



HAL
open science

Synthèse de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour la libération du glutamate et de la nicotine

Clément Morville

► **To cite this version:**

Clément Morville. Synthèse de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour la libération du glutamate et de la nicotine. Autre. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAF043 . tel-03934755

HAL Id: tel-03934755

<https://theses.hal.science/tel-03934755>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
CNRS UMR 7199

THÈSE présentée par :
MORVILLE Clément

Soutenue le : **13 décembre 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie organique

Synthèse de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique pour la libération du glutamate et de la nicotine

THÈSE dirigée par :

Dr. Specht Alexandre

Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg

Dr. Bolze Frédéric

Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Monnereau Cyrille

Maître de conférences, ENS Lyon

Dr. Sainlos Matthieu

Directeur de recherche au CNRS, Université de Bordeaux

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Gros Claude

Professeur, Université de Bourgogne

Remerciement

Ce travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives dans l'équipe de Chimie et Neurobiologie moléculaire sous l'encadrement du Dr. Alexandre Specht et du Dr. Frédéric Bolze.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Matthieu Sainlos, le Dr. Monnereau Cyrille ainsi que le Prof. Claude Gros pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, et bien sûr d'avoir pris le temps pour lire ces travaux qui m'ont occupé ces trois dernières années.

Alex, je tiens particulièrement à te remercier en premier pour m'avoir accepté en stage dans ton laboratoire et de m'avoir entraîné pour le concours doctoral. Ces quatre années passées sous ta supervision ont été aussi enrichissantes que plaisantes. Tu as su m'enseigner et me transmettre ta passion pour la chimie avec brio.

Fred, je te remercie d'avoir co-dirigé ma thèse. Ton aide sur la photophysique m'a grandement aidé. Tu m'en auras fait baver avec le bi-photon mais ça valait le coup ! Mon seul regret et de pas avoir appris à siffler aussi bien que toi !

Benoît, l'aventure a commencé il y a quatre ans et je n'aurais pas pu rêver meilleur binôme que ce soit au laboratoire ou en dehors, tu as toujours su m'épauler. Je ne compte plus les fous rires et autres délires du genre qui m'ont permis de passer des moments géniaux au laboratoire.

Federico et Francisco, premièrement merci à vous deux, à vos côtés j'ai pu grandement améliorer mon anglais. Francisco, tu m'as beaucoup appris sur le brassage de bière et nos longues discussions scientifiques vont me manquer. Federico, nos nombreuses pauses café à parler de tout et de rien étaient vraiment plaisantes et j'espère avoir encore l'occasion de discuter avec toi !

Adeline, la « maman » du laboratoire, tu as été présente quand on avait besoin de parler ou qu'on avait des problèmes et pour ça je t'en remercie. Je craignais que tu réprimes nos délires, je n'aurais pas imaginé que tu les encourages !

Thomas, Thierry, Juliane, Patrick, Kate, travailler avec vous fut un vrai plaisir. J'ai passé avec chacun de vous de très bons moments. Vous faites partie des personnes avec qui l'on peut discuter, débattre ou simplement écouter pendant des heures. Merci encore pour tout !

Un grand merci à mes deux relectrices, Charlotte et Jessica, qui il faut l'avouer ont eu beaucoup de travail !

Merci à tous mes amis et à ma famille de m'avoir supporté toutes ces années, si j'en suis là c'est aussi grâce à vous.

Table des matières

I. L'UTILISATION DE LA LUMIERE POUR L'ETUDE DES NEURONES	2
1. LES NEURONES : MORPHOLOGIE ET FONCTIONNEMENT	3
1.1 LES COURANTS ELECTRIQUES AU SEIN D'UN NEURONE	4
1.2 L'ELECTROPHYSIOLOGIE PATCH-CLAMP	7
1.3 LA PROPAGATION DES POTENTIELS D'ACTION	10
1.4 LA LIBERATION DE NEUROTRANSMETTEURS	12
2. L'APPROCHE OPTOPHARMACOLOGIQUE	14
2.1. OPTOGENETIQUE : LA COMBINAISON DU GENIE GENETIQUE ET DE LA LUMIERE	14
2.2 UTILISATION DE SONDAS CHIMIQUES	20
3. UTILISATION DE GROUPEMENTS PROTECTEURS PHOTOLABILES	26
3.1 CARACTERISTIQUES IDEALES POUR UN PRECURSEUR PHOTOLABILE DE BIOMOLECULE	27
3.2 LES DIFFERENTES FAMILLES DE GROUPEMENTS PROTECTEURS PHOTOLABILES	29
3.3 UTILISATION DES GROUPEMENTS PROTECTEURS PHOTOLABILES EN NEUROSCIENCES	34
4. L'EXCITATION BI-PHOTONIQUE	35
4.1 THEORIE	35
4.2 L'EXCITATION MULTI-PHOTONIQUE	37
4.3 L'EXCITATION A DEUX PHOTONS	39
4.4 INGENIERIE MOLECULAIRE DES CHROMOPHORES	42
5. LE PROJET DE THESE	45
II. DEVELOPPEMENT DE PRECURSEURS PHOTOLABILES DU GLUTAMATE POUR LA CARTOGRAPHIE DES MICRO-CIRCUITS NEURONAUX	47
1. LES RECEPTEURS DU GLUTAMATE	48
2. ETAT DE L'ART	50
3. SYNTHESE ET UTILISATION DE GANBP POUR LA LIBERATION DU GLUTAMATE	54
3.1 DESIGN DU GROUPEMENT PROTECTEUR PHOTOLABILE GANBP	55
4. TEST DE GANBP-GLUTAMATE SUR TRANCHE DE CERVELET	59
4.1 EFFETS DE GANBP-GLUTAMATE	60
4.2 EXCITATION A DEUX PHOTONS SUR TRANCHES DE CERVELET	63
5. CHOIX D'UN NOUVEAU DERIVE COUMARINIQUE	66
5.1 DES COUMARINES SENSIBLES A L'EXCITATION BI-PHOTONIQUE	66
6. STRATEGIE ET SYNTHESE	69

6.1	STRATEGIE DE DEVELOPPEMENT DE DEACAS-GLUTAMATE	69
6.2	SYNTHESE DE DEACAS-GLUTAMATE	70
6.3	CARACTERISATION DE DEACAS-GLUTAMATE	72
7.	UTILISATION DE DEACAS-GLUTAMATE SUR TRANCHES DE CERVELET	75
8.	DEVELOPPEMENT D'UN DERIVE SOLUBLE DE DEACAS-GLUTAMATE	78
9.	UNE COUMARINE HAUTEMENT CONJUGUEE A LA STRUCTURE RIGIDIFIEE	80
9.1	CHOIX DE LA COUMARINE 5-EXO-DIG-SUZUKI-GLUTAMATE	80
9.2	SYNTHESE DE LA COUMARINE RIGIDE ET CONJUGUEE OBTENUE PAR REACTION DOMINO 5-EXO-DIG-SUZUKI	81
10.	UNE COUMARINE AUX PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES INTERESSANTES	82
10.1	CHOIX DE LA COUMARINE 5-EXO-DIG-SONOGASHIRA	82
10.2	SYNTHESE DE LA COUMARINE-5-EXO-DIG-SONOGASHIRA	83
11.	CONCLUSION	87
III.	<u>CONCEPTION D'UN PRECURSEUR PHOTOLABILE DE LA NICOTINE EXCITABLE DANS LE VERT</u>	90
1.	LES RECEPTEURS NICOTINIQUES	91
2.	ETAT DE L'ART	92
3.	DEVELOPPEMENT DE PRECURSEURS PHOTOLABILES LIBERANT LA NICOTINE	95
3.1	CHALLENGES DU PROJET	95
3.2	LIBERATION DE LA NICOTINE A L'AIDE D'UN GROUPEMENT PHOTOLABILE GREFFE SUR LE MOTIF PYRROLIDINE	96
4.	LIBERATION DE LA NICOTINE A L'AIDE D'UN GPP GREFFE SUR LE MOTIF PYRIDINE	104
5.	CARACTERISATION DU PRECURSEUR PHOTOLABILE DE LA NICOTINE	69
6.	CONCLUSION	116
IV.	<u>DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX GROUPEMENTS PROTECTEURS PHOTOLABILES SENSIBLES A L'EXCITATION BI-PHOTONIQUE</u>	119
1.	ETAT DE L'ART	119
2.	DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE SERIE DE COUMARINE A LA STRUCTURE RIGIDIFIEE	125
2.1	DECOUVERTE D'UNE REACTION DOMINO PERMETTANT DE DEVELOPPER LA SERIE DES COUMARINES RIGIDIFIEES PAR UNE REACTION 5-EXO-DIG	125
2.2	INGENIERIE MOLECULAIRE EFFECTUEE SUR LA SERIE DES COUMARINES RIGIDIFIEES PAR UNE REACTION 5-EXO-DIG	127
2.3	SYNTHESE DES COUMARINES RIGIDIFIEES PAR UNE REACTION DE TYPE 5-EXO-DIG	129
3.	DETERMINATION DES PROPRIETES PHOTOCIMIQUES ET PHOTOPHYSIQUES DES COUMARINES 5-EXO-DIG	131
3.1	PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES ET PHOTOCIMIQUES UN PHOTON DES COUMARINES RIGIDIFIEES PAR UNE REACTION DE TYPE 5-EXO-DIG.	131

3.2 PROPRIETES PHOTOCHIMIQUES DES COUMARINES RIGIDIFIEES PAR REACTION 5-EXO-DIG	135
3.3 PROPRIETES A DEUX PHOTONS DES COUMARINES RIGIDIFIES PAR REACTION 5-EXO-DIG	136
4. MODIFICATION DE LA SERIE DES COUMARINES RIGIDIFIEES PAR REACTION 5-EXO-DIG	139
5. CONCLUSION	143
<u>V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	<u>146</u>
<u>VI. EXPERIMENTAL PART</u>	<u>150</u>
1. GENERAL PROCEDURES AND GENERAL EQUIPMENT	150
2. CHEMICAL SYNTHESIS	152
2.1 SYNTHESIS OF PHOTOLABILE GLUTAMATE PRECURSORS	152
2.2. SYNTHESIS OF PHOTOLABILE NICOTINE PRECURSORS	180
2.3 SYNTHESIS OF HIGHLY SENSITIVE COUMARIN PPG	193
2.4 1P AND 2P CHARACTERIZATION OF NEW PPG	201
3. RÉFÉRENCES	219

Abréviations

ABT594: tebanicline

AMPA :acide-alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

ANBP : 4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol

AP : acide phosphatidique

ATP : Adénosine triphosphate

Bhc : Brominated-7-hydroxycoumarin-4-ylemethyls

BIST : Bis-styrylthiophene

BIST: Bis-styrylthiophène

BLUF: Blue Light-Utilizing-Flavin

BNSF : 2,7-Bis-{4-nitro-8-[3-(2-propyl)-styryl]}-9,9-bis-[1-(3,6-dioxaheptyl)]-fluorene

C1B1 : Cryptochrome-Intéraction-Basique-hélice-boucle-hélice

CANBP: 2-(4'- (Bis(carboxymeth-yl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol

CBN: N-(alpha-Carboxy-2-nitrobenzyl)

CDNI : 4-Carboxyméthoxy-5,7-dinitroindolynil

ChR1 : ChannelRhodopsine I

ChR2 : ChannelRhodopsine II

CRY2 : Cryptochrome 2

CyHQ: 8-cyano-7-hydroxyquinolin-2-ylmethyl

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DEAC: 7-Diéthylamino coumarine

DIBAL-H : Diisobutylaluminium-hydrure

DIC : Diisopropylcarbodiimide

DMAP: 4-Diméthyleaminopyridine

DME : Diméthoxyéthane

DMF: Diméthylformamide

DMNPB: 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)- ethyl

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPNB: Di-polyéthylenglycol-nitrobenzyl

EANBP: (Bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)pro-pan-1-ol

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FMN : Flavine Mono Nucléotide

GABA : Acide 4-aminobutanoïque

GANBP : Glucose--4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol

GM: Goeppert-Mayer

GPP: Groupement Protecteur Photolabile

Chromatographie en phase liquide à haute performance

KOAc : Acétate d'ammonium

LiHMDS: Hexaméthylidisilazane de lithium

LOV : Light-Oxygen-Voltage

LPA: Ligand photochrome attaché

LPS: Ligand photochrome soluble

MDNI : 4-Méthoxy-5,7-dinitroindolynil

MeCN : Acétonitrile

MNI : 4-Méthoxy-7-nitroindolynil

nAChRs: Récepteurs nicotiques

NBS : N-bromosuccinimide

NI: Nitrindoline

NIS: N-iodosuccinimide

NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique

NPE: Ortho-nitrophényles

NpHR : Halorhodopsine

PA-Nic: Photoactivable Nicotine

PBS: Phosphate buffer solution

PIDA: Phényliodine diacétate

PMNB : p-Méthoxy-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RuBi: Ruthénium-Bipyridine

TA : température ambiante

TBAF: Fluorure de tributylammonium

TBAI : iodure de tetrabutylammonium

t-BuOK: *t*-butylate de potassium

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tetrahydrofurane

TMS: tri-méthylsilane

o-NB :Ortho-nitrobenzyle

Chapitre I

I. L'utilisation de la lumière pour l'étude des neurones

Les neurones sont des cellules que l'on retrouve dans le système nerveux, organisées en réseaux complexes ayant chacun une fonction précise. Ces réseaux neuronaux appelés également circuits neuronaux peuvent, par exemple, avoir pour fonction la réalisation d'un mouvement ou une modification comportementale chez un individu. De nombreuses maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, impliquent un dysfonctionnement de ces réseaux neuronaux. Ainsi, la compréhension de la fonction et de la régulation des différents circuits neuronaux est un réel enjeu en neurosciences afin de mieux comprendre les pathologies associées au dysfonctionnement de ces derniers et ainsi de pouvoir développer de nouvelles thérapies pour ces maladies.

Cependant, les neurones sont régulés de manière extrêmement fine et, pour pouvoir les étudier, il est nécessaire de contrôler leurs activités (excitation, inhibition) avec un contrôle spatio-temporel précis. Dans ce contexte, de nouveaux outils ont rapidement fait leur apparition permettant de contrôler l'activité neuronale par l'intermédiaire de stimuli lumineux. En effet, l'utilisation de la lumière est très attractive pour contrôler les phénomènes biologiques puisqu'elle est orthogonale aux processus s'effectuant au sein des cellules, à l'exception de certaines cellules très spécialisées, exprimant des photorécepteurs. De plus, la lumière peut être dirigée avec une grande précision grâce à des lasers et dans des gammes de temps variables, allant de la nanoseconde à des journées entières. Enfin, à des longueurs d'onde adaptées, elle présente peu de danger pour les cellules.

Dans cette introduction, nous allons nous intéresser au fonctionnement des neurones ainsi qu'aux différents outils photochimiques qui ont été développés pour étudier les phénomènes liés à la neurotransmission, c'est-à-dire, à la communication inter-neurones.

1. Les neurones : morphologie et fonctionnement

Les neurones sont des cellules se situant dans les tissus nerveux et permettant la propagation d'une information sous forme d'un courant électrique. Il existe différents types de neurones (moteurs, senseurs ...) avec chacun une morphologie qui lui est spécifique. Cependant, tous sont composés de quatre parties ayant leur propre fonction : le soma, l'axone, les dendrites et les terminaisons neuronales (cf. Figure 1)¹.

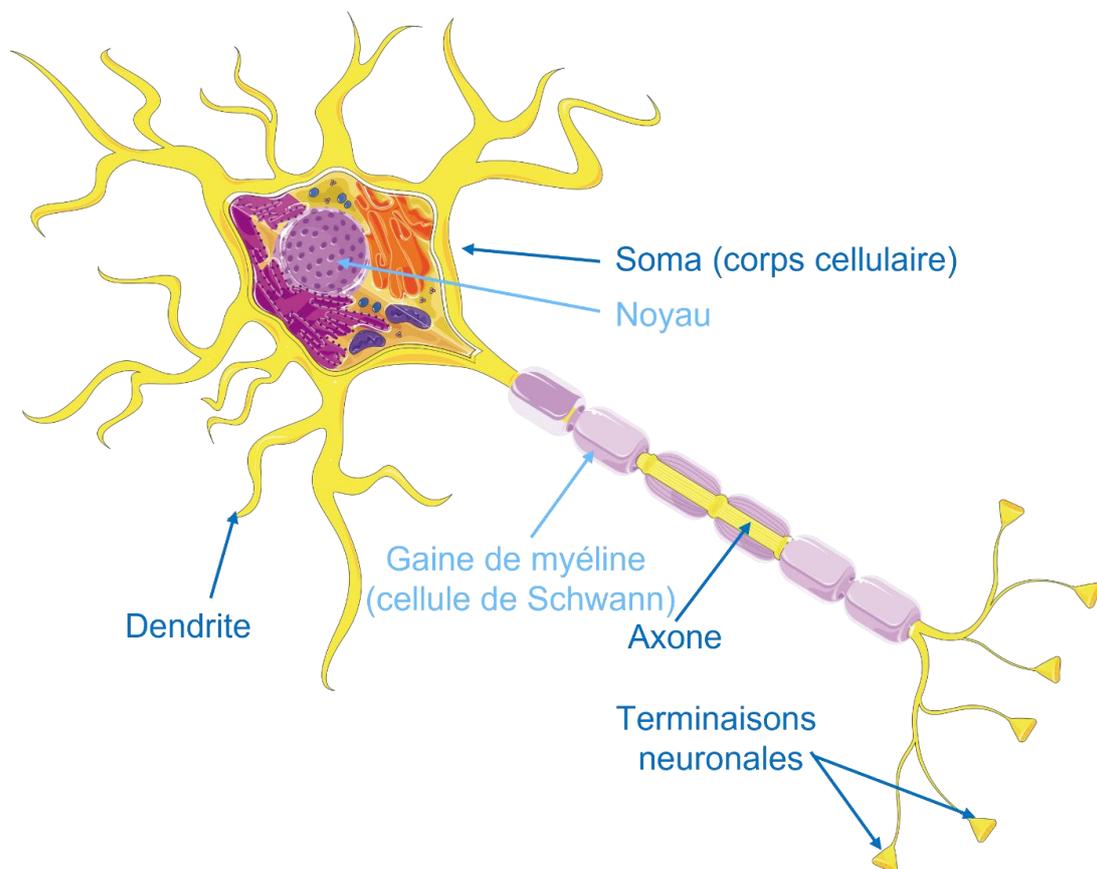


Figure 1: Schéma d'un neurone où sont représentés le soma, l'axone, les dendrites et les terminaisons neuronales. Dans le soma, on retrouve le noyau et les autres organelles. L'axone est entouré de la gaine de myéline composée de cellules de Schwann.

Ainsi, dans le soma (appelé également corps cellulaire) du neurone se retrouvent le noyau et toutes les organelles nécessaires au maintien à la vie de la cellule (cf. Figure 1). L'axone, quant à lui, est spécialisé dans la conduction de courants électriques appelés

potentiels d'action. Ceux-ci se propagent du soma jusqu'à l'extrémité de l'axone pour être ensuite convertis en messages chimiques sous la forme de petites molécules, appelées neurotransmetteurs. L'axone est entouré par la gaine de myéline qui lui permet d'acquérir une meilleure isolation électrique et donc une meilleure conduction des potentiels d'action (cf. Figure 1). Ensuite, le message est transmis à un autre neurone par le biais des terminaisons neuronales. Des neurotransmetteurs sont ainsi libérés dans les synapses, espace reliant l'extrémité terminale d'un axone avec les dendrites d'autres neurones, qui permettent l'échange inter-neurones de l'information. Pour finir, les dendrites sont spécialisées dans la réception et la conversion de ces messagers chimiques en courant électrique vers le corps cellulaire. Nous verrons par la suite le fonctionnement de la génération et propagation de ces courants électriques.

1.1 Les courants électriques au sein d'un neurone

Il peut paraître étrange de parler d'électricité et de biologie dans la même phrase. Cependant, de la même manière qu'un électron se déplace dans un fil électrique, les ions chargés positivement ou négativement peuvent se déplacer dans les neurones. Ainsi, ce mouvement de charges électriques génère des courants électriques qui peuvent être conduits à travers les neurones.

Il existe deux forces qui permettent le mouvement d'ions de part et d'autre de la membrane d'un neurone. La première, appelée gradient chimique, est due au gradient de concentration de chacun des ions entre les milieux intra- et extra-cellulaire. En effet, les concentrations en ions sodium, calcium, potassium et chlorure (ions les plus présents dans un neurone) sont différentes entre l'intérieur et l'extérieur du neurone (cf. Figure 2). De ce fait, les ions vont se déplacer spontanément de l'endroit le plus concentré vers le moins concentré. Ainsi, le gradient de concentration va pousser les ions sodium, calcium et chlore à rentrer dans le neurone tandis que le potassium va en sortir (cf. Figure 2). Les ions ne pouvant pas diffuser à travers la membrane plasmique, ils doivent donc passer par l'intermédiaire de protéines transmembranaires appelées canaux ioniques. Ces derniers peuvent s'ouvrir, formant ainsi un

canal permettant le passage des ions. Il est important de noter que ce flux d'ions est régulé de manière très fine. En effet, il existe des pompes à sodium et à potassium permettant la sortie de trois ions sodium et l'entrée de deux ions potassium à l'intérieur du neurone. Toutefois, pour s'opposer au potentiel chimique des ions, ces pompes ont besoin d'énergie, apportée par l'hydrolyse de molécules d'ATP par exemple². Des pompes similaires existent pour les autres ions³, entraînant des concentrations en ions *intra-* et *extra-*neurales constantes.

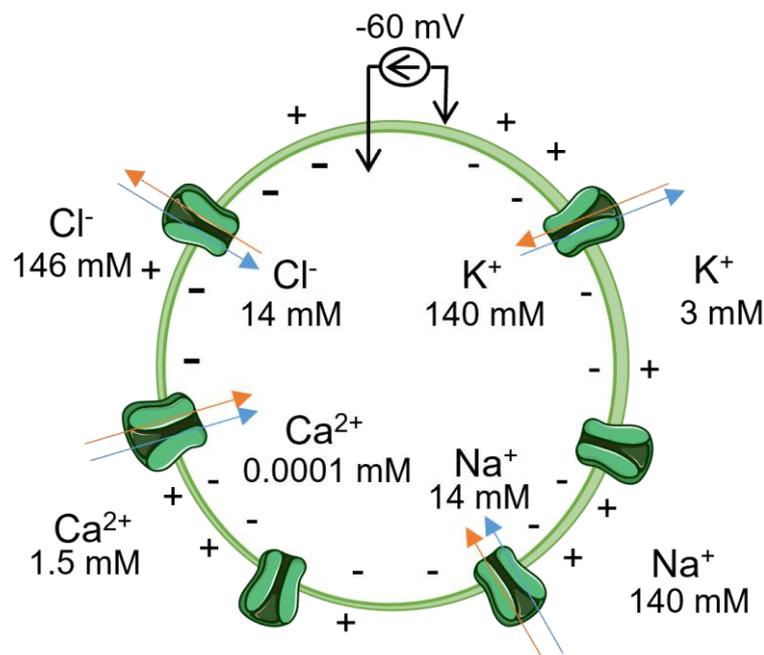


Figure 2: Représentation des gradients ioniques et électriques induisant le mouvement des ions calcium (Ca^{2+}), sodium (Na^+), potassium (K^+) et chlorure (Cl^-) de part et d'autre de la membrane du neurone. Les flèches orange représentent le gradient électrique et les flèches bleues représentent le gradient de concentrations.

Quant à la seconde force mise en jeu, appelée potentiel électrique, elle est due à la différence de potentiel entre les parois internes et externes de la membrane plasmique. En effet, il y a plus de charges négatives présentes sur la paroi interne que sur la paroi externe (cf. Figure 2). La membrane devient donc un dipôle ayant un potentiel s'exprimant par la différence de potentiel entre les faces internes et externes de la membrane (cf.

Équation 1). Au repos, la membrane d'un neurone a un potentiel de -60 mV.

Équation 1: Représentation du potentiel de la membrane (V_m) qui est déterminé à partir de la différence entre le potentiel de la paroi interne (V_i) et le potentiel de la paroi externe (V_e). Ces potentiels sont exprimés en mV.

$$V_m = V_i - V_e$$

De cette façon, les ions chargés positivement vont rentrer à l'intérieur du neurone et, à l'inverse, les ions chargés négativement vont tendre à en sortir. Pour les ions sodium et calcium, cela n'occasionne aucune complication, car les deux forces en présence les poussent à entrer dans le neurone. Dans le cas du chlorure et du potassium, les deux forces s'opposent. Ainsi, il est nécessaire de calculer le potentiel d'équilibre afin de déterminer le sens de circulation des ions, ce qui revient à déterminer les conditions dans lesquelles le gradient électrique et le gradient chimique de ces ions s'annulent. Le calcul du potentiel d'équilibre de chacun des ions est réalisé à l'aide de l'équation de Nernst (cf. Équation 2).

Équation 2 : Équation de Nernst où R est la constante des gaz parfaits ($8,314\ 462\ 1\ \text{J mol}^{-1}\ \text{K}^{-1}$), T la température absolue en Kelvin, z la valence de l'ion, F la constante de Faraday ($96\ 485\ \text{C mol}^{-1}$), $[ion]_e$ la concentration en ion à l'extérieur de la membrane, $[ion]_i$ la concentration en ion à l'intérieur de la membrane.

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \times \ln \left(\frac{[ion]_e}{[ion]_i} \right)$$

A noter que les concentrations étant maintenues constantes, il en va de même pour le gradient de concentration. Ainsi, seul le gradient électrique est variable, car le déplacement d'ions va dépolariser (réduction du potentiel membranaire) ou hyperpolariser (augmentation du potentiel membranaire) la membrane plasmique. Par exemple, lorsque du sodium, chargé positivement, entre dans un neurone, le nombre de charges positives augmente, entraînant une augmentation du potentiel de la paroi interne (cf.

Équation 1). Tant que le potentiel d'équilibre n'est pas atteint, l'ion va suivre le gradient de concentration. Une fois le potentiel d'équilibre atteint, le mouvement d'ions s'arrête. Enfin, lorsque celui-ci est dépassé, le sens de déplacement s'inverse pour suivre le gradient électrique. Dans le cas de l'ion potassium, le potentiel d'équilibre est de -97 mV. Or, la gamme de potentiel que peut prendre la membrane plasmique d'un neurone est de -80 à +50 mV. De ce fait, dans les conditions physiologiques, les ions potassium se dirigeront toujours de l'intérieur vers l'extérieur du neurone. Avec des potentiels d'équilibre respectifs de +58 et +121 mV, les ions sodium et calcium, quant à eux, vont toujours entrer dans le neurone. Pour ce qui est du chlorure, la situation est plus compliquée puisque son potentiel d'équilibre de -59 mV lui donne la possibilité d'entrer ou de sortir du neurone. Les phénomènes associés étant complexes, cette introduction ne les mentionnera pas.

1.2 L'électrophysiologie patch-clamp

Le mouvement d'un ion à travers les canaux ioniques d'un neurone génère un courant électrique proportionnel à la quantité d'ions déplacés. Ainsi, la loi d'Ohm permet de décrire le potentiel de la membrane comme étant proportionnel à la résistance électrique et au courant électrique (cf. Équation 3).

Équation 3 : Loi d'Ohm avec U la tension exprimée en V, R la résistance exprimée en Ω et I l'intensité du courant électrique exprimée en A.

$$U = R \times I$$

Cependant, pour appliquer cette loi à l'étude des neurones, quelques modifications sont nécessaires. En effet, les électrophysiologistes qui étudient les phénomènes électriques et électrochimiques se produisant au sein d'une cellule préfèrent utiliser la conductance qui est inversement proportionnelle à la résistance. De ce fait, au lieu de quantifier la difficulté du courant à passer la membrane, on quantifie plutôt la facilité avec laquelle il la traverse (cf. Équation 4).

Équation 4: Loi d'Ohm adaptée à l'étude de courants ioniques unitaires. Avec i_{ion} le courant unitaire exprimé en pA, γ la conductance à travers un canal ionique exprimé en siemens (S), r la résistance électrique d'un canal ionique et U le potentiel membranaire exprimé en mV.

$$i_{ion} = \gamma \times U \text{ où } \gamma = \frac{1}{r}$$

Néanmoins, les termes employés varient en fonction de ce que l'on observe. En effet, si l'on enregistre un courant unitaire (passant par un canal ionique uniquement), alors le courant sera noté i_{ion} et la conductivité γ (cf. Équation 4). En revanche, si l'on observe les courants qui passent à travers tous les canaux ioniques de la cellule, le courant sera noté I_{ion} et la conductance G . La variation de ces termes permet de prendre en compte le nombre de canaux ioniques présents dans le système étudié et le fait qu'ils ne soient pas forcément tous ouverts en même temps. Ainsi l'Équation 4 peut être redéfinie pour l'observation de courants totaux (cf. Équation 5).

Équation 5: Loi d'Ohm adaptée à l'étude de courants ioniques totaux. Avec I le courant ionique exprimé en pA, G la conductance à travers tous les canaux ioniques exprimée en siemens (S), U le potentiel membranaire exprimé en mV, N le nombre de canaux ioniques d'un ion présents sur la membrane du neurone, P_o la probabilité d'ouverture du canal ionique.

$$I_{ion} = G \times U \text{ où } I_{ion} = N \cdot P_o \cdot i_{ion} \text{ et } G = N \cdot P_o \cdot \gamma$$

Afin de pouvoir étudier les neurones, il a été nécessaire de développer une technique permettant de mesurer le courant (la quantité d'ions) qui passe au travers des canaux ioniques. Dans ce but, en 1981, Neher et Sackmann ont modernisé l'électrophysiologie patch-clamp, ce qui leur a valu le prix Nobel de physiologie et médecine dix ans plus tard⁴. Il s'agit d'une technique basée sur l'utilisation d'une électrode en verre (nommée également pipette) manœuvrée à l'aide d'un micromanipulateur. Cette dernière peut se coller à une membrane et former un compartiment ayant une très forte résistance (appelée « gigaseal » en anglais) qui isole électriquement la partie de la membrane sous la pipette. Cette électrode va alors permettre de capter les variations de potentiel de la membrane ainsi que le courant qui passe à travers la membrane. De plus, grâce à cette électrode, il est possible d'imposer un potentiel membranaire et d'enregistrer les courants qui passent au travers de la membrane. Ce mode d'enregistrement est appelé « voltage imposé ». A l'inverse, le mode « courant imposé »

permet de générer des courants électriques et d'enregistrer les changements de potentiel de la membrane.

En plus de ces deux modes d'enregistrement, plusieurs configurations d'électrophysiologie patch-clamp existent. En effet, en fonction de ce que l'on veut étudier, la partie de la membrane (appelée « patch » en anglais) que l'on va observer est différente. Premièrement, la configuration nommée « cellule attachée » consiste à approcher la pipette (contenant un milieu extracellulaire) de la membrane et à appliquer une légère pression négative pour sceller la pipette sur celle-ci sans toutefois la rompre (cf. Figure 3). Cette technique ne permet pas d'induire un courant au travers de la membrane, mais peut être utilisée en mode « potentiel imposé ». On utilise alors cette technique lorsque l'on veut étudier plusieurs canaux ioniques simultanément. Ensuite, si une pression négative plus forte est appliquée, la membrane se rompt et la pipette (cette fois-ci préalablement remplie de milieu intracellulaire) se retrouve connectée à la cellule entière, permettant d'obtenir la configuration « cellule entière ». En mode « voltage imposé », on pourra alors enregistrer tous les courants qui passent par les canaux ioniques de la cellule tandis qu'en mode « courant imposé », on pourra enregistrer les changements de potentiel membranaire de la cellule entière. Enfin, lorsque l'on souhaite observer le courant qui passe au travers d'un unique canal, il est alors nécessaire d'utiliser le mode « out-side out » ou littéralement « extérieur à l'extérieur ». Celui-ci est obtenu en étirant la membrane en configuration « cellule attachée » afin de la rompre et qu'un petit morceau de cette dernière vienne se refermer sur l'électrode. En mode « voltage imposé », on pourra observer des courants unitaires. Également, cette configuration permet de modifier le milieu intra-cellulaire à l'aide la solution se trouvant à l'intérieur de l'électrode.

Cellule attachée Cellule entière Out-side out

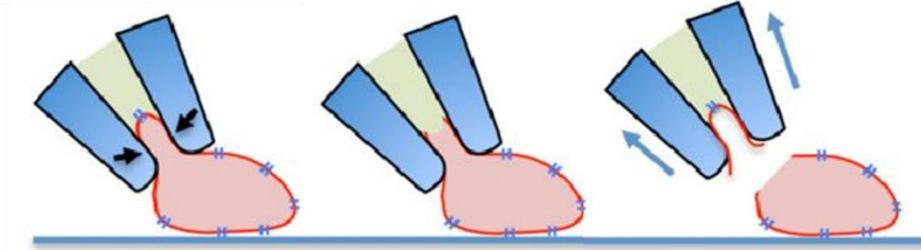


Figure 3 : Représentation des différentes configurations d'électrophysiologie patch-clamp. L'électrode est représentée en bleu, la cellule en rose, les canaux ioniques sont représentés par deux traits parallèles bleus et la solution intra-pipette en vert. Cette dernière est généralement un tampon proche de la composition du milieu extracellulaire en configuration cellule attachée, proche de la composition du milieu intracellulaire en configuration cellule entière et peut être modifiée en configuration « Out-side out ». Figure tirée de la littérature⁵.

Ainsi, l'électrophysiologie patch-clamp est devenue une technique de référence dans l'étude des récepteurs canaux ce qui a permis d'étudier de nombreux phénomènes en neurosciences^{6,7,8}. Dans la partie suivante, nous allons voir que des progrès non négligeables ont été faits grâce à une meilleure compréhension du fonctionnement des canaux sodiques.

1.3 La propagation des potentiels d'action

Les travaux d'Alan Hodgkin et d'Andrew Huxley ont permis d'enregistrer pour la première fois un potentiel d'action sur un axone géant de calamar⁹. Grâce aux résultats obtenus, ils ont pu établir un modèle appelé modèle d'Hodgkin et Huxley¹⁰⁻¹². Ce dernier décrit les potentiels d'action comme des courants intenses et brefs (de l'ordre de la milliseconde) se réalisant en plusieurs étapes (cf. Figure 4, étapes 1-4). Ainsi, si l'on observe par électrophysiologie patch-clamp un potentiel d'action qui se propage le long d'un axone, on s'aperçoit que le potentiel de la membrane va, dans un premier temps, augmenter légèrement. Puis, entre -50 et -40 mV, la membrane va se dépolariser (son potentiel devient plus élevé) de manière soudaine et rapide (cf. Figure 4, étape 1) jusqu'à atteindre des valeurs positives (cf. Figure 4, étape 2). La rapidité de ce phénomène s'explique de deux façons. Premièrement, l'ouverture des canaux sodiques est voltage-dépendante, c'est-à-dire que l'ouverture se déclenche au-delà d'un certain potentiel¹³. Deuxièmement, les gradients de potentiels chimiques et électriques sont tous deux dans le même sens pour l'ion sodium

permettant l'entrée d'un nombre conséquent de charges. Le potentiel va ensuite atteindre un maximum aux alentours de +50 mV (proche du potentiel d'équilibre de l'ion sodium) et redescendre rapidement (cf. Figure 4, étape 3). Cette diminution est causée par deux phénomènes. Le premier est l'inactivation des récepteurs canaux du sodium après un certain temps d'ouverture¹⁴. A noter que l'inactivation d'un récepteur est un état temporaire dans lequel le récepteur ne peut plus s'ouvrir. Le second est dû à l'ouverture des canaux potassiques, eux aussi voltage dépendants. Ces derniers s'ouvrent lorsque la membrane atteint un potentiel entre -50 et -40 mV et laissent sortir des ions potassium¹⁵. L'activation de ces canaux ioniques s'effectue au même potentiel que pour les canaux du sodium. Cependant, l'ouverture des canaux potassiques est beaucoup plus lente que celle des canaux du sodium. Par conséquent, ils ne contrebalancent pas la dépolarisation induite par les canaux sodiques et ne s'ouvrent qu'à une période où ces derniers sont inactivés. C'est grâce à ce mécanisme d'ouverture temporellement décalée des canaux sodiques et potassiques que les potentiels d'action sont intenses et brefs.

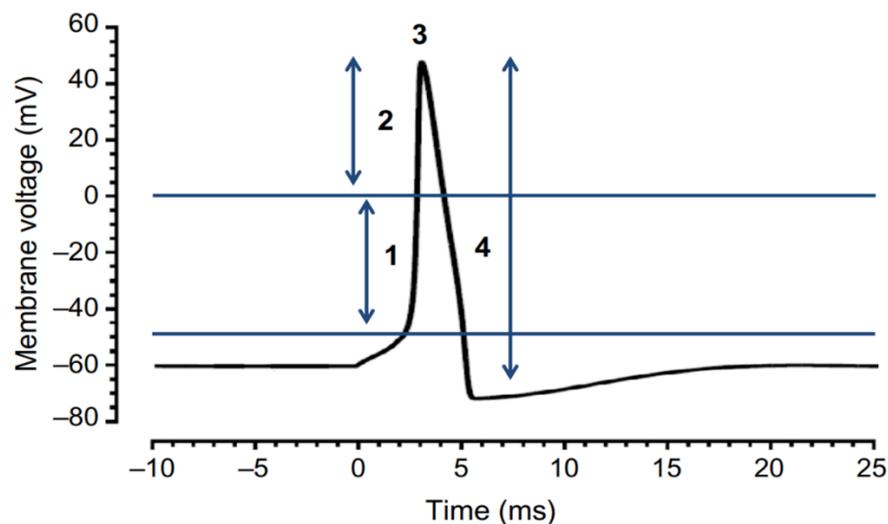


Figure 4: Trace d'électrophysiologie représentant le potentiel de la membrane d'un neurone en fonction du temps lors d'un potentiel d'action suivant le modèle d'Hodkin et Huxley. Figure extraite de la littérature¹⁶.

Les potentiels d'action sont générés à la base de l'axone, ce dernier présentant de nombreux canaux sodium voltage-dépendants^{17,18} (cf. Figure 5) qui s'ouvrent lors d'une faible

dépolarisation du soma. L'ouverture de ces canaux déclenche le potentiel d'action qui va se propager le long de l'axone. La gaine de myéline est constituée de cellules gliales (autre type de cellules nerveuses) qui vont isoler électriquement l'axone et ainsi empêcher une perte du signal¹⁹. Cette gaine ne recouvre pas la totalité de l'axone : il existe en effet des petits espaces non couverts que l'on appelle nœuds de Ranvier. Le nombre de canaux sodiques et potassiques est très important au niveau de ces nœuds. De ce fait, dès que le potentiel d'action atteint un nœud de Ranvier, il peut être renouvelé et propagé vers un autre nœud. L'inactivation temporaire des canaux sodium permet d'empêcher tout retour en arrière du potentiel d'action. Ainsi, ce dernier peut se propager jusqu'aux ramifications terminales du neurone et provoquer la libération de neurotransmetteurs.

