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (51 mg, 0.26 mmol, 0.7 eq) dissolved on H₂O (8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated and the crude was dissolved in anhydrous methanol (80 mL). Sodium (40 mg, 1.74 mmol, 4 eq) was added under argon. The mixture was stirred at room temperature overnight, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The crude was purified by steric-exclusion chromatography and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (352 mg, 75% yield).

IR (cm⁻¹): 3429, 2883, 1736, 1466, 1341, 1279, 1103, 1060.

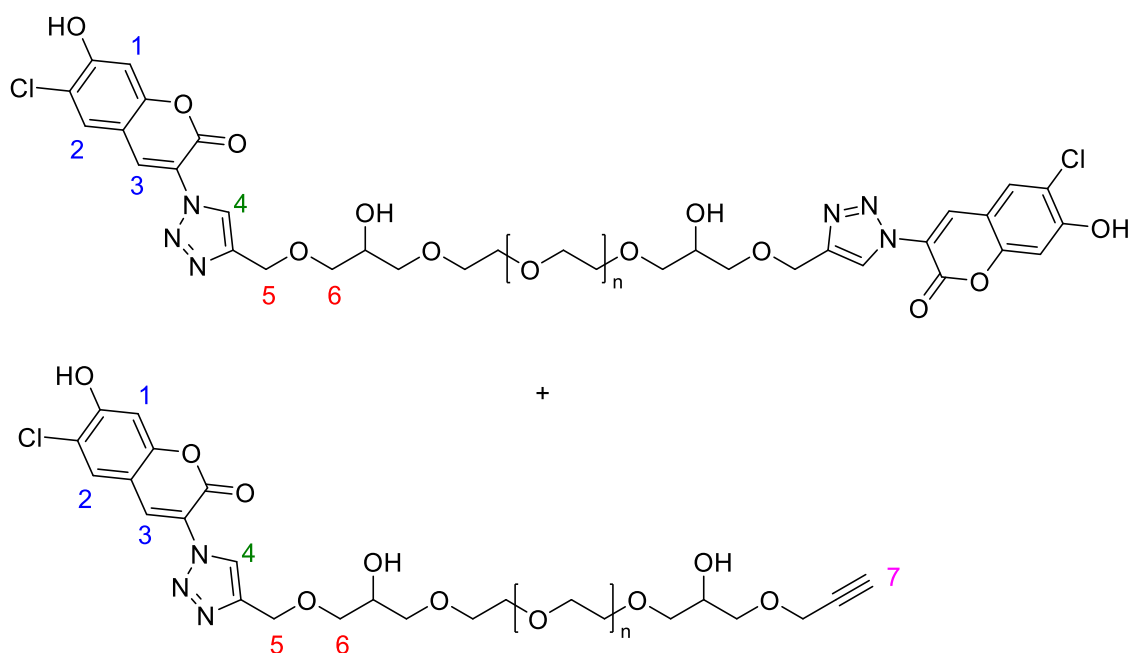
Galactosidase chlorocoumarine probe (45)



To a mixture of **41** (170 mg, 0.45 mmol, 25 eq) and **32** (230 mg, 0.17 mmol, 1 eq) in DMF (9 mL) was added the mixture of CuSO₄ (3 mg, 0.02 mmol, 1.2 eq) and sodium ascorbate (5 mg, 0.02 mmol, 1.4 eq) dissolved on H₂O (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated in vacuum and the crude was purified by steric-exclusion chromatography and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (130 mg, 64% yield).

IR (cm⁻¹): 3302, 2938, 1732, 1428, 1373, 1241, 1088.

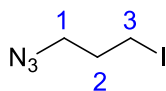
Chlorocoumarine pH probe (46)



To a mixture of **38** (100 mg, 0.42 mmol, 2 eq) and **31** (230 mg, 0.21 mmol, 1 eq) in DMF (45 mL) was added the mixture of CuSO₄ (20 mg, 0.13 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (29 mg, 0.15 mmol, 0.7 eq) dissolved on H₂O (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated in vacuum and the crude was purified by steric-exclusion chromatography and the residue was lyophilized to get the desired yellow solid (130 mg, 33% yield).

¹H NMR (300 MHz, Deuterium Oxide) δ 8.48 (s, 1H, **H4**), 8.31 (s, 1H, **H3**), 7.71 (s, 1H, **H2**), 6.69 (s, 1H, **H1**), 4.25 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H, **H6** and **H7**), 3.71 (s, 540H, PEG), 2.91 (s, 1H, **H7**).
IR (cm⁻¹): 3406, 2884, 1706, 1341, 1279, 1101.

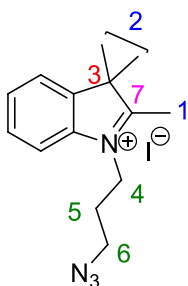
1-azido-3-iodopropane (47) [CAS 58503-62-1]



A solution of 1-chloro-3-iodopropane (1.5 mL, 14.0 mmol) and sodium azide (1.1 g, 16.8 mmol) in dry DMF (35 mL) was stirred at room temperature for 24 h. The reaction was diluted by the addition of water (100 mL), and diethyl ether washes (2 × 100 mL) were used to extract organic components. The diethyl ether fractions were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo until a small volume (~5 mL) of ether remained. The reaction was diluted in acetone (35 mL), and following the addition of sodium iodide (3.1 g, 21.0 mmol), the reaction was heated at 60 °C for 24 h. The solution was concentrated in vacuo until a small volume (~5 mL) remained, then diluted with diethyl ether (100 mL) and washed with H₂O (2 × 100 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo, obtaining the desired product as a yellow oil (1.8 g, 61%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.44 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H1), 3.25 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H3), 2.04 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, H2).

3-(3-Azidopropyl)-1,1,2-trimethyl-1H-indoliumiodide (48)

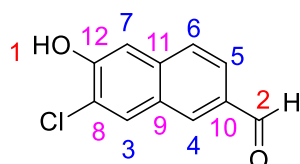


The solution containing 2,3,3-trimethylindolenine (680 mg, 4.27 mmol, 1 eq) and 1-azido-3-iodopropane (1.8 mL, 8.54 mmol, 2 eq) in acetonitrile (45 mL) was refluxed for 72 hours. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was dissolved in dichloromethane (20 mL). This solution was added dropwise to diethyl ether solution (100 mL) to precipitate the product. This purification step with diethyl ether solution was performed 3 times and the solid obtained was dried under vacuum (hygroscopic). The desired compound was obtained as a dark-brown solid (1.0 g, 63% yield).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.86 – 7.82 (m, 1H), 7.66 – 7.53 (m, 3H), 4.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H4), 3.76 – 3.71 (m, 2H, H6), 3.17 (s, 3H, H1), 2.37 – 2.27 (m, 2H, H5), 1.65 (s, 6H, H2).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196.61 (C7), 141.60 (C ar.), 141.00 (C ar.), 130.34 (CH ar.), 129.80 (CH ar.), 123.45 (CH ar.), 115.84 (CH ar.), 54.85 (C6), 49.02 (C4), 47.83 (C5), 31.03 (C2), 27.42 (C3), 23.24 (C2), 17.41 (C1). ESI-HRMS m/z [M⁺] calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4$: 243.1604, found: 243.1604.

5-chloro-6-hydroxy-2-naphthaldehyde (49)

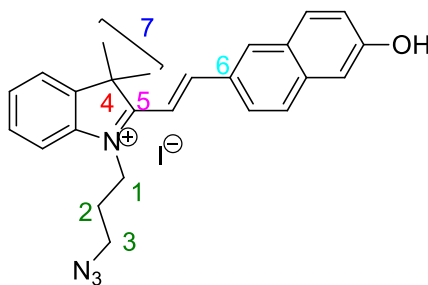


To a solution of 6-hydroxy -2-naphthaldehyde (200 mg, 1.16 mmol, 1 eq) in chloroform (5 mL) was added N-chlorosuccinimide (155 mg, 1.16 mmol, 1 eq) and the resulting mixture was stirred 1h at 60°C. HCl conc (20 μL) was added carefully and stirring was continued 20 hours. The mixture was cooled to room temperature and the precipitate was filtered to give the desired yellow powder (193 mg, 82% yield) used for newt step without further purification.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.08 (s, 1H, H1), 10.09 (s, 1H; H2), 8.51 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H5), 8.13 (dd, $J = 8.8, 0.8$ Hz, 1H, H4), 8.05 – 8.00 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H7), 7.95 (dd, $J = 8.8, 1.6$ Hz, 1H, H6), 7.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H3).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 192.35 (C2), 154.07 (C12), 134.72 (C5), 134.58 (C11), 131.67 (C10), 130.15 (C7), 127.47 (C9), 124.21 (C6), 123.24 (C4), 119.52 (C3), 112.83 (C8). ESI-HRMS m/z [M⁺] calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClO}_2$: 207.0207, found: 207.0207.

Cyanine (50)

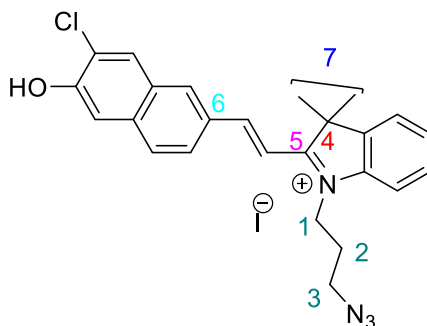


To a solution of 3-(3-Azidopropyl)-1,1,2-trimethyl-1H-indoliumiodide (1,8 mg, 4.86 mmol, 1.2 eq) and 6-hydroxy-2-naphthaldehyde (700 mg, 4.07 mmol, 1 eq) in absolute EtOH (110 mL) under a high purity nitrogen atmosphere was added 900 μ L of pyridine. After being stirred for 24 h at 78 $^{\circ}$ C, the mixture was cooled to room temperature and concentrated in vacuum. Then the crude was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (100% to 80% in dichloromethane) to yield a brick red solid (70 mg, 90% yield).

^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 9.71 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 8.68 (tt, J = 7.4, 3.7 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.35 – 8.31 (m, 1H), 8.27 – 8.16 (m, 2H), 7.93 – 7.86 (m, 2H), 7.83 – 7.68 (m, 2H), 3.17 – 2.95 (m, 2H, H1), 2.27 – 2.06 (m, 2H, H3), 1.90 (tt, J = 13.5, 7.2 Hz, 2H, H2), 1.79 (s, 6H, H7).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 205.06 (C5), 178.29 (C6), 146.80 (CH ar.), 143.36 (C ar.), 137.06 (C ar.), 136.79 (C ar.), 133.55 (C ar.), 132.94 (CH ar.), 130.75 (CH ar.), 129.12 (C ar.), 127.52 (CH ar.), 125.46 (CH ar.), 125.18 (CH ar.), 124.80 (CH ar.), 124.36 (CH ar.), 123.79 (CH ar.), 116.07 (CH ar.), 109.93 (CH ar.), 100.84 (CH ar.), 45.49 (C3), 41.50 (C1), 32.21 (C2), 26.80 (C4), 24.63 (C7). ESI-HRMS m/z [M⁺] calculated for C₂₅H₂₅N₄O: 397.2023, found: 397.2023.

Chlorocyanine (51)



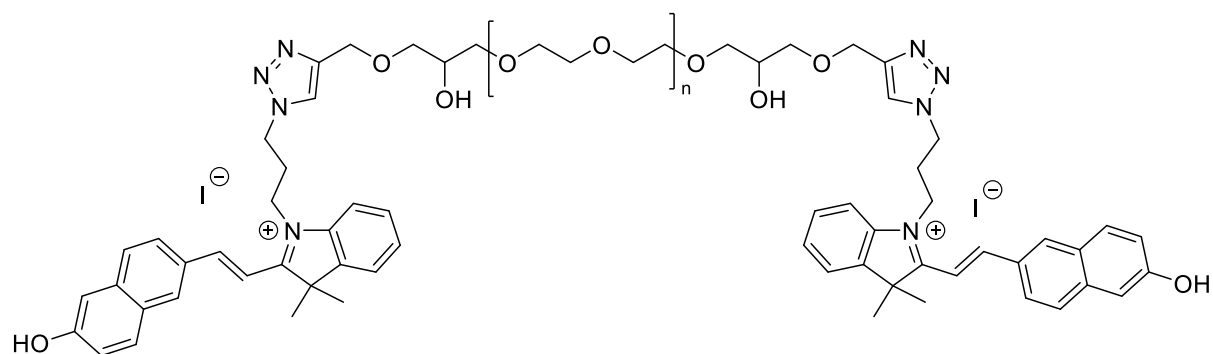
To a solution of 3-(3-Azidopropyl)-1,1,2-trimethyl-1H-indoliumiodide (500 mg, 1.34 mmol, 1.2 eq) and 5-chloro-6-hydroxy-2-naphthaldehyde (230 mg, 1.12 mmol, 1 eq) in absolute EtOH (36 mL) under a high purity nitrogen atmosphere was added four drops of pyridine. After being stirred for 24 h at 78 °C, the mixture was cooled to room temperature and concentrated in vacuo. Then the crude was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (8:2) to yield a brick red solid (465 mg, 74% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.89 (s, 1H), 8.34 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 9.2, 4.1 Hz, 3H), 7.67 – 7.53 (m, 6H), 7.44 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.18 (t, J = 7.2 Hz, 2H, **H1**), 3.88 (t, J = 5.9 Hz, 2H, **H3**), 2.31 (m, 2H, **H2**), 1.91 (s, 6H, **H7**).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 208.91 (**C5**), 182.05 (**C6**), 155.66 (CH ar.), 143.40 (C ar.), 143.01 (C ar.), 140.71 (C ar.), 135.03 (CH ar.), 134.44 (C ar.), 129.90 (CH ar.), 129.26 (C ar.), 128.84 (C ar.), 128.18 (CH ar.), 127.39 (CH ar.), 124.21 (CH ar.), 123.28 (CH ar.), 122.90 (CH ar.), 119.41 (CH ar.), 114.98 (CH ar.), 111.84 (CH ar.), 65.96 (**C3**), 52.64 (**C1**), 48.99 (**C2**), 30.22 (**C4**), 27.43 (**C7**).

MALDI-TOF MS: m/z =397.20 [M^+ H $^+$], calculated exact mass: 398.40.

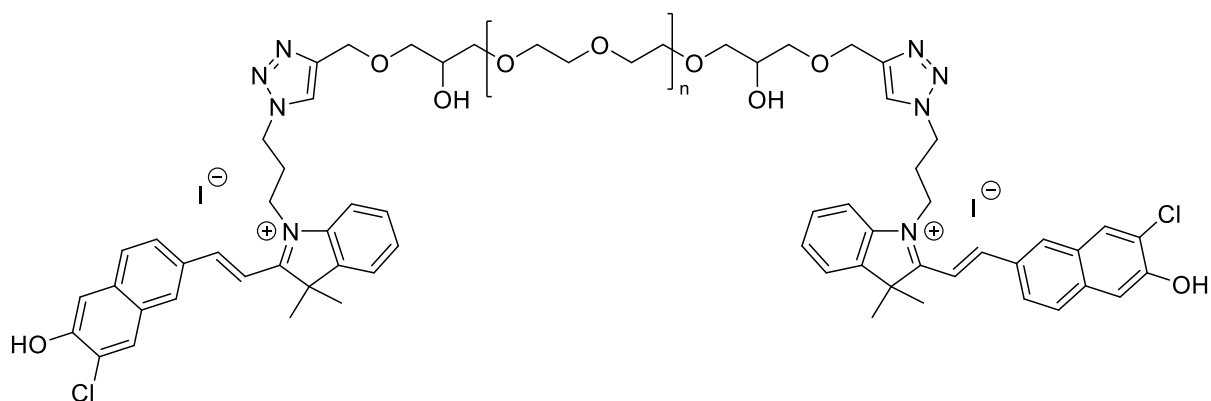
Cyanine pH probe (**52**)



To a mixture of **50** (200 mg, 0.38 mmol, 2.1 eq) and **31** (200 mg, 0.18 mmol, 1 eq) in DMF (36 mL) was added the mixture of CuSO₄ (17 mg, 0.11 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (25 mg, 0.13 mmol, 0.7 eq) dissolved on H₂O (4 mL). The mixture was stirred at room temperature for 48 hours. Then the solvent was evaporated in vacuum and the crude was purified by steric-exclusion chromatography. The fractions were collected and lyophilized to get the desired red solid (200 mg, 69% yield).

IR (cm⁻¹): 3404, 2883, 1579, 1466, 1341, 1100, 1059.

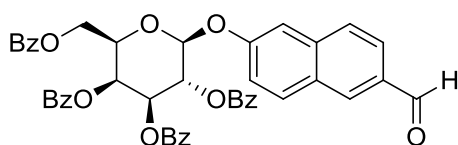
Chlorocyanine pH probe (53)



To a mixture of **51** (460 mg, 0.86 mmol, 2.2 eq) and **31** (430 mg, 0.39 mmol, 1 eq) in DMF (80 mL) was added the mixture of CuSO₄ (37 mg, 0.23 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (93 mg, 0.47 mmol, 1.2 eq) dissolved on water (20 mL). The mixture was stirred at room temperature for 48 hours. Then the solvent was evaporated in vacuum and the crude was purified by steric-exclusion chromatography. The fractions were collected and lyophilized to get the desired red solid (150 mg, 19% yield).