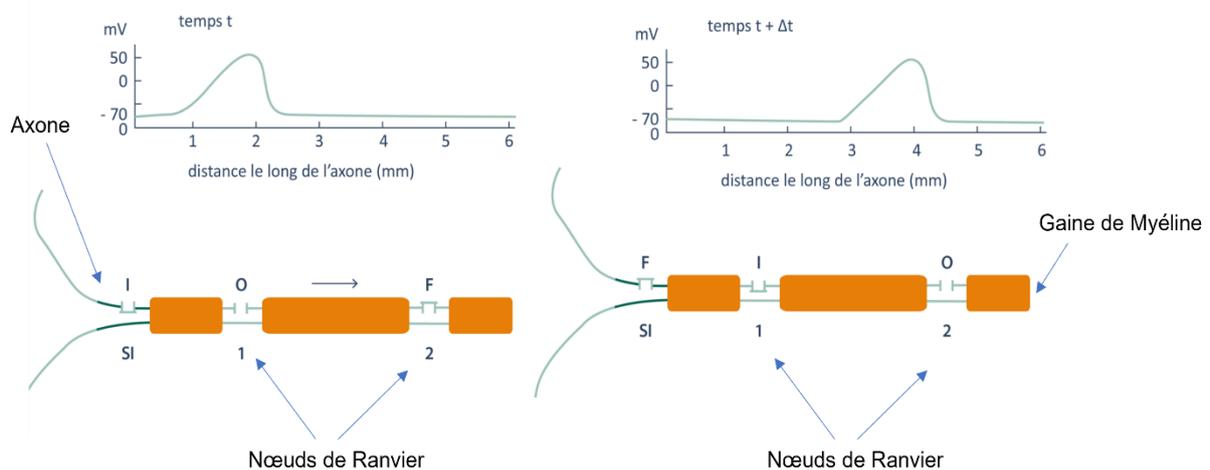


Figure 5: Propagation d'un potentiel d'action le long d'un axone. La lettre O signifie que les canaux du sodium sont ouverts, F que les canaux sont fermés et I que les canaux sont inactivés. Figure extraite de « la formation Neurophysiologie Cellulaire 1 : comment les neurones communiquent » par Constance Hammond.

1.4 La libération de neurotransmetteurs

La libération de neurotransmetteurs s'effectue à la jonction entre deux neurones, cette jonction étant appelée synapse. Le neurone qui libère les neurotransmetteurs est appelé neurone pré-synaptique tandis que le second neurone, qui reçoit les messagers chimiques, est nommé neurone post-synaptique. La synapse est donc l'espace de séparation entre la partie terminale de l'axone du neurone pré-synaptique et les dendrites du neurone post-

synaptique (cf. Figure 1). Ainsi, lorsque le potentiel d'action arrive à la partie terminale de l'axone (cf. Figure 6, étape 1), il déclenche l'ouverture des canaux du calcium qui sont voltage-dépendants^{20,21} (cf. Figure 6, étape 2). Ensuite, l'entrée des ions calcium dans le neurone pré-synaptique va entraîner la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane du neurone pré-synaptique entraînant leur exocytose²²⁻²⁴ (cf. Figure 6, étape 3). Cela permet alors de libérer les neurotransmetteurs qu'elles contiennent dans la fente synaptique^{25,26}. Pour finir, ces messagers chimiques vont pouvoir activer des récepteurs situés sur la membrane du neurone post-synaptique et qui sont spécifiques à chaque messenger. L'activation de ces récepteurs va déclencher de nombreux phénomènes tels que l'activation de récepteurs couplés aux protéines G^{27,28} ou l'ouverture de canaux ioniques²⁹⁻³¹ permettant le passage d'ions dans le neurone post-synaptique (cf. Figure 6, étape 4). Par conséquent, le flux d'ions va dépolariser la membrane dans le cas d'une excitation ou l'hyperpolariser dans le cas d'une inhibition. En effet, chaque récepteur va entraîner différents passages d'ions, ce qui peut conduire à une entrée d'ions positifs comme dans le cas des récepteurs ionotropiques du glutamate (K^+ et Na^+) ou une entrée d'ions négativement chargés comme dans le cas des récepteurs ionotropiques du GABA (Cl^-). Cette variation du potentiel de la membrane va être ensuite transmise au soma puis à l'axone qui peut à son tour déclencher un potentiel d'action qui se propage le long de son axone.

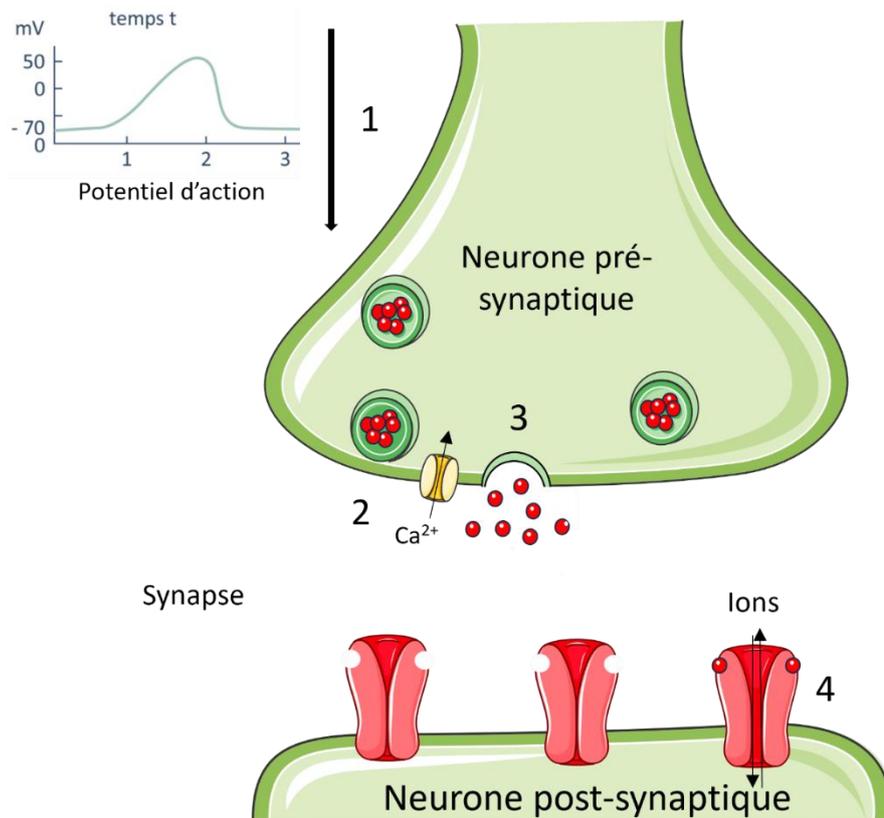


Figure 6: Schéma d'une libération de neurotransmetteur induite par l'arrivée d'un potentiel d'action dans le neurone pré-synaptique. Les boules rouges représentent des neurotransmetteurs, le canal ionique représenté en jaune est, un canal perméable aux ions calcium, activé par une dépolarisation de la membrane et les canaux ioniques en rouge représentent des canaux ioniques pouvant s'ouvrir lorsque des neurotransmetteurs se lient à ces récepteurs.

Par ces procédés un neurone peut communiquer avec plusieurs neurones et former des circuits neuronaux impliqués dans la gestion des mouvements, du comportement ou encore de l'apprentissage. Pour comprendre les mécanismes qui régulent l'activité des circuits neuronaux, des outils ont été développés afin de pouvoir étudier sélectivement une famille de récepteurs ou des populations de neurones spécifiques à l'aide d'impulsions lumineuses.

2. L'approche optopharmacologique

Nous avons vu précédemment que l'activité d'un neurone était dépendante de nombreux canaux ioniques s'ouvrant en fonction du potentiel de la membrane ou de la

présence d'un ligand à leur proximité. De nombreux travaux d'électrophysiologie, biologie moléculaire, génie génétique et de biologie structurale ont permis d'élucider certains mystères autour de leur fonctionnement. Cependant, beaucoup de leurs mécanismes restent encore méconnus. Cela peut être expliqué par le manque de précision des techniques employées qui ne permettent pas d'étudier un seul type de récepteurs ou une sous-population de neurone précise.

Afin, de pouvoir mieux les étudier, de nouvelles techniques ont vu le jour grâce au développement d'outils sensibles à la lumière. En effet, en combinant l'utilisation d'ondes lumineuses au génie génétique ou à des molécules exogènes photoactivables, il est possible de contrôler avec précision l'activité d'un récepteur. Ces techniques sont regroupées sous le terme d'optopharmacologie et ont mené à de grandes avancées dans la compréhension des processus liés à la neurotransmission.

2.1. Optogénétique : La combinaison du génie génétique et de la lumière

L'utilisation de la lumière en combinaison avec des techniques de génie génétique est appelée optogénétique. Cette technique repose sur l'expression d'une protéine exogène photoactivable qui va permettre de contrôler l'activité d'un neurone. En effet, grâce à des travaux de génie génétique, il est possible d'exprimer certains canaux ioniques capables de s'ouvrir lorsqu'ils sont éclairés avec de la lumière (cf. Figure 7).

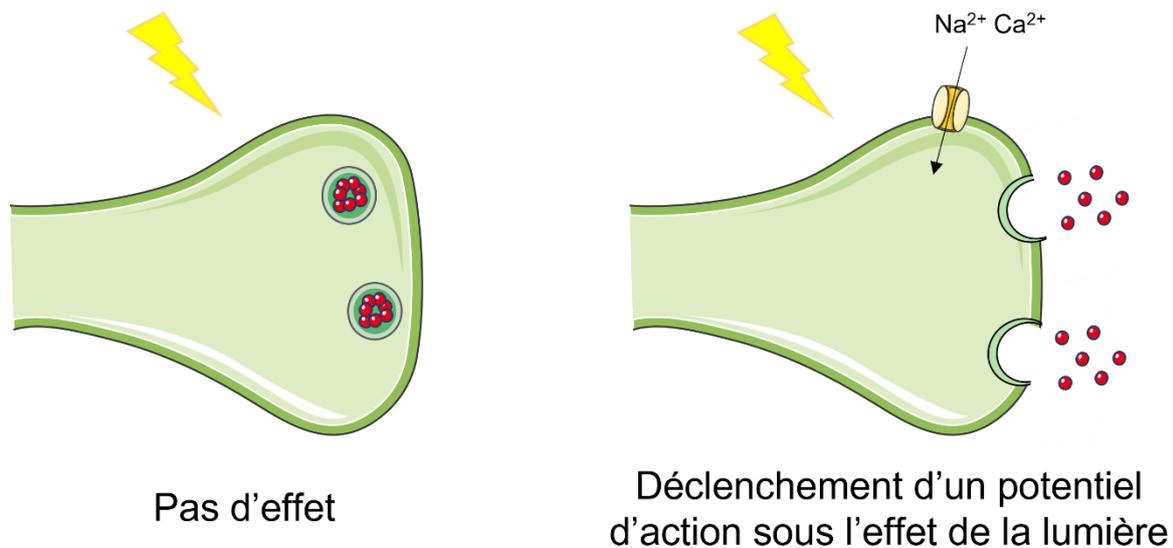


Figure 7: Illustration du principe de l'optogénétique : on rend sensible à la lumière un neurone qui n'était préalablement pas sensible aux impulsions lumineuses. Cela se fait par l'expression d'une protéine photosensible exogène. Ici une protéine (ChR2) est représentée par un canal ionique en jaune, permettant l'entrée des ions sodium et calcium déclenchant ainsi un potentiel d'action.

2.1.1 Utilisations des protéines de la famille des Rhodopsines

La première famille de protéines à avoir été utilisée en optogénétique est la famille des Rhodopsines de type I, exprimées par des algues vertes unicellulaires (*Chlamydomonas reinhardtii*). Dans cette famille, on retrouve les protéines ChannelRhodopsine I (ChR1) et ChannelRhodopsine II (ChR2) qui se sont révélées être des canaux ioniques pouvant s'ouvrir sous l'impulsion de la lumière. Ainsi, la protéine ChR1 est un canal sélectif des protons tandis que ChR2 est perméable aux ions sodium et calcium^{32,33}. L'ouverture réversible de ces canaux ioniques est due à un chromophore, le rétinal (une des formes actives de la vitamine A) lié de manière covalente à la protéine et pouvant s'isomériser sous l'influence de la lumière bleue. En effet, lorsque ce composé est irradié à 470 nm, il s'isomériser de la forme « tout trans » à la forme « 13-cis » (cf. Figure 8). Cette isomérisation va induire un changement conformationnel de protéine ChR2 provoquant l'ouverture d'un canal de 6 Å permettant le passage d'ions. En absence de lumière, le rétinal retourne à la configuration « tout-trans » et le canal se referme.

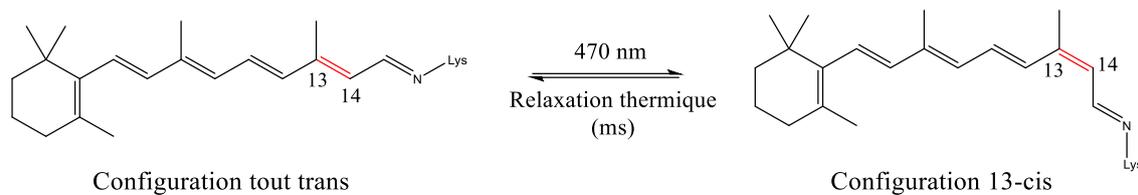


Figure 8: Isomérisation du rétinol lié à un résidu lysine d'une protéine ChR de la forme « tout trans » à la forme « 13-cis » à la suite d'une irradiation lumineuse à 470 nm.

Ainsi, la protéine ChR2 est très intéressante en neurosciences puisqu'elle permet d'induire une dépolarisation de la membrane d'un neurone à l'aide d'une impulsion lumineuse. Cela a été démontré en 2005 par le groupe de Karl Deisseroth qui a exprimé cette protéine dans des neurones de rat en culture et a pu enregistrer des courants excitateurs induits par des stimuli lumineux avec une résolution de l'ordre de la milliseconde³⁴. D'autres groupes ont également montré que cet outil pouvait permettre de contrôler le circuit neuronal responsable de la nociception chez la drosophile³⁵ ou encore de cartographier la connectivité neuronale sur tranches de cerveau de souris³⁶.

Plus tard, la halorhodopsine (NpHR), une autre protéine de la famille des Rhodopsines de type I, s'est révélée être une pompe à ions chlorures pouvant être activée par irradiation à 580 nm. De ce fait, cette protéine est également très intéressante pour induire de manière contrôlée, une hyperpolarisation de la membrane d'un neurone. Ainsi, le groupe de Karl Deisseroth a montré qu'il était possible d'inhiber l'activité d'un neurone exprimant cette protéine à l'aide d'une impulsion lumineuse³⁷. De plus, les protéines ChR2 et NpHR, ayant des longueurs d'onde d'absorption maximale différentes, elles peuvent être utilisées de manière sélective permettant respectivement d'exciter et d'inhiber le même neurone³⁷.

Bien que les protéines ChR2 et NpHR permettent de moduler l'activité neuronale, leurs photosensibilités restent faibles à des longueurs d'onde haute en énergie, ce qui est problématique pour une utilisation sur culture de neurones et encore plus sur tranche de cerveau. En effet, l'utilisation continue de telles longueurs d'onde induit des photo-dommages sur les neurones. De plus, ces radiations sont absorbées par les composants tissulaires ce qui contribue aux dégâts liés à la lumière et réduit la profondeur dans le tissu à laquelle il est possible d'irradier efficacement. De ce fait, de nouveaux variants de la protéine ChR2, plus

sensibles à la lumière et absorbant à des longueurs d'onde moins hautes en énergie ont fait leur apparition, ce qui permet de limiter les dégâts causés par les stimulations lumineuses. Par exemple, la protéine VChR1 a été découverte chez la chlorophyte *Volvox carteri* et permet de déclencher des potentiels d'action par impulsion lumineuse entre 500 et 550 nm³⁸. D'autres canaux ioniques sensibles à la lumière ont pu être obtenus par ingénierie génétique telle que la protéine ReaChR, un canal ionique perméable aux cations lorsqu'elle est excitée entre 590 et 630 nm³⁹. De même, la protéine iC1C2 obtenue en combinant les protéines ChR1 et ChR2 présente une perméabilité aux ions chlorures induite par une excitation entre 450 et 500 nm⁴⁰.

A noter qu'il existe également des protéines de la famille des Rhodopsines présentes chez les cellules eucaryotes. Cependant elles sont appelées Rhodopsines de type II. En effet, ces protéines s'activent également par une isomérisation du rétinol, mais cette fois-ci, il s'agit d'une isomérisation de la forme « 11-cis » en « tout trans » qui déclenche son hydrolyse (cf. Figure 9)⁴¹. La protéine change alors de configuration et ne retourne à son état initial qu'en recrutant de nouveau une molécule de rétinol, ce qui est beaucoup plus long (de l'ordre de la dizaine de millisecondes) que pour les Rhodopsines de types I. Par conséquent, leur utilisation pour étudier les neurones n'est pas judicieuse, car le manque de résolution temporel conduit à l'apparition d'artefacts. De plus, les Rhodopsines de type II ne sont pas des canaux ioniques, mais des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces dernières sont un type de protéines transmembranaires qui induisent une cascade signalétique lorsque le récepteur est activé, permettant le transfert rapide d'une information⁴².

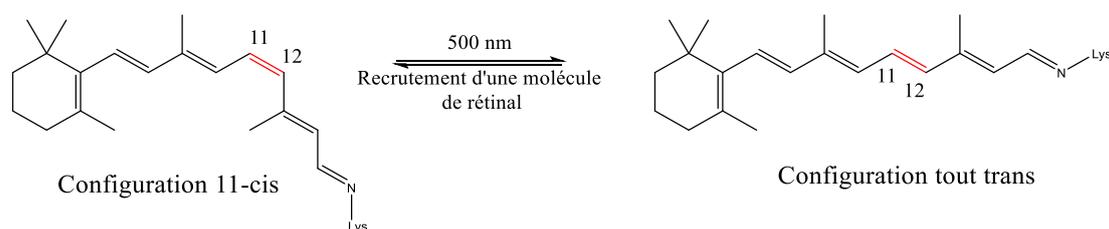


Figure 9: Isomérisation du rétinol, fixé à une Rhodopsines de type II par la formation d'une imine avec un résidu lysine, de la forme « 11-Cis » à la forme « tout trans » à la suite d'une irradiation lumineuse. Le changement de configuration entraîne l'hydrolyse de l'imine induisant un changement de configuration de la protéine.

De nombreux RCPG sont présents à la surface des neurones tels que les récepteurs métabotropiques du glutamate ou encore les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. Par conséquent, des outils ont également été développés pour les étudier. Ainsi, en fusionnant les domaines extra et transmembranaire d'une Rhodopsine de type II au domaine intracellulaire d'un RCPG, il est possible d'obtenir une protéine chimérique. Cette dernière garde donc la voie de signalisation que le RCPG déclenche, tout en devenant activable par la lumière. Ces récepteurs chimères sont appelés « opto-XR » et ont permis de contrôler par la lumière la voie de signalisation des récepteurs adrénérgiques⁴³, récepteurs adénosines⁴⁴ ou encore des récepteurs de la sérotonine⁴⁵.

2.1.2 L'utilisation des flavoprotéines

Les flavoprotéines sont une famille de protéines sensibles à la lumière utilisant toute la flavine comme chromophore. Ce dernier, peut être lié à de l'adénine mononucléotide (formant le Flavine Mono Nucléotide (FMN)) ou à de l'adénine dinucléotide (formant le Flavine Adénine Dinucléotide (FAD)). Parmi ces protéines, trois se sont révélées être sensibles à la lumière bleue : la protéine LOV (Light-Oxygen-Voltage), la protéine CRY2 (Cryptochrome 2) et la protéine BLUF (Blue Light-Utilizing-Flavin).

En effet, ces protéines peuvent changer de structure lorsqu'elles sont irradiées avec chacune un mécanisme distinct (cf. Figure 10). Ainsi, une photostimulation de la protéine LOV va induire un dépliement de son hélice α en partie C-terminal, modifiant ainsi la structure tertiaire de la protéine⁴⁶. Ce dépliement permet ensuite, par exemple, une interaction avec une seconde protéine ou une restauration de son activité. De manière similaire, une excitation de la protéine BLUF va provoquer le dépliement de l'hélice α en C-terminal de la protéine⁴⁶. Quant à la protéine CRY2, son activation par de la lumière bleue va induire un changement structural lui permettant de former des homo-oligomères ou des dimères avec la protéine CIB1 (Cryptochrome-Intéraction-Basique-hélice-boucle-hélice)⁴⁷.

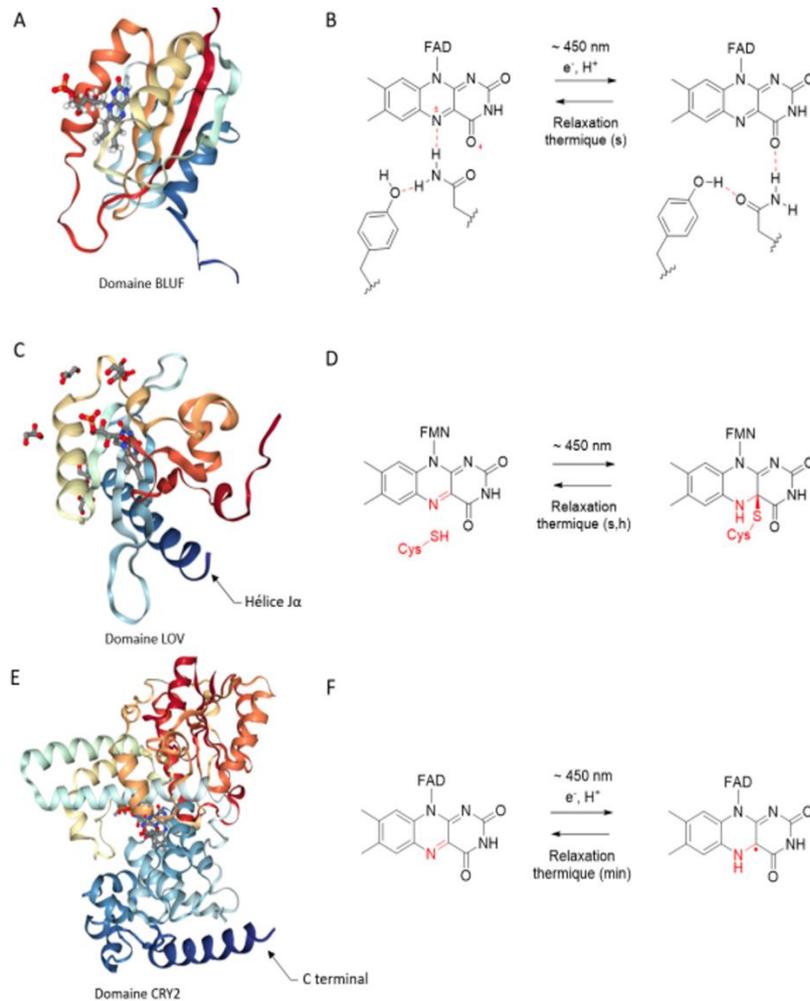


Figure 10: Représentation des protéines photoactivable LOV, BLUF et CRY2 ainsi que de leurs mécanismes d'activation. A : Structure du domaine de la protéine BLUF de *klebsielle pneumoniae* BlrP1 (PDB ID : 2KB2). La structure est représentée en ruban et la molécule de flavine en modèle bâtonnet. B : Mécanisme de photoactivation du domaine BLUF s'effectuant par un transfert d'électron du résidu tyrosine vers la flavine menant à un réarrangement des liaisons hydrogènes N5 et O4. C : Structure du domaine de la protéine LOV de *avena Avena sativa* phot1 (PDB ID : 2VOU). La structure est représentée en ruban et la molécule de flavine en modèle bâtonnet. D : Mécanisme de photoactivation du domaine LOV s'effectuant par formation d'un adduit entre une cystéine et la position 4 de la flavine. E : Structure du domaine de la protéine CRY2 de *Arabidopsis thaliana*. La structure est représentée en ruban et la molécule de flavine en modèle bâtonnet. F : Mécanisme de photoactivation du domaine CRY2 par échange d'électron entre un résidu Tryptophane et la flavine. Figure extraite d'une thèse⁴⁸.

Ainsi, grâce à des travaux de génie génétique, ces flavoprotéines ont été fusionnées à d'autres protéines pour contrôler des interactions protéines-protéines ou encore leur localisation avec un fort contrôle spatio-temporel⁴⁹. Les protéines LOV et CRY2 ont particulièrement été utilisées en neurosciences. En effet, la protéine LOV a permis de contrôler l'activité de canaux ioniques tels que les canaux potassiques⁵⁰ et calciques^{51,52} tandis que la protéine CRY2 a permis d'inhiber des récepteurs couplés aux protéines G⁵³ ou de contrôler la libération de neurotransmetteurs⁵⁴.

Pour conclure, l'optogénétique est un formidable outil d'étude permettant de contrôler des processus biologiques avec un fort contrôle spatiotemporel. Cependant, ces techniques reposent sur l'expression de protéines exogènes et ne permettent pas d'étudier des systèmes biologiques dans des conditions natives.

2.2 Utilisation de sondes chimiques

L'utilisation de sondes chimiques photoactivables est une alternative à l'optogénétique. En effet, au lieu de rendre le récepteur sensible à la lumière par le biais de modifications génétiques, on utilise un ligand rendu photosensible par l'intermédiaire de chromophores synthétiques. Cela permet donc d'étudier des systèmes biologiques en conditions natives. Ainsi de nombreux travaux ont été réalisés pour élaborer des sondes chimiques permettant l'étude des phénomènes de neurotransmission.

2.2.1 Le marquage par photo-affinité

Le marquage par photo-affinité repose sur l'utilisation d'une fonction chimique photosensible pouvant former un intermédiaire extrêmement réactif lors d'une irradiation lumineuse. Celui-ci va permettre de réaliser une alkylation irréversible avec des fonctions chimiques présentes dans l'entourage de la sonde et, en particulier, avec une protéine interagissant avec la sonde. Ainsi, en réalisant un dérivé d'un ligand arborant ce type de fonctionnalité, il est possible d'ancrer un ligand de manière irréversible au site de liaison de son récepteur. En effet, le ligand peut se lier de manière réversible (en fonction de son affinité) à son récepteur dans l'obscurité et donc lors d'une stimulation lumineuse, la probabilité que ce dernier soit lié au récepteur est importante. De plus, ce type de fonctionnalité permet également de sonder l'environnement chimique autour d'une protéine afin de détecter de possibles interactions protéines-protéines⁵⁵. Le marquage par photoaffinité a été développé par le groupe de Westheimer en 1962 qui a montré qu'en ajoutant un groupement

diazoacetate sur la partie C-terminal de la chymotrypsine il était possible d'obtenir la chymotrypsine acétylée après irradiation lumineuse. Depuis d'autres groupements permettant ce type de réactivité ont été utilisés, tels que des dérivés benzophénones, azoture d'aryles, diazirines et diazoniums (Cf. Figure 11).

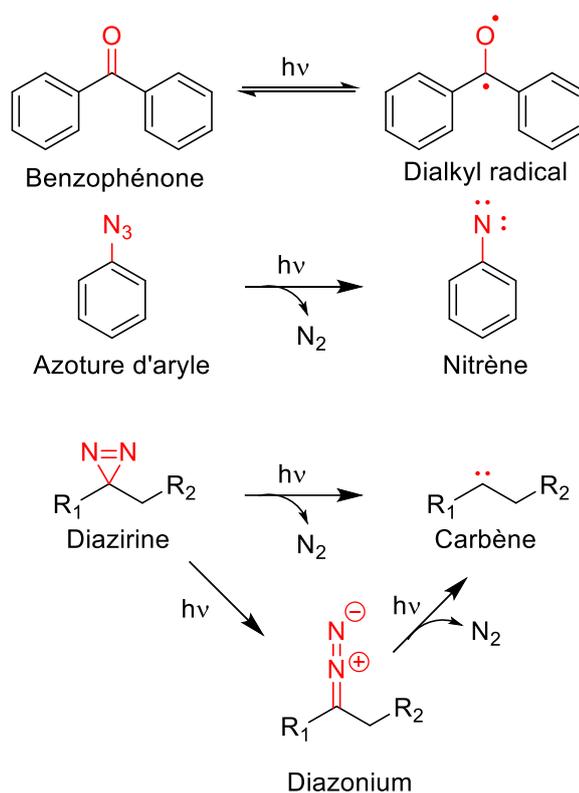


Figure 11: Représentation des différentes fonctions chimiques permettant de réaliser du marquage par photo-affinité ainsi que leurs mécanismes d'activation photoinduit.

Ainsi, il a été décrit dans la littérature de nombreux ligands pouvant se lier de manière irréversible à des récepteurs canaux et les forcer à rester dans un état ouvert permanent (ou fermé définitivement). Parmi eux, on retrouve les récepteurs du GABA⁵⁶, de l'AMPA⁵⁷ ou de la nicotine^{58,59}. L'utilisation de ce type de sonde photochimique a donc permis de cartographier les sites de liaisons des ligands avec une résolution atomique. De plus, la nature irréversible de la liaison permet de piéger une protéine dans un état conformationnel actif permettant de mieux interpréter les relations récepteurs-ligands.

2.2.2 *l'utilisation de composés « photo-isomérisables »*

D'autres sondes permettent, quant à elles, d'activer de manière contrôlée et réversible des récepteurs. En effet, à l'instar du rétinol pouvant réaliser une isomérisation réversible, certaines fonctions chimiques peuvent également s'isomériser de manière réversible lorsqu'elles sont irradiées. Cette propriété a permis de réaliser un nouveau type de sonde chimique : les ligands photo-isomérisables (« photoswitch ligand » en anglais). A noter que dans la littérature ces composés s'appellent également ligands photochromes, ce qui désigne un composé pouvant subir de manière photoinduite une transition réversible entre deux isomères présentant des propriétés spectrales différentes⁶⁰. Ainsi, en utilisant ce type de chromophore, il est possible de moduler la disponibilité d'un ligand de manière contrôlée. En effet, en liant un ligand à une fonction isomérisable, il est possible de le rendre inactif (en l'encombrant ou en l'éloignant d'un récepteur) et de restaurer son activité grâce à la lumière.

Il existe quelques fonctions permettant l'élaboration de ligands photochromes. La plus connue et utilisée est la fonction azobenzène qui à l'instar du photochrome hemithioindigo effectue une isomérisation cis/trans lorsqu'il est irradié⁶¹ (cf. Figure 12). D'autres composés comme les spiropyranes rompent une liaison à l'état excité, résultant en une ouverture de cycle et la formation d'un chromophore de type merocyanine. Ce dernier présente des propriétés de fluorescence ce qui rend son utilisation très attractive en biologie⁶². Pour finir, les diaryléthènes se sont également révélés être intéressants en biologie⁶³ puisque ces derniers peuvent subir une électrocyclisation réversible lorsqu'ils sont irradiés avec des radiations dans le domaine des UV. A noter, que tous ces photochromes reviennent à leur état le plus stable par relaxation thermique, mais également par excitation avec de la lumière dans le domaine du visible (vers 500 nm).

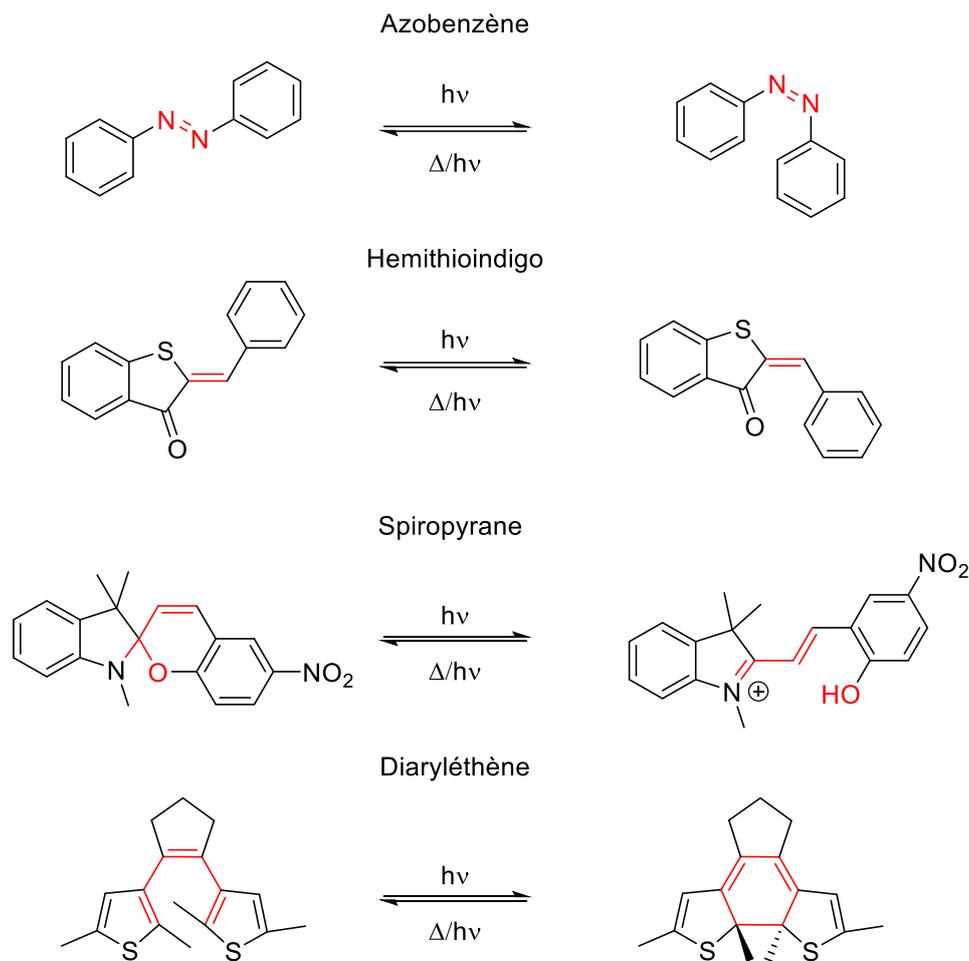


Figure 12: Différents photochromes ayant été utilisés en biologie.

Bien que ces différents photochromes soient intéressants pour des applications en biologie, les photochromes de type azobenzène ont principalement été utilisés. En effet, ces derniers sont facilement modifiables, s'isomérisent de la forme « trans » la plus stable à la forme « cis » par irradiation dans les UV et reviennent à leur forme « trans » par irradiation dans le vert ou par relaxation thermique dans l'obscurité. De plus, ces composés présentent des rendements quantiques d'isomérisation importants et ne se dégradent pas, même après de nombreux cycles d'isomérisation.

Il existe deux types de sondes photoisomérisables, les ligands photochromes solubles (LPS) et les ligands photochromes attachés (LPA). Les premiers sont simples à utiliser et permettent d'étudier des récepteurs endogènes. Ces ligands sont composés d'une partie photochrome et d'une partie agoniste, antagoniste ou bloqueur de canaux ioniques dont la

fonction biologique est inactivée quand le photochrome est en conformation « trans » (ou « cis » en fonction de l'application). L'activité du ligand est ensuite restaurée lors d'une isomérisation photoinduite permettant de passer à la conformation opposée (cf. Figure 13). Ainsi, le premier ligand photochrome soluble à avoir été développé est un dérivé azobenzène arborant un motif carbamoycholine permettant de contrôler l'activité des récepteurs nicotiques⁶⁴. S'en est suivi le développement de nombreux ligands photochromes permettant de moduler l'activité de différentes protéines telles que les canaux ioniques du potassium⁶⁵, du calcium⁶⁶ et les récepteurs ionotropes^{67,68} et métabotropiques du glutamate⁶⁹. Cependant, ces composés présentent souvent une spécificité limitée, car beaucoup de récepteurs présentent des sites de liaisons de ligands très similaires. De plus, les spectres d'absorption des formes « cis » et « trans » des azobenzènes (représentant la plupart des LPA et LPS) se recouvrent légèrement ce qui empêche d'obtenir une isomérisation complète impliquant une présence constante de molécules activées quand elles ne devraient pas l'être (ou inversement)⁷⁰.

Les ligands photochromes attachés, quant à eux, permettent d'améliorer la sélectivité de la sonde. En effet, ces ligands se différencient des LPS par l'ajout d'une fonction chimique réactive permettant de se lier de manière irréversible à un acide aminé proche du site de liaison (cf. Figure 13). De cette manière, lors de l'activation du photochrome par la lumière, il est possible de rapprocher le ligand du site de liaison et contrôler son activation de cette manière. L'affinité du ligand étant très forte pour son récepteur, la fonction réactive réagira préférentiellement avec la protéine cible permettant de limiter les effets indésirables (activations ou inhibitions d'autres récepteurs par exemple) que l'on peut retrouver avec les LPS. Cependant, cette stratégie implique bien souvent l'introduction d'un acide aminé (nécessaire à l'ancrage) par mutagenèse dirigée, ce qui ne permet pas toujours d'étudier des récepteurs en conditions natives. Le plus souvent, c'est une cystéine qui est introduite proche d'un site de liaison permettant de réaliser une liaison covalente avec un électrophile (un maléimide dans la plupart des cas). A noter que dans de très rares cas, il est possible qu'un acide aminé endogène soit déjà bien positionné sur une protéine et donc ne nécessite pas le recours à la modification génétique^{71,72}. Toutefois, de nombreux ligands photochromes attachés ont été utilisés pour contrôler des récepteurs modifiés grâce aux techniques de

mutagenèse dirigée. Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs canaux du potassium⁷³, les récepteurs nicotinique⁷⁴, les récepteurs P2X⁷⁵ et les récepteurs du GABA⁷⁶. L'utilisation de LPA permet d'augmenter la cinétique d'activation des récepteurs grâce à la proximité du ligand avec le site de liaison.

Une dernière stratégie repose sur l'utilisation d'un photochrome lié de part et d'autre à deux cystéines introduites sur le récepteur permettant de former une pince isomérisable (« optical tweezer » en anglais) pouvant forcer l'ouverture d'un récepteur à l'aide de stimulation lumineuse (cf. Figure 13). Cette technique a particulièrement été utilisée pour étudier les récepteurs P2X⁷⁷⁻⁷⁹.

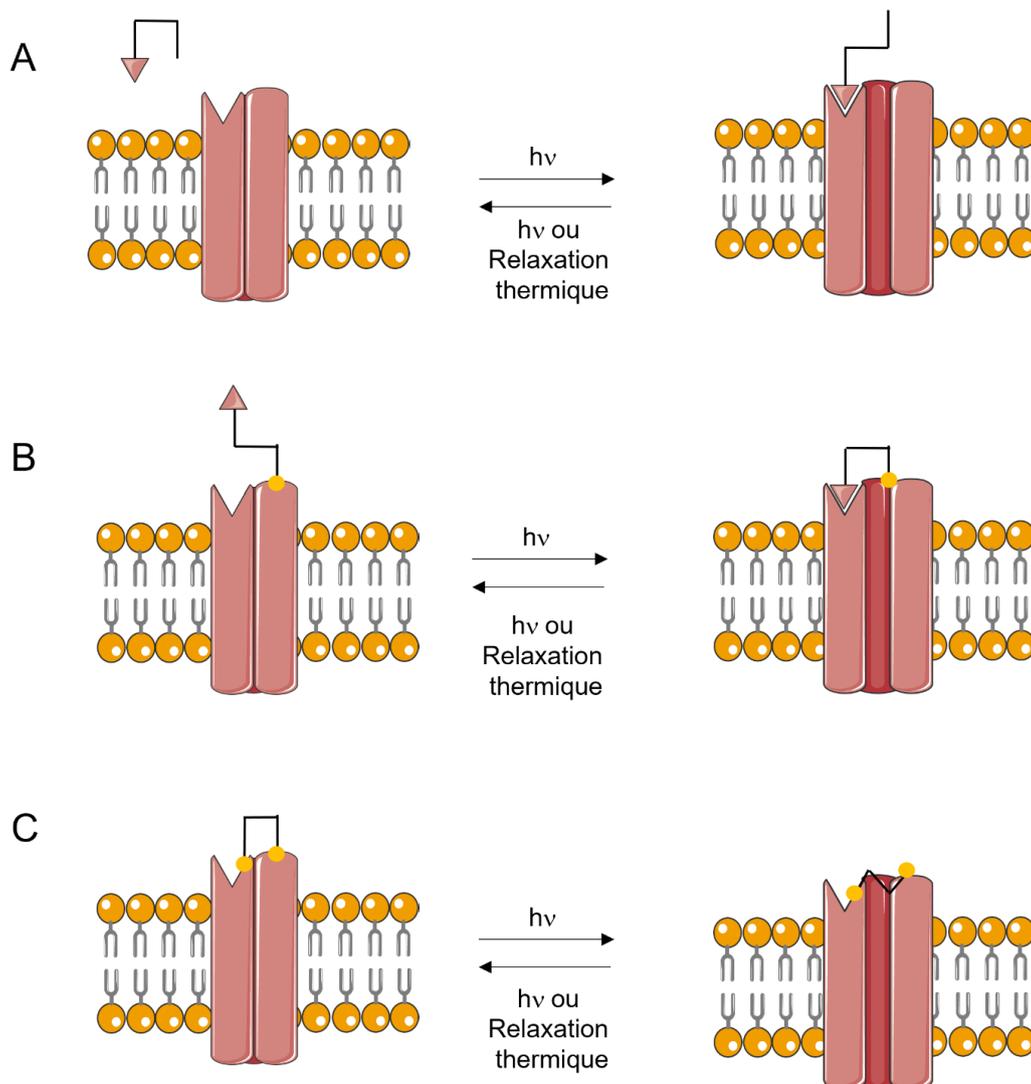


Figure 13: Présentation des deux méthodes principales lors de l'utilisation de ligands photo-isomérisables. A : Utilisation de ligands photochromes solubles qui sont présents dans le milieu biologique sous forme inactives et s'isomérisent sous forme active lors d'une stimulation lumineuse permettant au composé de se lier de manière réversible au

récepteur. Ensuite, le chromophore revient dans sa configuration initiale par relaxation thermique ou par irradiation lumineuse. B : Utilisation de ligands photochromes attachés par une liaison covalente entre une entité réactive présente sur le composé et un acide aminé naturel ou non-naturel (représenté par un point jaune). Lors d'une stimulation lumineuse, le changement de configuration permet de rapprocher le ligand du récepteur entraînant son activation. Ensuite, le chromophore revient dans sa configuration initiale par relaxation thermique ou par irradiation. C : Utilisation d'une pince isomérisable liée par deux entités réactives sur le récepteur permettant de forcer l'ouverture d'un canal ionique lors de stimulation lumineuse.

Pour étudier les phénomènes de neurotransmission nous avons vu qu'il était possible d'utiliser des canaux photosensibles ou encore de rendre un récepteur photoactivable en le fusionnant à des protéines sensibles à la lumière. Ces outils sont efficaces et, une fois les travaux de génie génétique effectués, ils sont simples à mettre en place. Cependant, ils ne permettent pas d'étudier des systèmes dans des conditions physiologiques.

L'utilisation de sondes synthétiques permettant de moduler l'activité des neurones est également intéressante. En effet, des interactions protéines-protéines ont pu être détectées grâce au marquage par photo-affinité. Aussi, l'utilisation de ligands photochromes solubles a permis de contrôler l'activation de récepteurs en conditions natives par la lumière. Néanmoins, ces composés présentent un manque de sélectivité et tendent à interagir avec d'autres récepteurs. Ce manque de sélectivité peut être évité grâce à l'utilisation de ligands photochromes attachés qui nécessitent pour la plupart l'introduction d'un acide aminé réactif, par mutagenèse dirigée, ne permettant plus d'étudier la protéine sous forme native.

De plus, la plupart de ces outils ne permettent pas de reproduire exactement l'activation d'un récepteur, car ils utilisent soit une protéine exogène, soit un ligand modifié. Ainsi, un autre type de sonde chimique a été utilisé pour tenter de mimer une activation d'un neurone par un neurotransmetteur : les groupements protecteurs photolabiles.

3. Utilisation de groupements protecteurs photolabiles

Les groupements protecteurs photolabiles (GPP) sont des molécules présentant une liaison qui peut se rompre lors d'irradiations lumineuses. En effet, à l'état excité, ces composés peuvent subir une réaction intramoléculaire, qui conduit à la rupture d'une liaison spécifique.

Ainsi, si une biomolécule est liée de manière covalente à un GPP, cela forme un précurseur photolabile de la biomolécule (cf. Figure 14). Idéalement, l'effecteur biologique est couplé par une fonction chimique nécessaire à la reconnaissance récepteur-ligand, ce qui masque son activité biologique. La biomolécule peut ensuite être libérée de manière contrôlée en irradiant le composé. De ce fait, les précurseurs photolabiles d'effecteurs biologiques ont très vite intéressé les biologistes puisqu'ils offrent la possibilité de réaliser des sauts de concentration d'une molécule bioactive avec un fort contrôle spatio-temporel.

Il est important de préciser que les précurseurs photolabiles de biomolécules sont appelés « molécule cagées » par les biologistes. Cependant, en chimie ce terme désigne déjà des structures moléculaires tridimensionnelles permettant de piéger en leurs seins des entités chimiques et donc, ne peut pas être employé, en français du moins.

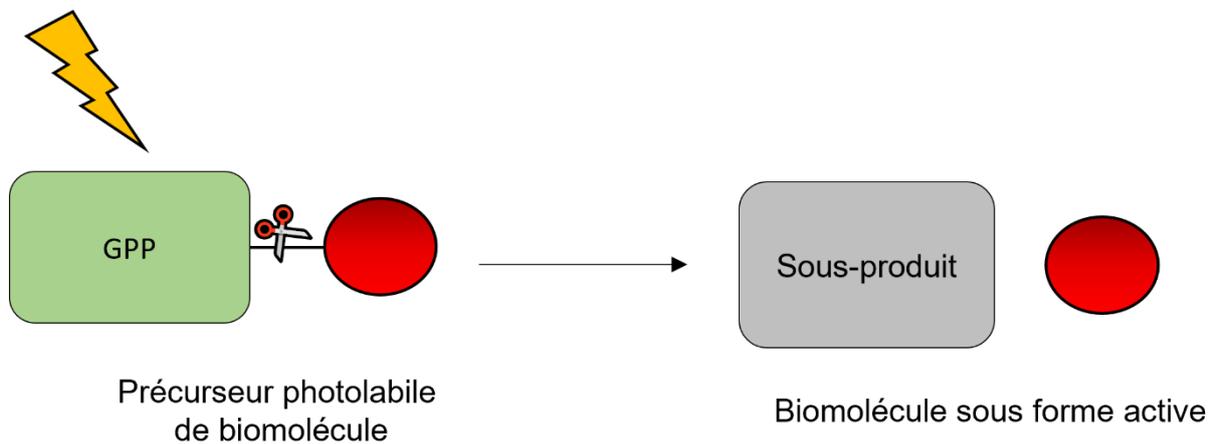


Figure 14: Principe de l'utilisation de GPP pour libérer une biomolécule reposant sur la rupture de la liaison entre le GPP et la biomolécule (représentée en rouge) initiée par un stimulus lumineux.

3.1 Caractéristiques idéales pour un précurseur photolabile de biomolécule

Le développement d'un nouveau précurseur photolabile de biomolécule doit prendre en compte de nombreux critères. En effet, la synthèse doit être efficace et les propriétés photochimiques, physico-chimiques et pharmacologiques doivent être en adéquation avec l'application biologique que l'on souhaite réaliser. Ainsi, chaque application nécessite de répondre à des besoins bien spécifiques. Toutefois, en règle générale les GPPs doivent :

- (i) Avoir une absorbance maximale aux longueurs d'onde les plus biocompatibles, c'est-à-dire déplacées vers le rouge. De plus, la réaction de photolyse doit être la plus efficace possible (cf. Équation 6). Cette dernière est proportionnelle au coefficient d'extinction molaire de la molécule, décrivant sa facilité à atteindre l'état excité, et au rendement quantique de photolyse exprimant le taux de molécule à l'état excité réalisant une réaction de photolyse. Pour finir, le composé doit libérer l'effecteur biologique avec une cinétique plus rapide que le phénomène biologique à étudier.

Équation 6: Formule permettant de déterminer l'efficacité de photolyse à un photon. Avec ϵ le coefficient d'extinction molaire exprimé en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ et Φ_u le rendement quantique de photolyse (sans unité).

$$\text{Efficacité de photolyse} = \epsilon \times \Phi_u$$

- (ii) Être soluble dans des milieux aqueux complexes contenant des sels à hautes concentrations. Le composé doit également être stable en solution aqueuse dans le noir. En effet, la plupart des liaisons covalentes entre un GPP et une biomolécule sont des liaisons ester, phosphate ou carbamate pouvant s'hydrolyser et ainsi dégrader en fonction du temps la molécule.
- (iii) Être inerte vis-à-vis du système biologique étudié. En effet, le GPP doit masquer le plus possible l'activité de la biomolécule. Cela n'est pas évident, car mêmes protégées, certaines molécules gardent de l'affinité pour leurs récepteurs ou deviennent antagonistes d'autres récepteurs.
- (iv) Avoir un sous-produit de photolyse n'absorbant idéalement pas aux mêmes longueurs d'onde que le GPP afin d'éviter une compétition d'absorption des photons entre les deux composés. De plus le sous-produit de photolyse doit également ne pas être toxique.

3.2 Les différentes familles de groupements protecteurs photolabiles

De nombreuses familles de groupements protecteurs photolabiles existent, ayant chacune leurs mécanismes de photolyse, leurs avantages et leurs inconvénients⁸⁰⁻⁸². Cette introduction ne présentera que les familles les plus utilisées.

3.2.1 Les groupements *ortho*-nitrobenzyles

Les *ortho*-nitrobenzyles (*o*-NB) sont de loin la famille de GPP la plus utilisée (cf. Figure 15). En effet, ce sont les premiers groupements protecteurs photolabiles à avoir été employés en synthèse organique. Ils ont notamment permis de protéger des fonctions d'acides aminés telles que l'amine d'une histidine⁸³ ou encore la fonction phénol d'une tyrosine⁸⁴. En 1978, les premiers biologistes se sont intéressés à l'utilisation de ces groupements protecteurs pour étudier les phénomènes du vivant. Ainsi, les premiers précurseurs photolabiles d'adénosines cycliques⁸⁵ ont été synthétisés par l'équipe de Juergen Schlaeger tandis que l'équipe de Kaplan a réalisé le premier précurseur photolabile d'adénosine triphosphate⁸⁶. Par la suite, ces composés ont été largement utilisés par les biologistes pour libérer de nombreux effecteurs biologiques tels du calcium⁸⁷, de l'inositol⁸⁸ ou encore de l'ARN⁸⁹.

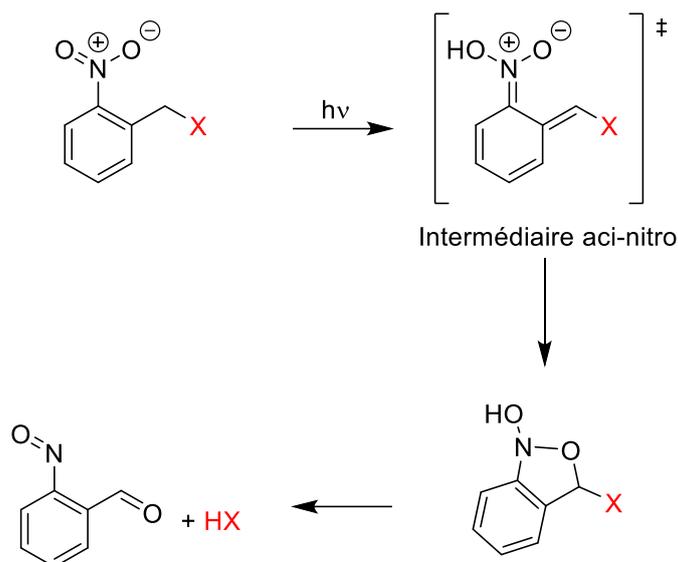


Figure 15: Mécanisme de photolyse des groupements *o*-NB d'un groupement partant noté X pouvant être lié par une fonction acide carboxylique, phosphate, amine ou carbamate.

a) 3.2.2 Les groupements ortho-nitrophénétyles

Dans les années 1990, l'équipe de Kenneth R. Isham a élaboré le premier groupement protecteur photolabile de type *ortho*-nitrophénétyle (NPE). Ces derniers, sont structurellement proches des groupements *o*-NB, mais présentent un mécanisme de photolyse différent (cf. Figure 16)⁹⁰. Ces groupements ont généralement des cinétiques de réactions photolytiques plus rapides avec des rendements quantiques de photolyse plus importants que ceux de groupements *o*-NB similaires. Ainsi, cette famille de composés a également été utilisée dans de nombreux travaux permettant de libérer des biomolécules telles que l'acide gibbelerique⁹¹, du GABA⁹² et du glutamate⁹³.

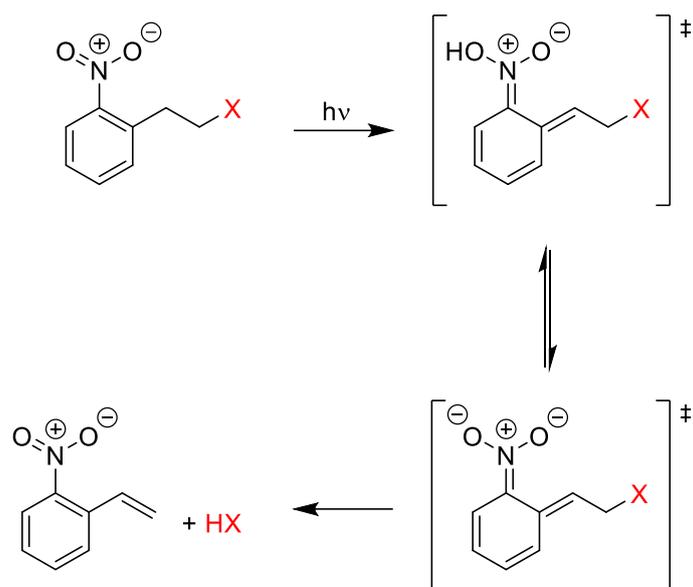


Figure 16: Mécanisme de photolyse des groupements de type ortho-nitrophényyle d'un groupement partant noté X, pouvant être lié par une fonction acide carboxylique, phosphate, amine ou carbamate.

3.2.3 Les groupements coumarinyles

Les coumarines ont été utilisées pour la première fois comme groupement protecteur photolabile par l'équipe de Richard Givens. Ceux-ci ont montré que des dérivés 7-méthoxycoumarinyl-4-méthyle pouvaient réaliser des réactions photolytiques permettant de libérer des alkyles phosphates (cf. Figure 17)⁹⁴. L'intérêt pour cette famille de GPP n'a fait que croître au fil des années. En effet, ces composés absorbent à des longueurs d'onde plus élevées avec des coefficients d'extinction molaire plus conséquents que ceux des autres GPPs cités ci-dessus. Par conséquent, cela leur permet d'avoir des efficacités de photolyse importantes malgré leurs rendements quantiques souvent plus faibles (cf. Équation 6). De plus, ces dernières sont fluorescentes ce qui permet, sous certaines conditions, de suivre la réaction de photolyse. Ainsi, ces composés ont été utilisés pour libérer de nombreux effecteurs biologiques tels que de l'adénosine monophosphate cyclique⁹⁵, des anticancéreux⁹⁶ ou encore un bloqueur des transporteurs du glutamate⁹⁷.

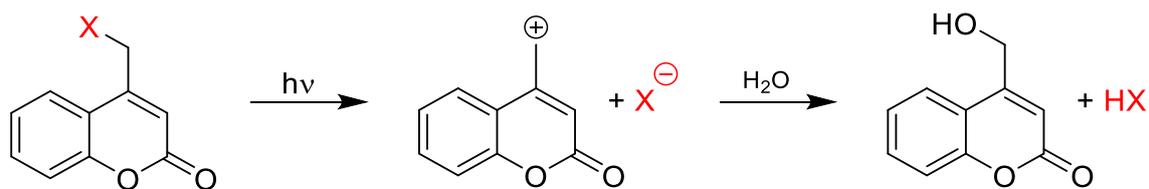


Figure 17: Mécanisme de photolyse des dérivés coumarinyles dans l'eau, d'un groupement partant noté X, pouvant être lié par une fonction acide carboxylique, phosphate ou carbamate.

3.2.4 Les groupements nitroindolines

La première équipe à avoir montré que les groupements 7-Nitroindoline (NI) pouvaient libérer des acides carboxyliques est celle de Patchornik (cf. Figure 18)⁹⁸. Cependant, ces composés ne seront que très peu utilisés et il faudra attendre vingt ans que l'équipe de Papageorgiou développe des modifications structurales permettant de rendre les groupements NI très intéressants⁹⁹. En effet, l'introduction d'une fonction méthoxy en position para du nitro sur la structure d'un groupement NI a permis d'obtenir un GPP relarguant efficacement des acides carboxyliques. De plus, contrairement aux *o*-NB, ces composés sont très peu sensibles à l'hydrolyse dans des solutions aqueuses, les rendant attractifs pour des applications en biologie. Ainsi, ces groupements seront particulièrement utilisés pour libérer des neurotransmetteurs tels que le glutamate^{100,101}.

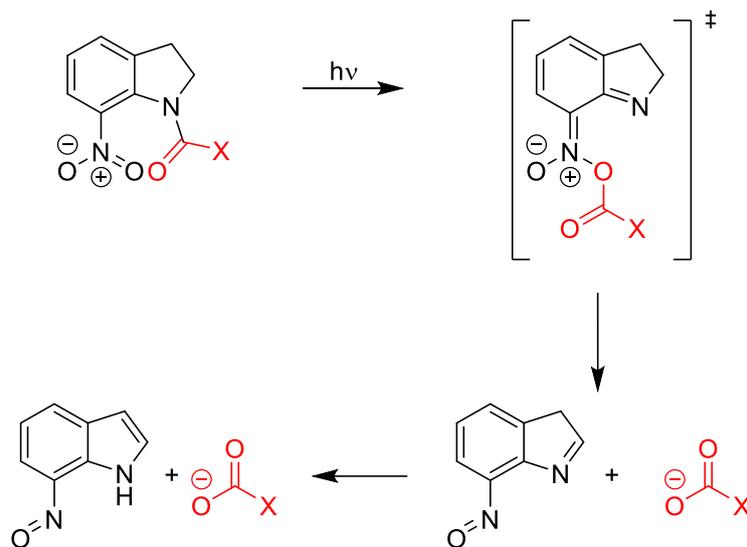


Figure 18: Mécanisme de photolyse des groupements 7-nitroindoline dans l'eau, d'un groupement partant noté X, pouvant être lié par une fonction acide carboxylique, phosphate ou carbamate.

3.2.5 Les complexes de ruthénium-bipyridine

Des composés inorganiques peuvent également être utilisés comme groupements protecteurs photolabiles. C'est le cas des complexes de ruthénium-bipyridine (RuBi) qui peuvent rompre une liaison ligand-métal lorsqu'ils sont à l'état excité (cf. Figure 19). Ces derniers sont très intéressants, car ils absorbent des radiations aux environs de 470 nm. Leur utilisation implique donc moins de phototoxicité que celle des GPPs classiques excitable dans le domaine des UV. De plus, ces composés peuvent également libérer des fonctions amines beaucoup plus facilement que les GPPs organiques, ce qui a permis de développer des précurseurs photolabiles de molécules aminées telles que la 4-aminopyridine¹⁰², la sérotonine¹⁰³ ou encore du glutamate¹⁰⁴ ou du GABA¹⁰⁵.

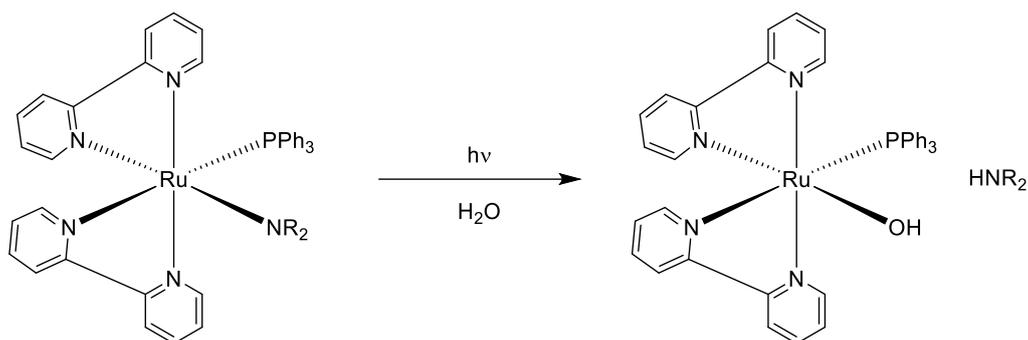


Figure 19 : Libération de molécules aminées déclenchée par stimulation lumineuse des complexes RuBi.

3.3 Utilisation des groupements protecteurs photolabiles en neurosciences

Les GPPs permettent donc de déclencher, grâce à la lumière, un saut de concentration d'un effecteur biologique avec un fort contrôle spatio-temporel. Ils ont par conséquent suscité beaucoup d'intérêt auprès des neurobiologistes menant au développement de nombreux précurseurs photolabiles de neurotransmetteurs. Ainsi, la première molécule à avoir été couplée à un GPP est la carbamoycholine, un agoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine¹⁰⁶. Cela a marqué le début de l'utilisation des GPPs en neurosciences. En effet, peu de temps après, la collaboration entre Barry Carpenter et George Hess, un chimiste et un biologiste, a permis le développement de nombreux précurseurs photolabiles de neurotransmetteurs tels que le glutamate¹⁰⁷, la sérotonine¹⁰⁸, le GABA¹⁰⁵ ou encore la glycine¹⁰⁷. Ainsi, ces composés ont été employés afin d'étudier de nombreux phénomènes liés à la neurotransmission. Par exemple, l'équipe de W. Zieglgänsberger a pu cartographier la répartition des récepteurs NMDA et AMPA sur cultures de neurones en utilisant un précurseur photolabile du glutamate^{111,112}. De nombreux mécanismes ont ainsi pu être élucidés grâce aux précurseurs photolabiles de neurotransmetteurs^{113,114}.

Cependant, la réaction de photolyse des premiers précurseurs photolabiles de neurotransmetteurs nécessitait une irradiation dans le domaine des UV. L'utilisation de cette région du spectre lumineux est problématique. En effet, le recours à des radiations aussi énergétiques peut induire une toxicité cellulaire. De plus, ces rayonnements sont fortement absorbés par de nombreux composants cellulaires (acides aminés, nucléotides), empêchant

ainsi la lumière de pénétrer profondément dans les tissus^{115,116}. D'autre part, cette irradiation classique, appelée « à un photon » montre ses limites lors de travaux requérant une haute résolution spatiale. En effet, lors de l'irradiation, le neurotransmetteur est libéré sur tout le trajet du rayon lumineux, ne permettant pas un contrôle spatial fin. Ces deux dernières décennies, les photochimistes se sont donc intéressés à développer des groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique. Ce mode d'excitation est basé sur l'absorption simultanée de deux photons pour exciter un chromophore. Cela permet de pallier certains des problèmes évoqués ci-dessus, en utilisant des longueurs d'onde dans le domaine du rouge et proche infrarouge, pour exciter des zones extrêmement petites (de l'ordre de grandeur d'un fL) avec une haute résolution spatiale et temporelle.

4. L'excitation bi-photonique

4.1 Théorie

L'interaction entre le champ électrique d'une onde lumineuse et la matière entraîne une polarisation de cette dernière qui est dépendante de l'amplitude du champ. Ainsi, la polarisation d'un matériau peut être exprimée par l'Équation 7

Équation 7 : Formule exprimant la polarisation d'un matériau (P_i) en fonction du champ électrique de l'onde lumineuse (E). P_0 représente la polarisation permanente du matériau et $\chi^{(i)}$ représente les susceptibilités électriques d'ordre (i).

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

Si le matériau polarisé est une molécule, l'expression de sa polarisation en fonction du champ électrique est légèrement différente. En effet, à l'échelle moléculaire, l'interaction de la lumière induit un moment dipolaire qui peut être exprimé par l'Équation 8.

Équation 8: Formule exprimant le moment dipolaire (μ_i) d'une molécule polarisée par la lumière, en fonction du champ électrique (E). μ_0 représente le moment dipolaire permanent de la molécule, α est la polarisabilité, β l'hyperpolarisabilité quadratique et γ l'hyperpolarisabilité cubique.

$$\mu_i = \mu_0 + \alpha . E + \beta . E^2 + \gamma . E^3 \dots$$

Ainsi, lorsque le champ électrique de l'onde lumineuse est faible, les termes d'ordre supérieur à 1 ne sont pas pris en compte, car négligeables. En effet, si le champ électrique est faible, alors les termes dépendant du carré ou du cube de ce dernier seront forcément minimes. Les sources lumineuses communes ne permettent pas d'obtenir des champs électriques élevés. Par conséquent, l'Équation 8 peut être simplifiée de la manière suivante.

Équation 9: Formule exprimant le moment dipolaire (μ_i) d'une molécule induit par un champ électrique E faible. Avec μ_0 le moment dipolaire permanent de la molécule et α est la polarisabilité.

$$\mu_i = \mu_0 + \alpha . E$$

Dans ce cas, la polarisation du matériau sera proportionnelle au champ électrique appliqué. Il s'agit alors du domaine de l'optique linéaire (cf. Figure 20) à la base de nombreux phénomènes tels que la réfraction ou l'absorption mono-photonique. Cependant, avec le développement de sources lumineuses plus puissantes, telles que des lasers, le champ électrique appliqué au matériau peut être beaucoup plus important. Ainsi, les termes d'ordres supérieurs à 1 ne sont plus négligeables et la polarisation du matériau éclairé n'est plus proportionnelle à l'intensité du champ exciteur, il s'agit là du domaine de l'optique non linéaire (cf. Figure 20). Les termes du second ordre β pour une molécule et $\chi^{(2)}$ pour un

matériau, caractérisent les phénomènes d'optiques non linéaires quadratiques dont le plus connu est la génération d'une seconde harmonique¹¹⁷. L'excitation à deux photons est, quant à elle, un phénomène d'optique non linéaire cubique, caractérisée par les termes du troisième ordre γ pour une molécule et $\chi^{(3)}$ pour un matériau.

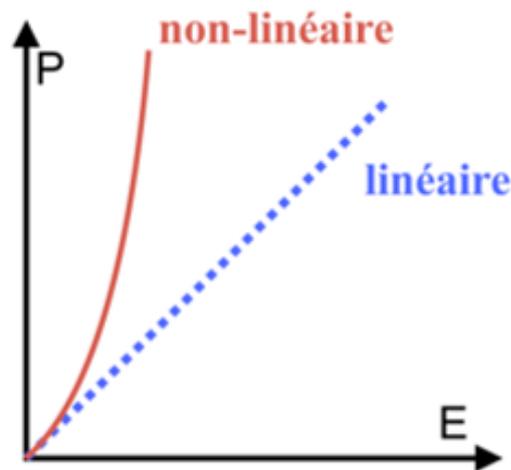


Figure 20: Représentation de la polarisation d'un matériau en fonction du champ électrique de l'onde lumineuse.

4.2 L'excitation multi-photonique

Le passage de l'état fondamental à l'état excité d'une molécule est atteint lorsque la molécule absorbe de l'énergie correspondant à la différence d'énergie entre les deux états. Cela peut être atteint grâce à de l'énergie thermique, mécanique, électrique ou encore lumineuse. Dans ce dernier cas, la molécule absorbe un photon possédant une énergie $E = h\nu$ (cf. Figure 21). Dans ce contexte, il s'agit d'un phénomène d'optique linéaire. Néanmoins, le passage à l'état excité peut aussi s'effectuer en absorbant deux photons (d'énergies égales ou non) par un processus relevant de l'optique non linéaire. Cependant, les deux photons doivent arriver quasi simultanément (phénomène de l'ordre de la femtoseconde). À noter qu'il est possible d'absorber plus de deux photons, on parle alors d'absorption multi-photonique. Ce phénomène a été prédit théoriquement par Maria Goeppert-Mayer¹¹⁸ en 1931, mais il

faudra attendre le développement des lasers pulsés pour qu'expérimentalement l'absorption à deux photons puisse être observée pour la première fois¹¹⁹.

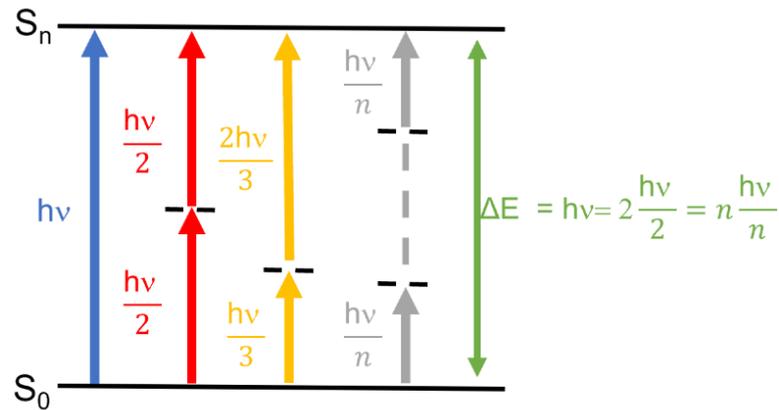


Figure 21: Diagramme de Jablonsky représentant une excitation à un photon (en bleu), à deux photons de même énergie (en rouge), à deux photons ayant des énergies différentes (en jaune) et une excitation multi-photonique (en gris).

Pour la suite, seul le cas de figure où une molécule absorbe des photons de même énergie sera considéré. Ainsi, pour une irradiation avec une seule source lumineuse, la probabilité d'absorption multi-photonique (P) peut être calculée avec l'Équation 10.

Équation 10 : Formule représentant la probabilité d'absorption multi-photonique (P) en fonction du nombre de photons absorbés (n), σ_n la section efficace d'absorption à n photons et I l'intensité lumineuse.

$$P = \frac{1}{n} \times \sigma_n \times I^n \text{ pour } n = 2, P = \frac{1}{2} \times \sigma_2 \times I^2$$

Ainsi, dans le cas où la molécule absorbe deux photons, σ_2 est appelé section efficace d'absorption à deux photons (noté également δ_a) et représente l'efficacité par laquelle la molécule va passer à l'état excité par ce mode d'excitation. Elle est exprimée en Goeppert-Mayer noté GM ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photons}^{-1}$).

4.3 L'excitation à deux photons

L'excitation à deux photons ne s'effectue qu'au point focal du système optique, c'est ce qui permet un meilleur contrôle spatio-temporel de la zone d'irradiation. Cela est dû à la relation quadratique entre la probabilité d'excitation à deux photons P et l'intensité lumineuse I (cf. Équation 10). En effet, pour que ce phénomène se réalise, il est nécessaire que les deux photons arrivent simultanément. Cela ne peut se produire que si la densité de photons arrivant sur la molécule est importante. Les excitations à deux photons sont habituellement faites à l'aide de lasers pulsés (le plus souvent des lasers titane : saphir) qui permettent une compression temporelle en envoyant une forte densité de photons pendant des pulses de 100 fs à une fréquence de 80 MHz. À cela, s'ajoute une compression spatiale grâce à l'utilisation de lentilles optiques permettant de concentrer les photons sur une zone d'irradiation plus restreinte (cf. Figure 22). Ainsi, la densité est suffisante pour que la probabilité d'excitation ne soit pas nulle.

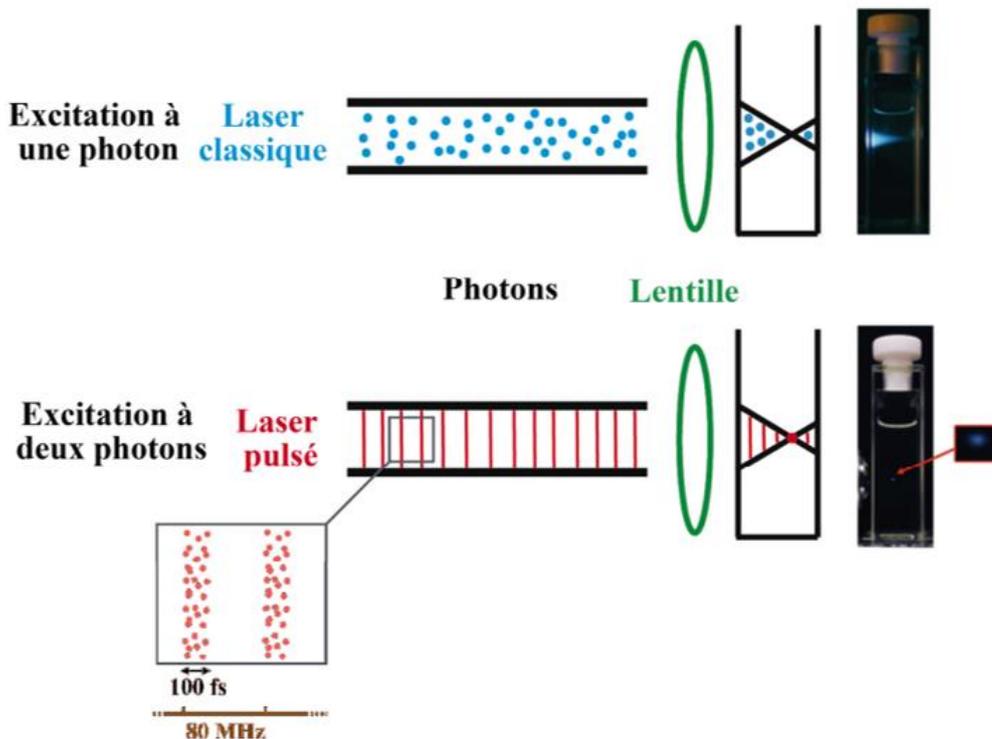


Figure 22: Comparaison des modes d'excitation à un photon et à deux photons d'une cuve contenant un fluorophore. Lors d'une excitation à un photon à l'aide d'un laser classique tout le trajet optique fluoresce contrairement à une excitation à deux photons à l'aide d'un laser pulsé où seul le point focal du système optique fluoresce.

L'excitation à deux photons présente un second avantage pour des applications en biologie. En effet, pour exciter une molécule il est nécessaire qu'elle absorbe une quantité d'énergie $E = hv$. De ce fait, lors d'une excitation bi-photonique, chaque photon possède une énergie $E = \frac{hv}{2}$. Si l'on représente l'énergie de ces photons en fonction de la longueur d'onde, on s'aperçoit que la longueur d'onde des deux photons est doublée lorsque l'énergie d'un photon est divisée par deux. (cf. Équation 11).

Équation 11 : Représentation de l'énergie d'un photon (E) lors d'une excitation à deux photons. Avec λ la longueur d'onde (en nm), c la vitesse de la lumière (299 792 458 en $m \cdot s^{-1}$), h la constante de Planck $6,62607004 \times 10^{-34} m^2 \cdot kg \cdot s^{-1}$, ν la fréquence de l'onde (Hz).

$$E = \frac{h\nu}{2} \leftrightarrow 2\lambda = \frac{hc}{E} \text{ avec } \nu = \frac{c}{\lambda}$$

Par conséquent, les chromophores des GPPs s'excitant pour la plupart entre 350 et 450 nm, leur excitation à deux photons nécessite donc des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 700 et 900 nm. Cette gamme de rayonnement est beaucoup moins absorbée que les rayonnements ultra-violets (cf. Figure 23). Par conséquent, leur utilisation va entraîner beaucoup moins de phototoxicité et va permettre d'exciter en profondeur dans les tissus.

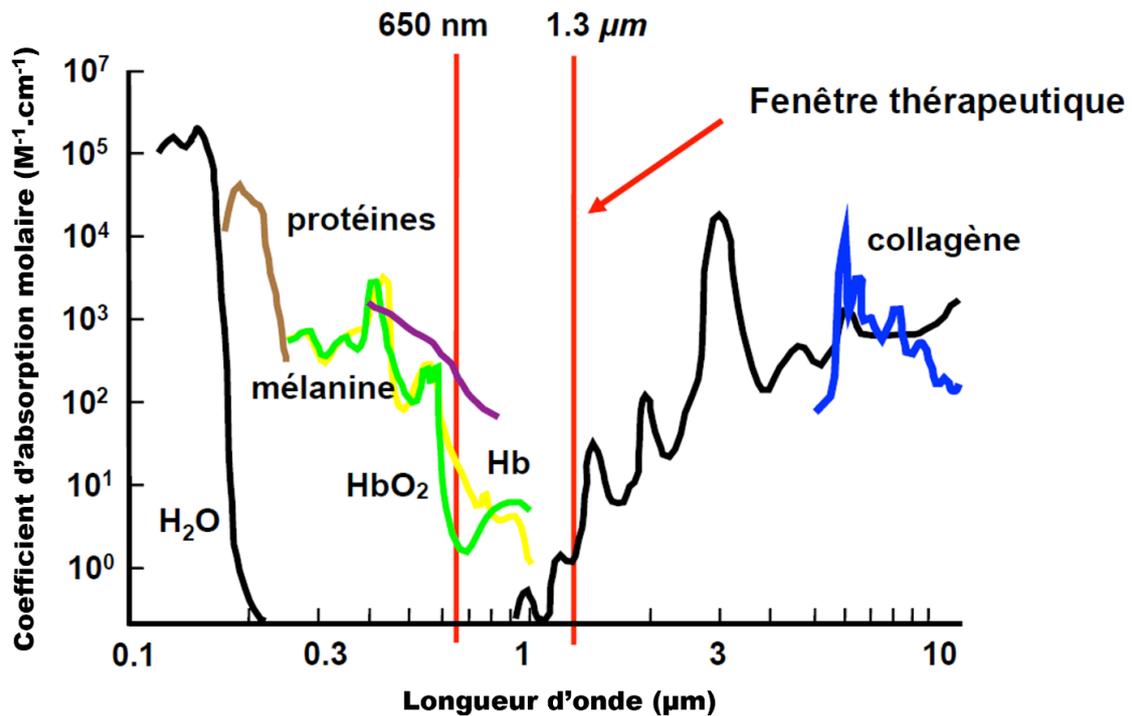


Figure 23: Représentation de l'absorbance d'une cellule en fonction de la longueur d'onde.