IR (cm⁻¹): 3440, 2877, 1466, 1341, 1106, 1061.

2-Naphthalenecarboxaldehyde, 6-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)oxy]- (54)

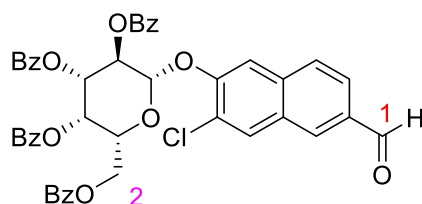


In a solution of 6-hydroxy-2-naphthaldehyde (400 mg, 2.32 mmol, 1 eq) in 15 mL of acetonitrile was added cesium carbonate (3 g, 9.29 mmol, 4 eq) and α-D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (3 g, 4.65 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 70°C during 18 hours. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified using cyclohexane/ethyl acetate (100% to 40% in cyclohexane) as eluent to give a yellow powder (1.6 g, 92% yield).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.10 (s, 1H), 8.17 – 7.76 (m, 10H), 7.69 – 7.28 (m, 14H), 6.20 – 5.99 (m, 2H), 5.85 – 5.71 (m, 1H), 5.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.92 – 4.55 (m, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.19 (CHO), 166.27 (C=O), 165.72 (C=O), 165.42 (C=O), 157.34 (C=O), 137.76 (C ar.), 134.38-133.60 (CH ar.), 131.53 (CH ar.), 30.42-129.84 (CH ar.), 129.41-128.93 (C. ar), 128.91-128.38 (CH. Ar.), 123.63 (CH ar.), 120.29 (CH ar.), 111.43 (CH ar.), 72.33 (CH gal.), 71.74 (CH gal.), 69.58 (CH gal.), 68.19 (CH gal.), 67.84 (CH gal.), 27.05 (CH_2 gal.). ESI-HRMS m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{45}\text{H}_{34}\text{O}_{11}\text{Na}$: 773.1993, found: 773.2001. $[\alpha]_D^{25} = 50$ (c 2 CHCl_3).

5-Chloro-2-Naphthalenecarboxaldehyde, 6-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]- (55)

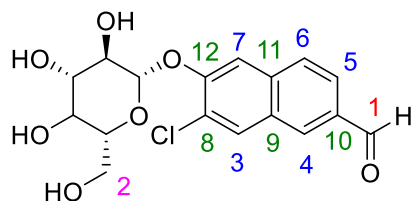


In a solution of 5-chloro-6-hydroxy-2-naphthaldehyde (500 mg, 2.43 mmol, 1 eq) in 16 mL of acetonitrile was added cesium carbonate (3.2 g, 9.71 mmol, 4 eq) and α -D-Galactopyranosyl bromide, 2,3,4,6-tetrabenzoate (1.9 g, 2.91 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred at 70°C during 23 hours. Then ethyl acetate was added and the mixture was neutralized with HCl 1M. The organic layer was washed with water and with brine, and was dried over MgSO_4 and concentrated. The crude product was purified using cyclohexane/ethyl acetate (100% to 60% in cyclohexane) as eluent to give a yellow powder (1.1 g, 58% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 10.16 (s, 1H, **H1**), 8.40 – 7.84 (m, 11H), 7.70 – 7.25 (m, 14H), 6.37 – 5.20 (m, 4H, H galactose), 5.03 – 4.43 (m, 3H, **H2** and H galactose).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform- d) δ 191.83 (**C1**), 171.85 (C ar.), 166.12-165.43 (C=O), 152.78 (C ar.), 151.65 (C ar.), 149.88 (C ar.), 134.84 – 118.69 (CH ar., C ar.), 101.50 (CH ar.), 72.31 (CH gal.), 71.58 (CH gal.), 70.29 (CH gal.), 69.39 (CH gal.), 68.05 (CH gal.), 62.36 (**C2**). MALDI-TOF MS: $m/z=784.17$ [$\text{M}+\text{Na}^+$], calculated exact mass: 808.84. $[\alpha]_D^{25} = 27$ (c 2 CHCl_3).

5-Chloro-2-Naphthalenecarboxaldehyde, 6-[(β-D-galactopyranosyl)oxy]- (56)

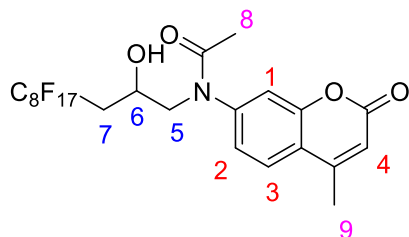


To a solution of 5-Chloro-2-Naphthalenecarboxaldehyde, 6-[(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl)oxy]- (800 mg, 1.02 mmol, 1 eq) in anhydrous methanol (95 mL) was added sodium (94 mg, 4.08 mmol, 4 eq) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 48 hours, neutralized with IR 120 H⁺ and concentrated. The residue was washed with cyclohexane in order to extract methyl esters. A beige powder was obtained used without further purification (400 mg, 100% yield).

¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 10.05 (s, 1H, **H1**), 8.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, **H5**), 7.84 (s, 1H, **H4**), 7.73 – 7.53 (m, 2H, **H6 and H7**), 7.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, **H3**), 5.88-5.21 (m, 2H, H galactose), 4.54 – 3.38 (m, 5H, **H2**, H galactose).

¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ 152.52 (**C1**), 134.84 (**C12**), 133.24 (**C5**), 129.92 (**C11**), 129.55 (**C10**), 129.39 (**C7**), 127.44 (**C9**), 126.79 (**C6**), 123.81 (**C4**), 119.53 (**C3**), 114.40 (**C8**), 74.96 (CH gal.), 72.30 (CH gal.), 72.22 (CH gal.), 70.19 (CH gal.), 64.35 (CH gal.), 52.59 (**C2**). [α]_D²⁵ = -199 (*c* 2 MeOH).

N-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoro-2-hydroxyundecyl)-N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)acetamide (57)

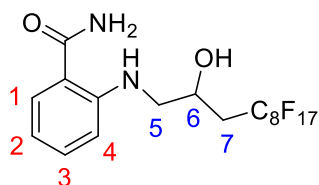


7-amino-4-methylcoumarine (110 mg, 0.68 mmol, 1 eq) and 3-perfluorooctyl-1,2-epoxypropane (717 mg, 1.51 mmol, 2.4 eq) were dissolved in 1 mL of THF and heated in microwaves at 180°C during 2 hours. The solvent was evaporated and the crude was dissolved on anhydrous pyridine (7 mL). Anhydride acetic (7 mL) was added and the

mixture was stirred during 5 hours. The solvent was evaporated and the crude was purified with cyclohexane/ethyl acetate (1:1) as eluent to give a white powder (132 mg, 28% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H, **H4**), 6.58 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H, **H3** or **H1**), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H, **H3** or **H1**), 6.02 (q, J = 1.2 Hz, 1H, **H2**), 5.53 (p, J = 5.3 Hz, 1H, **H6**), 3.54 – 3.36 (m, 2H, **H5**), 2.66 – 2.39 (m, 2H, **H7**), 2.35 (d, J = 1.2 Hz, 3H, **H8**), 2.07 (s, 3H, **H9**). ESI-HRMS m/z [$M+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{F}_{17}\text{NO}_4\text{Na}$: 716.0700, found: 716.0705.

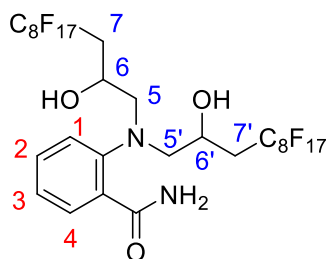
2-((4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoro-2-hydroxyundecyl)amino)benzamide (58)



2-amino-benzamide (100 mg, 0.73 mmol, 1 eq) was dissolved in 3-perfluorooctyl-1,2-epoxypropane (700 mg, 1.47 mmol, 2 eq) and heated in microwaves at 170°C during 2 hours. The solvent was evaporated and the crude was purified with cyclohexane/ethyl acetate (1:1) as eluent to give a yellow powder (295 mg, 66% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.40-7.20 (m, 2H, **H1**, **H3**), 6.71 – 6.66 (m, 1H, **H2**, **H4**), 6.62 – 6.55 (m, 1H), 4.30 (s, 1H, **H6**), 3.37-2.91 (m, 2H, **H5**), 2.48-2.05 (m, 2H, **H7**). ESI-HRMS m/z [$M+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: 635.0598, found: 635.0602.

2-(bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecyl)amino)benzamide (59)

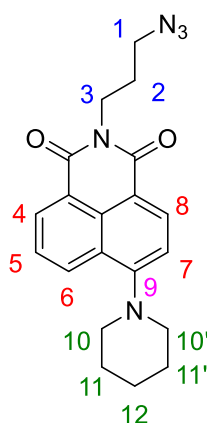


2-amino-benzamide (100 mg, 0.73 mmol, 1 eq) was dissolved in 3-perfluorooctyl-1,2-epoxypropane (700 mg, 1.47 mmol, 2 eq) and heated in microwaves at 170°C during 2 hours. The solvent was evaporated and the crude was purified with cyclohexane/ethyl acetate (1:1) as eluent to give a yellow powder (268 mg, 34% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.65-7.61 (m, 1H, **H1**), 7.52 – 7.42 (m, 1H, **H3**), 7.12-7.05 (m, 1H, **H2**), 6.98 – 6.89 (m, 1H, **H4**), 4.75 – 4.64 (m, 1H, **H6** and **H6'**), 3.62 – 3.28 (m, 2H, **H5** and **H5'**), 2.41 – 2.10 (m, 2H, **H7** and **H7'**).

ESI-HRMS m/z [$M+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{18}\text{F}_{34}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: 1111.0667, found: 1111.0676.

4-Piperidinyl-N-azidopropyl-1,8-naphthalimide (60)

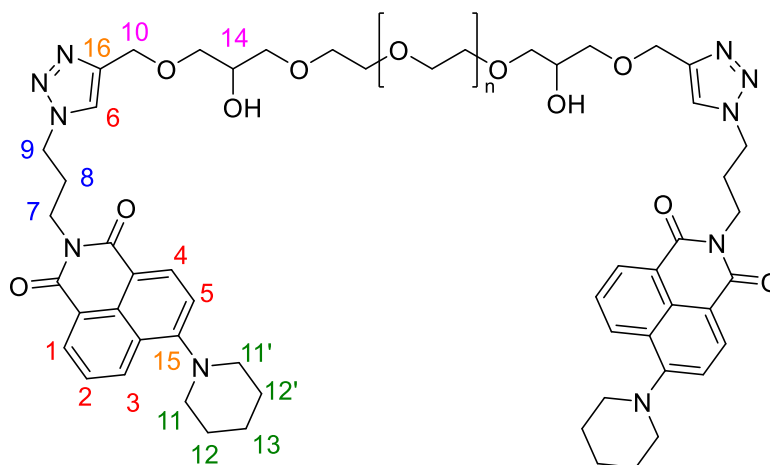


A mixture of 4-bromo-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (1.2 g, 3.35 mmol) in piperidine (50 mL) was stirred at 100 °C during 24 hours. Then the mixture was cooled to room temperature and concentrated. The residue product was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography using a solution of cyclohexane/ethyl acetate (10:0 to 5:5) as eluent to give yellow powder (1.0 g, 82% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.56 (d, $J = 7.3$ 1H, **H4 or H6**), 8.48 (d, $J = 8.2$, 1H, **H4 or H6**), 8.38 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, **H7 or H8**), 7.66 (dd, $J = 8.5$, 7.2 Hz, 1H, **H5**), 7.16 (d, $J = 8.2$, 1H, **H7 or H8**), 4.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, **H3**), 3.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, **H1**), 3.22 (m, 4H, **H10 and H10'**), 2.09 – 1.99 (m, 4H, **H11 and H11'**), 1.88 (m, 2H, **H12**), 1.72 (m, 2H, **H2**).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 164.73 (C=O), 164.21 (C=O), 157.58 (**C9**), 132.95 (CH ar.), 131.27 (CH ar.), 130.91 (CH ar.), 130.09 (C ar.), 126.39 (C ar.), 125.49 (CH ar.), 123.05 (C ar.), 115.79 (C ar.), 114.86 (CH ar.), 54.67 (**C1**), 49.62 (**C3**), 37.76 (**C2**), 27.87 (**C10, C10'**), 26.34 (**C11, C11'**), 24.46 (**C12**). ESI-HRMS m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}$: 386.1587, found: 386.1589.

Amphiphilic probe (61)

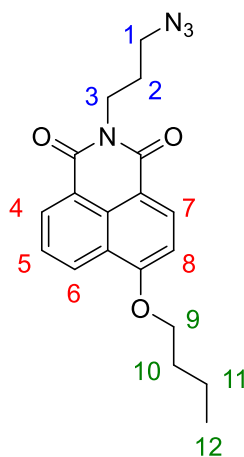


To a mixture of 4-piperidinyl-*N*-azidopropyl-1,8-naphthalimide (300 mg, 0.83 mmol, 2.2 eq) and alkyne-terminated poly(ethylene glycol) (413 mg, 0.38 mmol, 1 eq) in DMF (78 mL) was added the mixture of CuSO_4 (37 mg, 0.23 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (94 mg, 0.47 mmol, 1.2 eq) dissolved on H_2O (8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated and the crude was purified by steric-exclusion chromatography (G15). The fractions are collected and lyophilized to get the desired yellow solid (550 mg, 85% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.52 – 8.33 (m, 3H, **H1, H2 and H4**), 8.11 (s, 1H, **H6**), 7.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, **H5**), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, **H2**), 4.50 – 4.39 (m, 2H, **H10**), 4.13 – 3.99 (m, 2H, **H7**), 3.74 (dd, $J = 5.8$, 4.0 Hz, 1H, **H9**), 3.60-3.47 (m, 150H, PEG, **H14**), 2.30 – 2.13 (m, 4H, **H11 and H11'**), 1.97-1.75 (m, 6H, **H12, H12'** and **H13**), 1.72-1.60 (m, 2H, **H8**).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.76 (C=O), 163.21 (C=O), 156.79 (C15), 143.91 (C16), 132.32 (CH ar), 130.64 (CH ar), 129.30 (C ar), 129.29 (CH ar), 125.85 (CH ar), 125.49 (C ar), 123.84 (CH ar), 122.61 (C ar.), 115.10 (C ar), 114.95 (CH ar), 72.35 (CH_2 PEG), 69.80 (CH_2 PEG), 68.55 (C14), 60.23 (CH_2 PEG), 54.01 (C9), 48.83 (C7), 47.57 (C8), 27.13 (C11, C11'), 25.73 (C12, C12'), 23.86 (C13). IR (cm^{-1}): 3423, 2884, 1652, 1466, 1341, 1102, 1060.

4-Butoxy-N-azidopropyl-1,8-naphthalimide (62)



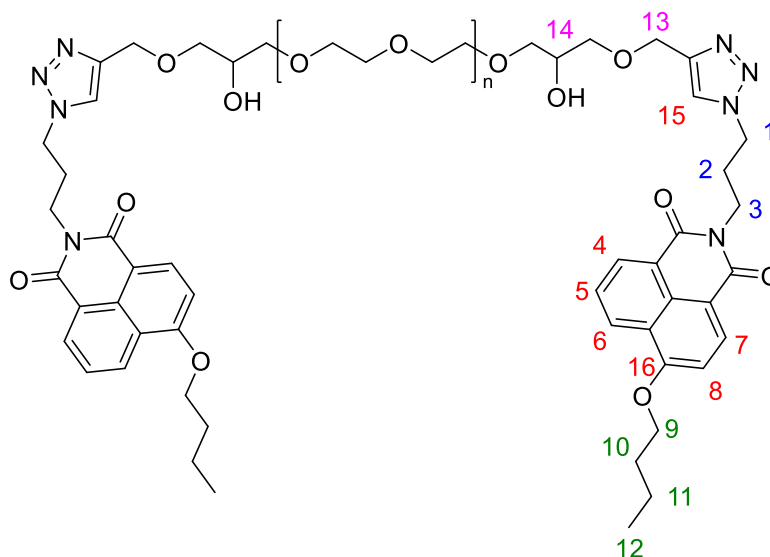
1H-Benz[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione, 2-(3-azidopropyl)-6-bromo- (300 mg, 0.84 mmol, 1 eq), sodium (37 mg, 1.68 mmol, 2 eq) and copper sulfate (40 mg, 0.25 mmol, 0.3 eq) were mixed in 1-butanol (10 mL). The reaction mixture was refluxed under argon for 20 hours. After cooling, ethyl acetate and HCl 1M was added and the mixture was extracted. The organic layer was washed with water and was dried over MgSO_4 and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography using a solution of cyclohexane/ethyl acetate (85:15) as eluent to give orange oil (250 mg, 68% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{Chloroform-}d$) δ 8.63 – 8.47 (m, 3H, H4, H6, H8), 7.69 (ddd, J = 8.3, 7.3, 2.5 Hz, 1H, H7), 7.02 (dd, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H, H5), 4.27 (ddd, J = 8.6, 5.0, 2.1 Hz, 4H, H3, H9), 3.42 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H1), 2.11 – 1.88 (m, 4H, H10, H11), 1.72 – 1.53 (m, 2H, H2), 1.05 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H12).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) 164.67 (C=O), 164.05 (C=O), 160.63 (C-O), 133.82 (CH ar), 131.73 (CH ar), 129.51 (CH ar), 129.01 (C ar), 125.88 (CH ar), 123.69 (C ar), 122.24 (C

ar), 114.58 (C ar), 105.97 (CH ar), 68.93 (C1), 49.59 (C3), 37.05 (C2), 31.12 (C9), 27.83 (C10), 19.48 (C11), 13.96 (C12). ESI-HRMS m/z [M+] calculated for C₁₉H₂₀N₄O₃Na: 375.1428, found: 375.1428.