L'excitation bi-photonique est donc une méthode de choix pour des applications nécessitant l'utilisation d'outils photochimiques avec une forte résolution spatiale tout en employant des gammes de radiations plus compatibles pour l'étude du vivant. A noter que tous les chromophores excitables à deux photons sont également excitables à un photon, mais ce n'est pas réciproque. En effet, l'élaboration de chromophores sensibles à deux photons nécessite de suivre quelques paramètres. Pour ce faire, différents modèles décrivant les effets non linéaires d'interaction lumière-matière ont permis d'établir des règles pouvant conduire au développement de nouveaux chromophores optimisés et extrêmement sensibles à l'excitation à deux photons¹²⁰⁻¹²². Des travaux expérimentaux ont ensuite permis de démontrer la validité de ces règles.

4.4 Ingénierie moléculaire des chromophores

Un des facteurs déterminants lors de l'ingénierie d'un chromophore est le transfert de charge intramoléculaire. Ce dernier peut être influencé par l'ajout ou la modification d'un couple de groupements donneur et attracteur d'électrons, séparés par un « pont » de liaisons π conjuguées qui permet la délocalisation de ces électrons sur la structure du chromophore. Ainsi, si l'on considère l'exemple d'un chromophore simple de type stilbène, on s'aperçoit que la section efficace d'absorption à deux photons maximale (σ_2^{\max}) augmente lorsque l'on introduit des groupements électrodonneurs sur celui-ci (cf. Figure 24, molécule **1-3**). En effet, l'ajout de dibutylamine permet d'obtenir une valeur de σ_2^{\max} de 110 GM tandis que l'ajout de diphenylamine augmente sa section efficace d'absorption à deux photons jusqu'à 340 GM¹²³.

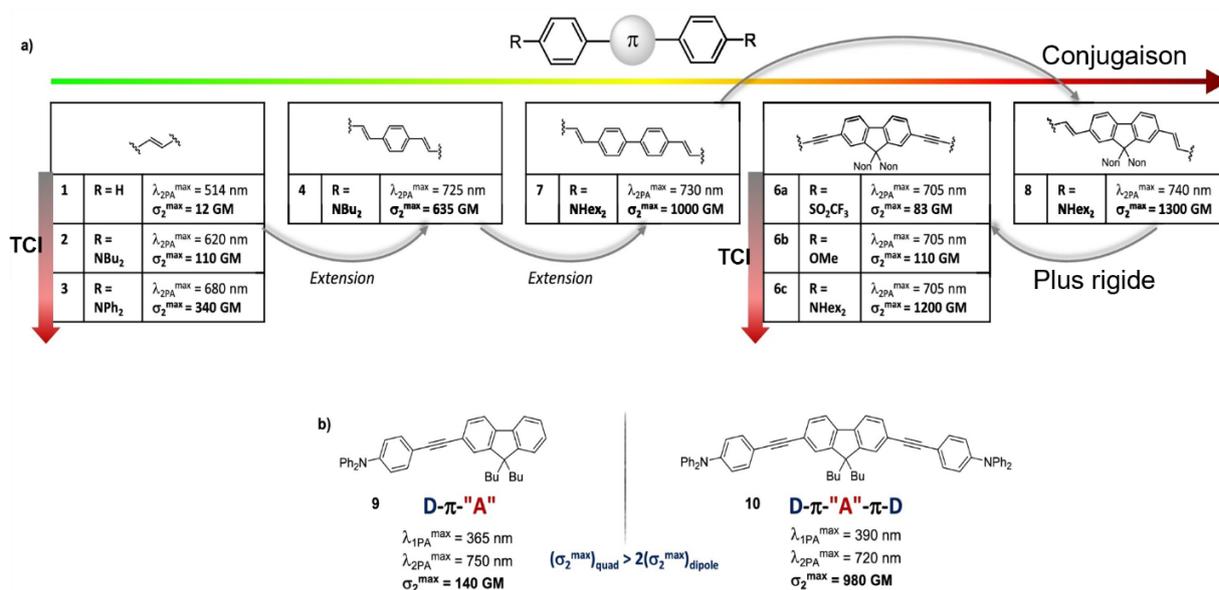


Figure 24: a) Figure retraçant les modifications structurales apportées au stilbène et leurs effets sur la σ_2^{\max} du chromophore en fonction du transfert de charge interne et de la longueur de la conjugaison ainsi que de sa rigidité. b) Comparaison entre σ_2^{\max} et les longueurs d'onde maximales d'excitation à un (λ_{1PA}^{\max}) et deux photons (λ_{2PA}^{\max}). Figure adaptée de la littérature¹²².

Un second facteur mis en avant pour l'élaboration de chromophores sensibles à l'excitation à deux photons est la longueur de la conjugaison. En effet, en augmentant la conjugaison d'un chromophore sa section efficace d'absorption à deux photons augmente. Ainsi, si l'on garde l'exemple du stilbène, l'extension de sa conjugaison par l'ajout d'un groupement phényle permet d'obtenir un chromophore possédant une sensibilité à deux photons de 635 GM (cf. Figure 24, molécule **4**). De même, une section efficace d'absorption à

deux photons de 1000 GM peut être atteinte par l'ajout d'un groupement biphenyle comme « pont » de liaisons π (Cf Figure 24, molécule **7**). A noter qu'un meilleur transfert de charge et une augmentation de la longueur de la conjugaison déplacent l'absorbance maximale du chromophore vers le rouge ce qui est très intéressant pour une application en biologie.

Cependant, une trop grande extension de la conjugaison est généralement accompagnée d'une perte de la coplanarité du chromophore, induisant un moins bon recouvrement des orbitales π . Cela entraîne une baisse de la section efficace d'absorption à deux photons du chromophore. En effet, la coplanarité est un point clé lors de l'élaboration de chromophores sensibles à l'excitation bi-photonique. Ainsi, l'introduction d'un « pont » de liaisons π contraint dans l'espace permet d'empêcher toute rotation et d'optimiser le recouvrement des orbitales π . Par exemple, le remplacement du motif diphenyle du chromophore **7** de la Figure 24 par un motif 2,7-fluorène permet d'augmenter la section efficace d'absorption à deux photons jusqu'à 1300 GM (cf. Figure 24, molécule **8**). Il est d'ailleurs plus efficace de placer des groupements électrodonneurs de part et d'autre du cœur du chromophore. En effet, la molécule **6a** de la figure 24 présente deux extrémités triflates et montre une section efficace d'absorption à deux photons de 83 GM, contre 1200 GM lorsque des groupements amines sont placés sur les extrémités (cf. Figure 24, molécules **6a-6c**).

Un troisième facteur important est la symétrie du chromophore qui peut influencer grandement la sensibilité à deux photons de la molécule. En effet, les chromophores centrosymétriques possèdent de plus grandes sections efficaces d'absorption à deux photons. Cela est dû au fait que l'état d'excitation virtuel atteint lors de l'absorption du premier photon est proche en énergie de l'état excité le plus faible en énergie autorisé par excitation à un photon (cf. Figure 25). Il en résulte ainsi une augmentation du temps de vie de l'état excité virtuel permettant d'augmenter les chances d'absorption du deuxième photon et augmentant par conséquent la section efficace d'absorption du chromophore. Ainsi, le chromophore **9** de la Figure 24 ayant une structure dipolaire D- π -A (D= donneur d'électrons, A=accepteur d'électrons) possède une sensibilité à deux photons sept fois moins importante que son dérivé quadrupolaire D- π -A- π -D (cf. Figure 24, molécule **10**). Cependant, le niveau d'énergie d'excitation atteint par excitation à deux photons de chromophores centrosymétriques est plus haut en énergie que lors d'excitation à un photon. Cela explique que ces composés ont

une longueur d'onde d'absorption maximale à deux photons plus basse que le double de la longueur d'onde d'absorbance maximale à un photon.

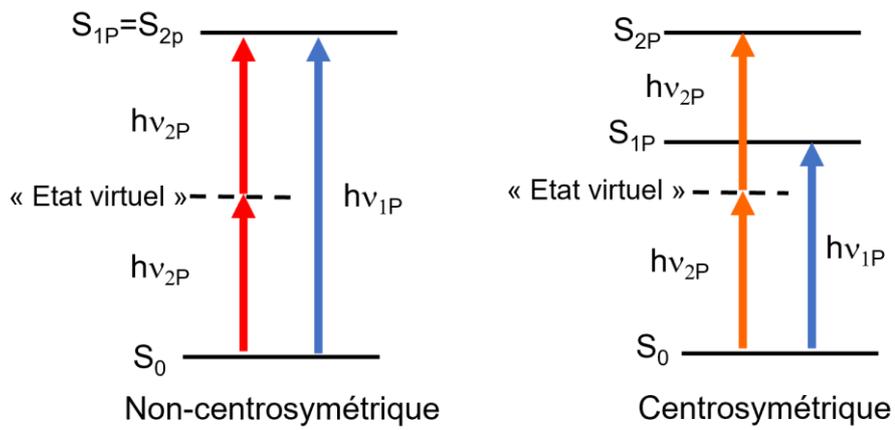


Figure 25: Diagramme de Jablonsky présentant les différents états excités atteints en fonction de la symétrie du chromophore.

5. Le projet de thèse

Lors de cette introduction, nous avons vu le fonctionnement d'un neurone et des mécanismes leur permettant de transmettre une information. Puis, l'utilisation de protéines photoactivables telles que les protéines ChR2 ou encore les protéines LOV afin d'étudier les phénomènes de la neurotransmission a été introduite. Ensuite, nous avons vu que l'utilisation de sondes chimiques photoactivables telles que les LPS ou les GPP pouvait également permettre de les étudier dans des conditions plus physiologiques.

Nous pouvons à présent aborder ce travail de thèse qui a consisté au développement de nouveaux groupements protecteurs photolabiles pour libérer des molécules bioactives en neurosciences. Ainsi, dans le premier chapitre seront décrits le développement et l'utilisation sur tranches de cervelets de deux précurseurs du glutamate sensibles à l'excitation bi-photonique. Le second chapitre présentera la conception d'un précurseur photolabile de la nicotine pouvant être excité dans le vert. Pour finir, un travail d'ingénierie moléculaire a permis d'aboutir à de nouvelles coumarines présentant d'excellentes propriétés à deux photons a été réalisé et sera exposé dans une troisième partie.

Chapitre II

II. Développement de précurseurs photolabiles du glutamate pour la cartographie des micro-circuits neuronaux

Le projet principal de cette thèse a été le développement de nouveaux précurseurs photolabiles du glutamate sensibles à l'excitation bi-photonique. Ce projet est le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Philippe Isope située à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI) de Strasbourg. Ces derniers souhaitent étudier les mécanismes du traitement temporel de l'information dans le cortex cérébelleux. Cette partie du cervelet, jouant un rôle important dans la coordination et l'apprentissage des mouvements, est constituée de modules stéréotypés¹²⁴ (c'est-à-dire que l'on retrouve chez tous les animaux d'une même espèce) qui sont capables de traiter parallèlement diverses informations. Les phénomènes à l'origine de l'organisation et de la coordination temporelle du traitement de l'information par ces différents modules restent encore inconnus. Pour mieux comprendre ces processus complexes, nos collaborateurs doivent réaliser une carte des entrées excitatrices des différents modules du cortex cérébelleux, qui peut être obtenue en utilisant un précurseur photolabile du glutamate. Cependant, le cahier des charges que doit respecter ce type de composé est très précis. Tout d'abord, cette application requiert un fort contrôle tridimensionnel de la zone d'excitation. Ainsi, un composé idéal pour cette application doit être sensible à l'excitation bi-photonique. De plus, le composé doit être pharmacologiquement inerte, c'est-à-dire qu'il ne doit pas interagir avec la tranche de cervelet avant irradiation. Ce second point reste problématique puisque tous les précurseurs photolabiles du glutamate connus présentent un très fort antagonisme aux récepteurs du GABA_A. Cela entraîne leur désactivation, empêchant un usage de ces précurseurs en conditions physiologiques. Notre rôle dans ce projet consiste donc à designer, synthétiser et caractériser de nouveaux précurseurs photolabiles du glutamate présentant une forte sensibilité à l'excitation bi-photonique et des propriétés pharmacologiques satisfaisantes (peu ou pas d'antagonisme envers les récepteurs du GABA_A par exemple).

1. Les récepteurs du glutamate

Les récepteurs du glutamate sont les récepteurs de neurotransmetteurs excitateurs les plus abondants dans le cerveau. Ces derniers sont impliqués dans de nombreux circuits neuronaux, mais aussi dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Parkinson ou la schizophrénie¹²⁵. Il existe deux types de récepteurs du glutamate : les récepteurs ionotropiques (notés iGluRs) et les récepteurs métabotropiques (notés mGluRs).

Les récepteurs ionotropiques sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. Ce sont des tétramères composés de quatre sous-unités formant un canal ionique permettant le passage des ions sodium, potassium et dans certains cas, calcium. On ne dénombre pas moins de vingt sous-unités différentes permettant de former trois familles de récepteurs iGluRs, chacune nommée en fonction de leur agoniste exogène principal : les récepteurs kaïnates, les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) et les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate). Bien que ces récepteurs aient tous des propriétés pharmacologiques différentes, leurs structures restent néanmoins similaires. Ainsi, les iGluRs sont composés de quatre sous-unités présentant chacune un domaine N-terminal extracellulaire, deux domaines de liaison à l'agoniste S1 et S2, quatre domaines transmembranaires M1 à M4 et, pour finir, un domaine C-terminal. Les iGluRs peuvent soit être des homomères ou des hétéromères, à l'exception des récepteurs NMDA composés obligatoirement de deux sous-unités GluN1 (pouvant lier une molécule de glycine ou de D-sérine) et deux sous-unités GluN2 (pouvant lier une molécule de glutamate). Lorsque les sous-unités composant un iGluR se lient à un agoniste, un changement de conformation s'opère résultant en un repliement du domaine transmembranaire M2 et en l'ouverture du canal (cf. Figure 26).

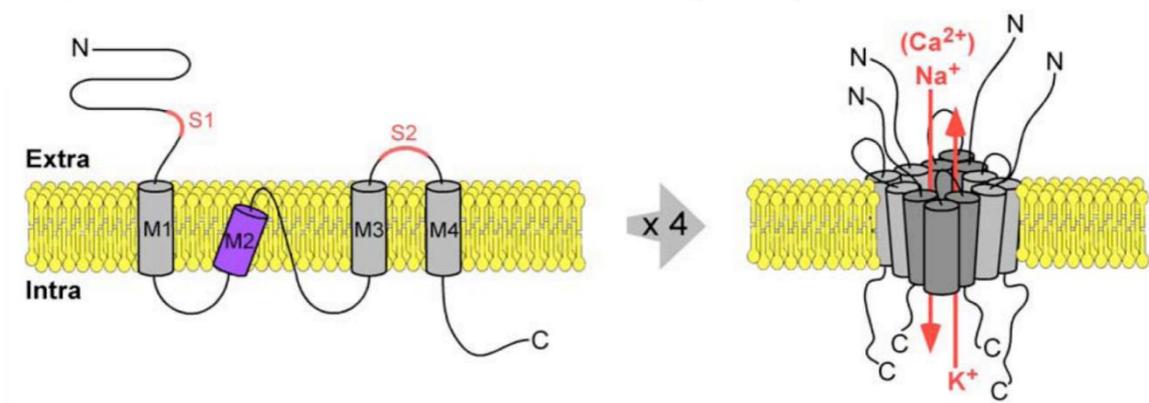


Figure 26: Structure des sous-unités des récepteurs ionotropiques du glutamate formant les iGluRs. Figure extraite d'un manuscrit de thèse¹²⁶.

Les récepteurs kaïnates sont généralement localisés sur les neurones présynaptiques et jouent un rôle dans la modulation des phénomènes de neurotransmission synaptique. Les récepteurs NMDA et AMPA sont, quant à eux, le plus souvent localisés sur les neurones post-synaptiques. Les récepteurs AMPA sont responsables des courants excitateurs rapides en étant activés et inactivés dans des gammes de temps inférieures à la milliseconde. A l'inverse, les courants générés par l'activation des récepteurs NMDA sont lents et intenses. Cependant, même si un récepteur NMDA est activé par le glutamate, aucun ion ne peut le traverser, car le canal est bloqué par la présence d'un ion magnésium qui ne se dissociera que si le potentiel de la membrane devient positif. Ainsi, l'activation des récepteurs NMDA dépend de l'activation des autres récepteurs glutamatergiques.

Les récepteurs métabotropiques sont, de leur côté, des récepteurs couplés aux protéines G. Ces derniers sont composés d'un domaine N-terminal extracellulaire, de sept hélices- α transmembranaires et d'un domaine C-terminal intracellulaire. Il existe huit sous-types mGluRs (numérotés de 1 à 8), regroupés en trois groupes en fonction de leurs pharmacologies et des protéines G auxquelles ils sont couplés. Ainsi, le groupe I (mGluR1 et 5) contient les récepteurs couplés à la phospholipase C tandis que les groupes II (mGluR2 et 3) et III (mGluR4,6,7 et 8) inhibent l'activité de l'adénylyle cyclase¹²⁷.

2. Etat de l'art

Les premiers précurseurs photolabiles du glutamate furent développés dans les années 1990. Ces derniers sont, pour la plupart, des dérivés *o*-nitrophényles^{128,107} ou des nitroindolines^{99,129} (cf. Figure 27). Ces groupements protecteurs sont principalement sensibles à une excitation classique à un photon dans le domaine des UV (250-380 nm) ce qui n'est pas idéal pour une application biologique. Néanmoins, ils ont été utilisés sur tranches de cerveaux dès 1993¹¹⁴ et ont permis d'étudier les connectivités neuronales, bien qu'avec une résolution limitée.

Ainsi, la nécessité d'améliorer la résolution de la zone de photolyse a amené les chimistes et les neurobiologistes à utiliser l'excitation bi-photonique. Une des premières utilisations de l'excitation bi-photonique en neurosciences a été la libération de la carbamoylcholine, un agoniste des récepteurs canaux de l'acétylcholine, pour l'étude de la distribution des récepteurs nicotiques sur culture de neurones en 1994¹³⁰. Il a ensuite fallu attendre cinq ans pour voir se développer les premiers précurseurs photolabiles du glutamate présentant une sensibilité à l'excitation bi-photonique suffisante pour être utilisés *in vitro* ou *ex vivo*. En effet, le développement du 4-Méthoxy-7-NitroIndolynile (MNI) a permis une utilisation efficace à un photon, mais également à deux photons avec une sensibilité à l'excitation bi-photonique de 0.6 GM à 740 nm. De plus, contrairement aux autres précurseurs, ce composé ne s'hydrolyse pas en milieux aqueux à pH physiologique¹³¹. La même année, le dérivé coumarinique Bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylemethyle (Bhc) (cf. Figure 27) a permis de libérer le glutamate par excitation à deux photons sur tranches de cerveau¹³². Cependant, le glutamate est fixé au dérivé coumarinique par une liaison carbamate. Sous l'action de la lumière, la rupture du carbamate est rapide, mais la décarboxylation permettant de libérer l'amine du glutamate est plus lente, de l'ordre d'une dizaine de millisecondes¹³³. La cinétique d'ouverture des récepteurs canaux du glutamate étant de l'ordre de la milliseconde, ce composé n'est pas idéal pour étudier les phénomènes de neurotransmission avec un bon contrôle spatio-temporel.

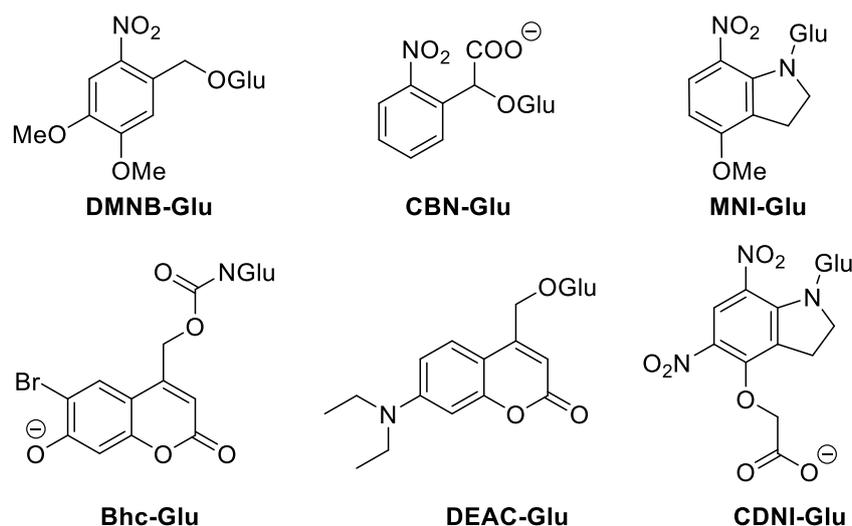


Figure 27: Structures des principaux précurseurs photolabiles du glutamate développés dans les années 2000.

A noter qu'en 2005, un autre dérivé coumarinique, le 7-DiEthylAmino Coumarine (DEAC) a été utilisé pour libérer du glutamate directement *via* la fonction acide carboxylique^{134,135} et non à l'aide d'un lien carbamate. Cependant, aucune utilisation de ce composé pour la libération du glutamate par excitation à deux photons n'a été décrite dans la littérature. La même année, l'introduction d'un groupement nitro sur la structure du chromophore MNI a permis d'obtenir l'analogue photolabile du glutamate 4-Méthoxy-5,7-dinitroindolynile (MDNI) ayant un rendement quantique de photolyse de 0.5¹³⁶. La solubilité de ce composé a ensuite été améliorée en remplaçant le groupement méthoxy par un groupement carboxylate afin d'obtenir le composé 4-Carboxyméthoxy-5,7-dinitroindolynil (CDNI)¹³⁷. Contrairement à la série des *o*-nitrobenzyles, la famille des nitroindolines est inerte aux récepteurs NMDA¹³⁸, en plus d'être moins sujette à l'hydrolyse. Par conséquent, le MNI-Glutamate étant disponible commercialement, stable et efficace, il a été très utilisé en neuroscience^{139,140,141,142}.

Toutefois, ces composés ne sont pas idéaux, car ils présentent tous un antagonisme aux récepteurs du GABA_A, principaux responsables des courants inhibiteurs dans le système nerveux central. En effet, à l'instar des analogues photolabiles du GABA_A¹⁴³, les précurseurs photolabiles du glutamate sont fortement antagonistes aux récepteurs gabaergiques^{104,144}. A

noter que le Rubi-Glutamate présente un antagonisme plus faible que les autres analogues du glutamate (cf. Tableau 1)

Tableau 1: Récapitulatif des propriétés photochimiques et physicochimiques des principaux précurseurs photolabiles du glutamate. $\epsilon(\lambda_{max})$ le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'absorbance maximale, Φ_u le rendement quantique de photolyse, δ_u l'efficacité de photolyse à deux photons exprimée en GM. IC_{50} la concentration inhibitrice médiane exprimée en μM et déterminée sur des tranches de cerveaux avec une pipette de stimulation en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA.

Analogue photolabile du glutamate	$\epsilon(\lambda_{max})$	Φ_u	$\epsilon(\lambda_{max}) \Phi_u$	δ_u	IC_{50}
CBN	500 (350 nm)	0.14	20	NR	NR
MNI	4500 (336nm)	0.065	293	0.06 (740 nm)	150
Bhc	17500 (368 nm)	0.019	329	1 (740 nm)	NR
Rubi	5600 (450 nm)	0.13	728	0.14 (800 nm)	7.3
CDNI	6400 (330 nm)	0.5	3200	0.06 (720 nm)	243
DEAC-450	43 000 (450 nm)	0.39	16800	0.5 (900 nm)	33

A cause de leurs faibles efficacités de photolyse à deux photons, ces composés s'utilisent à de très fortes concentrations, augmentant ainsi en particulier les problèmes d'antagonisme. Afin de réduire les concentrations utilisées, de nouveaux précurseurs photolabiles du glutamate ont fait leur apparition avec des systèmes π étendus. En effet, lorsque l'on augmente la conjugaison d'un chromophore, ses propriétés d'absorption à deux photons augmentent également. Dans ce domaine, notre laboratoire a été pionnier en développant en 2008 le PMNB-Glutamate (cf. Figure 28) présentant une efficacité de photolyse à deux photons de 0.45 GM¹⁴⁵. Cependant, malgré sa bonne efficacité à deux photons, il est nécessaire d'utiliser sur tranches de cerveau des concentrations de 5 mM pour observer des courants physiologiques. La même année, le laboratoire a développé le BNSF-Glutamate qui permet la libération simultanée de deux molécules de glutamate avec une efficacité à deux photons de 5 GM¹⁴⁶. Cependant, sa très faible solubilité dans l'eau ne permet pas une utilisation en milieu biologique.

L'année 2013 a vu l'apparition du DEAC-450 (cf. Figure 28), un dérivé coumarinique ayant une absorbance maximale à 450 nm et permettant de libérer le glutamate à deux photons à 900 nm avec une efficacité de 0.5 GM¹⁴⁴. La plupart des groupements protecteurs photolabiles sont sensibles à deux photons entre 740 et 800 nm. Avec son absorbance déplacée vers le rouge, le DEAC-450 a permis l'utilisation simultanée et sélective de DEAC-450-GABA et MNI-Glutamate sur tranches de cerveaux¹⁴⁷. Plus récemment, de nombreux groupes de recherche ont tenté de coupler des antennes ou « sensitizers » qui, une fois l'état excité atteint, vont transférer leur énergie au groupement protecteur photolabile pour déclencher la photolyse^{148,149,150} (cf. Figure 28). On peut citer l'ATTO 390-DEACM-Glu qui a permis d'augmenter la section efficace d'absorption à deux photons (jusqu'à environ 5 GM à 800 nm) du GPP DEAC. Malheureusement, ce type de composé présente un rendement quantique de photolyse faible ($\Phi_u=0.015$) conduisant à une section efficace à deux photons faible (environ 0.075 GM à 800 nm).

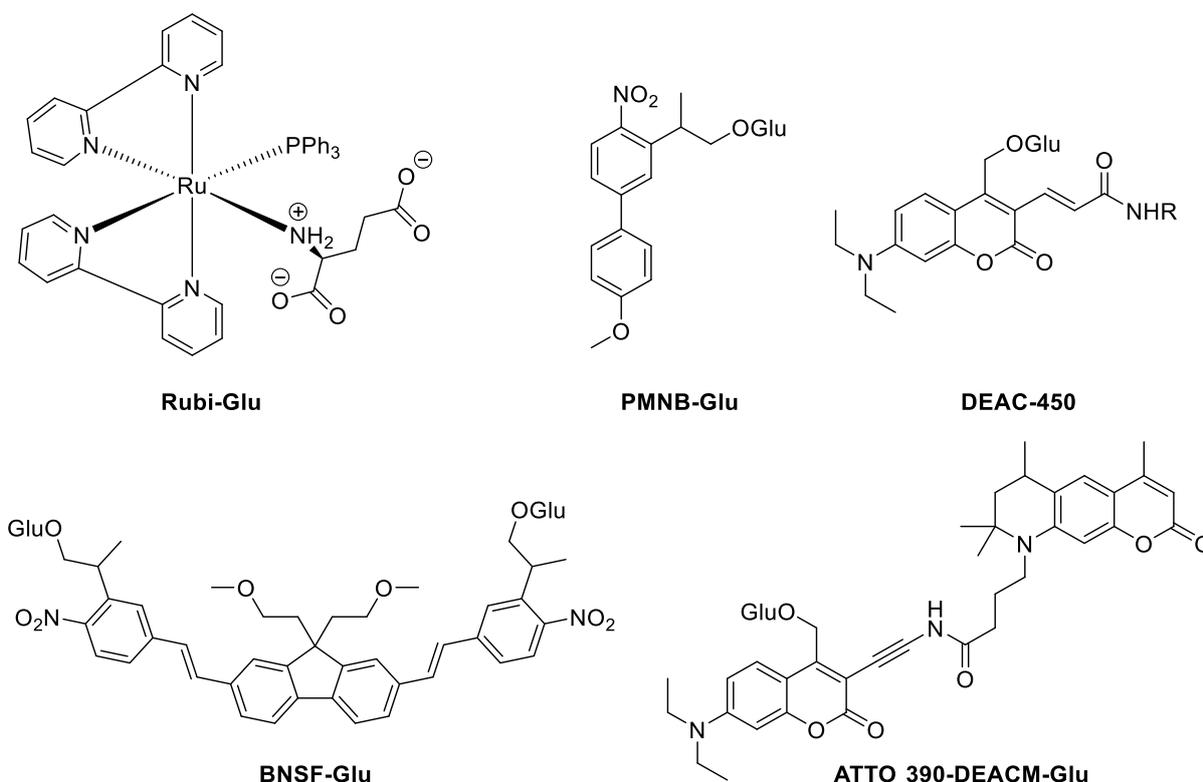
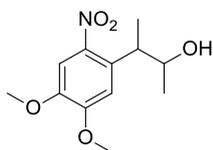


Figure 28: Précurseurs photolabiles développés, plus efficaces à deux photons.

Un autre moyen de réduire l'antagonisme envers les récepteurs du GABA_A est d'introduire une gêne stérique autour de la molécule de glutamate afin d'empêcher toute interaction avec les récepteurs gabaergiques. Le groupe d'Ellis-Davis s'est illustré ces dernières années dans ce domaine en développant des analogues photolabiles du glutamate couplés à des dendrimères tels que le MNI-Glutamate et le BIST-Glutamate^{147,151}. Ces composés n'induisent aucune réduction des courants inhibiteurs, indiquant une absence d'inhibition des récepteurs du GABA_A. Cependant, la taille de ces composés étant conséquente, nous ne pensons pas qu'ils puissent diffuser correctement dans les tranches de cerveaux.

3. Synthèse et utilisation de GANBP pour la libération du Glutamate

Le composé GANBP provient d'un travail d'amélioration des groupements protecteurs photolabiles de type (ortho-nitrophényl)éthyl effectué au laboratoire CAMB. En effet, le laboratoire a développé le 3-(4,5-Diméthoxy-2-NitroPhényl)-2-Butyl (DMNBP), un groupement protecteur photolabile permettant de libérer efficacement le glutamate par



DMNBP

$\lambda_{\max} = 350 \text{ nm}$
 $\delta_i = 0.17 \text{ GM}$
(720 nm)

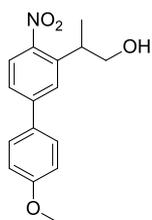
irradiation à un photon à 350 nm¹⁵². Cependant, ce composé présente une section efficace à deux photons de 0.17 GM à 720 nm ne permettant pas une utilisation optimale de ce dernier pour des applications en neurosciences. Le laboratoire a donc effectué de l'ingénierie moléculaire sur cette famille de GPP afin de développer de nouveaux dérivés possédant de meilleures propriétés d'excitation à deux photons.

3.1 Design du groupement protecteur photolabile GANBP

3.1.1 Développement d'une plateforme bi-phényle à haute efficacité à deux photons

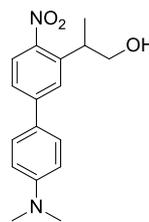
Il est connu que, pour améliorer la sensibilité à l'excitation bi-photonique d'une molécule, il est possible soit étendre son système π , soit modifier le couple π -donneur/ π -accepteur du chromophore. Dans le cas des (*ortho*-nitrophényl)éthyles, on ne peut pas déplacer ou enlever le groupement nitro, essentiel au phénomène de photolyse. Ainsi, on ne peut modifier que le groupement électrodonneur du couple ou étendre la conjugaison du chromophore. Des travaux d'ingénierie moléculaire ont permis de mettre en évidence que l'élongation de la conjugaison des σ -nitrobenzyle et σ -nitrophénéthyle en position-4 mène à de meilleures propriétés d'absorption à deux photons¹⁵³.

C'est dans ce contexte qu'a été développé au laboratoire le composé *p*-Méthoxy-4-nitro-[1,1'-biphényl]-3-yl)propan-1-ol (PMNB) possédant une section efficace de photolyse à deux photons d'acides carboxyliques de 3.2 GM à 740 nm et de 0.45 GM à 800 nm. Ce dernier a permis de libérer efficacement du glutamate par excitation monophotonique¹⁴⁵ et bi-photonique à 740 nm¹⁵⁴. La substitution du groupement méthoxy par une amine secondaire induit un déplacement bathochromique de l'absorbance maximale de 90 nm et augmente grandement la section efficace d'absorption à deux photons à 800 nm. Ainsi, le groupement 4-nitro-[1,1'-biphényl]-3-yl)propan-1-ol (ANBP) présente une absorbance maximale de 398 nm et également une section efficace de photolyse à deux photons de 11 GM à 800 nm⁹².



PMNB

λ_{\max} = 317 nm
 δ_u = 3.2 GM (740 nm)

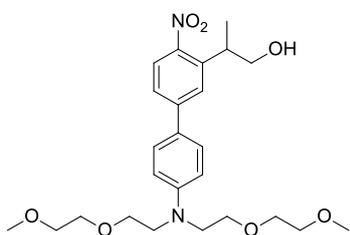


ANBP

λ_{\max} = 398 nm
 δ_u = 11 GM (740 nm)

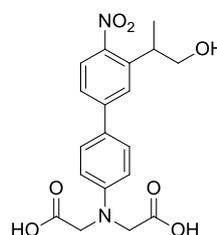
3.1.2 Ingénierie de ANBP en GANBP

Le composé ANBP ayant de bonnes propriétés photochimiques, son utilisation pour relarguer un neurotransmetteur par excitation à deux photons est pertinente. Cependant, pour cette application, il est nécessaire d'utiliser de fortes concentrations de précurseurs photolabiles du glutamate, ce qui implique d'être capable d'augmenter sa solubilité dans l'eau. Un moyen d'y parvenir est de fonctionnaliser l'amine présente sur l'ANBP par des groupements solubilisant. On peut par exemple citer la substitution des groupements méthyles sur l'aniline par des groupements 2-(méthoxyéthoxy)éthyles ou des groupement carboxyméthyles permettant d'augmenter grandement sa solubilité dans l'eau. Ainsi, les dérivés solubles EANBP et l'EANBP ont été développés au laboratoire et utilisés pour libérer l'ion phosphate¹⁵⁵ ainsi que du GABA¹⁵⁶.



EANBP

λ_{\max} = 398 nm
 δ_u = 11 GM (740 nm)



CANBP

λ_{\max} = 398 nm
 δ_u = 11 GM (740 nm)

Cependant, comme précisés précédemment, les précurseurs photolabiles du GABA et du glutamate inhibent les récepteurs du GABA_A. Les dérivés EANBP-GABA et CANBP-GABA

n'échappent pas à la règle. Pour pallier ce problème, une stratégie innovante a été mise en place pour le composé EANBP reposant sur l'introduction d'un groupement propyne en position benzylique. Cela permet d'effectuer des réactions de cycloaddition alcyne-azoture catalysées par du cuivre (que nous appellerons chimie « Click ») avec des groupements solubilisant ou encombrant (cf. Figure 29).

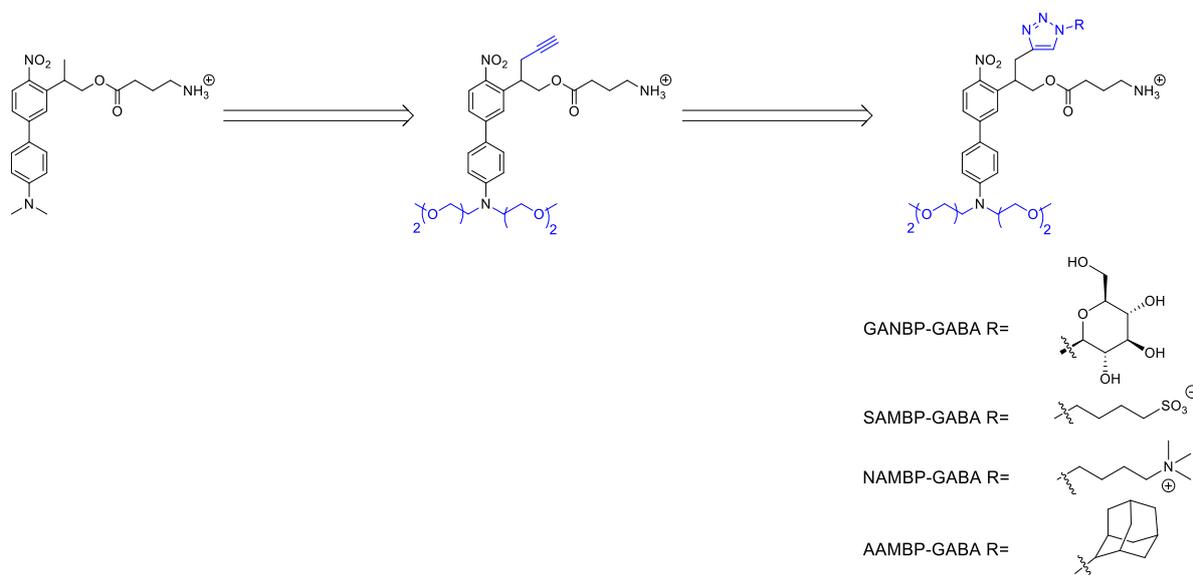


Figure 29: Utilisation de la chimie Click sur ANBP-GABA pour réduire son influence sur les courants inhibiteurs.

Cette approche permet d'augmenter la solubilité de la molécule tout en introduisant un encombrement stérique très important proche du neurotransmetteur protégé afin d'empêcher toute interaction avec les récepteurs responsables des courants inhibiteurs. De plus, de nombreux groupements azotures sont commercialement disponibles ce qui permet de tester une vaste librairie de composés. Ceci présente un grand avantage puisque l'on ne dispose pas de structure récepteur-ligand permettant le design d'une molécule inerte. Bien que cette méthode ait déjà été utilisée avec des dendrimères très encombrants^{147,151}, nous avons préféré l'élaboration de petites molécules que nous considérons plus prometteuses en termes de simplicité de synthèse et de diffusion dans les tranches de cerveau ou même *in vivo*.

Des résultats préliminaires à ce travail de thèse ont été obtenus avec des dérivés de l'EANBP-GABA auxquels ont été conjugués plusieurs groupements soit chargés positivement,

soit chargés négativement ou encore encombrants (cf. Figure 29). Leurs effets sur les récepteurs du GABA_A ont été mesurés sur des cellules HEK-293 exprimant ces derniers. Il en résulte que parmi les composés testés, le Glucose-4-nitro-[1,1'-biphényl]-3-yl)propan-1-ol (GANBP-GABA) réduit significativement moins les courants inhibiteurs (cf. Figure 30). Nous avons donc décidé d'utiliser ce composé pour libérer le glutamate par excitation bi-photonique.