Amphiphilic probe (63)



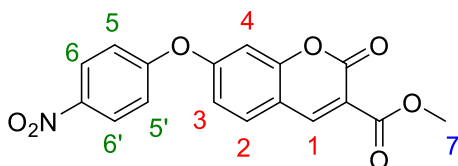
To a mixture of 4-butoxy-N-azidopropyl-1,8-naphthalimide (225 mg, 0.64 mmol, 2.2 eq) and alkyne-terminated poly(ethylene glycol) (320 mg, 0.29 mmol, 1 eq) in DMF (63 mL) was added the mixture of CuSO₄ (28 mg, 0.17 mmol, 0.6 eq) and sodium ascorbate (69 mg, 0.35 mmol, 1.2 eq) dissolved on H₂O (8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 40 hours. Then the solvent was evaporated and the crude was purified by steric-exclusion chromatography (G25). The fractions are collected and lyophilized to get the desired orange solid (221 mg, 51% yield).

¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.63-8.38 (m, 3H, H4, H6, H8), 8.10 (s, 1H, H15), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H7), 7.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 4.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H13), 4.33 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H3), 4.22 (dd, *J* = 9.4, 4.6 Hz, 2H, H9), 3.87 (dd, *J* = 5.8, 3.7 Hz, 1H, H14), 3.68-3.56 (m, 80H, CH₂ PEG), 3.46 – 3.37 (m, 2H, H1), 2.40-1.96 (m, 4H, H10, H11), 1.64 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2), 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H12).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.75 (C=O), 163.09 (C=O), 159.78 (C16), 133.35 (CH ar), 133.22 (CH ar), 131.05 (CH ar), 130.94 (C ar), 128.31 (CH ar), 128.26 (C ar), 126.35 (CH ar), 122.89 (C ar), 121.98 (C ar), 114.08 (C ar), 106.83 (CH ar), 72.35 (CH₂ PEG), 69.79

(CH₂ PEG), 68.69 (C14), 63.13 (C1), 60.22 (CH₂ PEG), 48.83 (C3), 47.57 (C2), 30.47 (C9), 27.10 (C10), 18.85 (C11), 13.72 (C12). IR (cm⁻¹): 3446, 2868, 1655, 1453, 1350 1088.

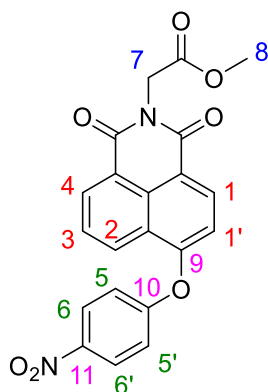
Methyl-6-chloro-7-(4-nitrophenoxy)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (64)



2H-1-Benzopyran-3-carboxylic acid, 3,4-dihydro-7-hydroxy-2-oxo-, methyl ester (300 mg, 1.36 mmol, 1 eq), 1-fluoro-4-nitrobenzene (290 μ L, 2.72 mmol, 2 eq) and potassium carbonate (528 mg, 4.09 mmol, 3 eq) was dissolved in 10 mL of anhydrous DMF. The mixture was stirred at 120°C during 24 hours. The crude product was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (4:1) as eluent to give beige powder (30 mg, 6% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.85 (s, 1H, H1), 8.33 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H6 and H6'), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H2), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H5 and H5'), 7.27 (s, 1H, H4), 7.22 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H3), 3.84 (s, 3H, H7).

Methyl 2-(6-(4-nitrophenoxy)-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate (65)

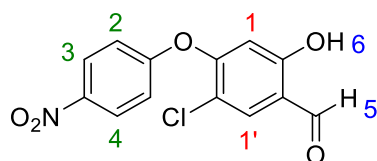


Methyl 2-(6-hydroxy-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate (450 mg, 1.58 mmol, 1 eq), 1-fluoro-4-nitrobenzene (335 μ L, 2.66 mmol, 2 eq) and cesium carbonate (1.0 g, 3.15 mmol, 2 eq) was dissolved in 10 mL of anhydrous DMF. The mixture was stirred at 90°C during 29 hours. Iced water was added and the mixture was extracted with ethyl acetate (x3). The organic layer was dried over MgSO₄, concentrated and purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (4:1) as eluent. The desired product obtained was a yellow solid (50 mg, 8% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (d, *J* = 7.3, 1H, H4), 8.63 – 8.54 (m, 2H, H1 and H2), 8.40 – 8.32 (m, 2H, H6 and H6'), 7.84 (dd, *J* = 8.4, 7.4 Hz, 1H, H3), 7.29 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, H5 and H5'), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H1'), 4.99 (s, 2H, H7), 3.82 (s, 3H, H8).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.53 (C=O), 163.63 (C=O), 161.82 (C=O), 160.95 (C19 or C10), 157.43 (C9 or C10), 144.55 (C11), 132.79-132.62 (CH ar), 130.03 (C ar), 128.54 (CH ar), 127.32 (CH ar), 126.37 (CH ar), 124.57 (C ar), 122.45 (C ar), 119.53 (CH ar), 118.32 (C ar), 113.89 (CH ar), 52.55 (C7), 41.25 (C8). ESI-HRMS *m/z* [M+H⁺] calculated for C₂₁H₁₅N₂O₇: 407.0874, found: 407.0872

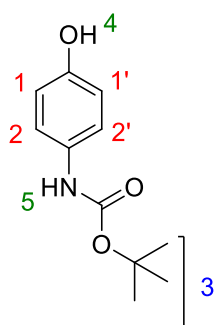
5-chloro-2-hydroxy-4-(4-nitrophenoxy)benzaldehyde (66) [CAS 290352-37-3]



5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldehyde (500 mg, 2.90 mmol, 1 eq), 1-fluoro-4-nitrobenzene (277 μ L, 2.62 mmol, 0.9 eq) and potassium carbonate (375 mg, 2.90 mmol, 1 eq) was dissolved in 5 mL of anhydrous DMSO. The mixture was stirred at 120°C during 20 hours. Then the mixture was cooled to room temperature and water was added. The precipitate was filtrated and recrystalized on ethanol to give the desired brown solid (200 mg, 29% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.19 (s, 1H, H6), 10.01 (s, 1H, H5), 8.28 – 8.06 (m, 3H, H2, H3 and H4), 7.18 – 7.00 (m, 2H, H1 and H1').

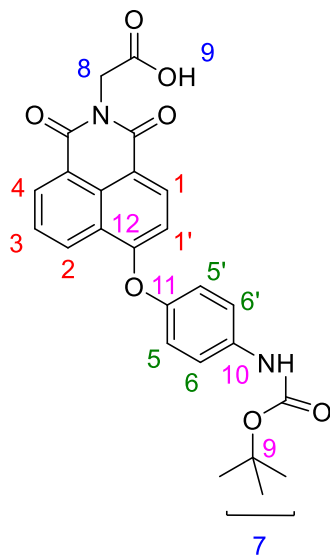
Tert-butyl 4-hydroxyphenylcarbamate (67) [CAS 54840-15-2]



Di-*tert*-butyl dicarbonate (2.0 g, 1.83 mmol, 1 eq) was dissolved in 20 mL of THF at 0°C. 4-aminophenol (4.4 g, 2.0 mmol, 1.1 eq) was added and the mixture was stirred 22 hours at room temperature. The product was concentrated in vacuo and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 and concentrated to give a brown powder with quantitative yield.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.04 (s, 1H, H4), 8.96 (s, 1H, H5), 7.20 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H2 and H2'), 6.64 (d, J = 6.8 Hz, 2H, H1 and H1'), 1.45 (s, 9H, H3).

Methyl 2-(6-(*Tert*-butyl 4-phenoxy-carbamate)-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate (68)

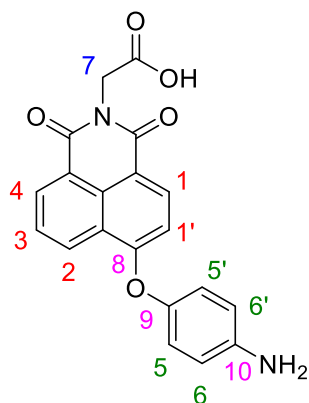


4-bromo-N-carboxymethyl-1,8-naphthalimide (500 mg, 1.5 mmol, 1 eq) and *tert*-butyl 4-hydroxyphenylcarbamate (659 mg, 3.15 mmol, 2.1 eq) were taken together with potassium carbonate (388 mg, 3.0 mmol, 2 eq) in dry DMF (20 mL) and stirred at 110 °C for 19 h. The reaction was cooled to room temperature and HCl 1M was added. The resulting precipitate was filtrated and purified by column chromatography using silica gel using ethyl acetate/ methanol / water (90:5:3) as eluent to obtain pure product as brown solid (120 mg, 17% yield).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 9.09 (s, 1H, H9), 8.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H4), 8.63 (d, J = 6.3 Hz, 1H, H1), 8.44 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H2), 7.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H3), 7.58 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H6 and H6'), 7.19 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H5 and H5'), 6.94 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H1'), 4.86 (s, 2H, H8), 1.56 (s, 9H, H7).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 171.55 (C=O), 165.02 (C=O), 164.35 (C=O), 161.87 (C=O), 155.13 (C12 or C11), 150.37 (C12 or C11), 138.45 (C10), 134.16 (CH ar), 132.82 (CH ar), 132.29 (CH ar), 130.42 (C ar), 129.86 (CH ar), 129.27 (CH ar), 127.56 (CH ar), 124.66 (C ar), 122.72 (C ar), 122.41 (CH ar), 121.42 (CH ar), 116.28 (C ar), 110.75 (CH ar), 81.10 (C9), 42.02 (C8), 28.71 (C7). ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₂₅H₂₂N₂O₇Na: 485.1319, found: 485.1318.

Methyl 2-(6-(4-aminophenyl)-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate (69)



Methyl 2-(6-(Tert-butyl 4-phenoxy carbamate)-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)acetate was dissolved in TFA (100 mL) and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was evaporated to afford the pure product as brown solid in quantitative yield.

^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.67 (d, J = 8.4, 1H, **H4**), 8.61 – 8.55 (m, 1H, **H1**), 8.43 (d, J = 8.3 Hz, 1H, **H2**), 7.93 – 7.79 (m, 1H, **H3**), 7.59 – 7.38 (m, 4H, **H5**, **H5'**, **H6**, **H6'**), 7.02 (d, J = 8.3 Hz, 1H, **H1'**), 4.84 (s, 2H, **H7**).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 170.25 (C=O), 163.80 (C=O), 163.17 (C=O), 159.27 (**C9** or **C8**), 155.06 (**C9** or **C8**), 133.19 (**C10**), 132.65 (CH ar), 131.78 (CH ar), 131.13 (CH ar), 131.01 (C ar), 129.51 (C ar), 128.41 (CH ar), 128.05 (CH ar), 126.74 (CH ar), 124.84 (CH ar), 123.92 (C ar), 121.90 (CH ar), 116.46 (C ar), 111.16 (CH ar), 40.69 (**C7**). ESI-HRMS m/z [$M+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$: 363.0975, found: 363.0975.

Annexes

Annexe 1 : Coefficients d'extinction molaire

1.1 Sonde naphthalimide **23**, forme acide

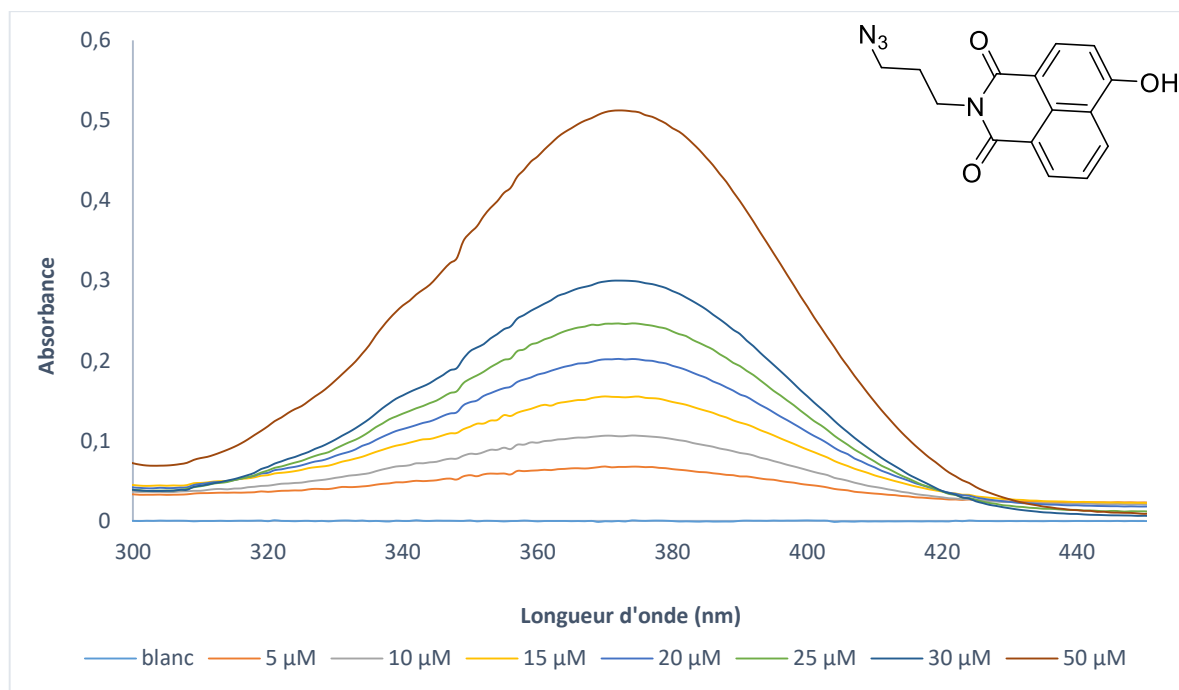


Figure 104 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde naphthalimide **23**. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=2.

Absorbance max (370 nm)	Concentration (μM)
0,510414183	50
0,298822671	30
0,24612391	25
0,201684266	20
0,15541108	15
0,106326789	10
0,067635745	5
-0,000700995	0

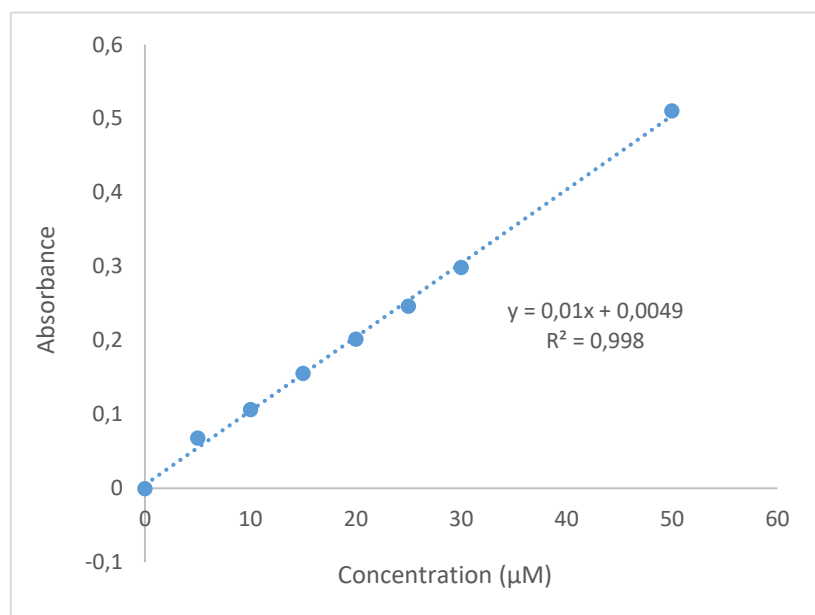


Figure 105 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde naphthalimide **23** à pH=2.

1.2 Sonde naphthalimide **23**, forme basique

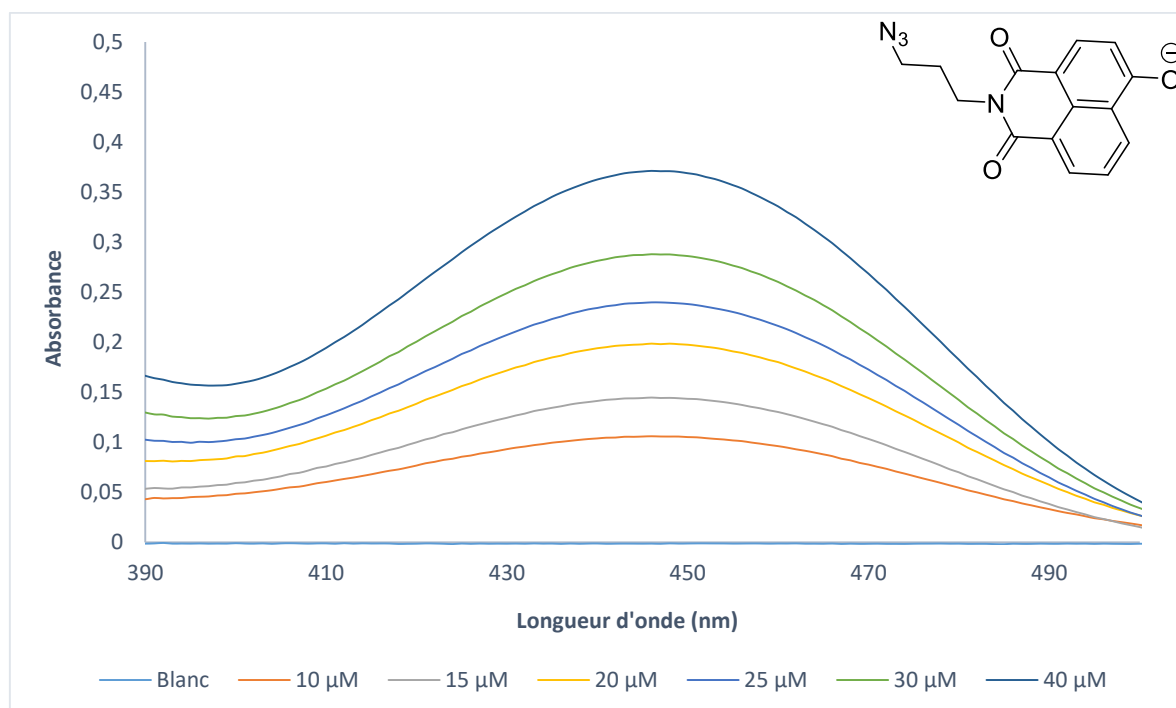


Figure 106 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde naphthalimide **23**. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=10.

Absorbance max (446 nm)	Concentration (μM)
0,37133953	40
0,288028687	30
0,239933342	25
0,19874008	20
0,144628122	15
0,106184289	10
-0,000528529	0

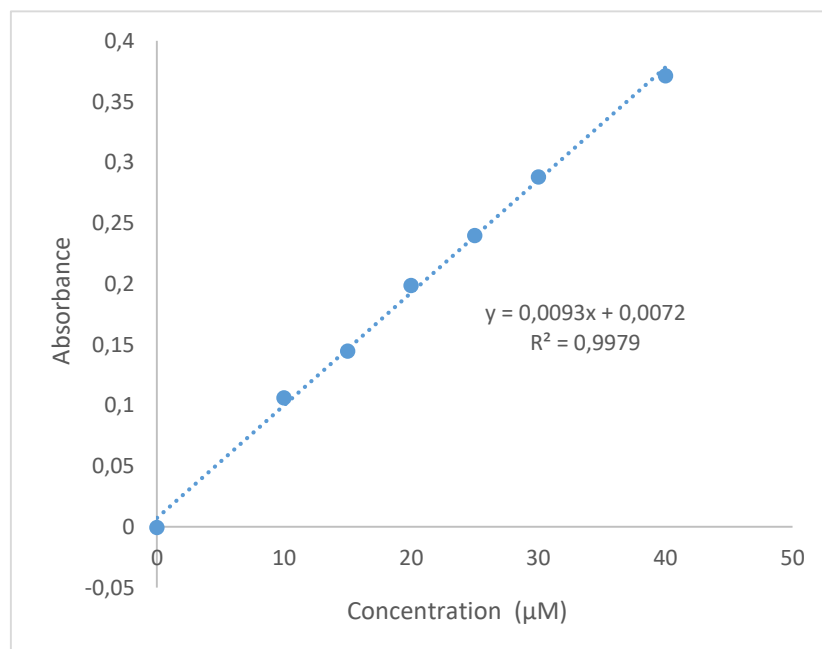


Figure 107 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde naphthalimide **23** à

1.3 Sonde coumarine 3, forme acide

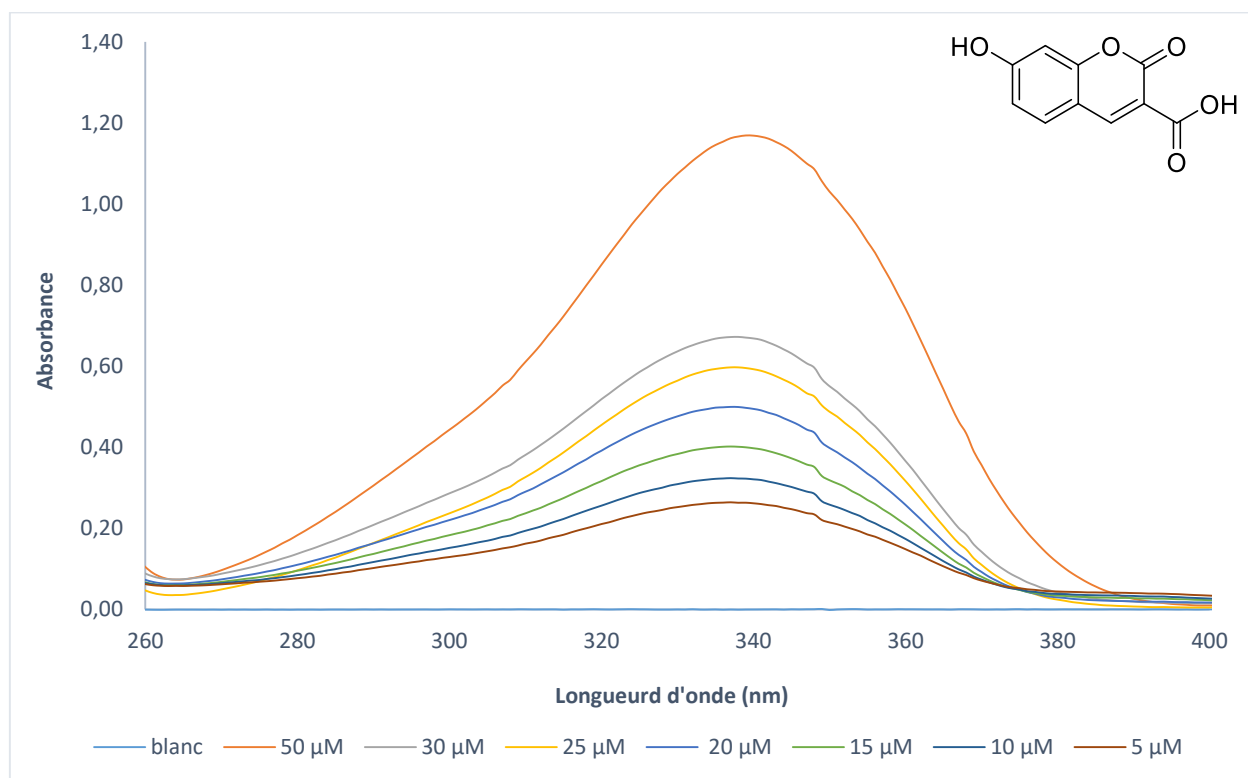


Figure 108 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde coumarine 3. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=2.

Absorbance max (338 nm)	Concentration (μM)
1,166386677	50
0,672541754	30
0,597339491	25
0,499288652	20
0,401509326	15
0,323415434	10
0,000390961	0

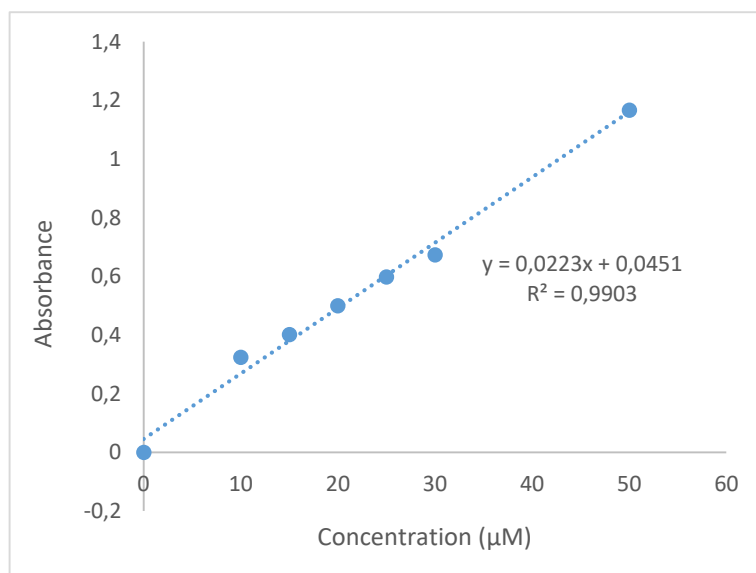


Figure 109 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde coumarine 3 à pH=2.

1.4 Sonde coumarine 3, forme basique

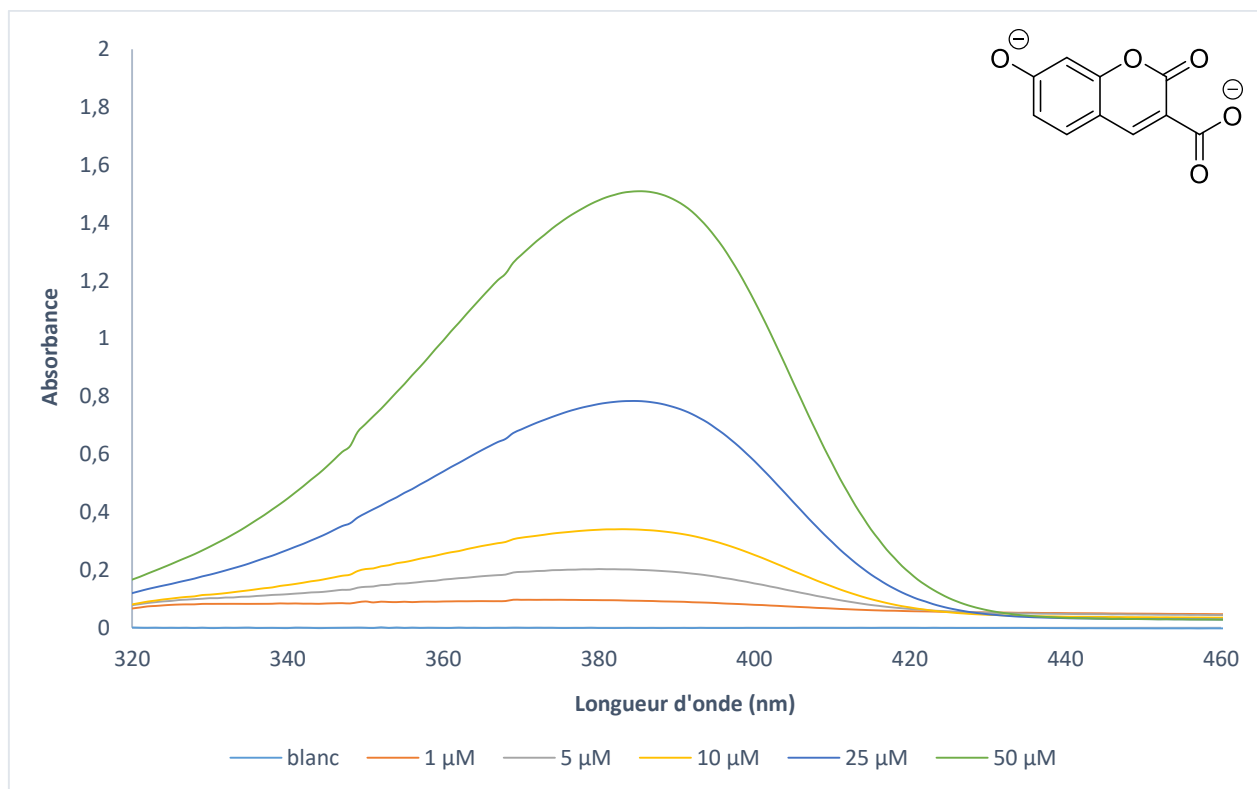


Figure 110 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde coumarine 3. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=10.

Absorbance max (385 nm)	Concentration (μM)
1,509504676	50
0,783841729	25
0,339684844	10
0,199882463	5
0,093521871	1

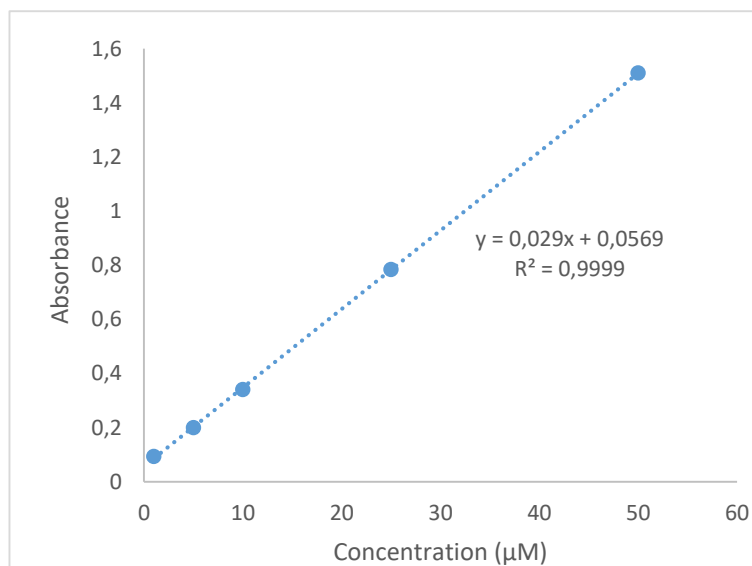


Figure 111 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde coumarine 3 à pH=10.

1.5 Sonde chlorocoumarine **38**, forme acide

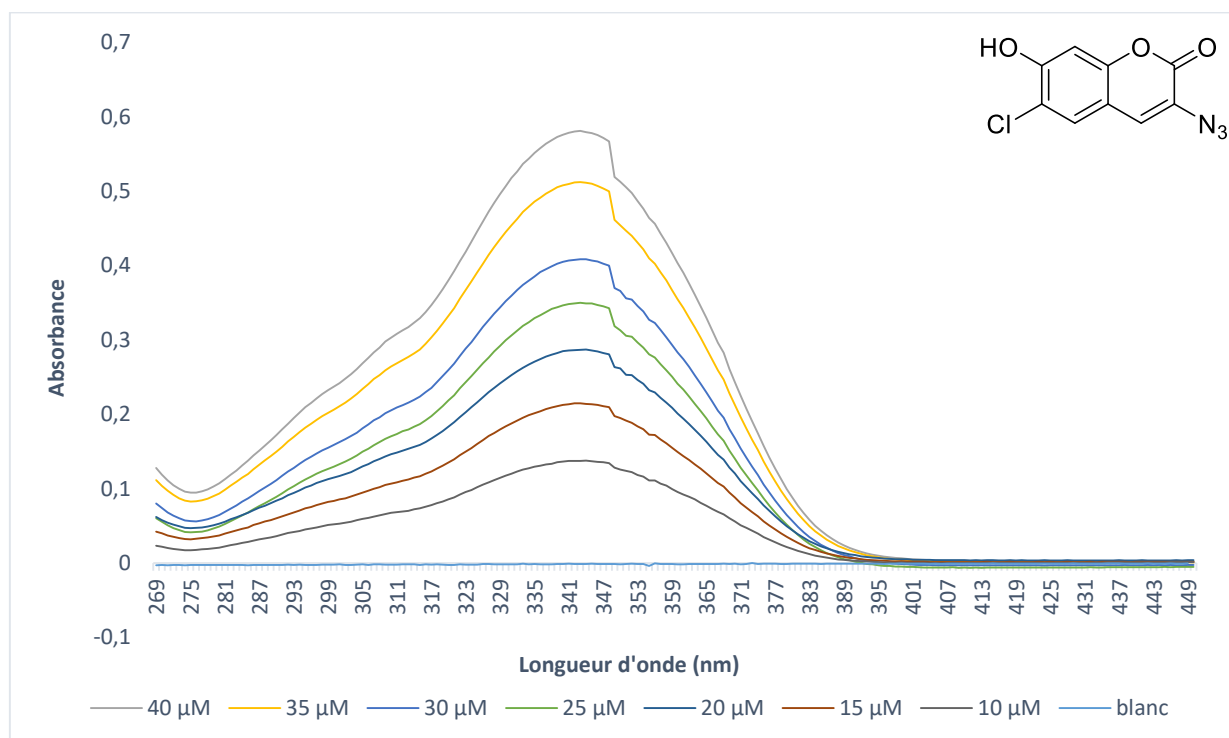


Figure 112 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde chlorocoumarine **38**. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=2.