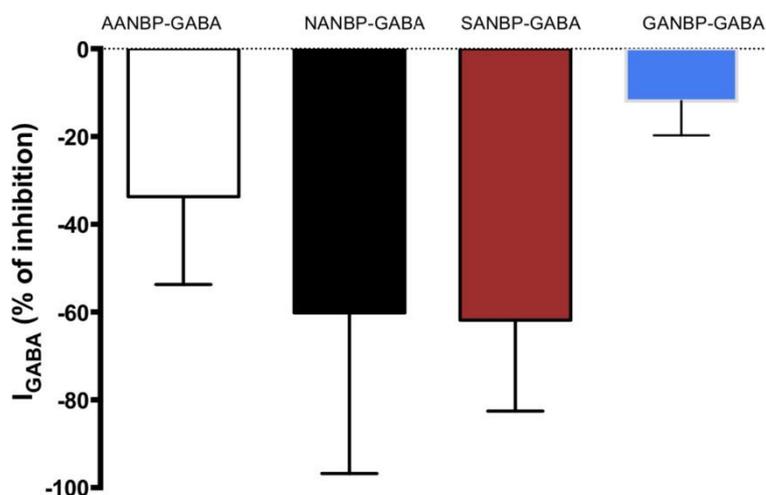


Figure 30: Effets antagonistes des précurseurs photolabiles sur les récepteurs du GABA_A exprimés par des cellules HEK-293.

3.1.3 Synthèse de GANBP-Glutamate

La synthèse du précurseur de GANBP-Glutamate est réalisée en deux parties (cf. Figure 31). Dans un premier temps le composé **2** est obtenu par une réaction de substitution nucléophile aromatique indirecte à l'aide de *t*-Butyle chloroacétate sur du 4-bromo-nitrobenzène en milieu basique. Un groupement propyne est ensuite introduit en α de l'ester *t*-butylique pour obtenir le composé **3** qui, après réduction de l'ester par du DIBAL-H, conduit à l'alcool **4**. Dans un second temps, le composé **5** est iodé en position para de la fonction l'amine à l'aide de *N*-Iodosuccinimide pour conduire au composé **6**. L'iode est ensuite substitué par un ester boronique à l'aide d'une borylation pallado-catalysée pour former le

composé **7**. Le précurseur **8** est obtenu par couplage de Suzuki-Miyaura entre les synthons **4** et **7** suivis d'une déprotection du silane par traitement au TBAF.

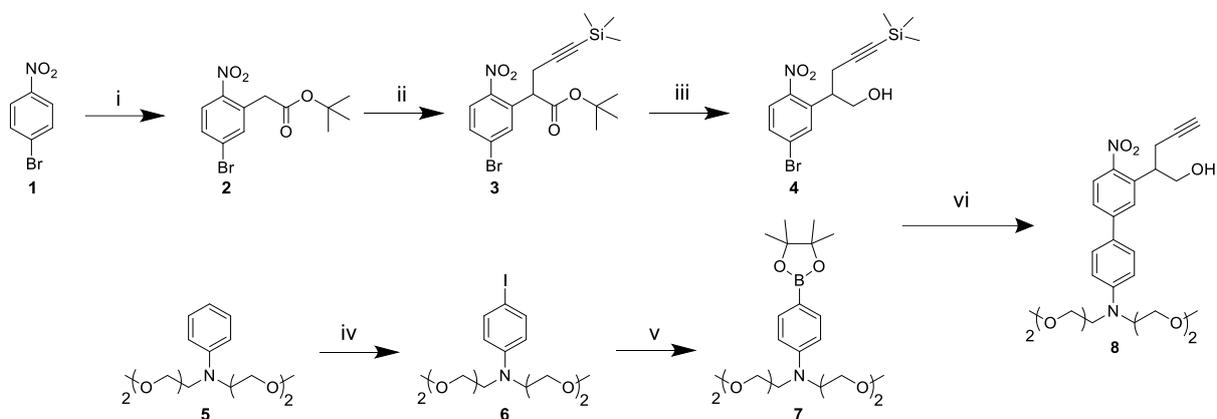


Figure 31: Synthèse du groupement protecteur photolabile EANBP i : t-Butyl chloroacetate, t-BuOK, DMF, TA, 2 h, 96%, ii : 3-Bromo-1-(trimethylsilyl)-1-propyne, DBU, MeCN, TA, 48 h, 90%, iii : DIBAL-H, THF, 0 °C, 3 h, 56%, iv : NIS ; KOAc, MeCN, 20 °C, 5 min, 99%, v : Bis(picolato)diboron, Pd(Cl)₂(PPh₃)₂, KOAc, DMSO, 80 °C, 12 h, 52%, vi : a) Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, toluène/EtOH/H₂O : 7/2/1, 80 °C, 45 min, b) TBAF, THF, TA, 1 h, 65%.

Le composé **8** est ensuite couplé à un dérivé protégé du glutamate pour donner le composé **9** (cf. Figure 32). Ce dernier, après une réaction de cycloaddition alcyne-azote catalysée par du cuivre et déprotection des groupements protecteurs par du TFA, permet d'obtenir le GANBP-Glutamate **10**.

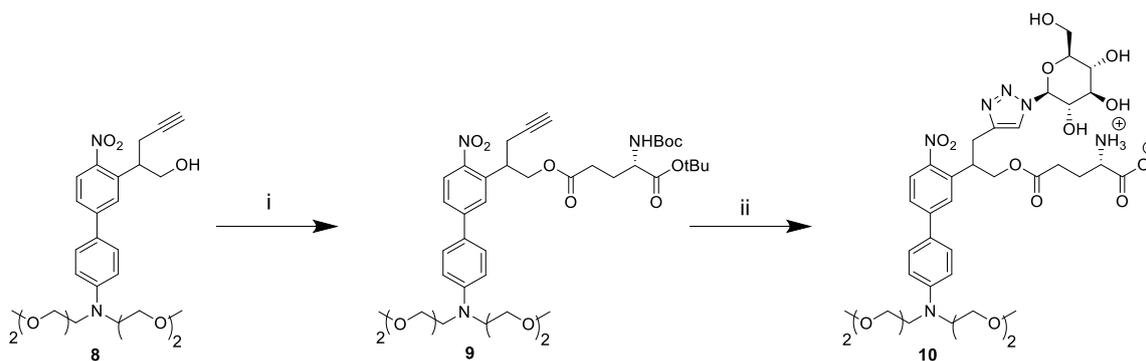
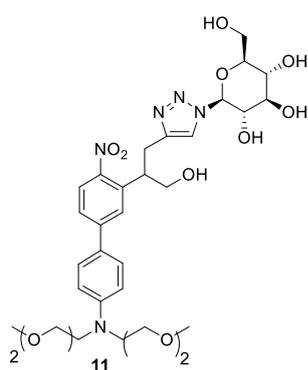


Figure 32: Synthèse du précurseur photolabile du glutamate GANBP-Glutamate. i : Acide 5-(t-butoxy)-4-((t-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoïque, DIC, DMAP, CH₂Cl₂, 20 °C, 12 h, 56%, ii a) 1-Azido-1-déoxy-β-D-Glucopyranoside, L-Proline, Acide ascorbique, Na₂CO₃, CuSO₄, t-BuOH/DMF/H₂O : 9/1/1, 65 °C, 12 h b) TFA, CH₂Cl₂, 20 °C, 8 h, 74%.

4. Test de GANBP-Glutamate sur tranche de cerveaulet

La molécule a ensuite été testée sur tranches de cervelet à l'Institut des Neurosciences Cellulaires Intégratives (INCI) par l'équipe du Dr. Philippe Isope.

4.1 Effets de GANBP-Glutamate



GANBP

Dans un premier temps, l'effet sur les courants inhibiteurs de GANBP non couplé au glutamate a été mesuré puisque nous supposons que les interactions indésirables proviennent de la molécule de glutamate protégée. Cependant, pour en être sûr, il est nécessaire de comparer les courants inhibiteurs induits sur un neurone avant, pendant et après introduction de GANBP dans le milieu. Les courants inhibiteurs sont, pour la plupart, générés par les récepteurs du GABA_A qui laissent passer au travers de la membrane, des ions chlorures. Le potentiel électrochimique de ces ions étant très proche du potentiel de la membrane, les courants sont sortants et généralement très faibles. Pour pallier cela, on augmente la concentration intra-neuronale en ion chlorure à l'aide d'une solution intra-pipette très concentrée. Cela permet de modifier le potentiel électrochimique de l'ion, l'éloignant du potentiel de la membrane. Ainsi, les courants deviennent plus forts et donc plus simples à observer. Dans ces conditions, le chlore sort du neurone au lieu de rentrer ce qui dépolarise la membrane. Les courants excitateurs sont inhibés à l'aide d'inhibiteurs des récepteurs AMPA, NMDA et métabotropes du glutamate. La micropipette d'enregistrement est posée sur le corps cellulaire d'une cellule de Purkinje et la pipette de stimulation est posée sur un interneurone connecté à la cellule (cf. Figure 33).

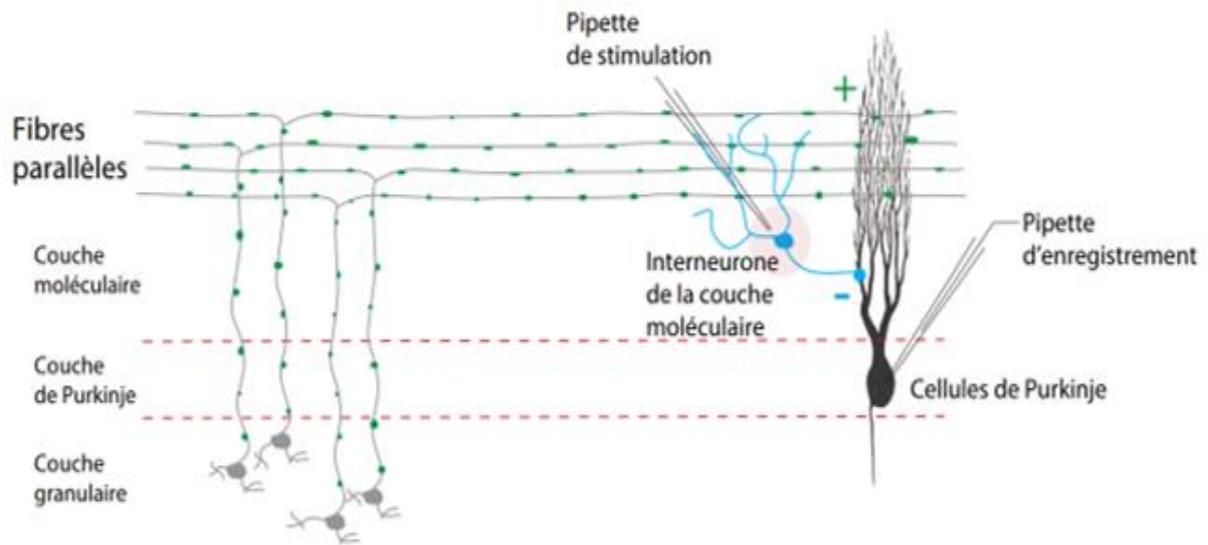
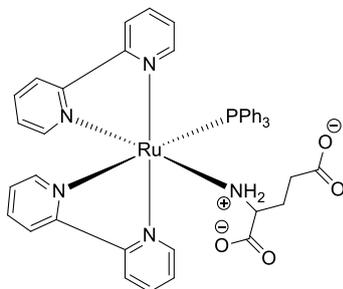


Figure 33 : Enregistrement des courants inhibiteurs d'une cellule de Purkinje par électrophysiologie patch-clamp

Il en résulte que la molécule seule n'interfère pas avec ces phénomènes. En effet, si l'on compare les courants inhibiteurs induits par la pipette de stimulation, avant l'application de GANBP, pendant, et après lavage (cf. Figure 34) aucune différence significative n'est observée. On peut donc en conclure que le groupement protecteur photolabile ne présente pas d'antagonisme envers les récepteurs gabaergiques lorsqu'il n'est pas couplé au glutamate.



Figure 34 : Effet du GANBP seul sur la transmission inhibitrice entre les interneurons de la couche moléculaire et les cellules de Purkinje. Courants post-synaptiques inhibiteurs enregistrés dans une cellule de Purkinje en patch clamp (voltage imposé à -60mV) induit par stimulation électrique d'un interneurone de la couche moléculaire en présence ou non de GANBP dans la solution de perfusion. Exemple de traces obtenues pour une cellule. Les traces brutes sont représentées en gris et la trace moyenne en rouge.



Rubi-Glutamate

$\lambda_{\text{max}} = 317 \text{ nm}$
 $\delta_u = 3.2 \text{ GM (740 nm)}$

L'effet sur les courants inhibiteurs de GANBP-Glutamate a ensuite été déterminé. Cette fois-ci, au lieu de déplacer le potentiel électrochimique de l'ion chlore, l'expérimentateur déplace le potentiel de la membrane à 0 mV . Cela permet ainsi de déplacer l'écart entre le potentiel de la membrane et le potentiel électrochimique de l'ion chlore. Par conséquent, les courants sont plus forts que dans des conditions physiologiques et peuvent plus facilement être observés. Les résultats ont ensuite été comparés à une référence commerciale, le Rubi-Glutamate¹⁰⁴, qui est un complexe de Ruthénium permettant la libération du glutamate par excitation à un et deux photons. Ce dernier possède une certaine toxicité pour les cellules, mais reste un des précurseurs photolabiles du glutamate induisant la moins grande perturbation des courants inhibiteurs.

Purkinje. Le GANBP-Glu ou le RuBi-Glu est alors excité au voisinage des épines dendritiques de la cellule à l'aide d'un laser pulsé Ti : Sapphire à 800 nm.

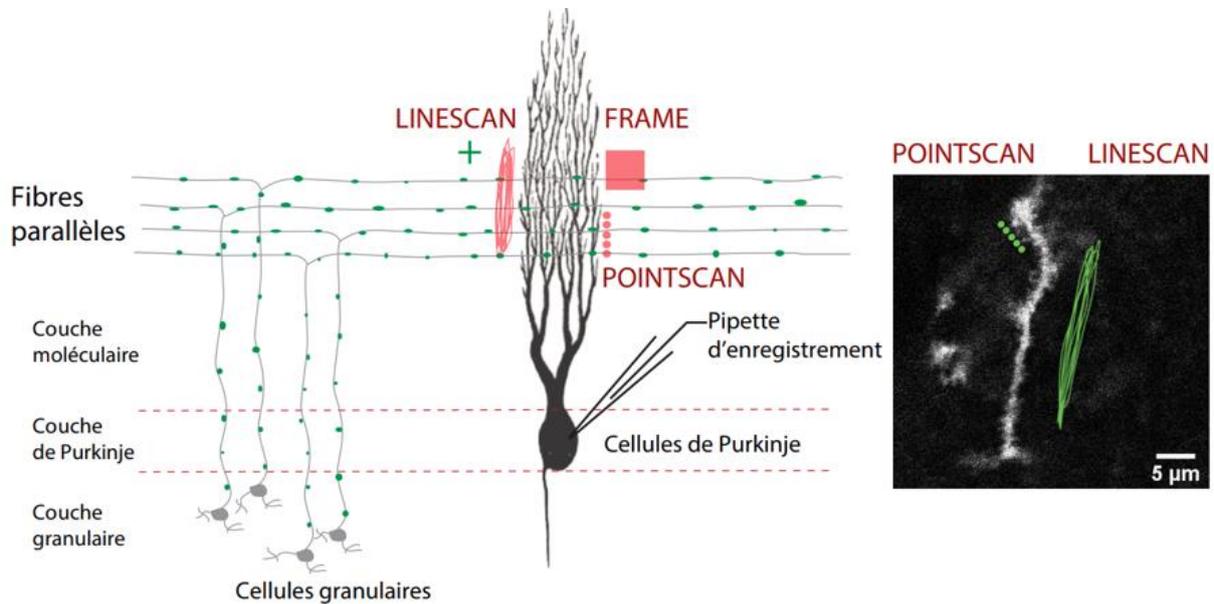


Figure 36: : Schéma des différents modes d'excitation utilisés pour l'excitation à 2-photons du GANBP-Glutamate.

Lors de ces essais, plusieurs modes d'excitation ont été mis en place. Le premier est un mode où le laser balaye une zone rectangulaire deux fois, que l'on appelle « frame scan », le second est un mode où le laser va suivre une ligne, que l'on appelle « line scan » (cf. Figure 36). Le troisième, quant à lui, est appelé « point scan » et consiste à irradier des petits points placés près des épines dendritiques de la cellule de Purkinje. Avec ces trois modes d'excitation, les courants générés par GANBP-Glutamate sont malheureusement très faibles et lents. En effet, il est nécessaire d'utiliser une puissance de laser très élevée et un temps d'irradiation long pour observer des courants de faibles intensités et très lents ce qui n'est pas physiologique (cf. Figure 37).

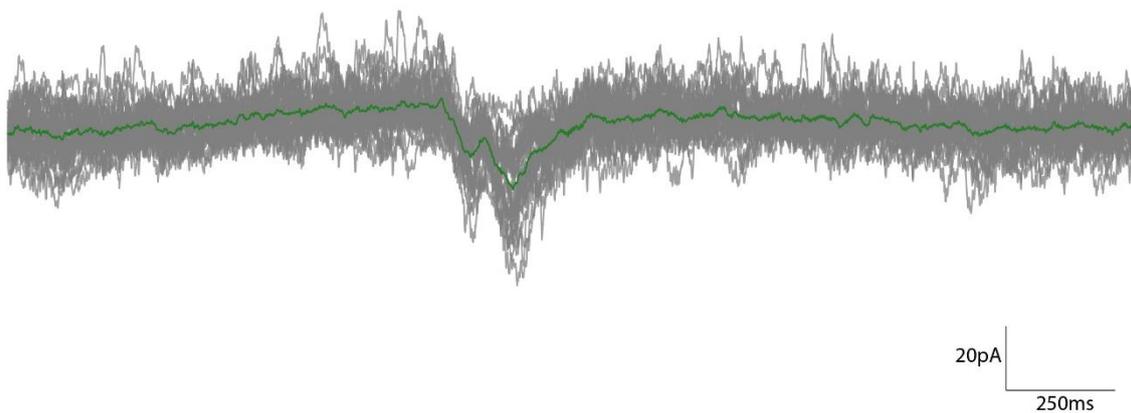


Figure 37 : Courant induit dans la cellule de Purkinje par le décaageage du GANBP-glutamate au microscope biphotonique. Exemple de réponses obtenues après illumination via deux séries successives de scans de point focal (2 x 6 points de 10ms). Les traces brutes sont représentées en gris et la trace moyenne en vert.

Bilan :

Le précurseur photolabile du glutamate GANBP-Glutamate est issu de l'ingénierie moléculaire effectuée par le laboratoire avec pour ambition d'en faire un outil photochimique performant. Cependant, le composé a été testé sur les tranches de cervelet et les résultats se sont révélés peu concluants. En effet, bien que le composé n'induisse qu'une faible inhibition des courants inhibiteurs, les courants générés par excitation à deux photons sont lents et peu intenses. Ce composé n'est donc pas utilisable sur tranches de cervelet. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats serait une faible pénétration de GANBP-Glu dans la tranche. Cependant, le composé n'étant pas fluorescent, on ne peut pas déterminer sa localisation sur la tranche. Ainsi, comme nous ne pouvons pas utiliser GANBP-Glutamate sur tranche de cervelet, nous avons décidé d'utiliser un nouveau groupement protecteur photolabile pour relarguer le glutamate.

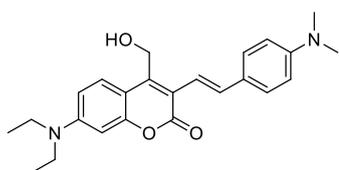
5. Choix d'un nouveau dérivé coumarinique

Suite aux problèmes rencontrés lors de l'utilisation de GANBP-Glutamate, nous avons décidé de nous orienter vers un second groupement protecteur photolabile. L'utilisation d'un dérivé coumarinique pour libérer le glutamate nous a paru pertinente. En effet, comme énoncé dans l'introduction, leurs plus faibles rendements quantiques de libération sont largement compensés par leurs cinétiques de photolyse ainsi que par leurs coefficients d'extinction molaire élevés. De plus, ces composés possèdent un avantage non négligeable, car contrairement au groupement GANBP, les GPP de type coumarinique sont capables de fluorescer^{157,158}. Cette propriété devrait nous permettre de visualiser la molécule lors de tests biologiques, en particulier d'étudier sa localisation sur des tranches de cerveaux. De cette manière, on peut étudier l'effet des groupements conjugués par chimie « Click » sur le comportement des précurseurs photolabiles de glutamate sur tranches de cervelet. Contrairement aux résultats de GAMBP-Glutamate où l'on ne peut expliquer ce qu'il se passe sur tranches de cerveau, l'usage de composés fluorescent permet de rationaliser notre approche et notre compréhension des résultats, en particulier ceux qui ne sont pas concluants.

5.1 Des coumarines sensibles à l'excitation bi-photonique

Ces groupements ont largement été utilisés ces trois dernières décennies pour libérer des effecteurs biologiques¹⁵⁹⁻¹⁶¹ et de nombreuses études ont été réalisées dans le but d'améliorer leurs propriétés photochimiques en apportant diverses modifications structurales. En effet, des travaux ont montré que relier des groupements électrodonneurs/électroaccepteurs à la position 3 par des « ponts » permettant la délocalisation des électrons induit un déplacement bathochromique de l'absorbance et améliore considérablement les propriétés photochimiques. Des travaux similaires ont été réalisés en substituant la position 7 de la coumarine¹⁶². Il en résulte que ces modifications structurelles améliorent les propriétés à deux photons, mais contrairement aux substitutions

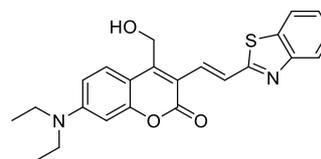
en position 3, ne déplacent pas l'absorbance maximale vers le rouge. Ainsi, l'utilisation d'un alcène comme « pont » entre la coumarine et des groupements électroattracteurs tels que des N-méthylpyridinium ou des N-méthylbenzothiazole¹⁶³ permettent d'obtenir des coumarines excitables dans le vert (> 500 nm). Cependant, le rendement quantique de libération de ces composés est très faible ($\Phi_u < 0.01$) ce qui les rend peu attractifs. Le remplacement du groupement électroattracteur chargé par un groupement non chargé (groupements benzothiazoles) ou par des groupements électrodonneurs tels que des N,N-diméthyl-anilines¹⁶⁴ permettent d'obtenir des coumarines avec de très bonnes propriétés à deux photons.



Lin *et al.* (2018)

$\lambda_{\max} = 446 \text{ nm}$

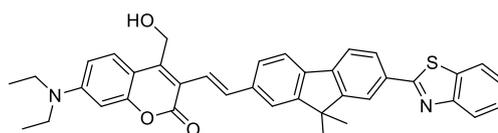
$\delta u = 39.6 \text{ GM (720 nm)}$



Klausen *et al.* (2019)

$\lambda_{\max} = 472 \text{ nm}$

$\delta u = 36 \text{ GM (710 nm)}$



Klausen *et al.* (2019)

$\lambda_{\max} = 458 \text{ nm}$

$\delta u = 442 \text{ GM (730 nm)}$

Le « pont » alcène semble être important, car, l'insertion seule d'un groupement N,N-diméthyl-aniline¹⁶⁵ ne semble augmenter que légèrement les propriétés à deux photons sans déplacer l'absorbance de ce composé. L'utilisation d'un « pont » fluorène¹⁶⁶ a également montré un impact positif sur l'efficacité de libération à deux photons.

Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé d'utiliser la 7-DiÉthylAminoCoumarine-3-N,N-diméthylAminoStyrène (DEACAS), car elle possède des propriétés photochimiques adaptées à notre application. Bien que les structures présentées par Klausen *et al.* soient également intéressantes, la structure de DEACAS à l'avantage d'être facilement modifiable sans ajouter de groupements hydrophobes. En effet, l'amine de la partie aniline peut être bis-alkylée par des groupements solubilisant, ce qui présente un fort intérêt pour les applications biologiques. Il s'agit d'une chimie que nous maîtrisons au laboratoire, car elle a déjà été utilisée pour les composés EANBP et GANBP. Il faut également noter que la présence d'un « pont » alcène entre la partie aniline et la coumarine présente un fort intérêt. En effet, lors de la photolyse de la coumarine, un réarrangement du sous-produit vient couper la conjugaison entre l'aniline et la coumarine. Le composé retrouve ainsi les propriétés spectroscopiques de la coumarine DEAC (cf. Figure 38). Tout comme la fluorescence du composé avant photolyse, la fluorescence du sous-produit peut également être utile pour localiser et déterminer s'il y a eu libération de l'effecteur biologique.

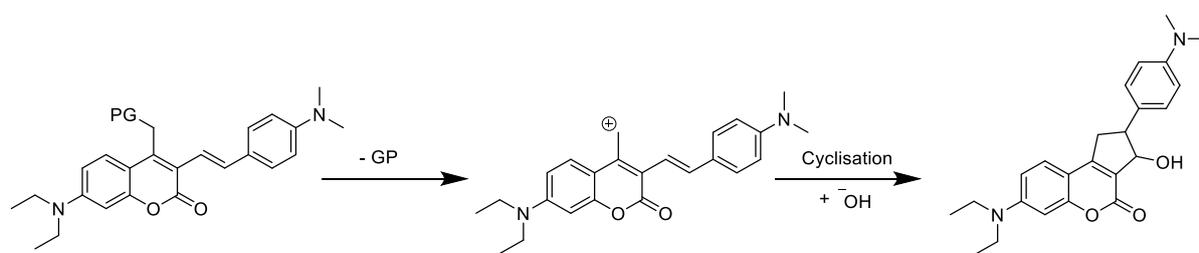


Figure 38 : Mécanisme de photolyse de la coumarine DEACAS.

6. Stratégie et synthèse

6.1 Stratégie de développement de DEACAS-Glutamate

Lors de la conception de ce groupement protecteur photolabile, nous avons décidé d'être plus méthodique. En effet, l'idée était dans un premier temps de simplifier au maximum la structure de la DEACAS afin de montrer qu'elle fonctionne sur tranches de cervelet. Puis, dans un second temps, au besoin, apporter des modifications permettant de la rendre plus soluble et/ou moins antagoniste envers les récepteurs du GABA_A. Cette stratégie permet de mieux contrôler l'impact de chacune des modifications que l'on réalise sur la biodistribution du composé sur tranches de cerveau. De plus, on peut également déterminer si le GPP est utilisable avant de s'engager dans des synthèses complexes. De cette façon, la seule modification qui a été apportée au groupement DEACAS est la substitution de l'amine par deux groupements (2-méthoxyéthoxy)éthyle pour la rendre plus soluble dans l'eau (cf. Figure 39).

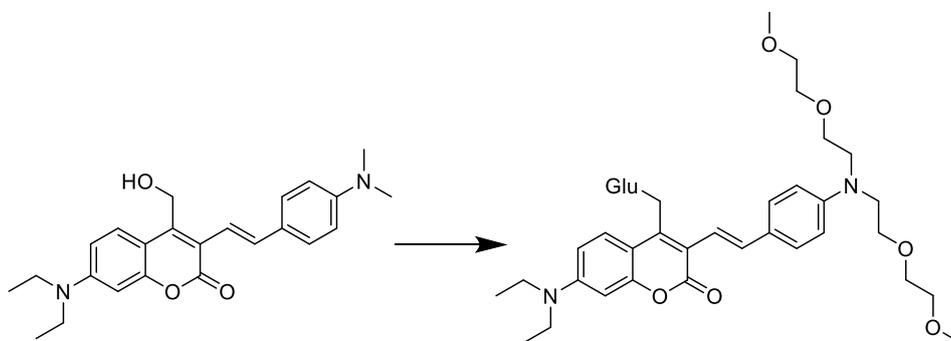


Figure 39 : Design de DEACEAS-Glutamate.

Une fois la capacité à relarguer le glutamate par excitation à deux photons sur tranches de cervelet validée par nos collaborateurs de l'INCI, la même stratégie que pour l'EANBP peut être appliquée. Pour cela, il faut placer un alcyne sur la molécule, au plus proche du glutamate. Deux choix s'offrent alors à nous pour introduire une fonction propyne : le premier est d'introduire ce dernier en position benzylique de la DEACAS, le second est de l'introduire sur

l'amine en position 7 (cf. Figure 40). La synthèse de la coumarine-alcyne est un point clé de cette stratégie puisque cela nous permet d'introduire facilement de la diversité au niveau des groupements solubilisant et ainsi déterminer quel groupement est le plus efficace pour limiter les interactions avec les récepteurs responsables de l'inhibition. La première stratégie ayant déjà été réalisée au laboratoire, la position benzylique a été choisie pour porter le groupement propyne.

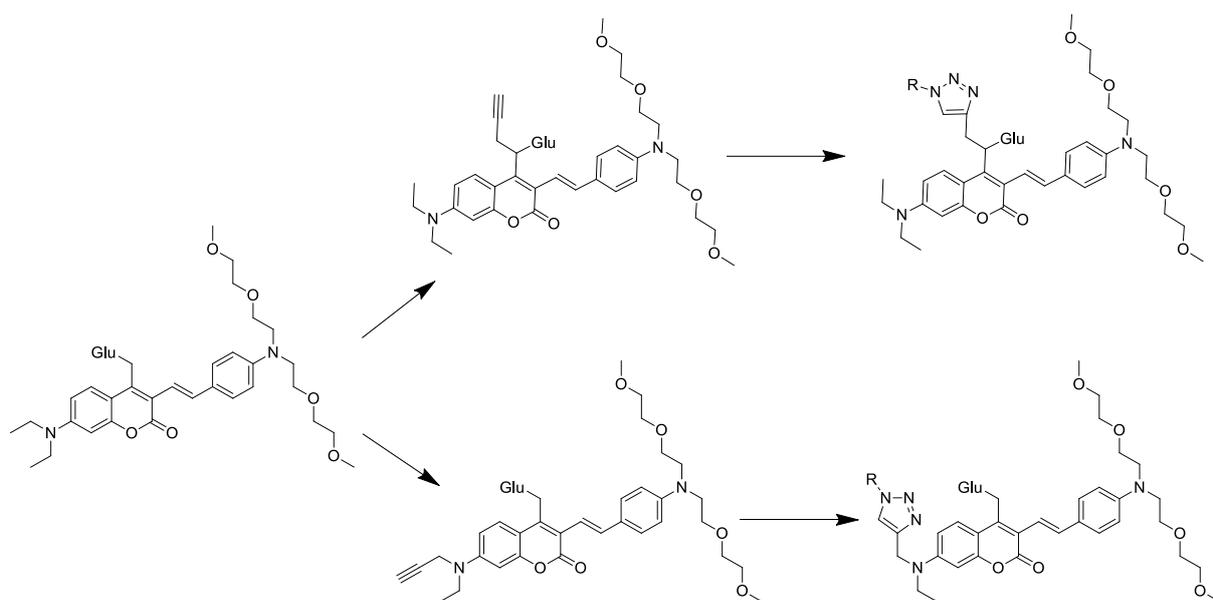


Figure 40: Représentation des deux dérivés du DEACAS arborant une fonction alcyne.

6.2 Synthèse de DEACAS-Glutamate

La synthèse de la coumarine DEACAS débute à partir du synthon **12** (Cf. Figure 41). Ce dernier est oxydé en deux temps. Tout d'abord, il est oxydé en énamine à l'aide de DMF-DMA puis en aldéhyde **14**, qui est obtenu par coupure oxydante au NaIO_4 . La réduction de l'aldéhyde avec du DIBAL-H permet l'obtention de l'alcool **15**. Un brome est ensuite inséré en position 3 par substitution nucléophile aromatique pour obtenir le composé **16**.

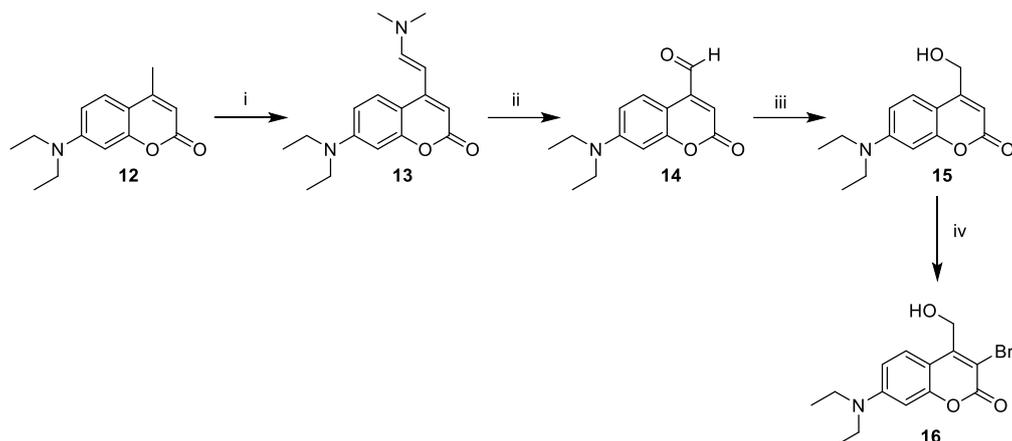


Figure 41: Synthèse du précurseur de DEACAS-Glutamate. (i) DMF-DMA, NaHCO₃, DMF, reflux, 16 h, quant., (ii) NaIO₄, THF/EAU : 1/1, 20 °C, 1 h, quant., (iii) NaBH₄, THF, 20 °C, 5 h, 60%, (iv) NBS, NH₄OAc, MeCN, 20 °C, 30 min, 84%.

L'insertion de la partie aminostyrène a été décrite en réalisant une réaction de Heck par l'équipe de Lin¹⁶⁴. Cependant, lors de la reproduction de cette réaction il semblerait que l'aminostyrène se dégrade très rapidement pour conduire majoritairement à un produit de polymérisation de ce dernier. Une alternative impliquant un couplage de Suzuki à l'aide de l'ester boronique **17** a donc été développée au laboratoire (cf. Figure 42). Ce dernier est obtenu à partir de l'aniline iodée **6**. En effet, en utilisant une source de palladium (0) très encombrée et l'ester pinacolique d'acide boronique de vinyle, il est possible de réaliser un couplage de Heck sans observer de dégradation de l'ester boronique **17** ni de réaction indésirable. Ensuite, l'ester pinacolique d'acide boronique de p-aminostyrène **17** est couplé à la coumarine **16** à l'aide d'une réaction de Suzuki permettant d'accéder au DEACAS **18**. La fonction alcool est ensuite couplée à un glutamate protégé puis les groupements protecteurs sont déprotégés par traitement au TFA pour donner le **DEACAS-Glutamate 19**.

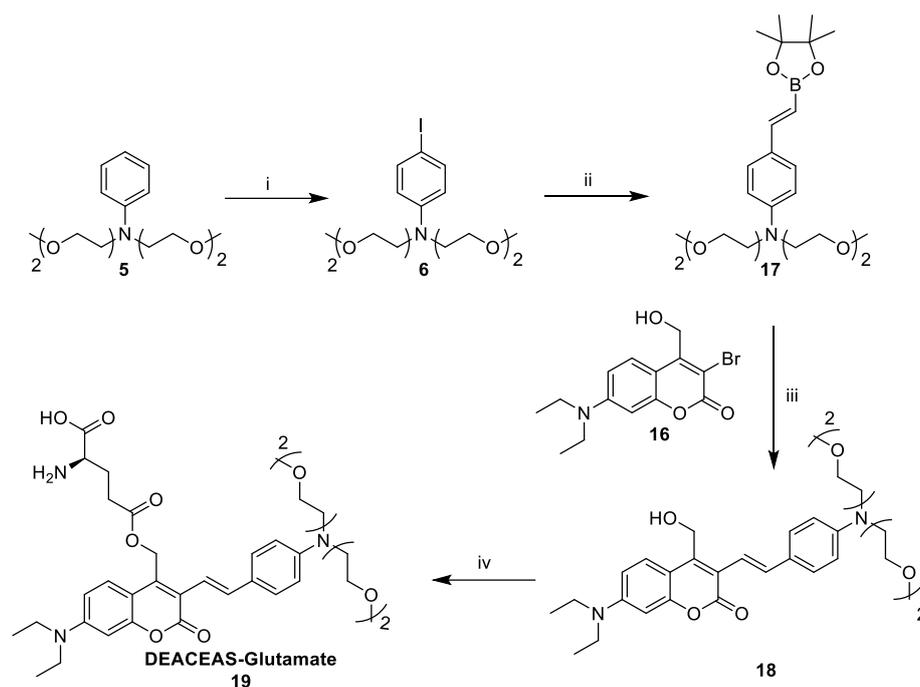


Figure 42: Synthèse de DEACEAS-Glutamate. (i) NIS, NH_4OAc , MeCN, 20 °C, 5 min, quant., (ii) Ester pinacolique d'acide boronique de vinyl, $\text{Pd}(\text{P}(\text{tBu})_3)_2$, Diisopropylamine, toluène, 90 °C, 2 h, 92%, (iii) K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4(0)$, DME/ H_2O : 1/1, 105 °C, 45 min, 60%, (iv) a) Acide 5-(tert-butoxy)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoïque, DIC, DMAP, CH_2Cl_2 , 20 °C, 12 h, b) TFA, CH_2Cl_2 , 20 °C, 12 h, 53%.

6.3 Caractérisation de DEACAS-Glutamate

Les propriétés photophysiques et photochimiques du chromophore DEACAS ont déjà été caractérisées par l'équipe de Lin *et al.*¹⁶⁴ Cependant, le rendement quantique de photolyse a été déterminé pour la libération de l'acide *p*-méthoxybenzoïque et non pour celle du glutamate. Le rendement quantique étant dépendant du groupement partant, il est donc nécessaire de le déterminer pour la libération photoinduite du glutamate. Le DEACAS-*p*-méthoxybenzoïque a servi de référence pour nos expériences de photolyse, car on peut suivre la réaction photolytique par spectroscopie UV-Visible. En effet, l'excitation de la molécule mène à la rupture hétérolytique de la liaison entre la coumarine et la molécule protégée. Ensuite un réarrangement s'effectue, rompant alors la conjugaison entre la partie aniline et la partie coumarine via une cyclisation intramoléculaire (cf. Figure 38). Le sous-produit de photolyse retrouve donc l'absorbance de la coumarine DEAC avec un maximum à 380 nm et non 440 nm comme la coumarine DEACAS. Ainsi, lors de l'irradiation d'un échantillon, l'absorbance à cette longueur d'onde baisse de manière linéaire (cf. Figure 43). La réaction a

donc été suivie par spectroscopie UV-Visible et la fin de réaction confirmée par HPLC analytique. Le taux de produit converti d'un échantillon à un temps donné t est donc déterminé par comparaison entre sa différence d'absorbance avant irradiation (t_0) et la perte de densité optique induite lors d'une photolyse complète (t_{\max}). Également, le suivi de la cinétique de photolyse de DEACAS-Glutamate a été réalisé de la même manière. La référence et le DEACAS-Glutamate ont ainsi été irradiés à 430 nm (cf. Figure 44).