Absorbance max (343 nm)	Concentration (μM)
0,580866337	40
0,51190269	35
0,408352166	30
0,349759638	25
0,286755413	20
0,214981958	15
0,137387097	10
-0,000970674	0

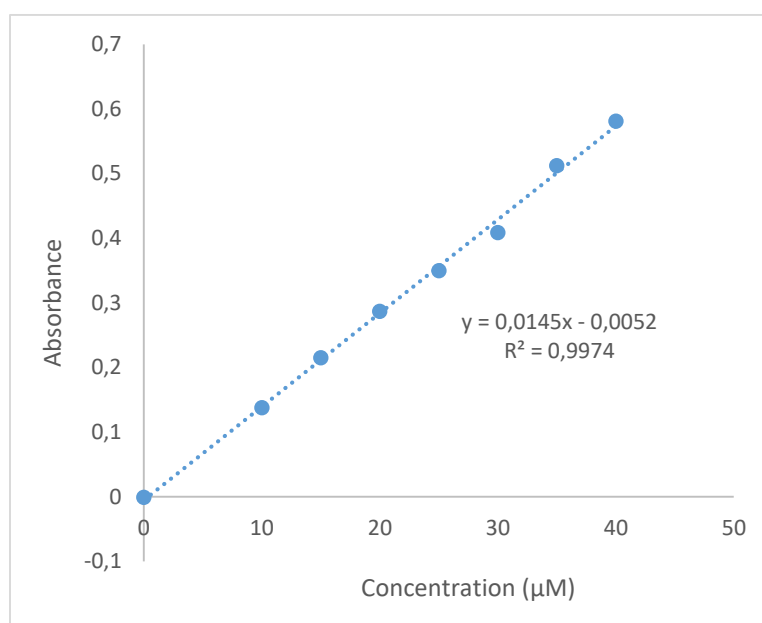


Figure 113 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde chlorocoumarine **38** à pH=2.

1.6 Sonde chlorocoumarine **38**, forme basique

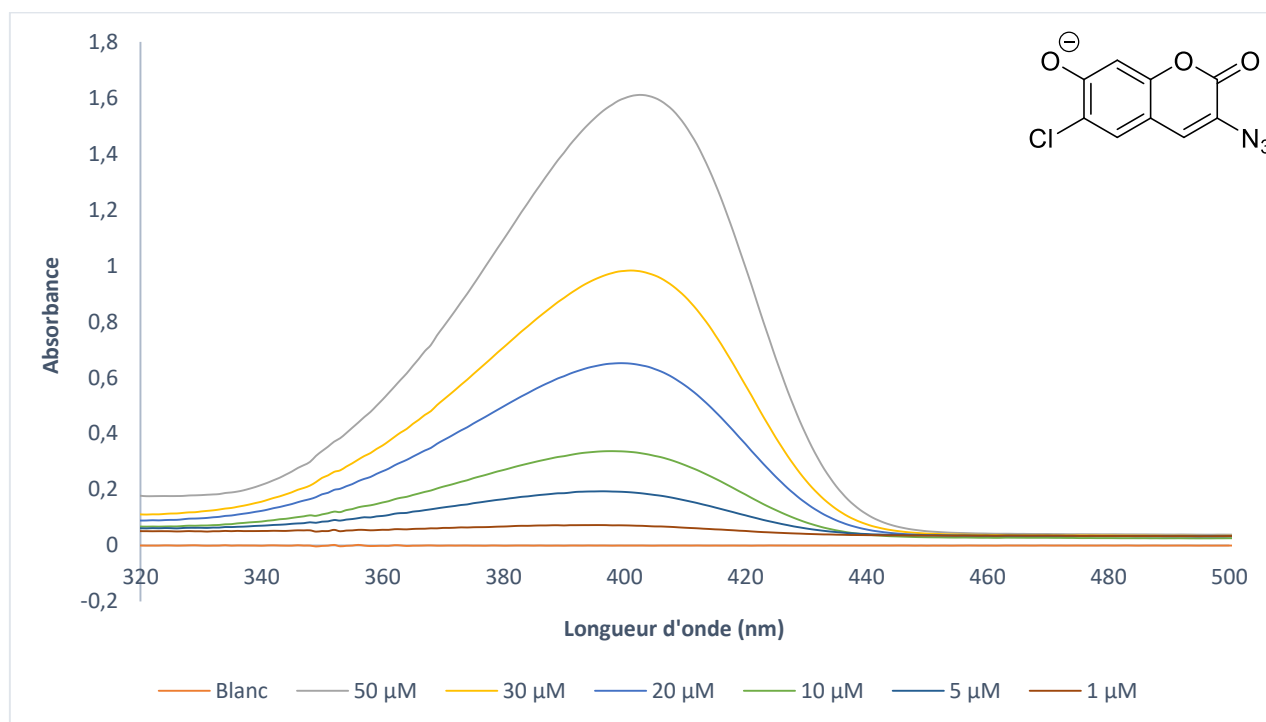


Figure 114 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde chlorocoumarine **38**. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=10.

Absorbance max (403 nm)	Concentration (μM)
1,610103369	50
0,978471041	30
0,642844081	20
0,328747422	10
0,186667189	5
0,070043817	1
-6,74E-05	0

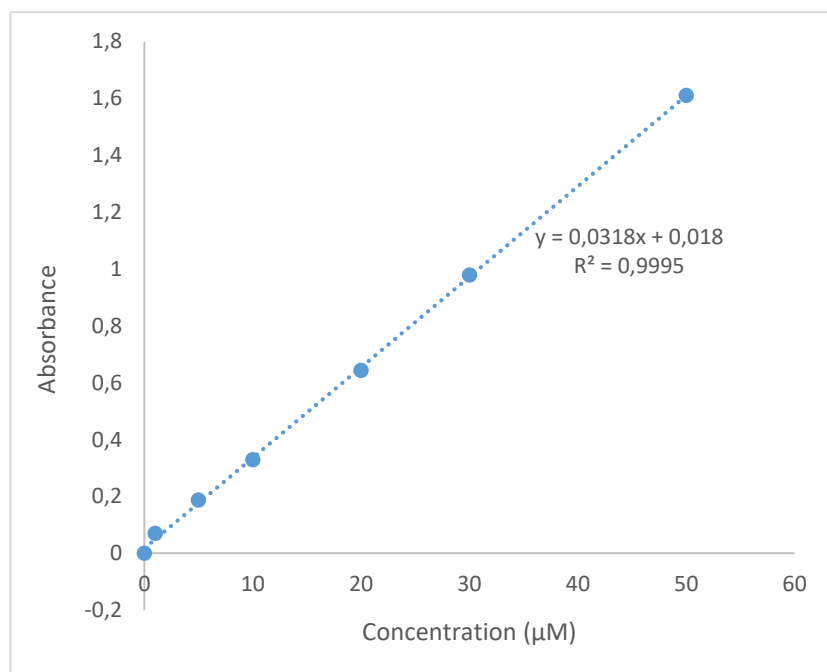


Figure 115 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde chlorocoumarine **38** à pH=10.

1.7 Sonde cyanine 50, forme acide

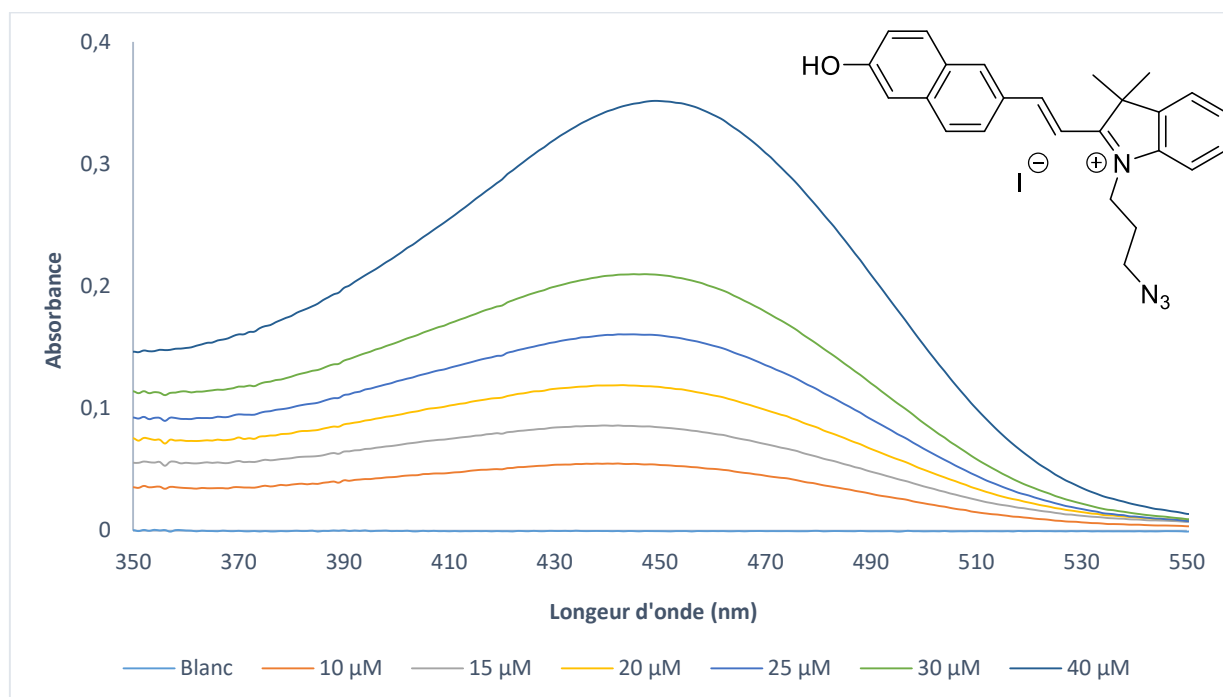


Figure 116 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde cyanine 50. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=2.

Absorbance max (440 nm)	Concentration (μM)
0,208522841	30
0,160179555	25
0,118843287	20
0,085939296	15
0,054919451	10
-0,000406013	0

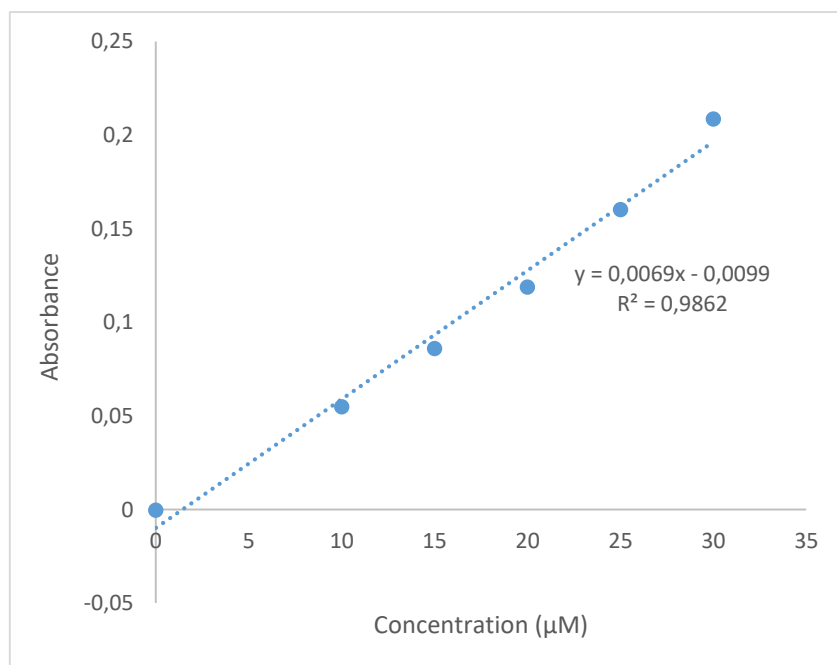


Figure 117 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde cyanine 50 à pH=2.

1.8 Sonde cyanine 50, forme basique

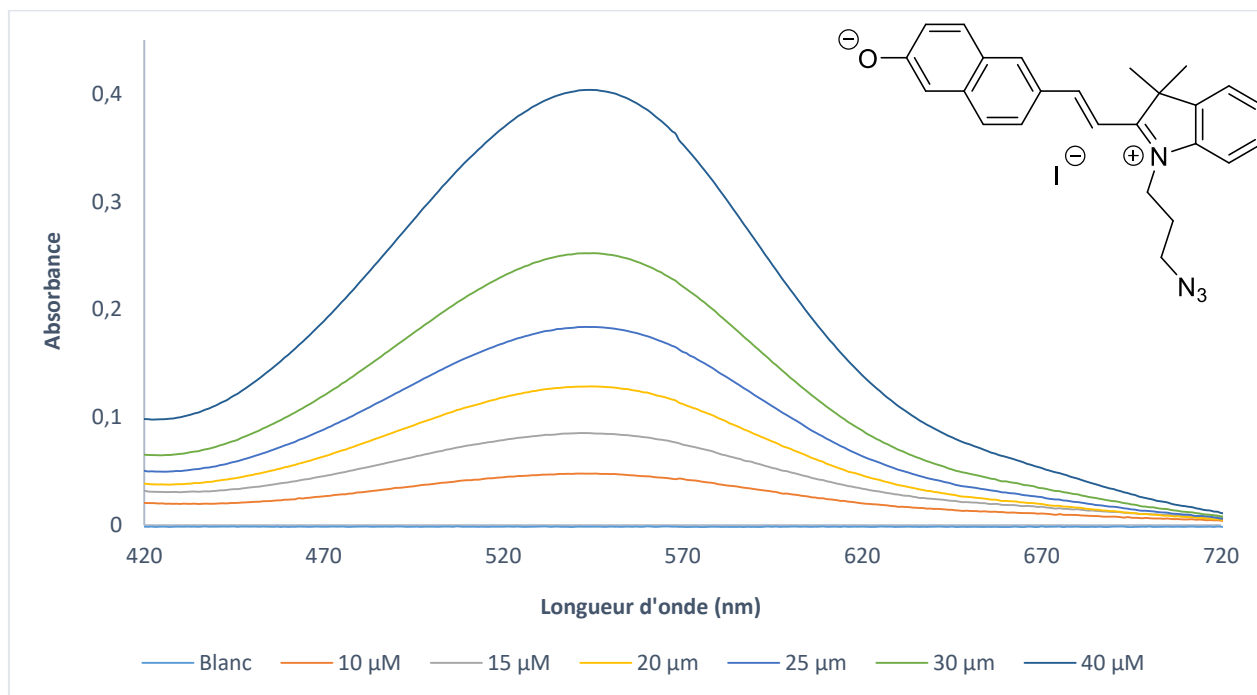


Figure 118 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde cyanine 50. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=10.

Absorbance max (546 nm)	Concentration (μM)
0,40344879	40
0,252125859	30
0,183768287	25
0,128670573	20
0,084957108	15

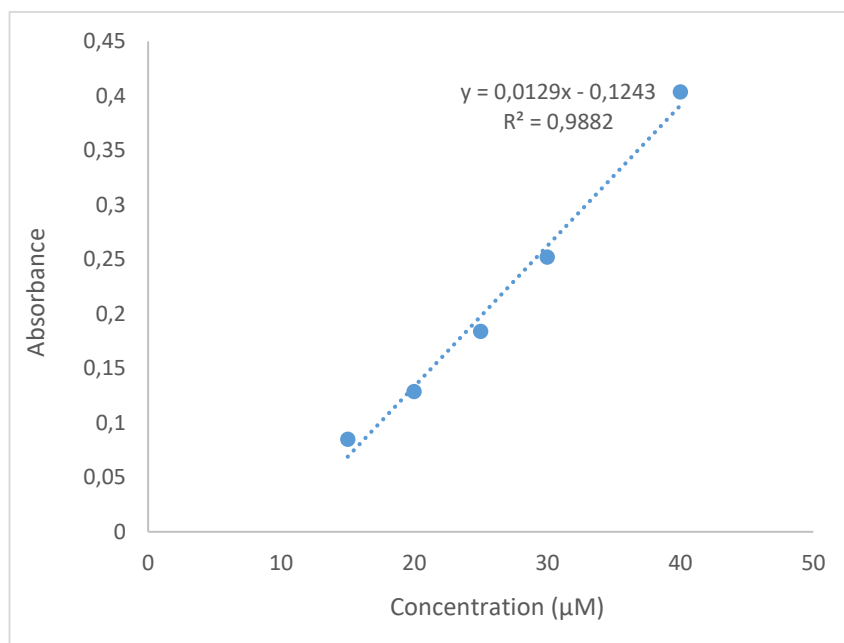


Figure 119 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde cyanine 50 à pH=10.

1.9 Sonde chlorocyanine 51, forme acide

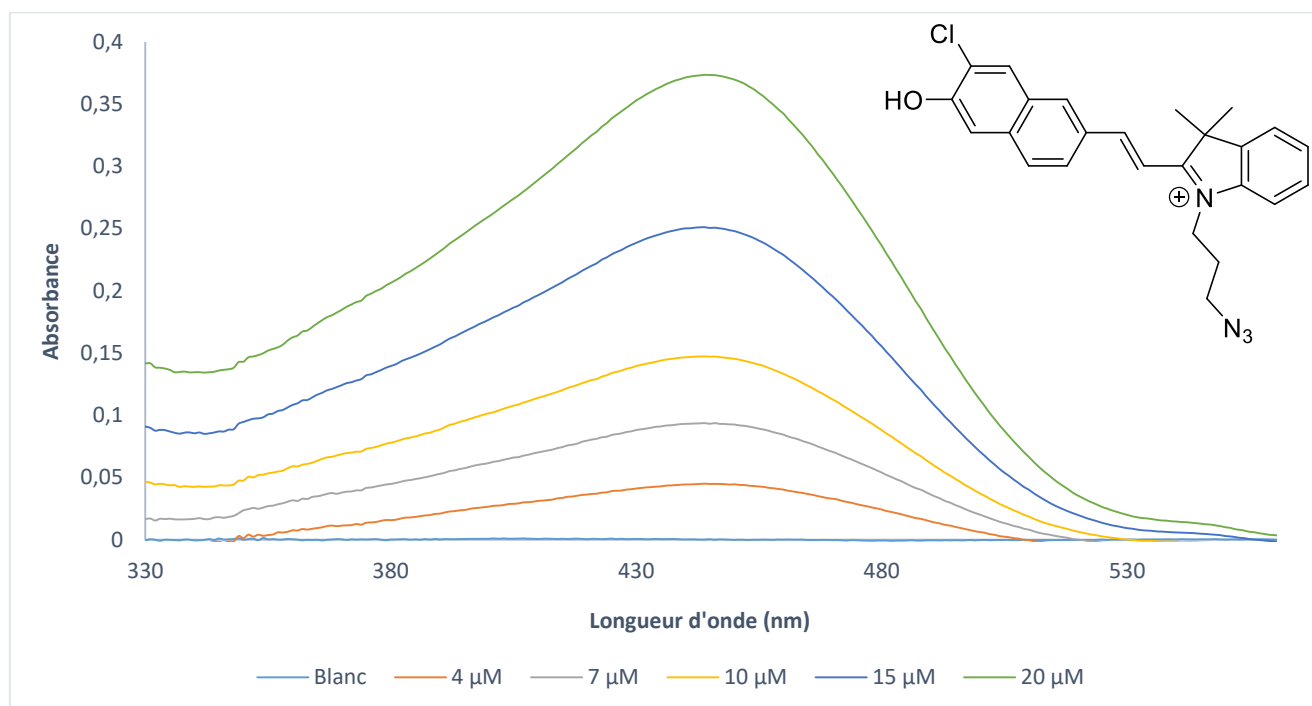


Figure 120 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde chlorocyanine 51. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=2.

Absorbance max (444 nm)	Concentration (μM)
0,251083881	15
0,14718692	10
0,09373492	7
0,044877466	4
2,32E-05	0

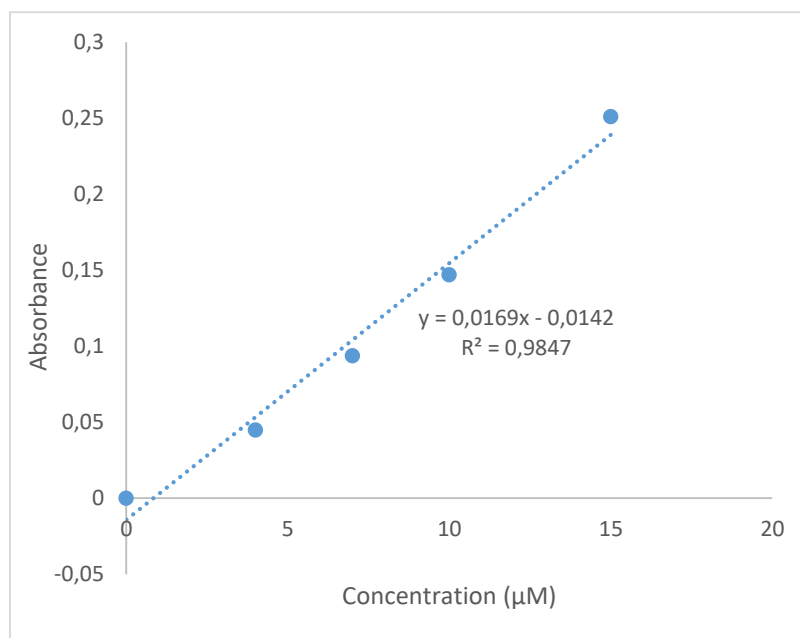


Figure 121 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde chlorocyanine 51 à pH=2.

1.10 Sonde chlorocyanine 51, forme basique

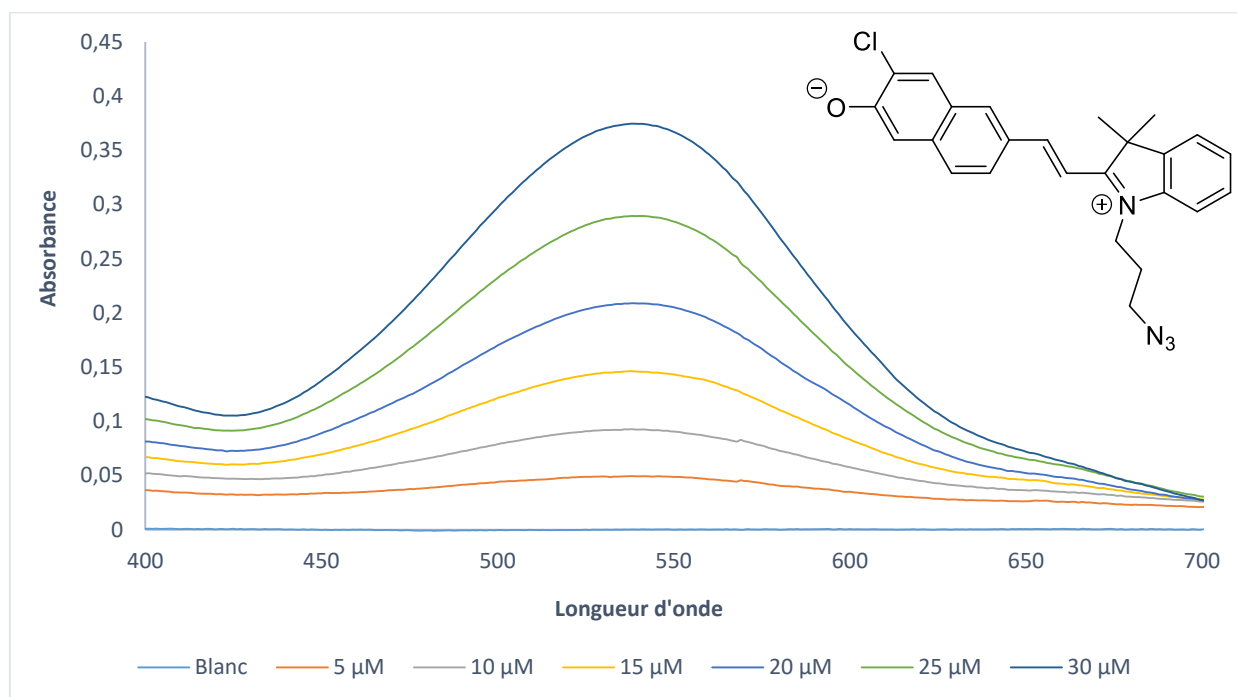


Figure 122 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration pour la sonde chlorocyanine 51. Les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de Britton-Robins à pH=10.

Absorbance max (538 nm)	Concentration (μM)
0,289406449	25
0,208813593	20
0,146338448	15
0,092757814	10
0,049363129	5
0,000184373	0

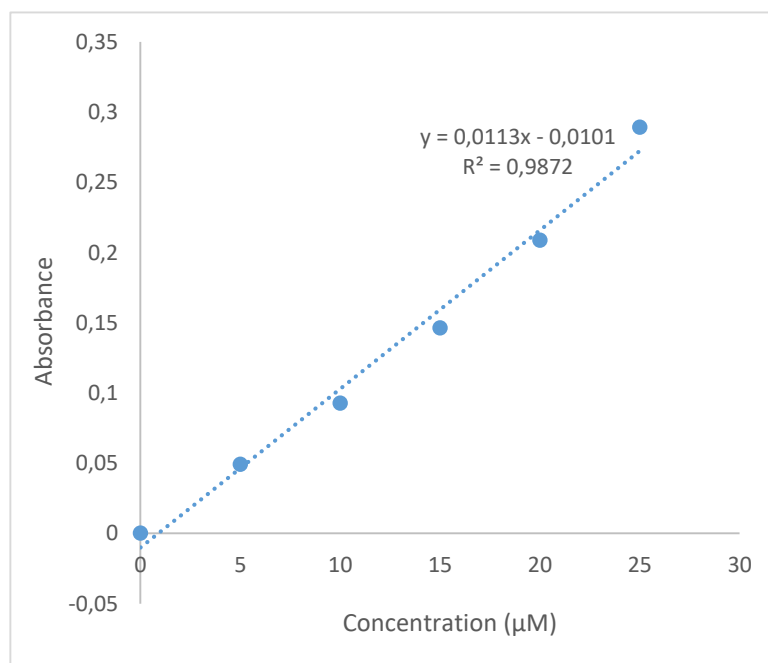


Figure 123 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde chlorocyanine 51 à

1.11 Sonde fluorée 59

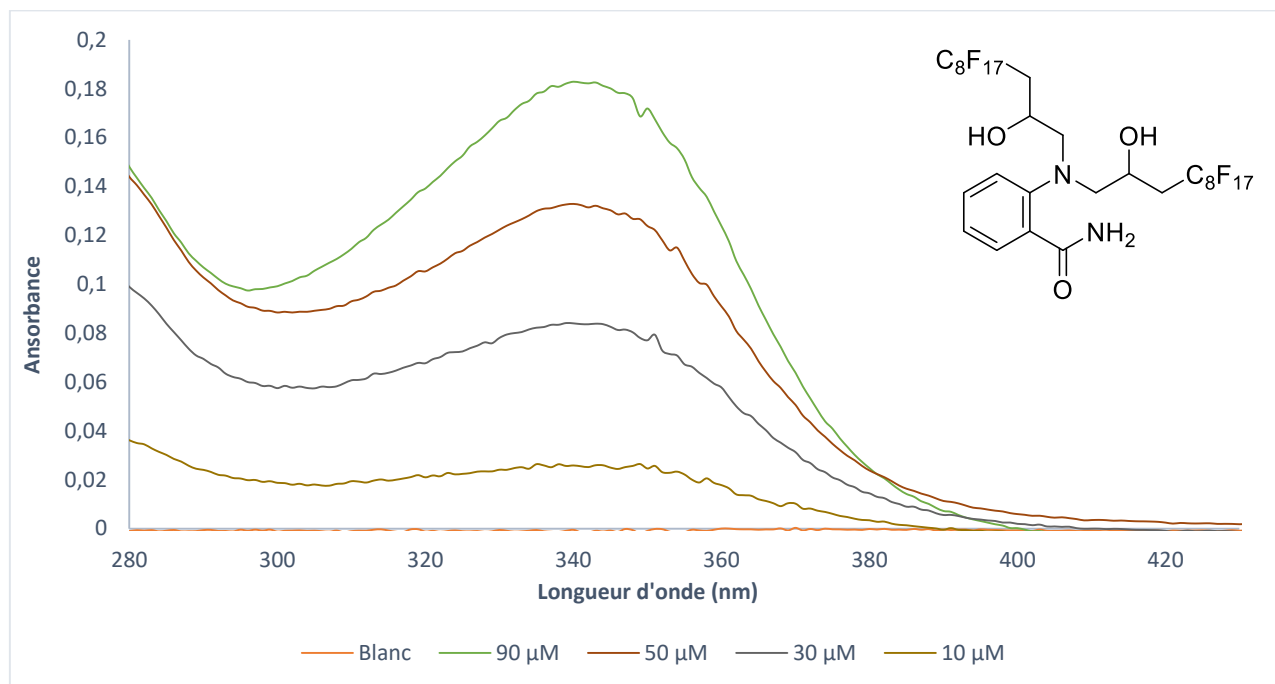


Figure 124 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration de la sonde fluorée 59 dans le dichlorométhane.

Absorbance max (339 nm)	Concentration (μM)
0,132672086	50
0,084110081	30
0,02561124	10
-0,000946291	0

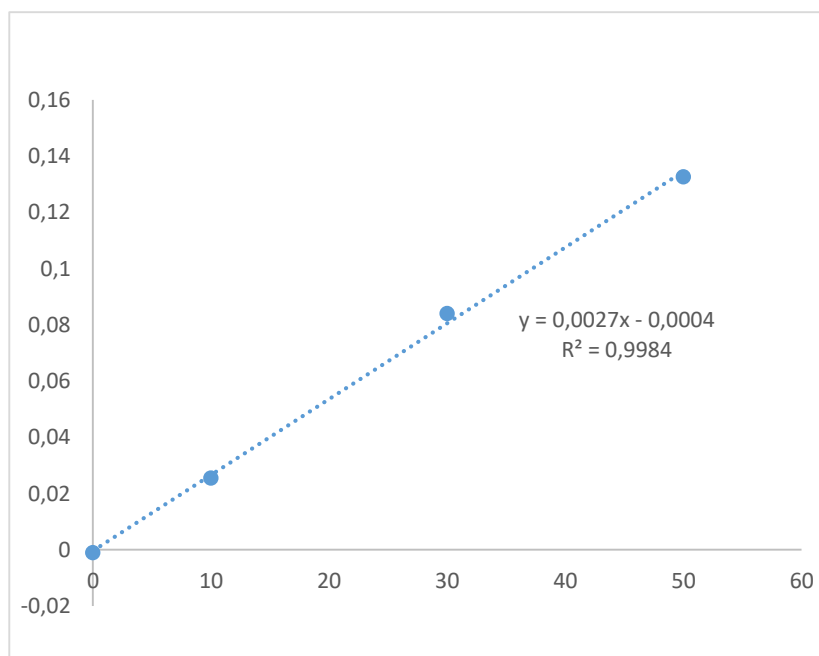


Figure 125 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde 59.

1.12 Sonde membrane verte

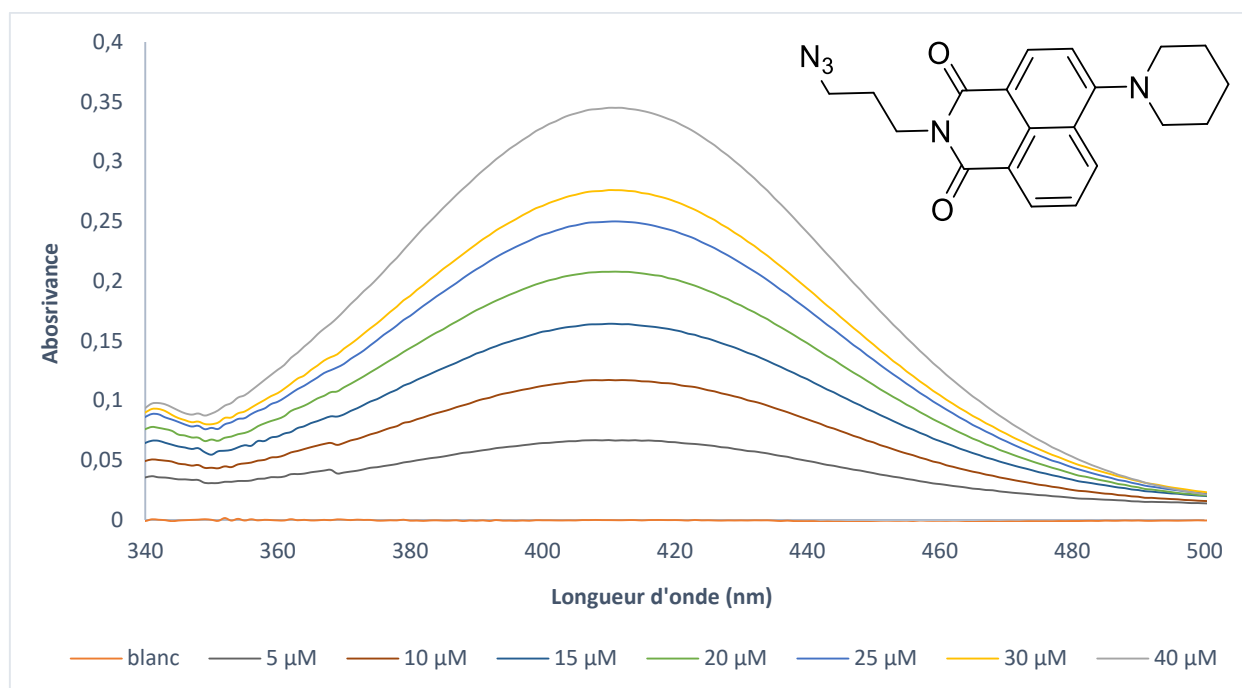


Figure 126 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration de la sonde **60** dans le méthanol.