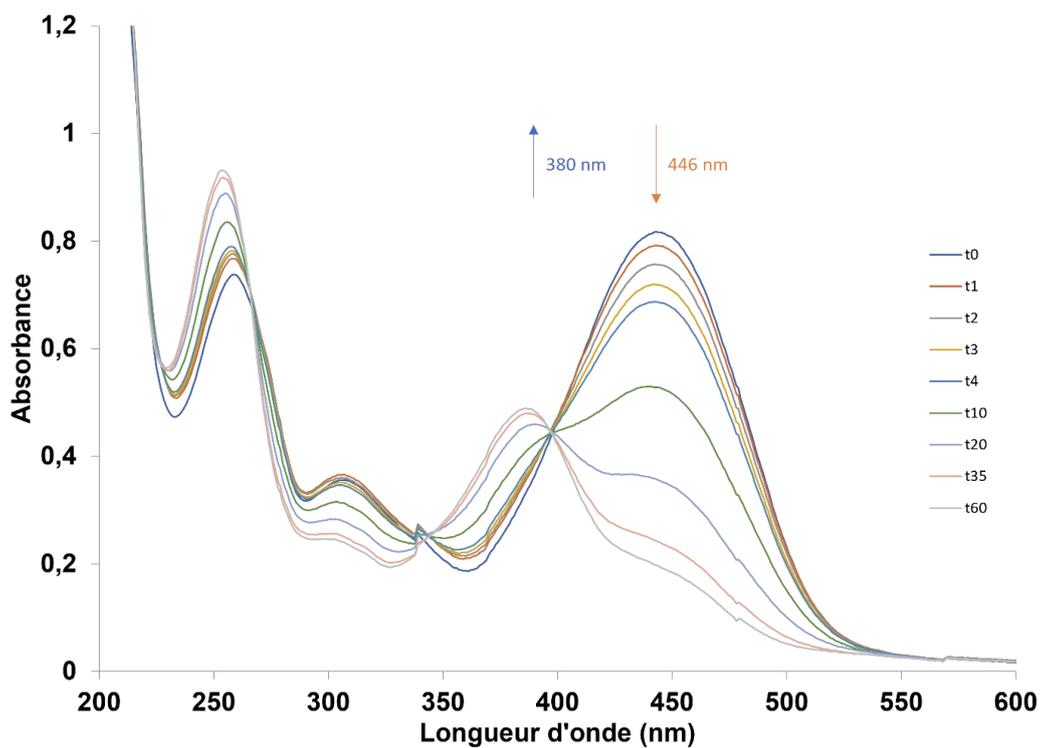


Figure 43: Représentation du spectre d'absorption en fonction du temps d'une solution de DEACAS *p*-méthoxybenzoïque à 20 µM irradié à 430 nm par un appareillage à LED de type LUMO 43 (Atlas Photonics).

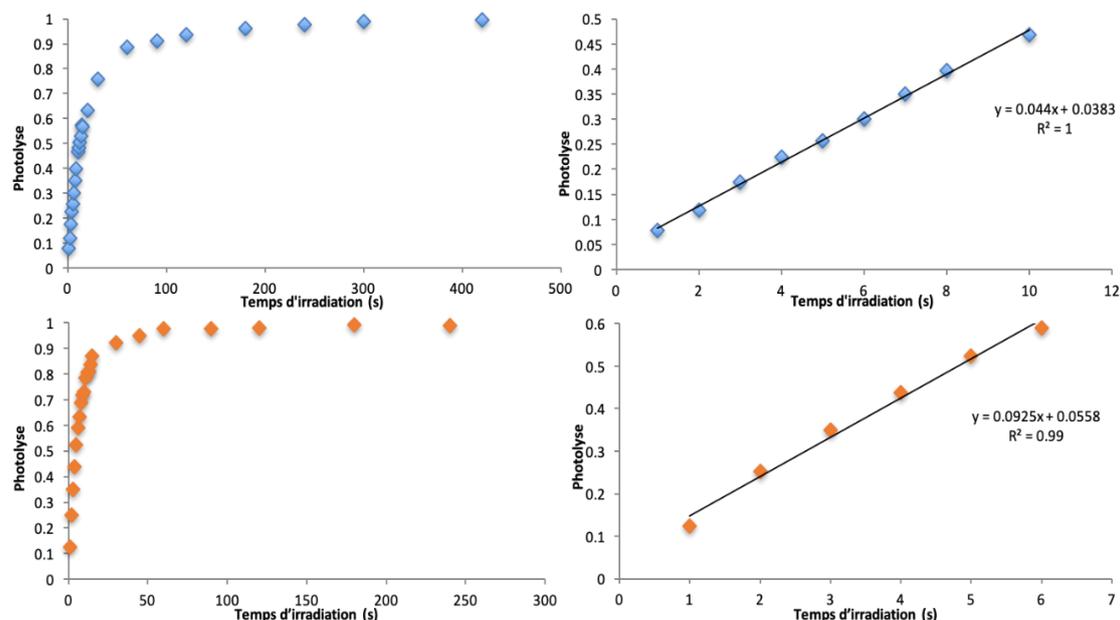


Figure 44: Photolyse de la référence (en bleu) et DEACAS-Glutamate (en orange) par irradiation à 430 nm (200 W.cm²). L'irradiation totale des composés est représentée à gauche et la régression linéaire de la photolyse de chaque composé est représentée à droite.

La cinétique d'une photolyse d'un analogue photolabile est dans un premier temps linéaire. Puis, lorsque la concentration en composé baisse et celle en sous-produit augmente, la cinétique ralentit. Ainsi, lorsque l'on trace la régression linéaire de ces cinétiques (cf. Figure 44), on obtient un coefficient directeur qui nous sert à déterminer le rendement quantique d'une molécule inconnue en utilisant l'Équation 12.

Équation 12 : Détermination du rendement quantique de photolyse Φ_u d'un composé par comparaison avec une référence.

$$\Phi_u(\text{molécule}) = \frac{\Phi_u(\text{référence}) \times \text{pente}(\text{molécule})}{\text{pente}(\text{référence})}$$

Le DEACAS-Glutamate possède un rendement quantique de 0.41, soit deux fois plus important que la référence ($\Phi_u=0.2$). Pour ce qui est des propriétés d'absorption à un et deux photons, elles ne sont pas modifiées par le groupement partant. La coumarine DEACAS-

Glutamate possède ainsi une efficacité de photolyse à deux photons qui peut être estimée à 64 GM à 740 nm et 16 GM à 800 nm.

7. Utilisation de DEACAS-Glutamate sur tranches de cervelet

La synthèse ayant été réalisée, le composé a été testé sur tranches de cervelet. Dans un premier temps, des photolyses à un photon ont été réalisées à une concentration de 100 μM . Cependant, le produit a précipité lors de la décongélation. Après dosage par spectroscopie UV-Visible, il s'est avéré que la concentration à laquelle les tests ont été effectués est de 20 μM . Néanmoins, malgré la faible concentration en analogue photolabile du glutamate, les courants générés par l'irradiation un photon à 450 nm de DEACAS-Glutamate sont rapides et intenses (cf. Figure 45). A cette concentration, le Rubi-Glutamate n'induit aucun courant c'est pourquoi les tests ont été réalisés à 300 μM pour ce précurseur du glutamate.

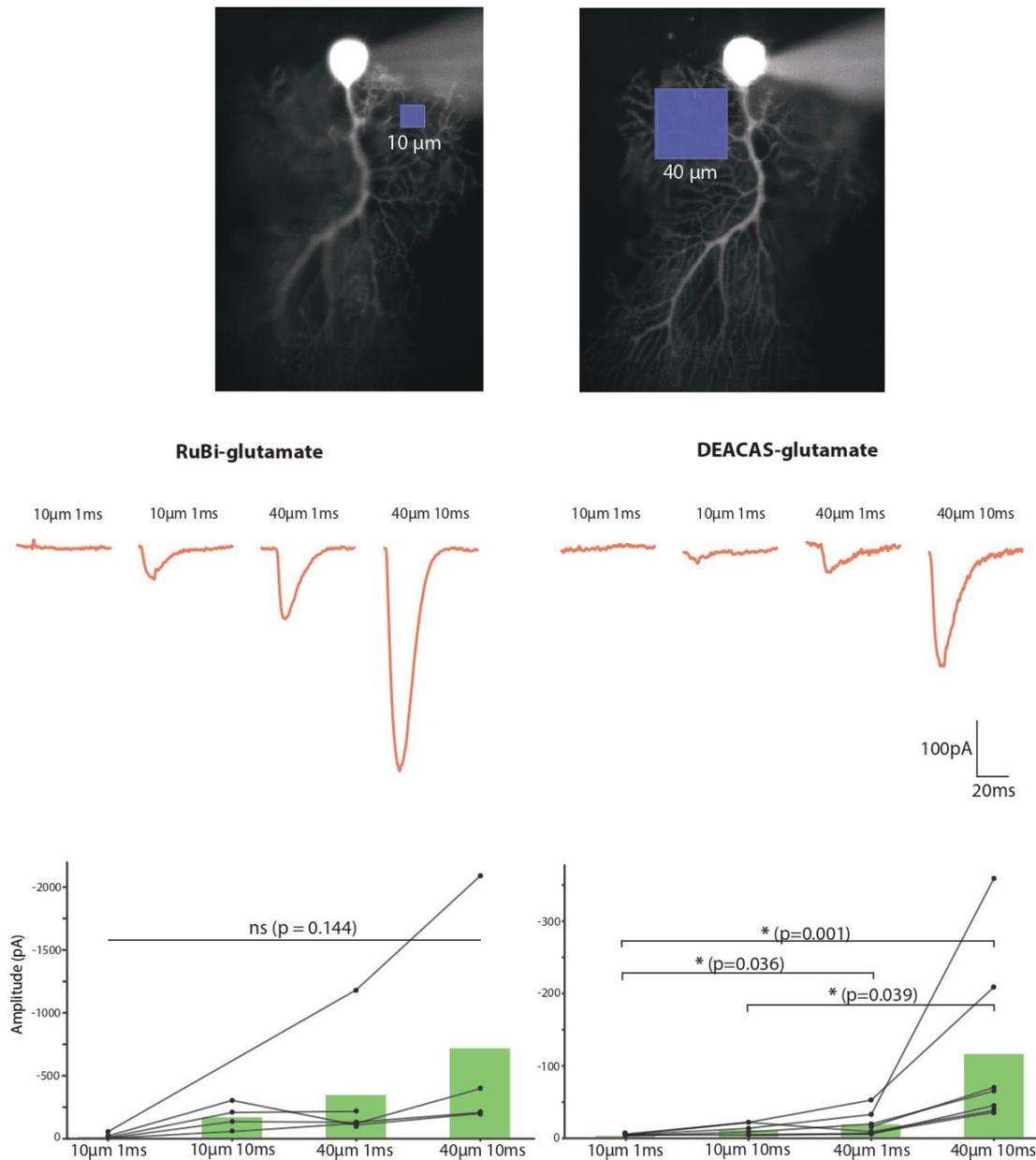


Figure 45: Décageage du DEACAS-glutamate à 450 nm et comparaison avec le RuBi-glutamate. A. Cellule de Purkinje remplie avec de l'Alexa-594, un marqueur fluorescent. L'illumination est réalisée au niveau de l'arbre dendritique sur des zones de 10 x 10 μ m et 40 x 40 μ m pendant 1 et 10ms. B. Exemple de réponses moyennes obtenues pour une cellule suite au décageage du RuBi-glutamate à gauche et du DEACAS-glutamate à droite. C. Effet de la libération du RuBi-glutamate (n=5) à gauche et du DEACAS-glutamate (n=7) à droite. *significatif, ns : non significatif (Test de Friedman, post-hoc : Test de Nemenyi)

De la même manière, pour les expériences à deux photons des aliquots à 300 μ M dans du tampon aCSF ont été préparés. Le produit a également précipité après décongélation et, après dosage par spectroscopie UV-Visible, la concentration des aliquots a été déterminée à 20 μ M. Toutefois, des expériences de photolyse à deux photons ont été réalisées sur tranches

de cervelet avec ces aliquots et il en résulte que, même à 20 μM , la coumarine DEACAS-Glutamate induit des courants excitateurs puissants et rapides pouvant être comparés à ceux induits par le Rubi-Glutamate à 300 μM (cf. Figure 46). Des aliquots à 20 μM ont été préparés et sont toujours en attente d'être testés pour s'assurer de l'efficacité de la molécule sans présence de précipité.

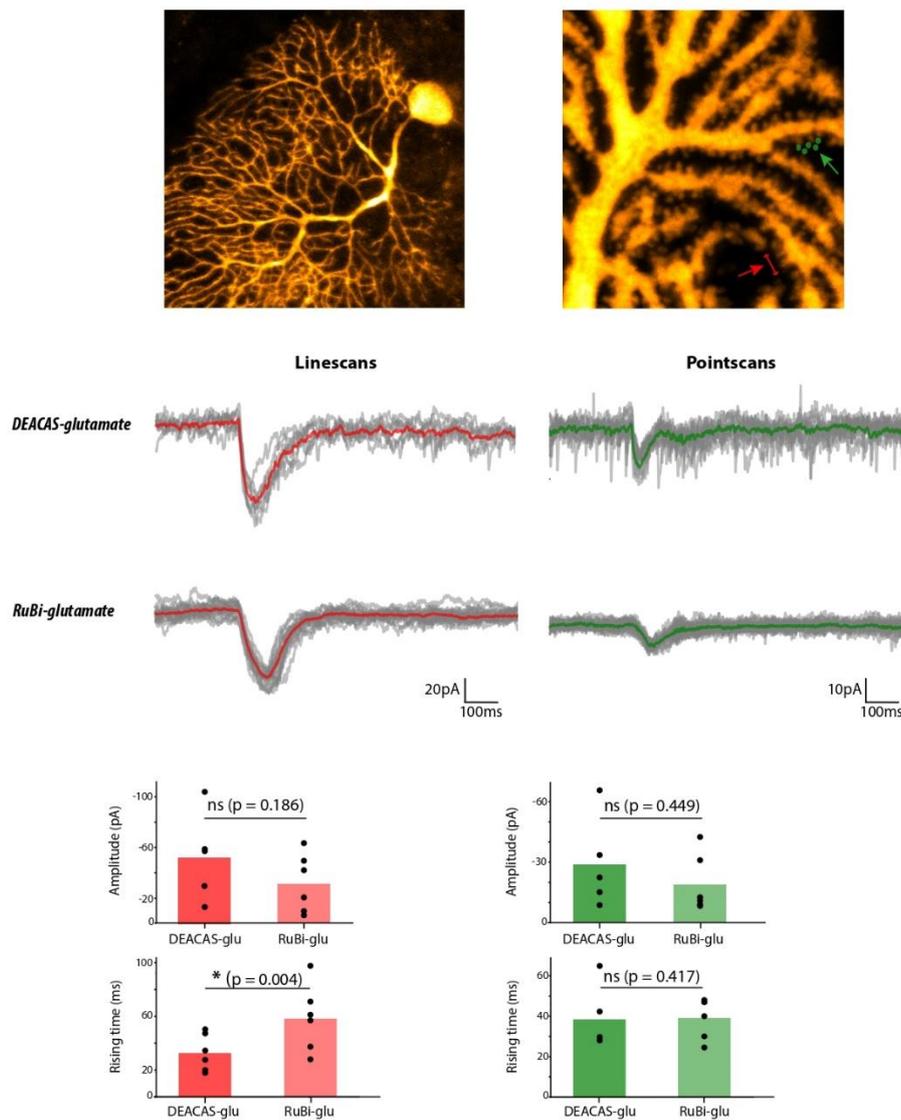


Figure 46: Décageage du DEACAS-glutamate à 740 nm au microscope biphoton et comparaison avec le RuBi-glutamate à 800nmA. Cellule de Purkinje remplie avec de l'Alexa-594. L'illumination est réalisée à proximité des épine dendritiques via un scan linéaire pendant 30ms (en rouge) ou un point focal (5 points de 10ms) (en vert). B. Exemple de réponses obtenues après photo-stimulation de DEACAS-glutamate (en haut) et de RuBi-glutamate (en bas). Les traces brutes en gris, moyennes en rouge. C. Comparaison des caractéristiques des courants induits par l'illumination des deux composés cagés en fonction des protocoles de stimulation. * significatif, ns : non significatif (Test de Mann-Whitney).

8. Développement d'un dérivé soluble de DEACAS-Glutamate

La nécessité de rendre plus soluble le DEACAS-Glutamate tout en améliorant ses propriétés pharmacologiques nous a amené à utiliser la même stratégie que pour le GANBP. Nous avons donc décidé d'insérer un groupement propyne en position benzylique. Un premier essai a été réalisé par Juliane Chaud en protégeant l'aldéhyde sous forme d'un acétal (cf. Figure 47) puis en insérant un brome en position 3. Un couplage de Suzuki-Miyaura avec l'ester boronique **17** pour former la coumarine **22** a ensuite été réalisé avant d'effectuer la déprotection de l'aldéhyde ce qui n'a pas permis d'obtenir la coumarine **23**.

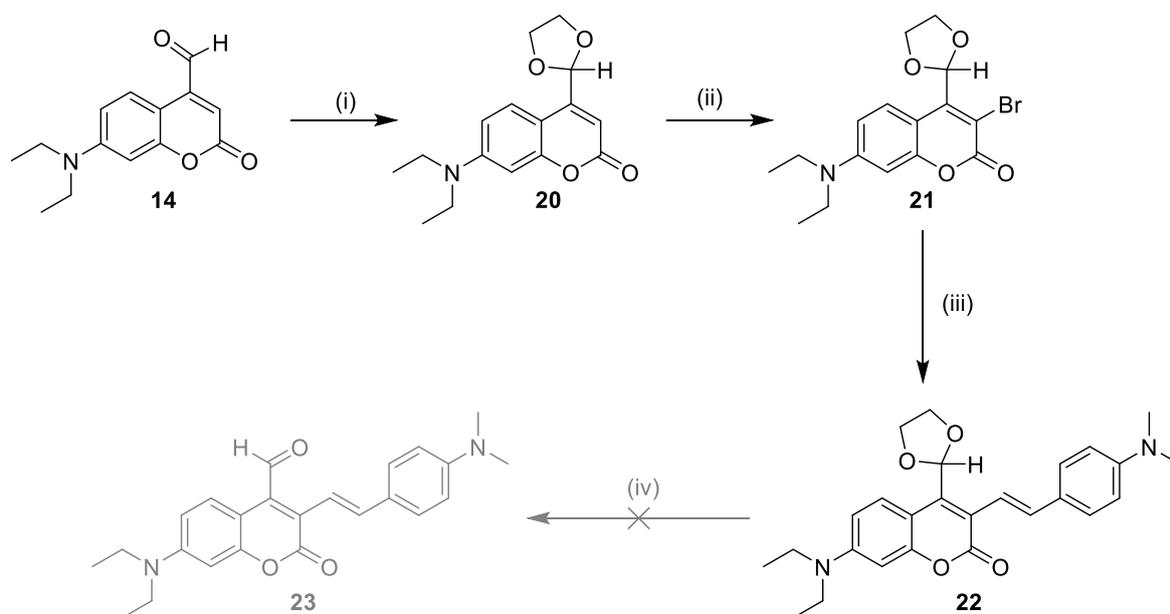


Figure 47 : Synthèse d'un dérivé soluble de DEACAS utilisant un aldéhyde protégé en acétal. i : Ethylène glycol, acide *p*-toluènesulfonique, toluène, reflux, 12 h, 95%, ii : NBS, NH_4OAc , MeCN, 20 °C, 90 min, 62%, (iii) Ester pinacolique d'acide boronique de *p*-Dimethyl-aminostyrène **17**, K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DME/ H_2O (3 :1), 105 °C, 45 min. (iv) TsOH, Toluène/ H_2O (1:1), 100 °C, 16 h.

La précédente stratégie n'ayant pas été concluante, le groupement propyne a été inséré sur la coumarine **14** à l'aide d'une solution de l'organozincique correspondant pour former l'alcool **24** puis bromé en position 3 afin d'obtenir le composé **25** (cf. Figure 48).

Cependant, lorsque l'on réalise le couplage avec le composé **17**, le produit observé n'est pas issu d'un couplage direct, mais d'une réaction en domino. En effet, l'alcyne semble être idéalement placé pour réaliser une cyclisation 5-exo-dig suivi d'un couplage de Suzuki-Miyaura pour obtenir le composé **26** (cf. Figure 48).

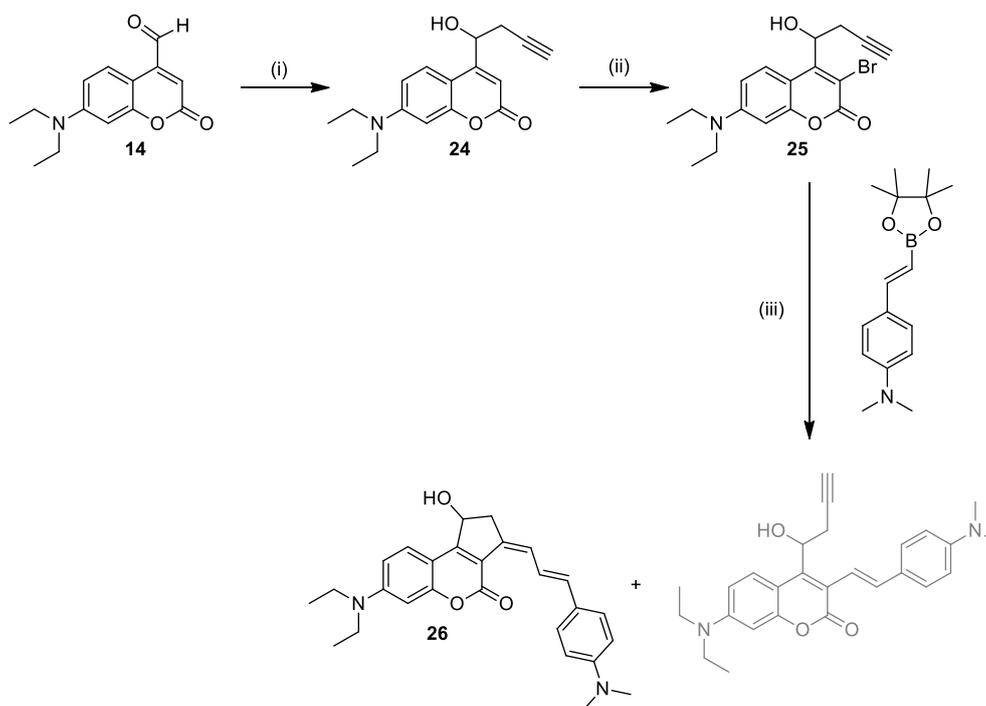


Figure 48 : Tentative de synthèse d'un dérivé alcyne de DEACAS en réalisant la réaction de Barbier suivie d'une réaction de Suzuki. i : Bromopropyne, Zn, THF, 0 °C puis TA, 90 min, 68 %, ii : NBS, NH₄OAc, MeCN, 20 °C, 90 min, 92%, (iii) Ester pinacolique d'acide boronique de p-diméthyl-aminostyrène, K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, DME/H₂O (3:1), 105 °C, 45 min.

Bilan :

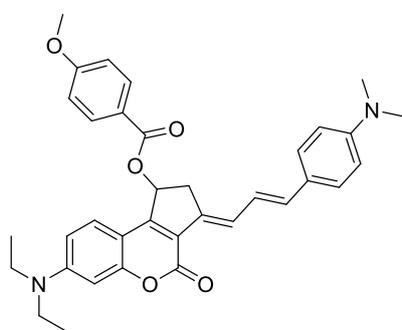
La coumarine DEACAS présente de très bonnes propriétés photophysiques et photochimiques, elle a donc été adaptée pour la libération du glutamate. L'ajout de chaînes oligoéthylène glycol sur la fonction aminostyrène n'a cependant pas permis d'obtenir un composé très soluble dans l'eau. Les premiers tests suggèrent tout de même que le composé est très efficace, mais il est nécessaire de réaliser les expériences dans des conditions optimales sans précipité pour s'en assurer. Les dérivés alcynes étant compliqués à obtenir, leur développement a été suspendu. Les précurseurs photolabiles tels que le DEACAS-

Glutamate ayant une forte sensibilité à deux photons peuvent être utilisés à de très faibles concentrations, il semble prometteur de développer des composés encore plus sensibles pour des applications en neurosciences.

9. Une coumarine hautement conjuguée à la structure rigidifiée

9.1 Choix de la coumarine 5-exo-dig-Suzuki-Glutamate

Nous avons vu dans les parties précédentes de ce chapitre que le DEACAS-Glutamate présente une efficacité de photolyse à deux photons importante, permettant potentiellement de l'utiliser à de très faibles concentrations. Ainsi, l'antagonisme aux récepteurs du GABA_A est potentiellement moins problématique que lorsque l'on utilise des groupements moins efficaces. En effet, la plupart des analogues photolabiles de glutamate nécessitent de fortes concentrations à cause de leurs faibles sensibilités à l'excitation bi-photonique, tels que le MNI-glutamate, utilisé entre 1 et 2 mM ($\delta_u = 0.06$ GM).



5-exo-dig-Suzuki **79**

Au cours de cette thèse, une nouvelle série de coumarines a été élaborée. Le développement et la caractérisation de cette série de composés seront présentés au chapitre IV. La première molécule qui a été synthétisée, la coumarine **79** présente une efficacité de photolyse à deux photons pour la libération de l'acide *p*-méthoxybenzoïque de 63 GM, soit deux fois plus que pour le DEACAS-*p*-méthoxybenzoïque. Nous avons ainsi décidé d'adapter cette molécule pour la libération du glutamate. Une tentative d'ingénierie moléculaire a été réalisée pour modifier cette structure afin de la rendre plus soluble (cf. Chapitre IV), mais cet essai ne s'est pas révélé fructueux. Nous avons donc pris la décision d'apporter à cette coumarine les mêmes modifications que pour le DEACAS-Glutamate en ajoutant à la partie aminostyrène deux chaînes oligoéthylène glycol.

9.2 Synthèse de la coumarine rigide et conjuguée obtenue par réaction domino 5-exo-dig-Suzuki

La synthèse de ce nouveau précurseur photolabile du glutamate a été réalisée avec l'ester boronique **17** et la coumarine **21** (cf. Figure 49). La purification de l'alcool **27** s'effectue difficilement sur silice. C'est pourquoi le produit est directement utilisé pour réaliser un couplage avec un glutamate protégé. Après purification par HPLC, l'ester **32** est obtenu avec un rendement pour les deux étapes de 10%. La déprotection de ce composé a été réalisée, mais après purification HPLC, très peu de produit a été obtenu ne permettant pas d'effectuer la caractérisation du produit **33**. Malheureusement par manque de temps, la synthèse de ce composé n'a pas été finalisée.

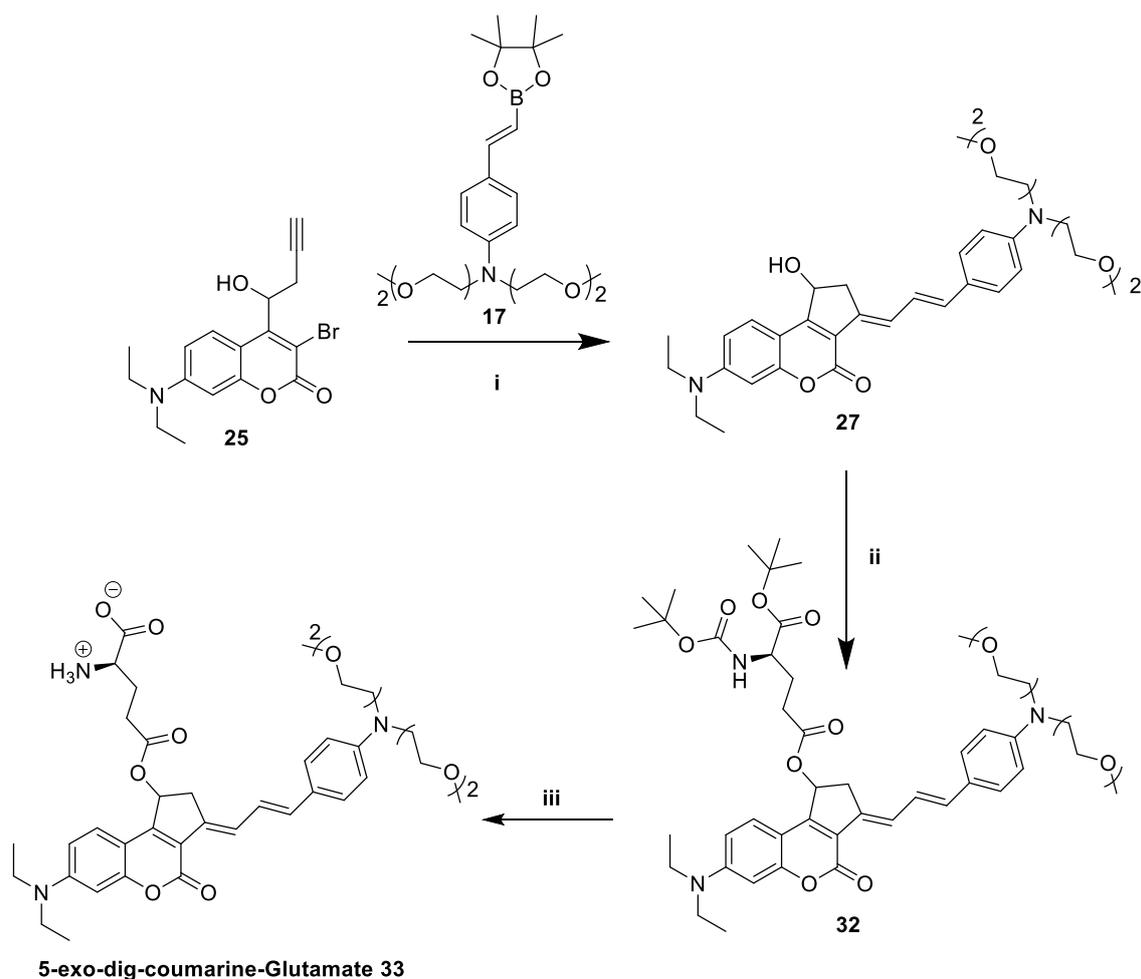
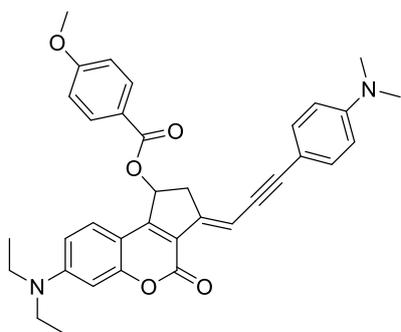


Figure 49: Synthèse de la 5-exo-dig-coumarine-Glutamate. i: K_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, DME/ H_2O (3:1), 105 °C, 45 min (ii): Acide 5-(t-butoxy)-4-((t-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoïque, DIC, DMAP, CH_2Cl_2 , 20 °C, 12 h, 10%, iii TFA, CH_2Cl_2 , 20 °C, 12 h.

10. Une coumarine aux propriétés photophysiques intéressantes

10.1 Choix de la coumarine 5-exo-dig-Sonogashira



5-exo-dig-Sonogashira

125 GM (740 nm)

Lors du travail d'optimisation de la sensibilité à deux photons réalisé sur cette nouvelle série de coumarines rigidifiées, la coumarine 5-exo-dig-Sonogashira a été synthétisée. Ce GPP est encore plus intéressant que la coumarine **79**. En effet, l'introduction d'un alcyne à la place de l'alcène augmente l'efficacité de photolyse à deux photons jusqu'à 125 GM pour la libération de l'acide *p*-méthoxybenzoïque, soit quatre fois plus que la coumarine DEACAS. A l'instar de son homologue **79**, son

développement et sa caractérisation seront développés au chapitre IV.

Au vu de ses propriétés encore plus importantes à deux photons que les molécules précédentes, nous avons décidé de nous concentrer sur ce composé pour la libération du glutamate. Cependant, il a fallu réfléchir à différentes stratégies afin d'augmenter sa solubilité dans l'eau puisque l'introduction d'oligoéthylène glycol a montré ses limites lors de l'utilisation de DEACAS-Glutamate, molécule moins hydrophobe que la série des coumarines 5-exo. Ainsi, nous avons décidé de substituer l'amine de la partie aniline par deux acétates *t*-butyliques. L'intérêt est que, lors de l'étape finale de déprotection du glutamate en condition acide, les deux esters *t*-butyliques soient également clivés pour obtenir un bis-carboxylate (cf. Figure 50). Cette stratégie permet d'obtenir un composé chargé permettant d'augmenter la solubilité dans l'eau, tout en évitant un empilement ou « stacking » entre deux molécules d'analogues de glutamate qui résulteraient en la précipitation du composé.

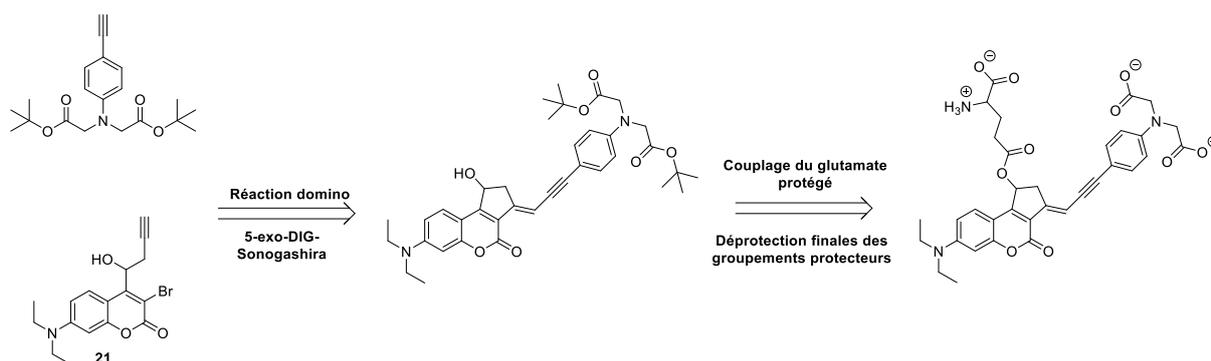


Figure 50: Rétrosynthèse de la coumarine 5-exo-Sonogashira-Glutamate.

10.2 Synthèse de la coumarine-5-exo-dig-Sonogashira

10.2.1 Synthèse de la bis-*t*-butylethynylaniline

La synthèse de la bis-alkyl aniline **38** a été entreprise à partir de l'aniline **34** (cf. Figure 51). Cette dernière, par réaction au micro-ondes avec du *t*-butyl bromoacetate, a permis d'obtenir l'aniline bis alkyle **35**. Ce composé a ensuite été iodé en para de l'amine par substitution électrophile aromatique avec du *N*-Iodosuccinimide afin de pouvoir ensuite réaliser un couplage de Sonogashira avec du triméthylsilyle acétylène pour conduire au composé **37**. La déprotection de l'alcyne par du TBAF à température ambiante ou par une quantité catalytique de carbonate de potassium n'a pas permis d'obtenir le composé désiré **38**. En effet, on observe la formation du produit **39** issu d'un homo-couplage au niveau de l'alcyne. La purification de l'alcyne protégé **37** se faisant simplement sur colonne courte de silice, nous avons dans un premier temps supposé que des traces résiduelles de cuivre permettant un couplage de Glaser seraient présentes. Ainsi, le dérivé **37** a été traité par une solution aqueuse d'EDTA, un chélatant du cuivre. Cependant, même après traitement, les deux conditions de déprotection mènent toujours à la formation du dimère **39**. Pour expliquer cette formation, nous pouvons supposer que l'intermédiaire anionique formé lors de la déprotection du groupement silane est extrêmement réactif et réagirait sur lui-même.

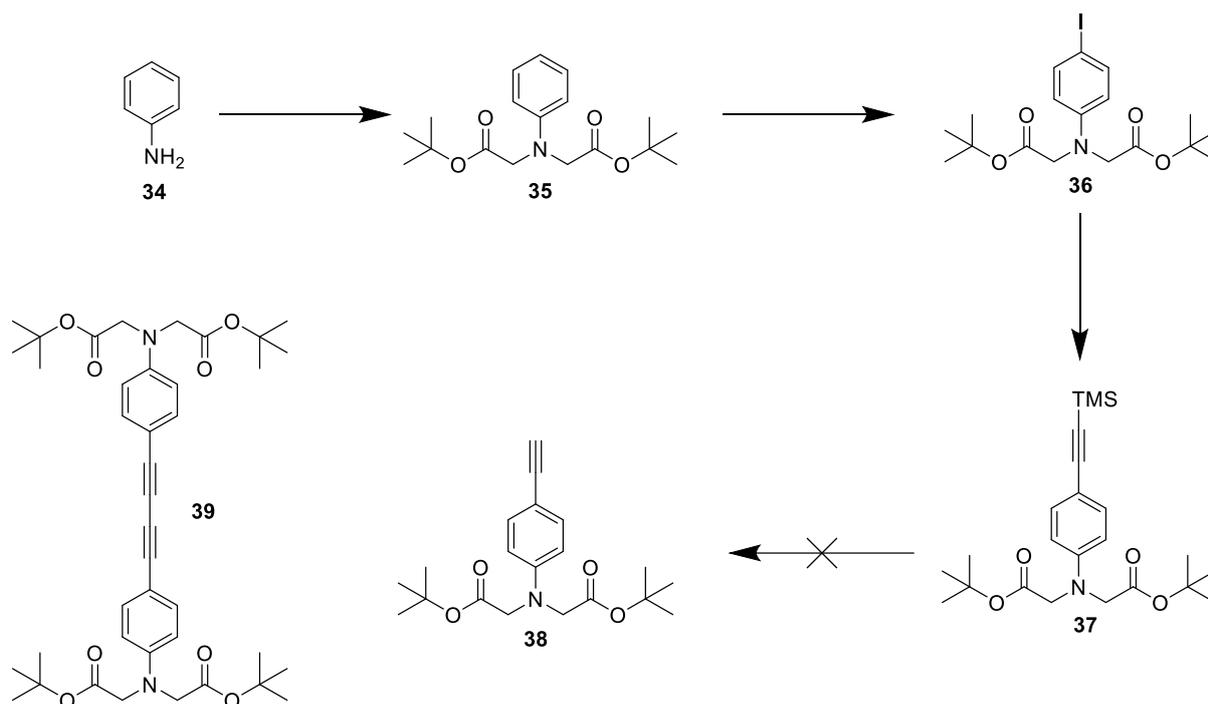


Figure 51: Synthèse du synthon **37** à partir d'aniline. i : *t*-Butylbromoacétate, TBAI, DIPEA, DMF, MW 120 °C, 1 h, 82%, ii: NIS, NH₄OAc, MeCN, 0 °C puis TA, 20 h, 92%, iii Triméthylsilyl acétylène, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, THF, MW 40 °C, 2 h, 80%, iv : TBAF, THF, TA, 20 h ou K₂CO₃, MeOH, TA, 20 h.

Suite à ces résultats, la synthèse de **38** a été réalisée à partir de l'éthynylaniline **40** (cf. Figure 52). Contrairement à l'aniline, la réaction par micro-onde avec du *t*-butyl bromoacetate ne permet pas d'obtenir le composé bis-alkylé mais seulement le mono-alkylé **41**. La présence de l'alcyne semblant rendre l'amine moins réactive, nous avons augmenté la température jusqu'à 160 °C, mais le produit s'est dégradé. Nous avons changé de stratégie et en variant le nombre d'équivalents des réactifs lors de cette alkylation, nous avons déterminé qu'il est nécessaire de mettre deux équivalents de *t*-butylbromoacetate pour observer une mono-alkylation complète. Le réactif de départ se dégradant probablement très rapidement et l'amine étant moins réactive, elle n'a pas le temps de réagir une seconde fois. Une fois le composé **41** isolé, la bis-alkylation peut être réalisée dans les mêmes conditions, confirmant l'hypothèse de la dégradation du réactif.