Absorbance max (420 nm)	Concentration (µM)
0,335689604	40
0,268629015	30
0,24313952	25
0,202459171	20
0,159949184	15
0,1144813	10
0,065249346	5
-0,000134897	0

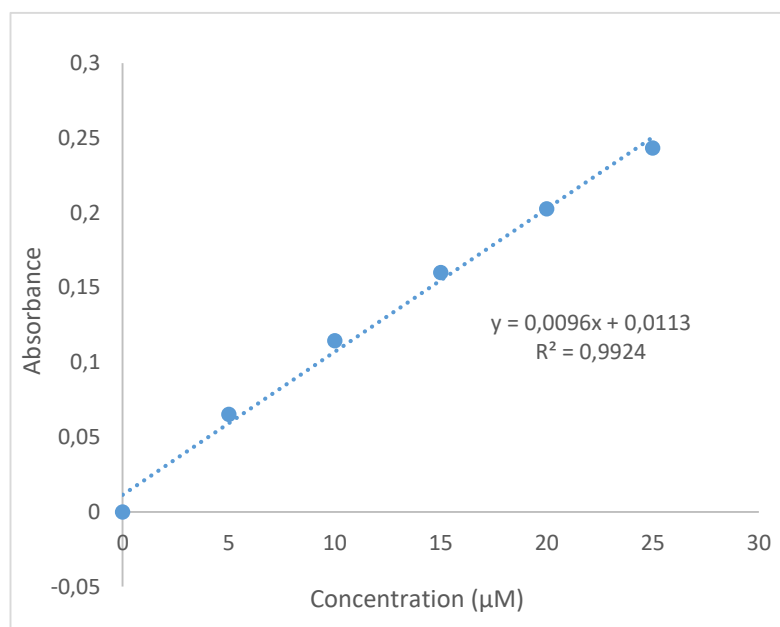


Figure 127 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde **60**

1.13 Sonde membrane bleue

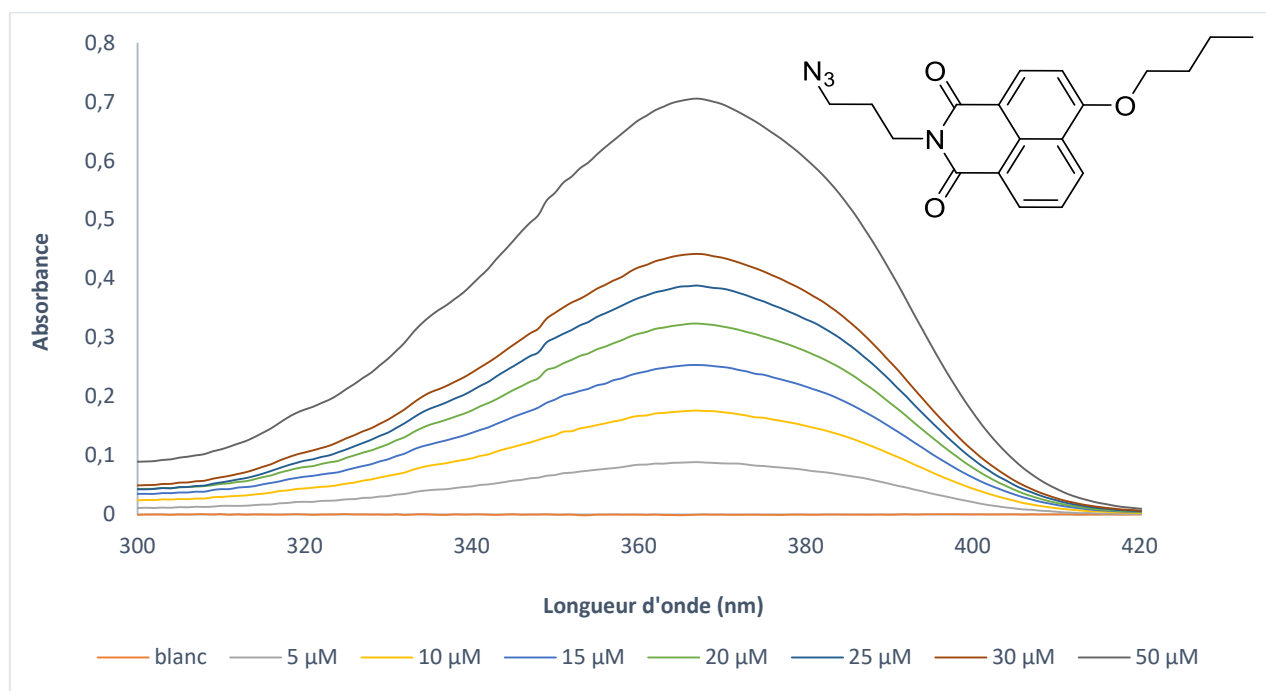


Figure 128 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration de la sonde **62** dans le méthanol.

Absorbance max (370 nm)	Concentration (μM)
0,705428243	50
0,441945165	30
0,388278008	25
0,323619157	20
0,25345844	15
0,176103517	10
0,088739432	5
-0,000246416	0

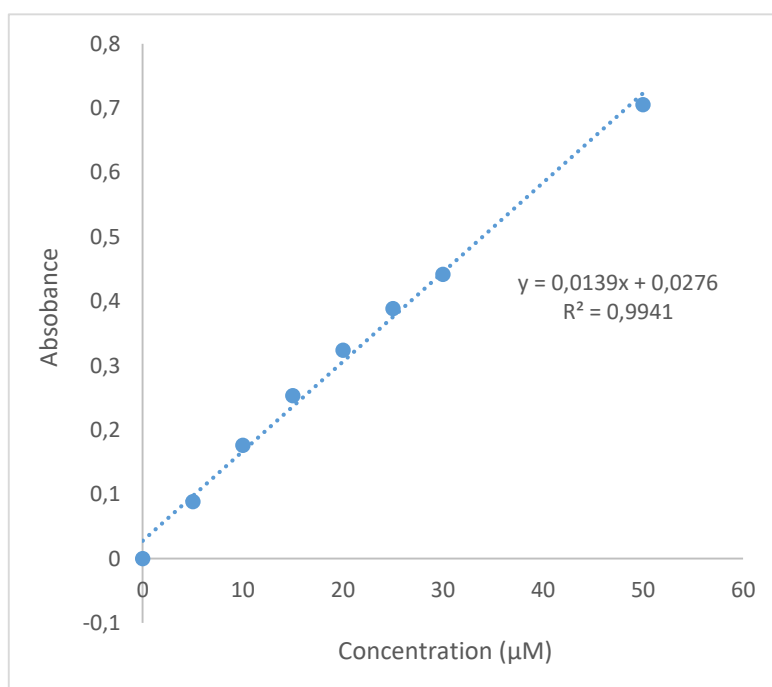


Figure 129 : Régression linéaire de l'absorbance maximale en fonction de la concentration pour la sonde **62**

Bibliographie

1. Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* **49**, 53–70 (2003).
2. Paolozzi, L. *Microbiologie : biologie des procaryotes et de leurs virus*. (Dunod, 2015).
3. Flandrois, J.-F. *Bactériologie médicale*. (Presses universitaires de Lyon, 2000).
4. Willey, Sherwood & Woolverton. *Microbiologie de Prescott*. (DE BOECK SUPERIEUR, 2018).
5. Classification des bactéries. <https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/classification>.
6. Vollmer, W., Blanot, D. & Pedro, M. A. D. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 149–167 (2008).
7. Shockman, G. D. & Barren, J. F. Structure, Function, and Assembly of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **37**, 501–527 (1983).
8. Schleifer, K. H. & Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**, 407–477 (1972).
9. Daubin, V. Phylogénie et évolution des génomes procaryotes. (Lyon 1 - Claude Bernard, 2002).
10. Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5088–5090 (1977).
11. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221–271 (1987).
12. Zwietering, M. H., Jongenburger, I. & Rombouts, F. M. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **56**, 7 (1990).
13. Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 415–420 (1979).

14. Porter, J., Diaper, J., Edwards, C. & Pickup, R. Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2783–2786 (1995).
15. Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. & Ridgway, H. F. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1801–1808 (1992).
16. Dalgaard, P. & Koutsoumanis, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods* **43**, 183–196 (2001).
17. Monod, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* **3**, 371–394 (1949).
18. Marc Parmentier. Développement d'un module microbiologique dédié à la modélisation hydrobiogéochimique et application à la mobilité de l'arsenic. *ResearchGate*
https://www.researchgate.net/publication/29973910_Developpement_d'un_module_microbiologique_dEdiE_A_la_modelisation_hydrobiogEochimique_et_application_A_la_mobilitE_de_l'arsenic (2006).
19. Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R. & Massidda, O. Bacterial Walls, Peptidoglycan Hydrolases, Autolysins, and Autolysis. *Microbial Drug Resistance* **2**, 95–98 (1996).
20. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 259–286 (2008).
21. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).

22. Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. & Caldwell, D. E. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology* **173**, 6558–6567 (1991).
23. Richards, J. J. & Melander, C. Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem* **10**, 2287–2294 (2009).
24. Whiteley, M. *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 5 (2001).
25. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 95–108 (2004).
26. Staley, J. T. & Konopka, A. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology* **39**, 321–346 (1985).
27. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M. & Wade, W. G. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **309**, 1–7 (2010).
28. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 48–56 (2007).
29. Alain, K. & Querellou, J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13**, 583–594 (2009).
30. Pace, N. R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* **276**, 734–740 (1997).
31. Görke, B. & Stülke, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 613–624 (2008).
32. Monod, J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. (Hermann, 1942).
33. Galinier, A. La répression catabolique ou comment les bactéries choisissent leurs sucres préférés. *médecine/sciences* **34**, 531–539 (2018).

34. Santos-Beneit, F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
35. Tortora, G. J., Case, C. L., Funke, B. R., Dupuis, M. & Martin, L. *Introduction à la microbiologie, troisième édition*. (Pearson, 2017).
36. ALONSO, J.-M., FORTERRE, P. & BEJOT, J. BACTÉRIES.
37. CHROMAGAR. <http://www.chromagar.com/>.
38. Perry, J. D. & Freydière, A. M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 2046–2055 (2007).
39. Gillam, E. M. J., Notley, L. M., Cai, H., De Voss, J. J. & Guengerich, F. P. Oxidation of Indole by Cytochrome P450 Enzymes. *Biochemistry* **39**, 13817–13824 (2000).
40. Galeries d'identification API. *bioMérieux France*
<https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/galeries-didentification-api>.
41. API®/ID32. *bioMérieux United Kingdom & Ireland*
<https://www.biomerieux.co.uk/food/apirid32>.
42. Rotman, B. & Papermaster, B. W. Membrane Properties of Living Mammalian Cells as Studied by Enzymatic Hydrolysis of Fluorogenic Esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**, 134–141 (1966).
43. Grimm, J. B., Heckman, L. M. & Lavis, L. D. The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 113 1–34 (Elsevier, 2013).
44. Chyan, W. & Raines, R. T. Enzyme-Activated Fluorogenic Probes for Live-Cell and *in Vivo* Imaging. *ACS Chemical Biology* **13**, 1810–1823 (2018).
45. Croce, A. C. & Bottiroli, G. Autofluorescence Spectroscopy and Imaging: A Tool for Biomedical Research and Diagnosis. in *European journal of histochemistry : EJH* (2014). doi:10.4081/ejh.2014.2461.

46. Kamikawa, Y. *et al.* Design of a protein tag and fluorogenic probe with modular structure for live-cell imaging of intracellular proteins †Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5sc02351c. *Chem Sci* **7**, 308–314 (2016).
47. Brehm-Stecher, B. F. & Johnson, E. A. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 538–559 (2004).
48. Joux, F. & Lebaron, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* **2**, 1523–1535 (2000).
49. Gobat, J.-M. *Le sol vivant ; bases de pédologie ; biologie des sols (3e édition)*. (2010).
50. Müller, S. & Nebe-von-Caron, G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 554–587 (2010).
51. Barer, M. R. & Harwood, C. R. Bacterial Viability and Culturability. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 41 93–137 (Elsevier, 1999).
52. Caro, L. Conception et caractérisation de biocapteurs basés sur l'association de récepteurs et canaux ioniques. (2010).
53. Ussing, H. H. Transport of ions across cellular membranes. *Physiological Reviews* **29**, 127–155 (1949).
54. Kaprelyants, A. S. & Kell, D. B. Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3187–3196 (1993).
55. Reers, M. *et al.* [29] Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. in *Methods in Enzymology* vol. 260 406–417 (Elsevier, 1995).
56. Votyakova, T. V., Kaprelyants, A. S. & Kell, D. B. Influence of Viable Cells on the Resuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended

- Stationary Phase: the Population Effect. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3284–3291 (1994).
57. García, D., Gómez, N., Mañas, P., Raso, J. & Pagán, R. Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *International Journal of Food Microbiology* **113**, 219–227 (2007).
58. Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* **37**, 77–86 (1999).
59. Barbesti, S. *et al.* Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. *Cytometry* **40**, 214–218 (2000).
60. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol - FR.
<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/live-dead-baclight-bacterial-viability-protocol.html>.
61. Ishiki, K., Nguyen, D. Q., Morishita, A., Shiigi, H. & Nagaoka, T. Electrochemical Detection of Viable Bacterial Cells Using a Tetrazolium Salt. *Anal. Chem.* **90**, 10903–10909 (2018).
62. Kobayashi, T. *et al.* Use of 5-Cyano-2,3-Ditolyl-Tetrazolium Chloride Staining as an Indicator of Biocidal Activity in a Rapid Assay for Anti-Acanthamoeba Agents. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 1606–1612 (2012).
63. Bhupathiraju, V. K., Hernandez, M., Landfear, D. & Alvarez-Cohen, L. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **37**, 231–243 (1999).

64. Pyle, B. H., Broadaway, S. C. & McFeters, G. A. Factors Affecting the Determination of Respiratory Activity on the Basis of Cyanoditolyl Tetrazolium Chloride Reduction with Membrane Filtration. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4304–4309 (1995).
65. González-Pinzón, R., Haggerty, R. & Myrold, D. D. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* **117**, (2012).
66. Knapp, J. L. A., González-Pinzón, R. & Haggerty, R. The Resazurin-Resorufin System: Insights From a Decade of “Smart” Tracer Development for Hydrologic Applications. *Water Resources Research* **54**, 6877–6889 (2018).
67. Haggerty, R., Argerich, A. & Martí, E. Development of a “smart” tracer for the assessment of microbiological activity and sediment-water interaction in natural waters: The resazurin-resorufin system. *Water Resources Research* **44**, (2008).
68. Peterson, F. J., Mason, R. P., Hovsepian, J. & Holtzman, J. L. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**, 4009–4014 (1979).
69. Williams, E. M. *et al.* Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochemical Journal* **471**, 131–153 (2015).
70. Xu, S. *et al.* Real time detection of ESKAPE pathogens by a nitroreductase-triggered fluorescence turn-on probe. *Chem. Commun.* **53**, 11177–11180 (2017).
71. Charlier, P. *et al.* Résistance bactérienne aux β -lactamines. **14**, 12.
72. Hodges, H. L., Brown, R. A., Crooks, J. A., Weibel, D. B. & Kiessling, L. L. Imaging mycobacterial growth and division with a fluorogenic probe. *PNAS* **115**, 5271–5276 (2018).

73. Larsen, E. M. & Johnson, R. J. Microbial esterases and ester prodrugs: An unlikely marriage for combating antibiotic resistance. *Drug Development Research* **80**, 33–47 (2019).
74. Green, V. S., Stott, D. E. & Diack, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 693–701 (2006).
75. Kawai, M., Yamaguchi, N. & Nasu, M. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 496–504 (1999).
76. Šilhár, P. *et al.* Targeting Botulinum A Cellular Toxicity: A Prodrug Approach. *J. Med. Chem.* **56**, 7870–7879 (2013).
77. Duhamel, S., Gregori, G., Wambeke, F. V. & Nedoma, J. Detection of extracellular phosphatase activity at the single-cell level by enzyme-labeled fluorescence and flow cytometry: The importance of time kinetics in ELFA labeling. *Cytometry Part A* **75A**, 163–168 (2009).
78. Nedoma, J. & Vrba, J. Specific activity of cell-surface acid phosphatase in different bacterioplankton morphotypes in an acidified mountain lake. *Environmental Microbiology* **8**, 1271–1279 (2006).
79. Váradi, L. *et al.* β -Alanyl aminopeptidase-activated fluorogenic probes for the rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *RSC Adv.* **6**, 58884–58889 (2016).
80. Burke, H. M., Gunnlaugsson, T. & Scanlan, E. M. Recent advances in the development of synthetic chemical probes for glycosidase enzymes. *Chemical Communications* **51**, 10576–10588 (2015).

81. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**, D490–D495 (2014).
82. Xu, Y., Uddin, N. & Wagner, G. K. Chapter Nine - Covalent Probes for Carbohydrate-Active Enzymes: From Glycosidases to Glycosyltransferases. in *Methods in Enzymology* (ed. Imperiali, B.) vol. 598 237–265 (Academic Press, 2018).
83. Dejob, M. Études structurales et fonctionnelles d'alpha-glucosidases bactériennes. 266 (2013).
84. Hyun, J. Y., Kang, N. R. & Shin, I. Carbohydrate Microarrays Containing Glycosylated Fluorescent Probes for Assessment of Glycosidase Activities. *Organic Letters* **20**, 1240–1243 (2018).
85. Asano, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **13**, 93R – 104 (2003).
86. Park, S. & Shin, I. Profiling of Glycosidase Activities Using Coumarin-Conjugated Glycoside Cocktails. *Org. Lett.* **9**, 619–622 (2007).
87. Najah, M. *et al.* New Glycosidase Substrates for Droplet-Based Microfluidic Screening. *Analytical Chemistry* **85**, 9807–9814 (2013).
88. Rodriguezvillalobos, H. & Struelens, M. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation* **15**, 205–213 (2006).
89. Bush, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care* **14**, 224 (2010).
90. Qian, X. *et al.* A carbapenem-based fluorescence assay for the screening of metallo- β -lactamase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **29**, 322–325 (2019).

91. Cheng, Y. *et al.* Fluorogenic Probes with Substitutions at the 2 and 7 Positions of Cephalosporin are Highly BlaC-Specific for Rapid Mycobacterium tuberculosis Detection. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 9360–9364 (2014).
92. Mao, W., Qian, X., Zhang, J., Xia, L. & Xie, H. Specific Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase Activities with a Ratiometric Fluorescent Probe. *ChemBioChem* **18**, 1990–1994 (2017).
93. Li, L., Li, Z., Shi, W., Li, X. & Ma, H. Sensitive and Selective Near-Infrared Fluorescent Off-On Probe and Its Application to Imaging Different Levels of β -Lactamase in Staphylococcus aureus. *Anal. Chem.* **86**, 6115–6120 (2014).
94. Mao, W., Xia, L., Wang, Y. & Xie, H. A Self-Immobilizing and Fluorogenic Probe for β -Lactamase Detection. *Chemistry – An Asian Journal* **11**, 3493–3497 (2016).
95. Helling, R. B. *et al.* Toxic Waste Disposal in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **184**, 3699–3703 (2002).
96. McMurry, L., Petrucci, R. E. & Levy, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. *PNAS* **77**, 3974–3977 (1980).
97. Bador, J. Résistance aux antibiotiques par mécanisme d’efflux chez Achromobacter xylooxidans. (Université de Bourgogne, 2013).
98. Ueckert, J. *et al.* Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 317–326 (1995).
99. Caron, G. N., Stephens & Badley. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 988–998 (1998).

100. Singh, M. *et al.* Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* **133**, 535–540 (2011).
101. Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V. & Pagès, J.-M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother* **59**, 1223–1229 (2007).
102. Baraban, L. *et al.* Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a Chip* **11**, 4057 (2011).
103. Liang, S. *et al.* New naphthalimide modified polyethylenimine nanoparticles as fluorescent probe for DNA detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **97**, 359–365 (2012).
104. Brahmachari, G. Room Temperature One-Pot Green Synthesis of Coumarin-3-carboxylic Acids in Water: A Practical Method for the Large-Scale Synthesis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **3**, 2350–2358 (2015).
105. Chilvers, K. F., Perry, J. D., James, A. L. & Reed, R. H. Synthesis and evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of bacterial β -galactosidase. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 1118–1130.
106. Musso, L., Cincinelli, R., Giannini, G., Manetti, F. & Dallavalle, S. Synthesis of 5,6-dihydro-4H-benzo[d]isoxazol-7-one and 5,6-dihydro-4H-isoxazolo[5,4-c]pyridin-7-one Derivatives as Potential Hsp90 Inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design* **86**, 1030–1035 (2015).
107. Mahajan, T., Kumar, L., Dwivedi, K. & Agarwal, D. D. Efficient and Facile Chlorination of Industrially-Important Aromatic Compounds using NaCl/ *p* - TsOH/NCS in Aqueous Media. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **51**, 3881–3886 (2012).

108. Vieira, L. C. C., Paixão, M. W. & Corrêa, A. G. Green synthesis of novel chalcone and coumarin derivatives via Suzuki coupling reaction. *Tetrahedron Letters* **53**, 2715–2718 (2012).
109. Koenigs, W. & Knorr, E. Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **34**, 957–981 (1901).
110. Zhu, Z.-Y. *et al.* Preparation and activity evaluation of chrysin- β -d-galactopyranoside. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 1433–1440 (2016).
111. Cattiaux, L. *et al.* Synthetic biotinylated tetra β (1 \rightarrow 5) galactofuranoside for in vitro aspergillosis diagnosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**, 547–555 (2011).
112. Zhang, X.-X. *et al.* A versatile two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging E. coli β -galactosidase in live cells and in vivo. *Chem. Commun. (Camb.)* **52**, 8283–8286 (2016).
113. Peltier-Pain, P., Marchillo, K., Zhou, M., Andes, D. R. & Thorson, J. S. Natural Product Disaccharide Engineering through Tandem Glycosyltransferase Catalysis Reversibility and Neoglycosylation. *Org. Lett.* **14**, 5086–5089 (2012).
114. Wen, H. *et al.* Synthesis and biological evaluation of helacid analogues as novel acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 166–173 (2008).
115. Ren, B. *et al.* Zemplén transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years. *Green Chem.* **17**, 1390–1394 (2015).
116. Dunetz, J. R., Magano, J. & Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Organic Process Research & Development* **20**, 140–177 (2016).
117. Baier, G. *et al.* Glutathione Responsive Hyaluronic Acid Nanocapsules Obtained by Bioorthogonal Interfacial “Click” Reaction. *Biomacromolecules* **17**, 148–153 (2016).

118. Song, L., Yang, Y., Zhang, Q., Tian, H. & Zhu, W. Synthesis and Photochromism of Naphthopyrans Bearing Naphthalimide Chromophore: Predominant Thermal Reversibility in Color-Fading and Fluorescence Switch. *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 14648–14658 (2011).
119. Song, G.-L., Zhang, Z., Da, Y.-X. & Wang, X.-C. Copper and l-sodium ascorbate catalyzed hydroxylation and aryloxylation of aryl halides. *Tetrahedron* **71**, 8823–8829 (2015).
120. Pulst, M. *et al.* Crystallization of Poly(ethylene oxide) with a Well-Defined Point Defect in the Middle of the Polymer Chain. *Macromolecules* **49**, 6609–6620 (2016).
121. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 2596–2599 (2002).
122. Himo, F. *et al.* Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 210–216 (2005).
123. Xu, J. *et al.* Improved Micellar Formulation for Enhanced Delivery for Paclitaxel. *Molecular Pharmaceutics* **14**, 31–41 (2017).
124. Koshi, Y. *et al.* Target-Specific Chemical Acylation of Lectins by Ligand-Tethered DMAP Catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 245–251 (2008).
125. Wang, Q. & Sivakumar, K. Chemoselective fluorogenic molecular linkers and methods for their preparation and use. (2010).
126. McKinnie, S. M. K. *et al.* Synthetic Modification within the “RPRL” Region of Apelin Peptides: Impact on Cardiovascular Activity and Stability to Neprilysin and Plasma Degradation. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 6408–6427 (2017).

127. Jetty, R. *et al.* Protein triggered fluorescence switching of near-infrared emitting nanoparticles for contrast-enhanced imaging. *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 4542 (2013).
128. Liu, G. *et al.* A hemicyanine-based colorimetric and ratiometric fluorescent probe for selective detection of cysteine and bioimaging in living cell. *Talanta* **170**, 406–412 (2017).
129. Depauw, A. Synthèse et étude photophysique de sondes fluorescentes pour la détection de cations alcalins en milieux aqueux. (2014).
130. Skoog, D. A. & Leary, J. J. *Principles of instrumental analysis*. (Fort Worth : Saunders College Pub, 1992).
131. Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H. & Trevors, J. T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 149–182 (2003).
132. Chan, Y.-H. *et al.* Development of Ultrabright Semiconducting Polymer Dots for Ratiometric pH Sensing. *Anal. Chem.* **83**, 1448–1455 (2011).
133. Wencel, D., Abel, T. & McDonagh, C. Optical Chemical pH Sensors. *Anal. Chem.* **86**, 15–29 (2014).
134. Han, J. & Burgess, K. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chem. Rev.* **110**, 2709–2728 (2010).
135. Britton, H. T. S. & Robinson, R. A. CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.* 1456–1462 (1931)
doi:10.1039/JR9310001456.
136. Řezáčová, B., Coïc, Y.-M., Zentz, C., Turpin, P.-Y. & Štěpánek, J. Spectroscopic Determination of pKa Constants of MADS Box Segments. *Journal of Spectroscopy* (2012) doi:10.1155/2012/674032.

137. Ge, Y. *et al.* A simple pH fluorescent probe based on new fluorophore indolizine for imaging of living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical* **247**, 46–52 (2017).
138. Sherman, W. R. & Robins, Eli. Fluorescence of substituted 7-hydroxycoumarins. *Anal. Chem.* **40**, 803–805 (1968).
139. Manges, A. R. *et al.* Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1007–1013 (2001).
140. Held, P. *Kinetic Analysis of β -Galactosidase Activity using the PowerWaveTM HT and Gen5TM Data Analysis Software.* (2007).
141. Jacob, F. & Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* **3**, 318–356 (1961).
142. L'opéron lactose: le répresseur | RN' Bio. https://rnbio.upmc.fr/bio-mol_operon-lactose_operon1bis.
143. Tabeling, P. *Introduction à la microfluidique.* (2003).
144. Ohno, K., Tachikawa, K. & Manz, A. Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *ELECTROPHORESIS* **29**, 4443–4453 (2008).
145. Boitard, L. *et al.* Monitoring single-cell bioenergetics via the coarsening of emulsion droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7181–7186 (2012).
146. Tawfik, D. S. & Griffiths, A. D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol* **16**, 652–656 (1998).
147. Cottinet, D. Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli* étudiées en millifluidique digitale. (Université Pierre et Marie Curie, 2013).

148. Engl, W., Tachibana, M., Panizza, P. & Backov, R. Millifluidic as a versatile reactor to tune size and aspect ratio of large polymerized objects. *International Journal of Multiphase Flow* **33**, 897–903 (2007).
149. Anna, S. L., Bontoux, N. & Stone, H. A. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Appl. Phys. Lett.* **82**, 364–366 (2003).
150. Matsui, M., Shibata, K., Muramatsu, H., Sawada, H. & Nakayama, M. Synthesis, Fluorescence, and Photostabilities of 3-(Perfluoroalkyl)coumarins. *Chemische Berichte* **125**, 467–471 (1992).
151. Sletten, E. M. & Swager, T. M. Fluorofluorophores: Fluorescent Fluorous Chemical Tools Spanning the Visible Spectrum. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 13574–13577 (2014).
152. Trevors, J. T. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods* **57**, 87–103 (2003).
153. Betz, W., Mao, F. & Bewick, G. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J. Neurosci.* **12**, 363–375 (1992).
154. Bolte, S. *et al.* FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy* **214**, 159–173 (2004).
155. Fischer-Parton, S. *et al.* Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy* **198**, 246–259 (2000).
156. Müller, S., Ullrich, S., Lösche, A., Loffhagen, N. & Babel, W. Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Microbiological Methods* **40**, 67–77 (2000).

157. Kim, I. S., Lee, H. & Trevors, J. T. Effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and biphenyl on cell membranes of *Ralstonia eutropha* H850. *FEMS Microbiology Letters* **200**, 17–24 (2001).
158. Heřman, P., Konopásek, I., Plášek, J. & Svobodová, J. Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1190**, 1–8 (1994).
159. Kostrominova, T. Y. Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone and ligament/tendon studies. *Microsc Res Tech* **74**, 18–22 (2011).
160. Plasma Membrane - FR. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/plasma-membrane.html>.
161. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
162. Gomes, A., Fernandes, E. & Lima, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **65**, 45–80 (2005).
163. Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J. & Nagano, T. Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 3170–3175 (2003).
164. Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**, 231–255 (2004).

165. Zhang, C. *et al.* A FRET-ICT dual-quenching fluorescent probe with large off-on response for H₂S: synthesis, spectra and bioimaging. *Chemical Communications* **51**, 7505–7508 (2015).
166. Zhang, B. *et al.* Selective Selenol Fluorescent Probes: Design, Synthesis, Structural Determinants, and Biological Applications.
<http://pubs.acs.org.accessdistant.upmc.fr/doi/suppl/10.1021/ja5099676> (2015)
doi:10.1021/ja5099676.
167. Taghavi, M., Ghaemy, M., Nasab, S. M. A. & Hassanzadeh, M. Influence of ionic liquid on selective polycondensation of a new diamine-bisphenol: Synthesis and properties of polyamides and their composites with modified nanosilica. *Polymer* **54**, 3828–3840 (2013).
168. Najafi, Z. *et al.* Design and synthesis of novel anti-Alzheimer's agents: Acridine-chromenone and quinoline-chromenone hybrids. *Bioorganic Chemistry* **67**, 84–94 (2016).
169. Superville, P.-J. Suivi en ligne par voltampérométrie de la spéciation des éléments traces métalliques et des espèces soufrées résuites en cours d'eau. (Université Lille 1, 2014).
170. Dandeville, Y. Analyse thermique et électrochimique de supercondensateurs carbone-MnO₂ en milieu aqueux. (Université de Nantes, 2012).
171. Greiner, R., Schlüvker, T., Zgela, D. & Langhals, H. Fluorescent aryl naphthalene dicarboximides with large Stokes shifts and strong solvatochromism controlled by dynamics and molecular geometry. *J. Mater. Chem. C* **4**, 11244–11252 (2016).
172. Brouwer, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **83**, 2213–2228 (2011).

173. Singh, Y. & Demchenko, A. V. Koenigs–Knorr Glycosylation Reaction Catalyzed by Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate. *Chemistry – A European Journal* **25**, 1461–1465 (2019).

Développement de sondes fluorogéniques pour le suivi du métabolisme et de la croissance des bactéries en gouttes

Résumé :

Le but de ce projet est de proposer des outils pour identifier la diversité fonctionnelle des bactéries provenant d'un même patient. Les bactéries sécrètent de nombreuses enzymes afin de digérer leur environnement, et ces activités enzymatiques extracellulaires sont des marqueurs des espèces de bactéries et donnent des informations sur leur phénotype, leur viabilité et leur état de développement. La fluorescence est une méthode de choix pour suivre cette activité enzymatique du fait de sa grande sensibilité. Le premier objectif de ce projet est de synthétiser des sondes fluorogéniques dont la fluorescence sera contrôlée par la déprotonation d'une fonction phénol. Pour suivre les bactéries de manière continue et sans induire de toxicité, un polymère hydrophile sera greffé sur la sonde, ce qui permettra d'augmenter sa solubilité dans le milieu et de la rendre non perméable. L'exemple de l'enzyme β -galactosidase, un marqueur connu des bactéries *Escherichia coli* sera présenté.

Mots-clés : Sonde fluorogénique ; activité enzymatique ; bactéries ; phénol ; polymère hydrosoluble

New fluorescent probes to follow bacteria growth or metabolism in droplets

Abstract:

The aim of this project is to identify functional diversity within bacteria from the same patient. Bacteria secrete a lot of enzymes to digest their environment and these extracellular enzymatic activities are the markers of bacterial species, their phenotype, viability and state of development. Fluorescence is a powerful and sensitive method to track enzyme activity. Our first goal is to synthesize enzymatic fluorogenic probes whose fluorescence is controlled by the deprotonation of a phenol function. For continuous follow up of bacteria, one major concern is the potential toxicity of probe. To address this problem probes are linked to a hydrophilic polymer in order to increase their solubility and reduce toxicity for bacteria, as they are cell impermeant. Example of the β -galactosidase enzyme, a well-established marker of *Escherichia coli*, will be presented.

Keywords: Fluorogenic probe; enzymatic activity; bacteria; phenol; hydrosoluble polymer