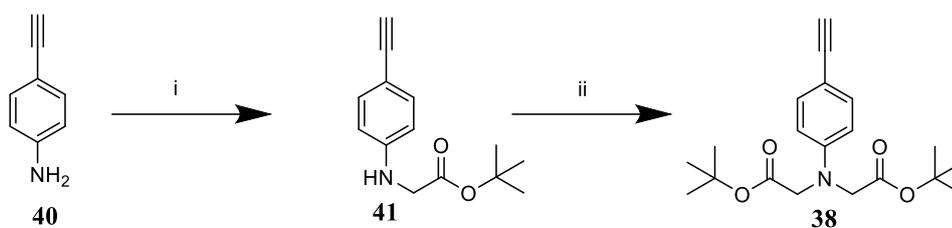


Figure 52: Synthèse du synthon **38** partir de l'éthynylaniline. i: t-Butylethylamine, TBAI, DIPEA, DMF, MW 120 °C, 1 h, 95%, ii: t-Butylethylamine, TBAI, DIPEA, DMF, MW 120 °C, 1 h, 95%.

12.2.2 Synthèse de la coumarine 5-exo-dig-Sonogashira-Glutamate

La synthèse de la coumarine 5-exo-dig-Sonogashira **42** a ensuite été réalisée grâce à une réaction domino 5-exo-dig-Sonogashira (cf. Figure 53). Cette dernière a ensuite été couplée à un glutamate protégé permettant d'obtenir le composé **42**. Cependant, la déprotection en condition acide des groupements *t*-butyles mène à la dégradation du composé et la présence d'un ester empêche l'utilisation de conditions d'hydrolyse basiques. Ainsi, aucune méthode de déprotection n'est envisageable pour cette molécule.

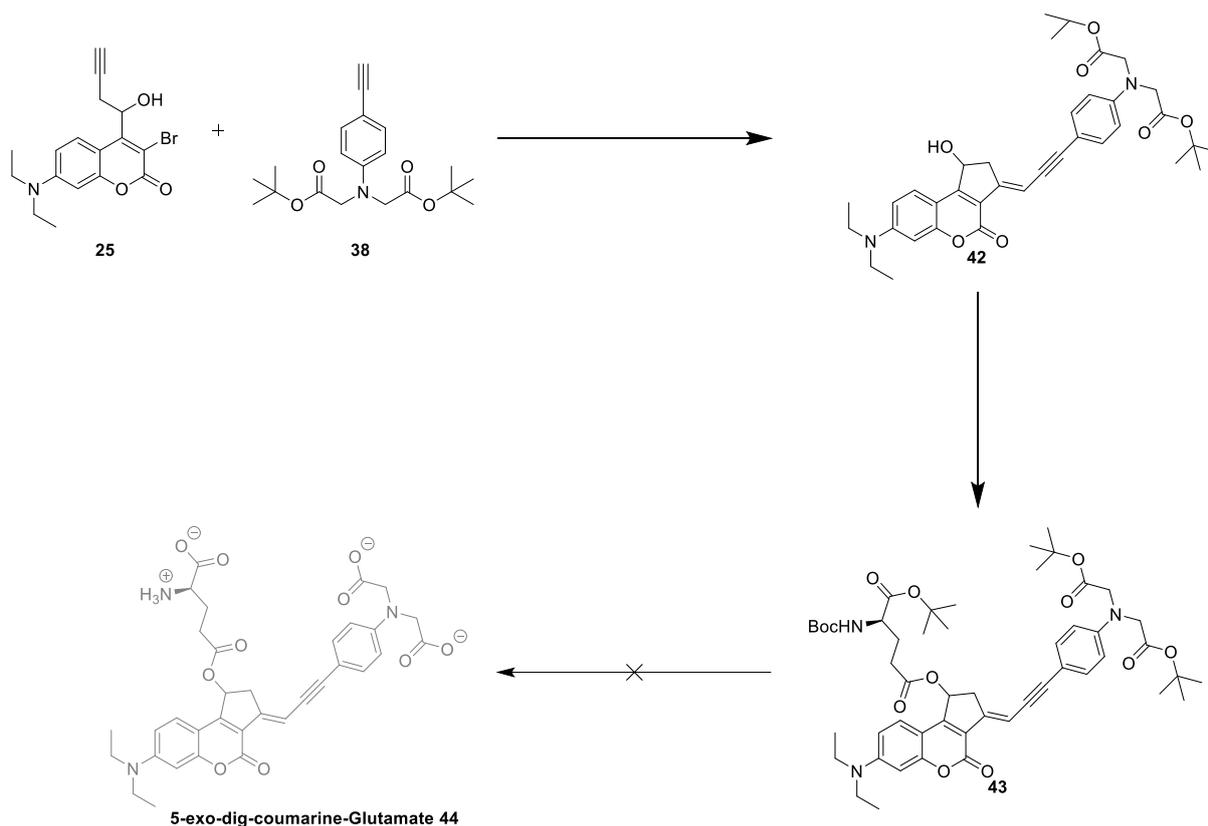


Figure 53: Synthèse de la coumarine 5-exo-dig-Sonogashira-Glutamate. i: Diisopropylamine, CuI, PdCl₂(PPh₃)₂, MW 120 °C, 1 h, 26%, ii : Acide 5-(tert-butoxy)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoïque, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C puis TA, 16 h, 15%.

Bilan :

Le développement de cette série de coumarines hautement sensibles à l'excitation bi-photonique est très intéressant pour une utilisation sur des systèmes biologiques. Ainsi, deux précurseurs photolabiles du glutamate ont été réalisés avec deux coumarines issues de cette série. La synthèse de la coumarine 5-exo-dig-Suzuki-Glutamate **33** n'est pas assez efficace pour imaginer une utilisation en biologie. Nous avons alors préféré nous concentrer sur la coumarine-5-exo-dig-Sonogashira-Glutamate **44** qui présente une efficacité à deux photons quatre fois plus importante que la coumarine DEACAS. Cependant, le développement de ce précurseur photolabile du glutamate n'a pas pu aboutir, car la fonction en-yne semble être sensible aux conditions acides et par manque de temps, aucune autre stratégie de protection n'a été envisagée.

11. Conclusion

La synthèse de GANBP-Glutamate a initié ce projet. Ce dernier n'a pas donné les résultats escomptés lors de tests sur tranches de cervelet effectués par nos collaborateurs. En effet, nous supposons que ce composé ne pénètre pas correctement les tranches de cervelet. Cependant, nous n'avons pas eu l'occasion de réaliser des tests sur cultures de neurones pour voir si sur des systèmes moins complexes, le composé pénètre dans le tissu et relargue efficacement le glutamate lors d'excitation à deux photons.

Ensuite, la synthèse de DEACAS-Glutamate, un composé plus efficace et fluorescent, a été réalisée. Malheureusement, ce composé se révèle être peu soluble, car il précipite lors des tests sur tranches de cervelet. Néanmoins, malgré la présence de précipité, les irradiations à un et deux photons induisent des courants forts, supérieurs à ceux induits par le RuBi-Glutamate à des concentrations plus élevées. Des expériences à faibles concentrations sans la présence de précipité devront être réalisées afin de confirmer ces résultats.

Ainsi, le développement de nouveaux GPPs libérant le glutamate par excitation à deux photons plus efficacement semble être prometteur pour réduire considérablement les concentrations en précurseurs photolabiles du glutamate. De ce fait, les coûts de leur utilisation et les effets non désirés tels que l'antagonisme aux récepteurs du GABA_A seront réduits. Cependant, que ce soit pour la coumarine DEACAS-Glutamate ou pour la série des coumarines rigidifiées par réaction 5-exo-dig, la solubilité dans l'eau reste problématique. Deux stratégies peuvent être imaginées pour résoudre ce problème, alkyler des groupements solubilisant sur la fonction aminostyrène ou introduire un alcyne sur le squelette de ces coumarines afin de greffer des groupements solubilisant sur la molécule (cf. Figure 54).

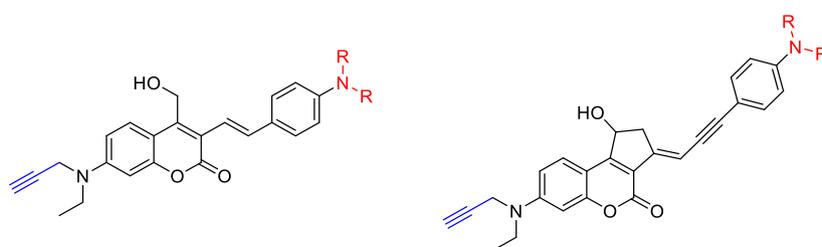


Figure 54: Représentation des stratégies possibles pour rendre la coumarine DEACAS, ou la série des coumarines rigidifiées par réaction domino 5-exo-dig, solubles dans l'eau. En bleu est représenté un alcyne permettant de greffer des

groupements solubilisant en position 7 de la coumarine et en rouge est représenté une alkylation de groupement solubilisant R sur la fonction aminostyrène.

Chapitre III

III. Conception d'un précurseur photolabile de la nicotine excitable dans le vert

Le second projet de cette thèse est la synthèse d'un nouveau précurseur photolabile de la nicotine réalisant des réactions de photolyse après irradiations dans le vert (>500 nm). Ce projet est issu d'une collaboration entre notre équipe et celle du Dr. Nicolas Vitale située à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI). Celle-ci s'attèle à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'exocytose régulée, avec une attention particulière sur le rôle des phospholipides. En effet, l'exocytose est un processus du trafic vésiculaire essentiel au fonctionnement des organismes multicellulaires, car nécessaire à la libération de molécules informatives (neurotransmetteurs, hormones ...) permettant d'établir une communication inter-cellulaire. Au niveau du système nerveux, l'exocytose de neurotransmetteurs ou d'hormones à la suite d'une stimulation est régulée par des protéines telles que la protéine SNARE ou le cytosquelette d'actine. Récemment, l'équipe du Dr. Vitale a révélé que la phospholipase D1, responsable de la synthèse d'acide phosphatidique (AP), est également impliquée dans la régulation de l'exocytose régulée. Ils ont également montré que les AP mono-insaturés participent à l'ancrage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique tandis que les AP poly-insaturés participent directement au phénomène de fusion entre les membranes vésiculaires et plasmiques.

Malheureusement, le manque d'outils moléculaires permettant de manipuler les phospholipides avec une précision spatio-temporelle suffisante représente un frein à la compréhension des fonctions des AP dans l'exocytose régulée. Pour cela, nos collaborateurs souhaitent utiliser différents outils optiques tels que des enzymes permettant la synthèse ou la dégradation des AP de manière photocontrôlée par la protéine CRY2, des précurseurs photolabiles de AP ou encore des peptides ayant une affinité pour les AP contrôlés par la protéine photoactivable LOV2. Pour pouvoir utiliser pleinement ces outils, ils doivent également provoquer l'exocytose régulée de neurotransmetteurs ou d'hormones. Nos collaborateurs travaillent avec les cellules chromaffines, responsables de la libération d'adrénaline et de noradrénaline dans la circulation sanguine. Les cellules chromaffines expriment fortement les récepteurs nicotiniques, perméables aux ions calciums, un élément déclencheur de l'exocytose. Ainsi, l'utilisation d'un précurseur photolabile de la nicotine

excitable à des longueurs d'onde permettant l'utilisation d'autres outils photochimiques semble être une solution pour étudier plus précisément l'implication des AP dans l'exocytose régulée.

1. Les récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques (nAChRs) font partie des récepteurs canaux de l'acétylcholine. Ces récepteurs ont pour agoniste endogène l'acétylcholine et pour agoniste exogène la nicotine. On les retrouve au niveau des jonctions reliant les nerfs aux cellules musculaires permettant la contraction musculaire et, également, dans le système nerveux central où ils jouent un rôle de régulateur de la libération d'autres neurotransmetteurs¹⁶⁷. Ces récepteurs font partie de la superfamille des canaux ioniques de type « cys-loop », des pentamères composés de cinq sous-unités assemblées pour former un canal ionique, reconnaissable par la présence d'une boucle formée par treize acides aminés liés par deux cystéines (Cys) (cf. Figure 55). Cette superfamille comprend également les récepteurs du GABA, de la sérotonine et du zinc.

Dans le cas des récepteurs nicotiques, le canal est perméable aux cations sodium, potassium et calcium. Il existe seize sous-unités permettant de former trois classes de récepteurs nicotiques en fonction de leurs pharmacologies et leurs physiologies. En effet, les nAChRs situés au niveau des jonctions muscles-nerfs, formant la première classe de récepteurs, sont constitués des sous-unités $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ , γ . La seconde classe représente les nAChRs exprimés à la surface des neurones et sont constitués des sous-unités $\alpha 2$ - $\alpha 6$ et $\beta 2$ - $\beta 4$. Pour finir, la troisième classe de récepteurs est composée des sous-unités $\alpha 7$ - $\alpha 9$ capables de former des homo-pentamères. Lorsqu'un agoniste se lie au récepteur nicotique, cela provoque le mouvement d'une boucle dite « C » menant à l'ouverture du canal ionique¹⁶⁸.

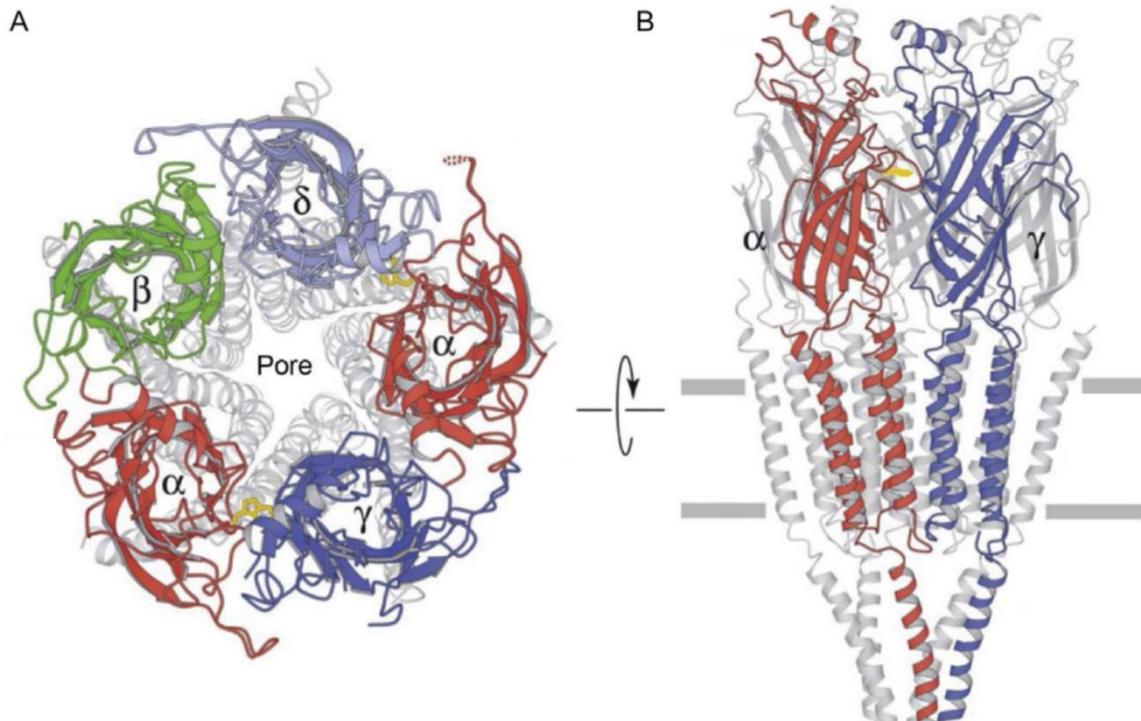


Figure 55: Structure en mode ruban de nAChR. A : Vue au-dessus du pore avec la partie supérieure de chaque sous-unité représentée en couleurs. B : Vue de côté de la protéine avec les deux sous-unités de face colorées. Figure extraite de la littérature¹⁶⁹.

2. Etat de l'art

Les récepteurs canaux de l'acétylcholine sont principalement composés des récepteurs nicotiques (nAChRs) dont l'agoniste endogène est l'acétylcholine et l'agoniste exogène le plus connu est la nicotine. Les récepteurs muscariniques, quant à eux, sont les principaux récepteurs métabotropiques de l'acétylcholine dont l'agoniste exogène le plus connu est la muscarine. La photorégulation de la libération de l'acétylcholine à l'aide de groupements protecteurs photolabiles n'est pas aisée, car l'acétylcholine n'a pas d'hétéroatomes disponibles permettant de créer une liaison covalente avec un groupement protecteur photolabile. En effet, il est nécessaire d'utiliser des agonistes pouvant être liés à des groupements protecteurs photolabiles pour pouvoir mimer une activation de ces récepteurs avec un bon contrôle spatio-temporel. C'est pourquoi, jusqu'alors, aucun précurseur photolabile de l'acétylcholine n'a été décrit dans la littérature. Ceci explique ainsi que,

contrairement aux autres neurotransmetteurs^{113,170,171}, l'utilisation du concept de libération photoinduite soit plus rare dans le cas des récepteurs cholinergiques. Ainsi, le premier outil photochimique développé pour étudier les récepteurs cholinergiques a été le N-(alpha-carboxy-2-nitrobenzyl)carbamylocholine, abrégé en CBN-Carbamylocholine (ou CBN-Carbachol). Ce groupement *o*-nitrobenzyle permet de libérer par excitation à un et deux photons de la carbamylocholine, un autre agoniste des récepteurs de l'acétylcholine^{88,106,172,173} (cf. Figure 56). Ce composé a été utilisé par le groupe de Denk pour réaliser les premières expériences utilisant ces précurseurs photolabiles de neurotransmetteurs à deux photons¹⁷⁴ ainsi que pour beaucoup d'autres études de ces récepteurs^{175,176,177}. Cependant, ce composé est peu photosensible (cf. Tableau 2) et nécessite des irradiations à un photon longues dans le domaine des UV impliquant une forte phototoxicité. De plus, le chromophore *o*-nitrobenzyle présente une très faible sensibilité à deux photons¹⁷⁸. Il est donc nécessaire de l'utiliser à de très fortes concentrations (0.5 mM) ce qui engendre des problèmes lors de l'étude des récepteurs cholinergiques. En effet, à haute concentration, le composé CBN-Carbamylocholine active les récepteurs nicotiniques et les désensibilise¹⁷⁴.

Tableau 2: Récapitulatif des propriétés photochimiques et physicochimiques des principaux précurseurs photolabiles d'agonistes des nAChRs. $\epsilon(\lambda_{max})$ le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'absorbance maximale, ϕ_u le rendement quantique de photolyse, δ_u l'efficacité de photolyse à deux photons exprimée en GM.

Nom	$\epsilon(\lambda_{max})$	ϕ_u	$\epsilon(\lambda_{max}) \phi_u$	δ_u
CBN-carbamylocholine	5200 (262 nm)	0.25	1300	N/R
Rubi-Nicotine	4300 (453 nm)	0.23	989	0.1 GM 0.2 (800 nm)
PA-Nic	17400 (405 nm)	0.007	122	0.01 GM 0.02 (810 nm)
DPNB-ABT594	4550 (332 nm)	0.2	910	N/R

Dans les années 2010, le premier précurseur photolabile de la nicotine a été synthétisé. En effet, après avoir développé le Rubi-GABA¹⁷⁹, le Rubi-Glutamate¹⁸⁰ et le Rubi-Sérotonine¹⁰³, l'équipe de Etchenique a adapté les complexes de ruthénium à la libération de la nicotine¹⁸¹ (cf. Figure 56). Cependant, bien que commercial, ce dernier n'a été que très peu utilisé contrairement au dérivé PA-Nic (pour PhotoActivable Nicotine) qui a été développé huit ans plus tard par l'équipe de Lavis¹⁸²(cf. Figure 56). Bien que ses propriétés photochimiques soient faibles avec un rendement quantique de photolyse < 1%, son activation induit des courants supérieurs à ceux observés avec le Rubi-Nicotine¹⁸². Ainsi, PA-Nic a été utilisé sur tranches de cerveau pour étudier les phénomènes de dépendance à la nicotine dans l'habenula, partie du cerveau responsable du système récompense/punition^{183,184}. A noter qu'un autre agoniste des récepteurs nicotiques a été utilisé sur tranches de cerveau. En effet, le groupement protecteur photolabile di-polyéthylèneglycol-nitrobenzyl (DPNB) a été adapté pour libérer à un et à deux photons la tebanicline (appelé également l'ABT594) et permettre ainsi d'exciter les neurones médiaux de l'habenula¹⁸⁵ (cf. Figure 56).

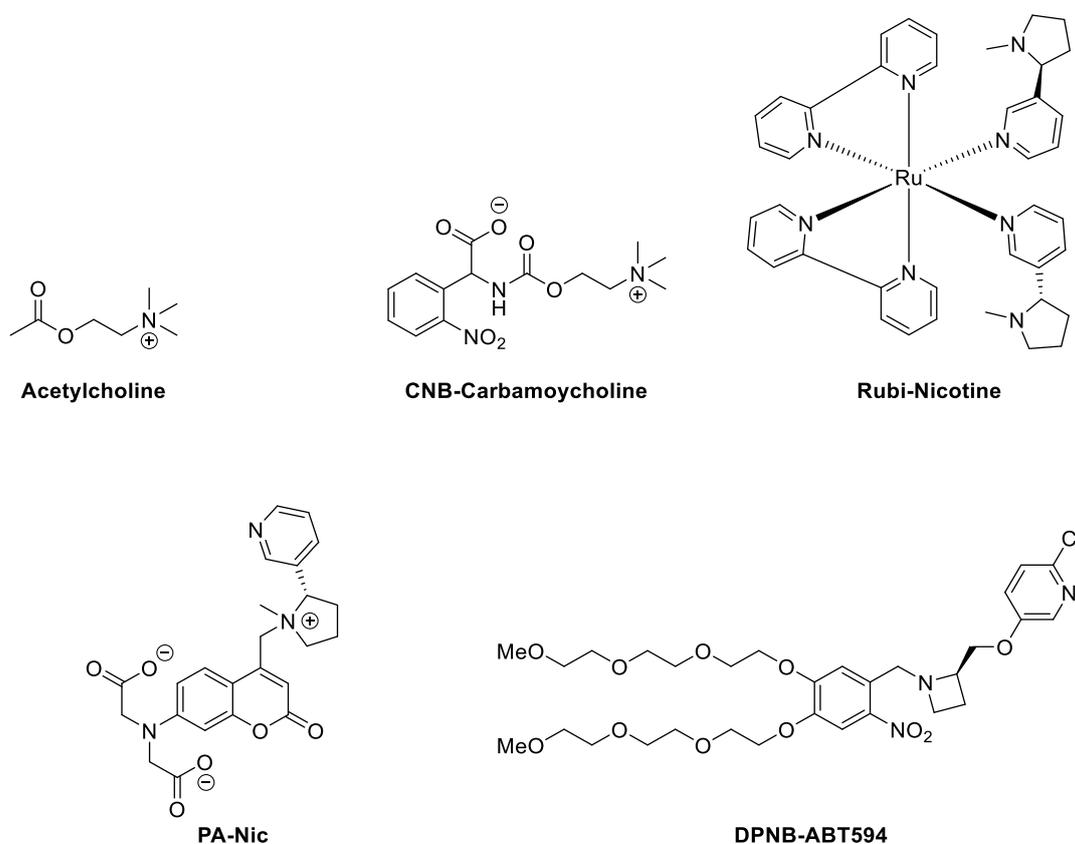


Figure 56 : Structures de l'acétylcholine et des différents précurseurs photolabiles d'agonistes de l'acétylcholine.

3. Développement de précurseurs photolabiles libérant la nicotine

3.1 Challenges du projet

Parmi les deux précurseurs photolabiles de la nicotine existants, aucun ne peut être utilisé par nos collaborateurs. En effet, le composé PA-Nic est photoactivable à un photon à 405 nm, empêchant de l'utiliser simultanément avec la protéine LOV, excitable à la même longueur d'onde. De la même manière, le Rubi-Nicotine et la protéine CRY2 présentent tous les deux une absorbance aux alentours de 470 nm. Dans l'idéal, il faudrait développer un précurseur photolabile de la nicotine excitable au-dessus de ces longueurs d'onde. Le déplacement de l'absorbance à un photon d'un groupement protecteur photolabile vers le rouge n'est pas aisé. C'est pourquoi nous avons décidé de développer un groupement protecteur photolabile activable aux environs de 500 nm, qui correspond au domaine vert du spectre lumineux.

Forts de notre expérience en synthèse de dérivés coumariniques, nous avons décidé de nous inspirer de la synthèse du précurseur photolabile PA-Nic pour le design d'un analogue photolabile permettant de libérer la nicotine efficacement à un photon à 500 nm. Cependant, l'élaboration d'un tel composé se heurte à deux problématiques. La première est que, bien souvent, plus l'absorbance d'un groupement protecteur photolabile est déplacée vers le rouge, moins le rendement quantique de photolyse est élevé. De plus, les rendements quantiques sont généralement décrits pour des acides carboxyliques ou des carbamates qui sont de bons groupements partants. Les amines, quant à elles, ne sont pas de bons groupements partants, ce qui explique pourquoi le dérivé PA-Nic montre un rendement quantique de photolyse dix fois moins important pour la libération de la nicotine ($\Phi_u=0.007$) que pour un acide carboxylique ($\Phi_u=0.07$)¹⁶⁴. Ainsi, la plupart des dérivés coumariniques présentant une absorbance au-dessus de 500 nm montrent de très faibles efficacités de photolyse^{166,163}. La famille des BODIPY, quant à elle, permet également de libérer des biomolécules par excitation avec de la lumière dans le vert^{186,187}, mais présente pour la plupart, des rendements quantiques très faibles ($\Phi_u<0.01$). De plus, ces derniers sont capables

d'initier la formation d'oxygène singulet à l'état excité, menant à la dégradation du chromophore et à l'apoptose des cellules étudiées¹⁸⁸.

La seconde problématique est directement liée à la réactivité particulière de la nicotine, qui possède deux atomes d'azote¹⁸⁹. En effet, on trouve sur cette dernière un motif pyridine et un motif pyrrolidine (cf. Figure 57). Ainsi, lorsque l'on fait réagir la nicotine avec un électrophile, deux régioisomères peuvent se former, le premier étant issu de l'alkylation de la pyridine et le second où l'alkylation s'effectue sur la pyrrolidine (cf. Figure 57). Il semblerait que la présence de la pyridine rende moins réactive la pyrrolidine tandis que la présence de la pyrrolidine exacerbe la réactivité de la pyridine. Cela peut être problématique lorsque l'on veut sélectivement alkyler un azote sans faire réagir l'autre. Ainsi, si l'on s'intéresse à la synthèse de PA-Nic, on s'aperçoit que la nicotine réagit principalement par l'azote pyridinique et très peu par celui présent sur la pyrrolidine¹⁸² (cf. Figure 57). Cependant, lorsque la nicotine est liée par la pyridine au dérivé coumarinique, la liaison n'est que très faiblement photolabile contrairement à la liaison coumarine-pyrrolidine présente sur le composé PA-Nic.

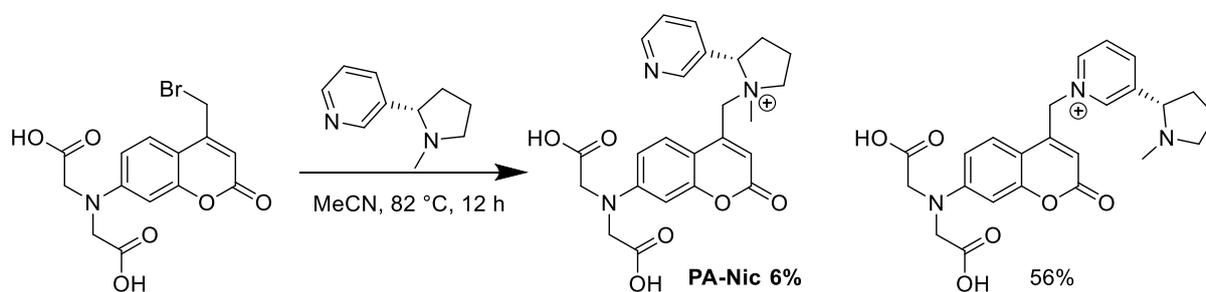


Figure 57: Synthèse de la coumarine PA-NIC, celle-ci conduit à la formation de deux régioisomères¹⁸².

3.2 Libération de la nicotine à l'aide d'un groupement photolabile greffé sur le motif pyrrolidine

3.2.1 Design et synthèse d'un GPP absorbant dans le vert

Pour répondre à la première problématique, nous avons décidé de nous inspirer des travaux d'ingénierie moléculaire existants et d'y apporter des modifications afin d'améliorer leurs propriétés photochimiques (déplacement de l'absorbance vers le vert et/ou rendement quantique de photolyse). Notre choix s'est porté sur une coumarine structurellement proche de DEACAS, avec pour différence l'utilisation d'un groupement benzothiazole à la place du groupement aniline¹⁶⁶. Cette modification permet d'obtenir une coumarine qui absorbe au maximum à 470 nm (déplacement bathochrome de 30 nm par rapport à la coumarine DEACAS) (cf. Figure 58, molécule A). Cependant, le rendement quantique de photolyse d'acides carboxyliques de ce dérivé benzothiazole de coumarine diminue à 0.08 (contre 0.2 pour DEACAS). Pour pallier cette perte d'efficacité, une seconde modification a été envisagée pour ce groupement protecteur : la substitution du carbonyle de la molécule par un thiocarbonyle (cf. Figure 58, molécule B). Le soufre ayant ses orbitales d accessibles et vides, cela améliore le transfert de charge intramoléculaire résultant en un déplacement bathochrome de l'absorbance maximale d'une coumarine et une légère amélioration des rendements quantiques de photolyse^{164,190}. En somme, cette dernière modification devrait décaler un peu plus l'absorbance vers le rouge et compenser le faible rendement quantique de photolyse de cette coumarine. En effet, la fonction pyrrolidine de la nicotine étant un moins bon groupement partant qu'un carboxylate on peut s'attendre à une diminution significative de son rendement quantique de photolibération. Toutefois, le composé PA-Nic présentant un rendement quantique de photolyse de 0.007 reste tout de même utilisable. Nous avons donc espéré qu'avec le fort coefficient d'extinction molaire (ϵ) de ces coumarines au système π étendu l'efficacité de photolyse à un photon ($\epsilon\Phi_i$) soit bonne même avec des rendements quantiques plus faibles.

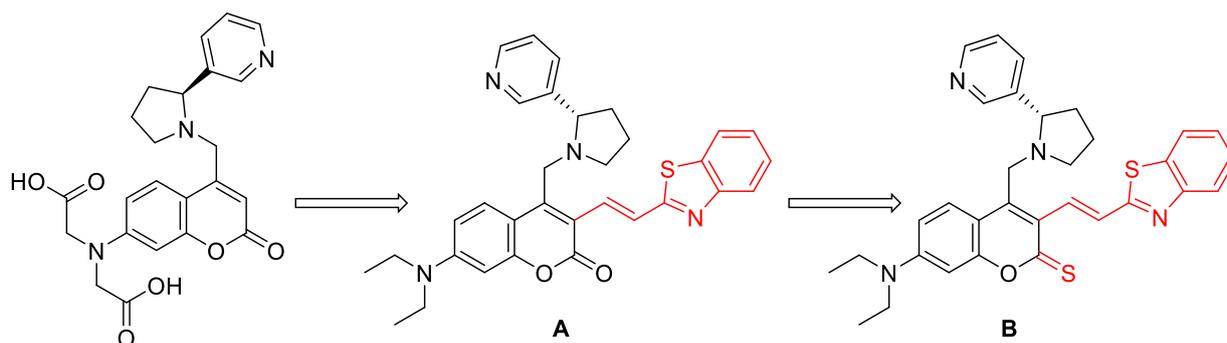


Figure 58 : Modification de PA-Nic en un précurseur photolabile de la nicotine excitable dans le vert.

La synthèse de ce composé a été entreprise à partir de la coumarine **15** qui après iodation en position 3 à l'aide de *N*-iodosuccinimide en présence d'éthérate de trifluorure de bore a permis d'obtenir la coumarine **45** (Cf. Figure 59). Cette dernière est ensuite couplée à l'alcène **47** par un couplage de Heck pour obtenir la coumarine **48**. Cependant, ce couplage s'effectue avec un rendement faible et cette synthèse ne semble pas présenter une bonne reproductibilité. L'étape suivante consiste en une réaction de Lawesson qui est hélas connue pour avoir de faibles rendements sur des substrats complexes tels que des coumarines hautement conjuguées¹⁶⁴. Après activation de l'alcool, la substitution de ce dernier par la nicotine pour former le composé final **50** est également très compliquée à cause des problèmes de régiosélectivité énoncés précédemment. L'enchaînement de faibles rendements et la possibilité que le composé final ne soit pas aussi efficace que prévu nous ont amenés à ne pas poursuivre dans cette voie.

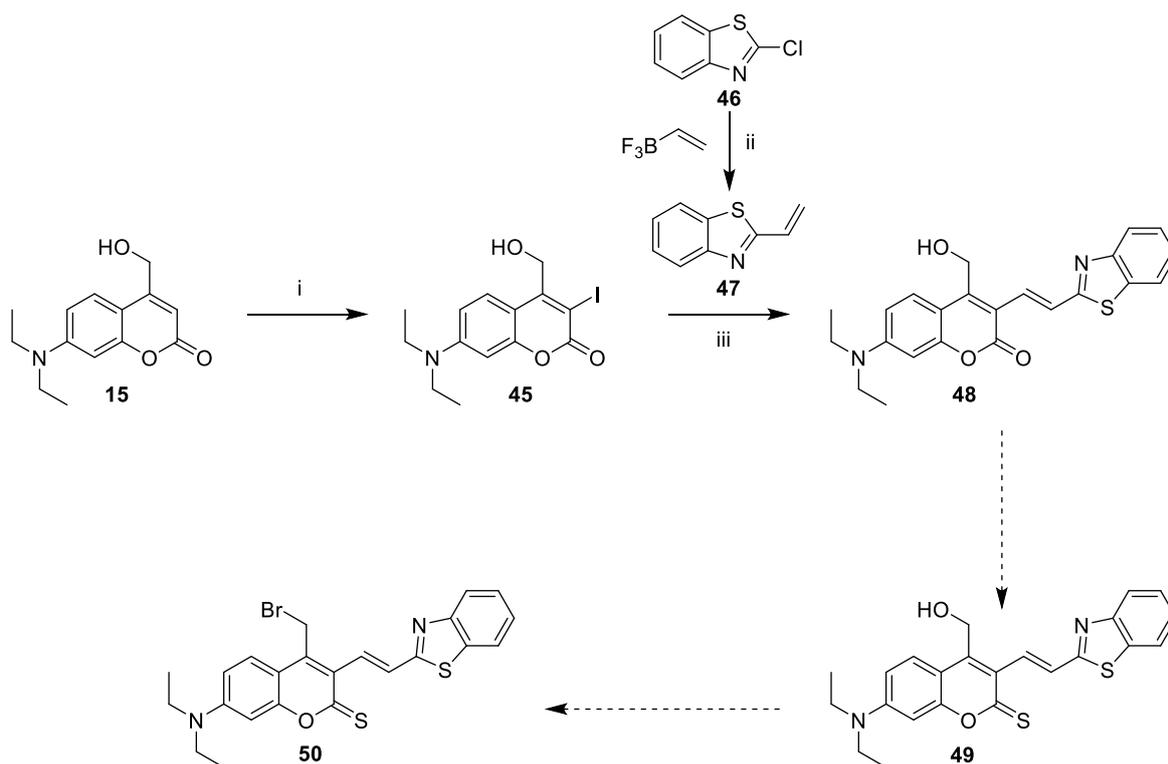
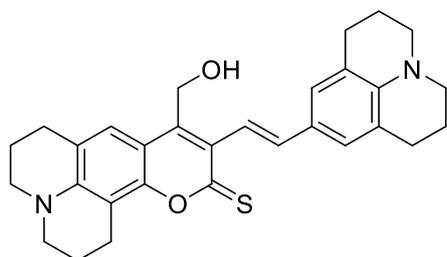


Figure 59: Vers la synthèse d'une première coumarine absorbant dans le vert. i : NIS, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CHCl_3 , TA, 2 h, 67%, ii: Et_3N , $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, isopropanol, MW: 90 °C, 1 h, 91%, iii: LiCl , Bu_4NCl , NaHCO_3 , $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, DMF, 130 °C, 16 h, 24%.



$$\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$$

$$\epsilon\phi_{\text{u}} = 14350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Nous avons décidé d'utiliser une autre coumarine pour ce projet. En effet, le groupe de Zhu a développé en même temps que la coumarine DEACAS, une coumarine très efficace à un photon et dont l'absorbance maximale se situe à 515 nm²⁴. Cette coumarine arbore un motif julolidine directement au cœur de la coumarine ainsi qu'un second motif connecté par un alcène en position 3. De plus, elle présente une fonction thioester à la place du motif lactone de la coumarine. Dans un premier temps, cette structure très hydrophobe nous a paru inadaptée pour une application biologique. Cependant, ce composé présente les meilleures propriétés à un photon pour des excitations à 515 nm décrites à ce jour dans la littérature. Au chapitre II, les résultats obtenus avec DEACAS-Glutamate nous ont montré qu'il est possible d'utiliser un composé à faible concentration s'il est suffisamment efficace. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser cette coumarine arborant deux motifs julolidine en misant sur sa grande efficacité photochimique, ce qui pourrait permettre de l'utiliser à faible concentration.

En effet, pour cette application à un photon, les biologistes n'utilisent que des concentrations de quelques dizaines de micromolaires contrairement aux applications à deux photons nécessitant des concentrations beaucoup plus élevées allant à plusieurs centaines de micromolaires. Ainsi, la solubilité obtenue par la formation d'un sel d'amine quaternaire liée à la coumarine devrait être suffisante pour une utilisation en milieu aqueux.

La synthèse de cette coumarine a été initiée à partir d'une condensation de Pechmann entre du 8-hydroxyjulolidine et de l'acétoacétate de méthyle pour obtenir le synthon **52** (cf. Figure 60). Ce dernier a ensuite été bromé en présence de *N*-bromosuccinimide activé par de l'acétate d'ammonium pour former le composé **53**. La position benzylique a ensuite été substituée par un brome à l'aide d'un traitement au LiHMDS suivi d'un ajout de *N*-bromosuccinimide pour obtenir le composé **54**. En parallèle, la julolidine **55** a été bromée en position *para* de l'amine permettant d'accéder au synthon **56**. Un couplage de Heck a été tenté entre le composé **56** et l'ester pinacolique d'acide boronique de vinyle. Malheureusement, la réaction fonctionne mal et le composé se dégrade sur silice, ne permettant pas d'envisager l'utilisation de ce type de composé coumarinique pour cette application.

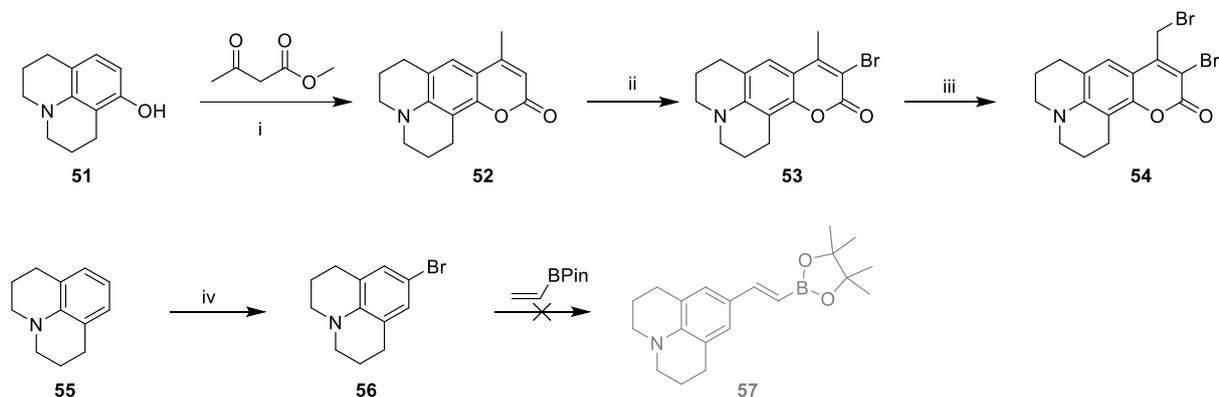


Figure 60: Voie de synthèse d'une seconde coumarine absorbant dans le vert. i: $\text{TiCl}(\text{OiPr})_3$, toluène, 110 °C, 16 h, 36%, ii: NBS, NH_4OAc , MeCN, TA, 3 h, 96%, iii: a) LiHMDS, THF, -30 °C, 1 h, b) NBS, THF, -78 °C, 2 h, 10%, iv: NBS, NH_4OAc , MeCN, TA, 1 h, quant.

3.2.2 Protection de la nicotine

Pour répondre à cette problématique liée à la réactivité de la nicotine, nous avons envisagé de développer une méthode de protection de la fonction pyridine de la nicotine. De ce fait, l'alkylation avec la coumarine pourra s'effectuer uniquement sur l'azote de la pyrrolidine et, après déprotection, cela devrait permettre d'obtenir le précurseur photolabile de la nicotine désiré (Cf. Figure 61).

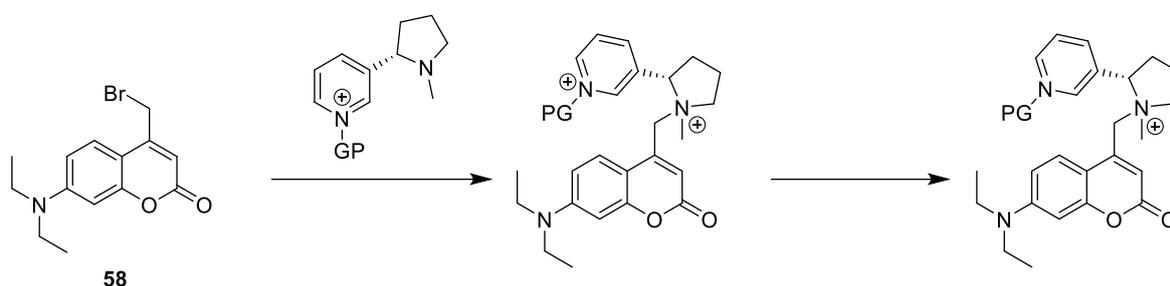


Figure 61: Utilisation d'un groupement protecteur (GP) pour orienter la formation d'un précurseur photolabile capable de libérer la nicotine par sa fonction pyrrolidine.

Ainsi, le composé **58** a été choisi comme modèle pour développer notre stratégie de protection. En effet, l'alkylation du groupement protecteur photolabile par la nicotine est la dernière étape de la synthèse. Or, pour pouvoir travailler aisément et développer une stratégie d'alkylation de la nicotine efficace, il est nécessaire de définir précisément les conditions pour obtenir une alkylation sélective. Cela aurait été une contrainte de réaliser cela sur des coumarines obtenues par synthèse multi-étapes. C'est pourquoi nous avons choisi de synthétiser le modèle **58** qui a été obtenu après substitution de la fonction hydroxyle de la coumarine **15** par un brome à l'aide de tribromure de phosphore (cf. Figure 62). Ensuite, dans un premier essai pour protéger la nicotine, son dérivé sous la forme de sel de bore a été utilisé. En effet, dans la littérature quelques exemples de pyridines sous forme de sel de bore ont été décrits pour protéger une pyridine¹⁹¹. Cependant, lors de cet essai le borane n'a pas réagi avec la nicotine **59**. Nous avons décidé d'utiliser de l'éthérate de tri-fluorure de bore qui, quant à lui, a réagi avec la nicotine nous permettant d'obtenir le sel **60**. Lors de l'alkylation de ce

dernier avec le modèle **58**, nous n'avons pas observé la formation du composé **61**, mais celle du régioisomère **62**. L'analyse RMN ^1H et le déplacement d'absorbance du composé **60** semble suggérer qu'à température ambiante le bore est fixé préférentiellement sur l'azote de la pyridine. Nous supposons qu'il y a un équilibre entre le sel de pyridinium et de pyrrolidinium et que l'on déplace cet équilibre vers la pyridine à chaud tandis que la pyrrolidine est désactivée par la présence du bore. Ainsi, ce premier essai visant à obtenir sélectivement le régioisomère **61** s'est soldé par un échec.

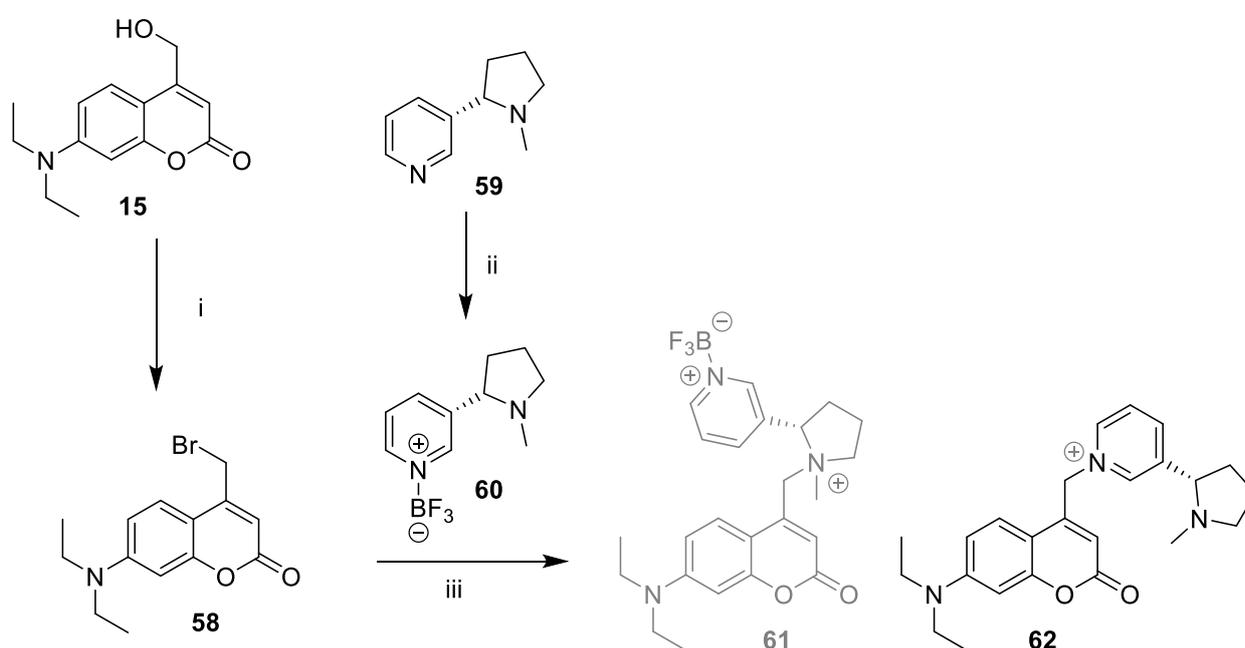


Figure 62: Utilisation d'un sel de bore pour protéger la nicotine résultant en une alkylation sélective de la nicotine par sa fonction pyrrolidine. *i*: PBr_3 , CH_2Cl_2 , TA, 16 h, 50%, *ii*: $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, THF, TA, 1 h, 64%, *iii*: MeCN, 60 °C, 16 h, 30%.

D'autres groupements protecteurs ont également été envisagés, notamment le groupement benzyle qui a été utilisé dans la littérature pour protéger la fonction pyridine de la nicotine¹⁹². La synthèse a donc été entreprise en faisant réagir la nicotine **59** avec du bromure de benzyle résultant en la formation du sel de pyridinium **63** (cf. Figure 63). Malheureusement, l'alkylation de la coumarine **58** par ce dernier ne fonctionne pas, aucun produit n'a été observé après trois jours de chauffage à 60 °C.

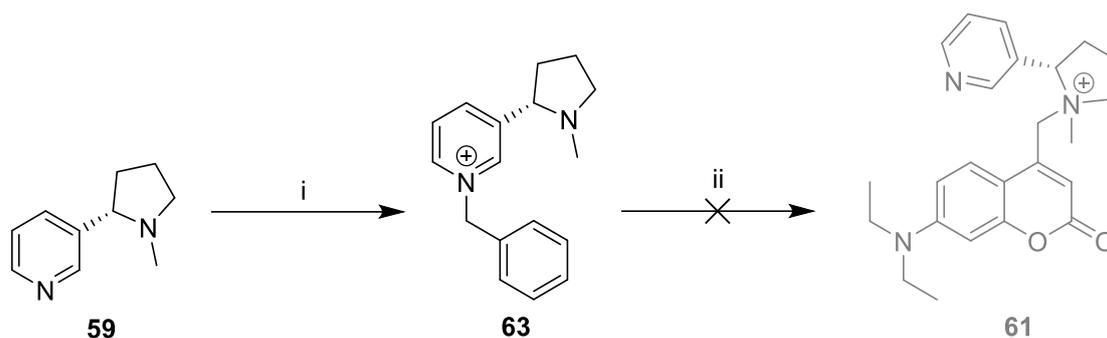


Figure 63: Utilisation d'un sel de benzyle pour protéger la nicotine résultant en une alkylation sélective de la nicotine. i : bromure de benzyle, AcOH, 0 °C puis TA, 72 h, 24 % , ii : **58**, MeCN, 60 °C, 72 h.

Une autre tentative a été réalisée en protégeant la partie pyridine par un allyle. Cependant, lorsque l'on fait réagir de la nicotine **59** avec du bromure d'allyle, la réaction donne un mélange complexe de composés à analyser et à purifier. En revanche, l'utilisation du sel de bore **60** résulte en la formation du produit désiré **64**. Malheureusement, l'alkylation de la coumarine **58** par ce dernier ne mène à la formation d'aucun produit.

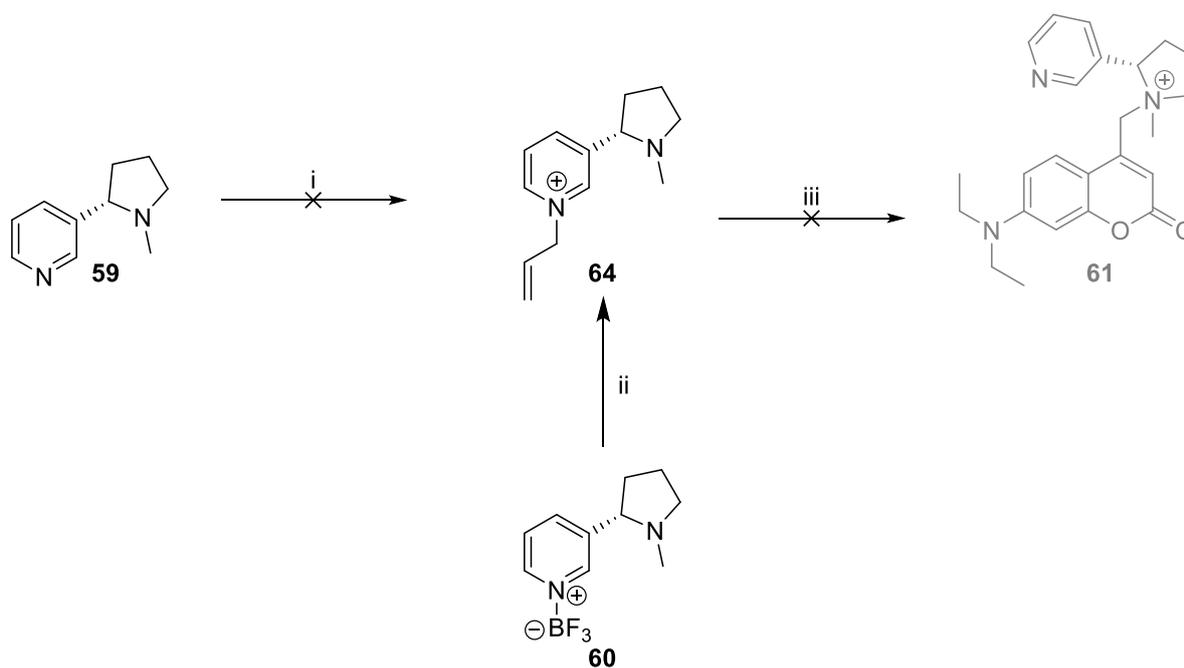


Figure 64 : Utilisation d'un sel d'allyle pour protéger la nicotine résultant en une alkylation sélective de la nicotine par la fonction pyrrolidine. i : bromure d'allyle, AcOH, 0 °C puis TA, 72 h, ii : bromure d'allyle, MeCN, 60 °C, 16 h, 62%, iii: **58**, MeCN, 60 °C, 72 h.

La synthèse d'un groupement protecteur absorbant dans le vert n'a pas pu être réalisée en s'inspirant des travaux d'ingénierie moléculaire réalisés sur les coumarines^{163,164,166}. De même, le développement d'une stratégie de protection de la nicotine pour n'avoir qu'un régioisomère n'a pas été fructueux. Ainsi, nous avons décidé de changer totalement de stratégie et de libérer la nicotine en greffant un groupement photolabile sur la partie pyridine de cette molécule.

4. Libération de la nicotine à l'aide d'un GPP greffé sur le motif pyridine

En général, le rendement quantique de photolyse d'un GPP coumarinique dépend du groupement protecteur et du pKa du groupement partant. En effet, plus le groupement partant a un pKa faible, plus le rendement de photolyse sera élevé. C'est pourquoi les phosphates, acides carboxyliques et carbamates sont les fonctions les plus souvent libérées efficacement par des groupements protecteurs photolabiles coumariniques^{171,193}. Ainsi, la photolyse de composés greffés par une fonction amine ayant un pKa plus élevé présente un rendement quantique de photolyse très faible. Toutefois, des travaux récents montrent que la libération photo-induite d'amines tertiaires par des groupements protecteurs photolabiles est possible^{182,185,194,195}. Par conséquent les fonctions pyridines ayant un pKa plus faible que des amines tertiaires devraient également pouvoir être libérées lorsqu'elles sont greffées sur un GPP coumarinique.

Or, ce n'est pas le cas et jusqu'à récemment aucune utilisation de GPP n'avait conduit à une libération photochimique efficace de fonctions pyridines dans l'eau. Effectivement, l'équipe de Fang a montré en 2020 qu'en utilisant des dérivés coumariniques halogénés en position 3, la photolyse de molécules greffées par la fonction pyridine est possible¹⁹⁶. Ces derniers ont supposé que lorsqu'une pyridine est liée à un dérivé coumarinique, les orbitales π^* du noyau pyridinique sont assez proches en énergie des orbitales du dérivé coumarinique pour pouvoir accepter un électron issu de la coumarine à l'état excité. Ainsi, lorsque le groupement protecteur photolabile est excité à l'état singulet S_1 , il peut donner un électron par transfert d'électron photoinduit (photoinduced electron transfert) vers le pyridinium.

Ensuite, le pyridinium donne à nouveau l'électron à la coumarine par transfert d'électron inverse¹⁹⁷ (back electron transfer) permettant le retour de la coumarine à l'état fondamental sans déclencher de réaction de photolyse. Ce processus photochimique est favorisé par rapport au phénomène de photolyse résultant en une importante diminution du rendement quantique de photolyse (cf. Figure 65).

Pour pallier ce problème, les auteurs ont proposé que l'ajout d'atomes lourds, tels que des halogénures, puisse réduire ce transfert d'électron photoinduit vers le motif pyridinium. En effet, ces atomes favorisent le passage de l'état singulet à l'état triplet par un processus appelé croisement intersystème (intern system crossing)¹⁹⁸. L'état triplet, quant à lui, est plus bas en énergie et le transfert d'électron photoinduit vers le pyridinium est donc moins favorisé qu'à l'état singulet. Ainsi, une fois le dérivé coumarinique à l'état triplet, le phénomène de photolyse peut avoir préférentiellement lieu.

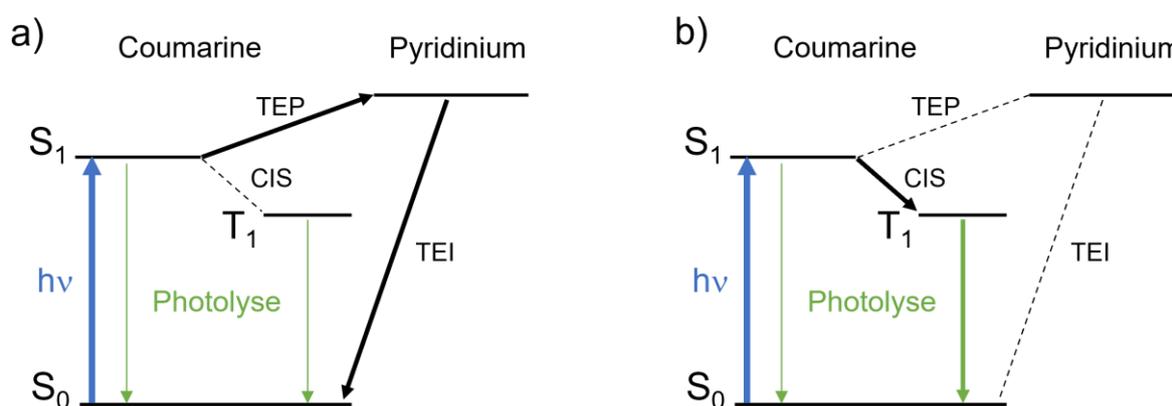


Figure 65: Diagramme de Jablonsky décrivant les différents processus possibles lors du passage à l'état excité S₁ du dérivé coumarinique. a) La coumarine ne présente pas d'atome lourd sur sa structure, le processus principal est le transfert d'électron photoinduit (TEP) vers le pyridinium suivi d'un transfert d'électron inverse (TEI). b) La coumarine présente un atome lourd sur sa structure favorisant le croisement intersystème (CIS) inhibant ainsi le TEP vers le pyridinium au profit du processus de photolyse.

En utilisant un dérivé coumarinique bromé ou iodé en position 3, les auteurs ont montré qu'il est possible de libérer efficacement de nombreux dérivés greffés par la fonction pyridine. Parmi les composés libérés, de la nicotine a pu être relarguée de manière efficace. En effet, avec un iode en position 3, la coumarine DEAC-I-Nicotine libère la nicotine par sa

fonction pyridine de manière plus efficace que la coumarine PA-Nic, libérant la nicotine par sa fonction pyrrolidine (cf. Figure 66).

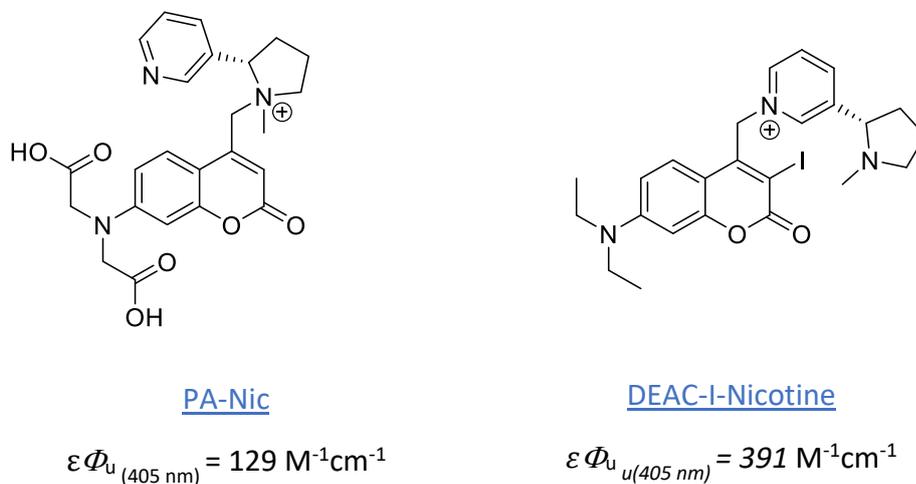


Figure 66: Comparaison des efficacités de photolyse à un photon entre PA-Nic et DEAC-I-Nicotine.

Nous avons décidé de nous inspirer de ces travaux pour réaliser ce projet. Ainsi, l'alkylation de la nicotine n'étant plus un problème, seul le développement d'un groupement protecteur photolabile absorbant au-dessus de 500 nm a dû être exploré. Pour ce faire, nous avons décidé de réutiliser la série des dérivés de type julolidine de coumarine. En effet, cette modification structurale déplace l'absorbance d'environ 50 nm par rapport à la coumarine DEAC (380 nm) (cf Figure 67, molécule A). Pour déplacer l'absorbance encore plus vers le rouge, la substitution du carbonyle par un thiocarbonyle a été proposée (cf Figure 67, molécule B). De plus, l'alkylation du chromophore de la DEAC par une pyridine conduit à un déplacement de 25 nm vers le rouge (absorbance maximale de DEAC-I-Nicotine et de PA-Nic est de 405 nm contre 380 nm pour l'absorbance normale du chromophore de la DEAC). Tous ces éléments nous confortent dans l'idée que le composé B de la **Erreur ! Source du renvoi introuvable**.65 est susceptible de présenter une longueur d'onde d'absorbance maximale aux alentours de 500 nm.

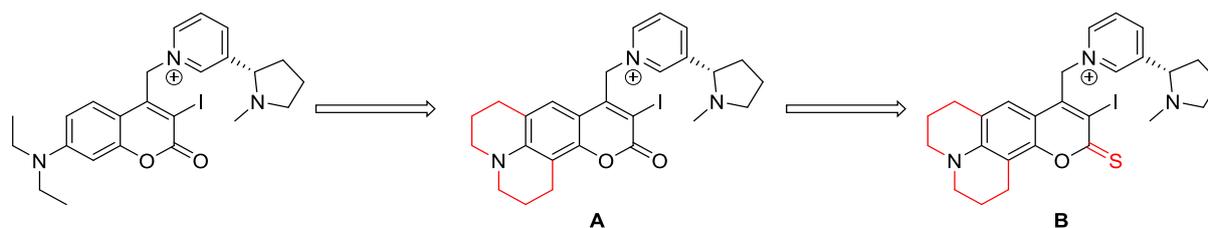


Figure 67: Ingénierie moléculaire permettant la conception d'un nouveau précurseur photolabile de la nicotine absorbant dans le vert.

Nous avons décidé d'initier la synthèse de cette coumarine à partir d'une condensation de Pechmann à partir de la 8-hydroxyjulolidine et du chloro-acetoacetate (cf. Figure 68). Ainsi, on peut obtenir la coumarine **66** avec une position benzylique activée par un halogène en une seule étape, réduisant considérablement le nombre d'étapes de synthèse. En effet, en règle générale pour obtenir une position benzylique activée sur une coumarine, il est nécessaire d'introduire un alcool en position benzylique pour ensuite le substituer par un atome de brome ou autres groupements activateurs (Tosyles, triflate ect...) (cf. Figure 62). Ensuite, la coumarine **66** a été iodée en position 3 à l'aide de *N*-iodosucinimide pour obtenir la coumarine **67**. Cependant, lorsque l'on fait réagir la nicotine **59** avec cette coumarine, on observe la formation majoritaire d'un produit non désiré. En effet, l'analyse RMN du proton et l'analyse par spectrométrie de masse montrent que l'on obtient le produit issu de l'alkylation de la nicotine sans le groupement iodo. Les pyridines sont connues pour être capables de réduire les iodo-aryles, ce qui peut donc expliquer la perte du groupement iodo¹⁹⁹. Nous n'avons pas testé si le composé **68** est capable de libérer la nicotine lorsqu'elle est greffée par la fonction pyridine. En effet, ce dernier n'a pas éveillé notre intérêt, car la perte du groupement iodo implique un déplacement hypsochrome de son absorbance, le rendant moins intéressant. De plus, nous avons estimé que si l'on obtenait le composé iodé, les propriétés photochimiques seraient sans doute meilleures pour les raisons évoquées précédemment.

Afin de pallier ce problème de réduction de l'iode, nous avons décidé d'utiliser le dérivé de nicotine **60** pour alkyler la coumarine **67**. En effet, nous avons supposé que le pyridinium de la nicotine stabilisé par le sel de trifluorure de bore serait moins enclin à réagir avec l'iode, mais serait toujours assez réactif pour substituer la position benzylique. Ainsi, nous avons pu observer la formation du produit iodé **69** avec, cependant, la formation minoritaire du produit

68 (environ 10%). Une réaction de Lawesson a été tentée avec le composé **69**, mais cela n'a pas permis d'obtenir le composé **70**. Toutefois, le précurseur photolabile de la nicotine **69** reste tout de même intéressant avec une absorbance maximale à 470 nm. En effet, l'absorbance de ce composé est large et reste importante à 500 nm ce qui devrait permettre à nos collaborateurs de l'utiliser simultanément avec d'autres outils photochimiques.

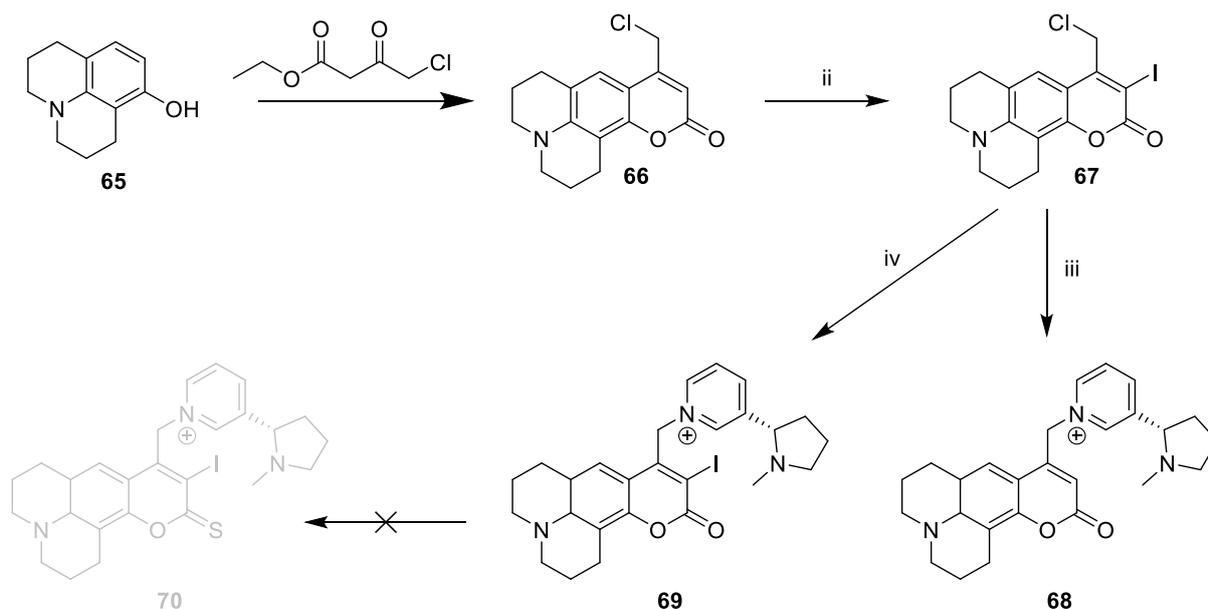


Figure 68: Synthèse de la coumarine **69** à partir de 8-hydroxyjulolidine. i : $\text{TiCl}(\text{OiPr})_3$, toluène, 110 °C, 16 h, 65%, ii : NIS, TFA, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ 1/1, TA, 2 h, 64%, iii: **59**, TBAI, DMF, TA, 60 °C, 16 h, 63%, iv : **60**, TBAI, DMF, TA, 60 °C, 16 h, 72%.

Lors de la réaction d'iodation de la coumarine **66**, un autre produit est obtenu si l'addition de *N*-iodosucinimide s'effectue avant l'activation par de l'acide trifluoroacétique ou si l'ajout est trop rapide. En effet, nous avons pu observer la formation du dimère de coumarine **71** (cf. Figure 69). Ce dernier a également été couplé à la nicotine **59** permettant d'obtenir un nouveau précurseur photolabile de la nicotine. Ce composé est donc très intéressant pour le projet, car en plus d'avoir une structure originale, son absorbance maximale est idéalement située à 500 nm et il permet de libérer deux molécules de nicotine avec un seul équivalent de précurseur photolabile. Cependant, la purification de ce composé est complexe. En effet, le produit ou une impureté précipite lors des analyses HPLC, ne permettant pas d'envisager le recours à une purification HPLC. De plus, les purifications par

chromatographie flash ne permettent pas d'obtenir le produit avec une pureté satisfaisante. Pour finir, le composé se dégrade en solution aqueuse maintenue à -18°C ce qui rend son utilisation compliquée. Face à ces problèmes, l'exploitation et la caractérisation complète du composé **72** n'ont pas été réalisées.

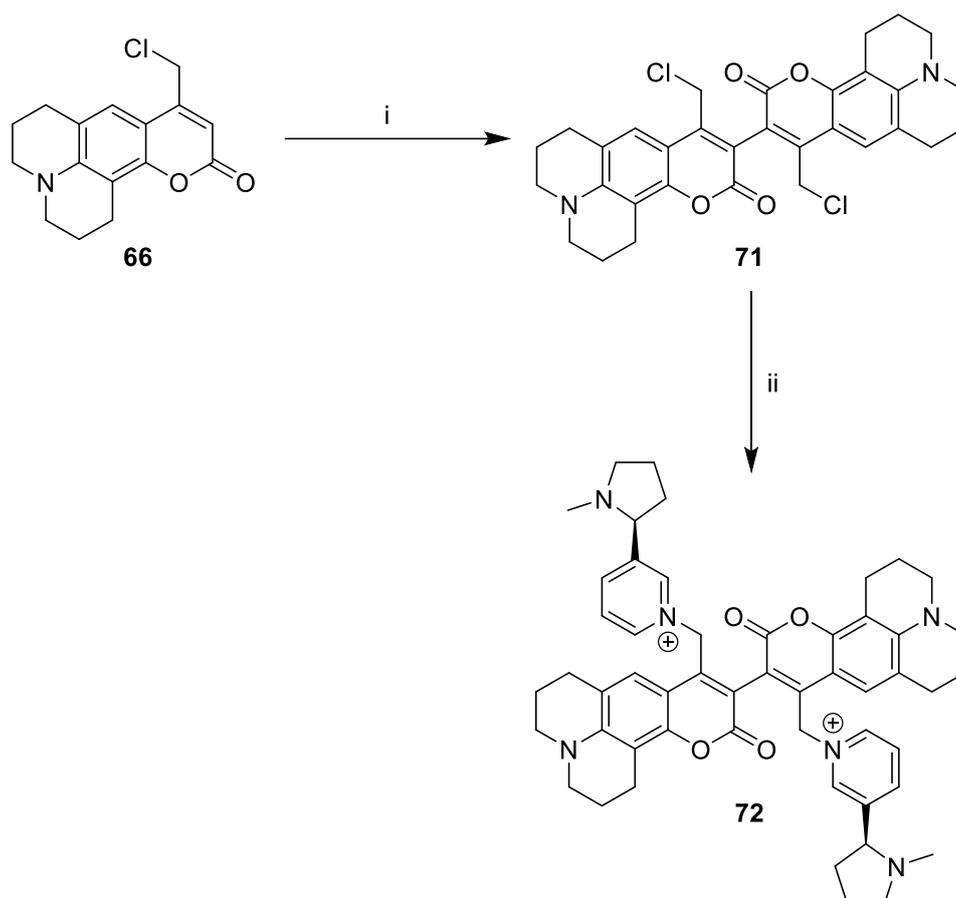


Figure 69: Formation du dimère de coumarine **71** et synthèse de l'analogue photolabile de la nicotine **72**. i: NIS, MeCN/CH₂Cl₂, TA, 20 min, 20%, ii: Nicotine **59**, TBAI, DMF, 60 °C, 16 h.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au mécanisme de formation du composé **71** afin de pouvoir mieux contrôler le phénomène. Une des hypothèses que l'on pourrait avancer est qu'il reste potentiellement un peu de complexe de titane issu de la condensation

de Pechmann. Celui-ci pourrait jouer le rôle de donneur d'électron et ainsi favoriser l'oxydation de la coumarine sous forme d'un dimère lorsqu'il est en contact du *N*-iodosuccinimide. Des couplages similaires ont été réalisés sur la série des coumarines DEAC avec d'autres composés donneurs d'électrons²⁰⁰. Néanmoins, le rôle du *N*-iodosuccinimide reste inconnu, il pourrait être initiateur de radicaux^{201,202} ou doper le complexe de titane²⁰³ permettant ainsi l'activation du titane catalysant la dimérisation. Toutefois, la coumarine **65** a été purifiée sur colonne de silice rendant la présence de titane très peu probable. De plus, la réaction de dimérisation a été tentée avec du *N*-bromosuccinimide, également capable de générer des radicaux, mais aucun dimère de coumarine n'a été observé. L'ensemble de ces données ne permettent donc pas d'expliquer la formation du dimère de façon rationnel, il faudrait mener un travail plus approfondi pour expliquer la formation de **71**. Face à la complexité de ce que nous avons observé, nous avons décidé de tenter de réaliser ce dimère d'une autre manière. Il existe peu de dimères de coumarine ayant été synthétisés avec de bons rendements. Un des meilleurs moyens décrits est l'utilisation d'un intermédiaire stanylé généré *in-situ* pour former ensuite le dimère²⁰⁴ (cf. Figure 70). Pour cela, la coumarine **65** a été bromée en position 3 pour former le composé **73**. Malheureusement, la réaction de ce dernier avec du bis(tributylétain) en présence de palladium tetrakis(triphenylphosphine) n'a pas formé le dimère souhaité. L'augmentation de la température n'affecte pas la réaction, l'utilisation d'un chauffage sous micro-ondes n'a pas montré d'effet non plus. Les mêmes conditions ont été utilisées avec la coumarine méthylée **53** et aucun produit n'a été formé.

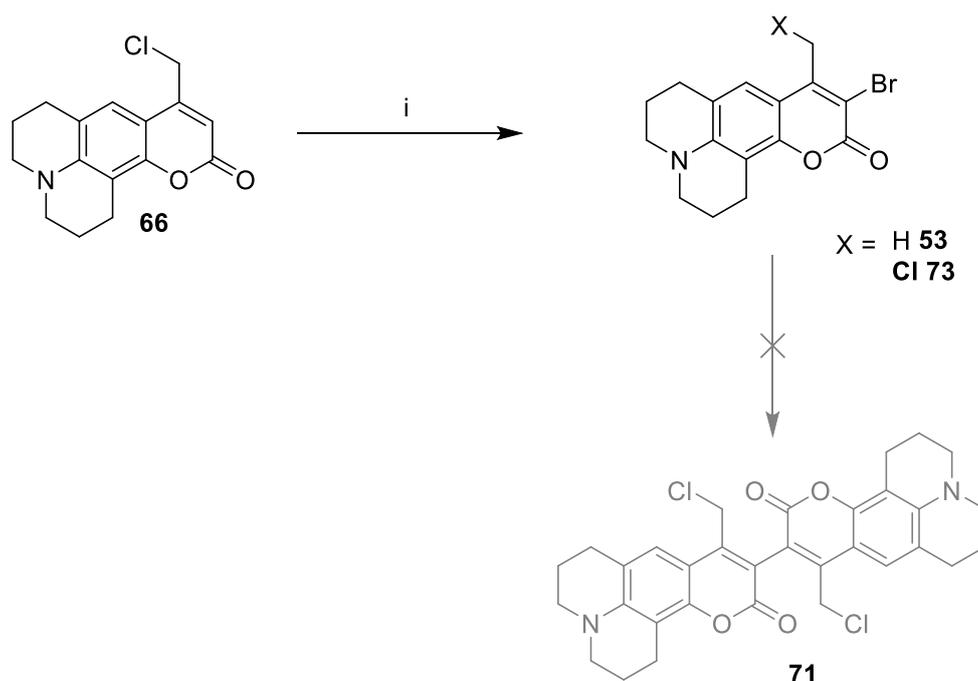


Figure 70: Synthèse du dimère **70** par couplage de Stille. *i* : NBS, MeCN/CH₂Cl₂ 1:1, 2 h, TA, 79%.

Un autre moyen de former des dimères de coumarine est d'utiliser un donneur d'électrons pour oxyder une coumarine en dimère²⁰⁰ de manière similaire à ce que nous obtenons lors de la formation de **71**. Ainsi, une tentative d'oxydation au PIDA (un dérivé d'iode hypervalent) a été tentée, mais là encore aucun produit n'a été formé.

5. Caractérisation du précurseur photolabile de la nicotine **69**

Les propriétés photophysiques et photochimiques de la coumarine **69** ont été déterminées au laboratoire. Ainsi, cette dernière présente une absorbance maximale à 462 nm dans un tampon phosphate (noté PBS). A noter que l'on observe un effet solvatochrome pour ce composé. En effet, une baisse de la polarité du solvant induit un déplacement hypsochromique de l'absorbance et une augmentation du coefficient d'extinction molaire (cf. Tableau 3).

Tableau 3: modification de l'absorbance de la coumarine **69** en fonction de la polarité des solvants (du plus polaire au moins polaire). λ_{max} la longueur d'onde d'absorbance maximale exprimée en nm, $\epsilon(\lambda_{max})$ le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'absorbance maximale, exprimée en $M^{-1}.cm^{-1}$.

Solvant	λ_{max}	$\epsilon(\lambda_{max})$.
PBS	462 nm	12400
PBS/MeOH	460 nm	13500
PBS/MeCN	453 nm	14200

Ensuite, des solutions à 71 μ M de la coumarine **69** ont été irradiées à 430 nm à l'aide d'un appareil à LED (de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics) et la réaction de photolyse a été suivie par spectroscopie UV-Visible. On constate alors que lors de la réaction de photolyse, l'absorbance diminue aux alentours de 460 nm jusqu'à atteindre un seuil après 90 secondes d'irradiation indiquant la fin de la réaction de photolyse. Cela a également été confirmé par analyse HPLC. Ces irradiations ont été faites dans du tampon PBS, et dans des mélanges 1:1 PBS/MeOH et PBS/MeCN (cf. Figure 72). Ainsi, on observe que dans le tampon PBS, aucun sous-produit de photolyse n'est visible sur le chromatogramme, tandis que pour le mélange PBS/MeCN un sous-produit apparaît. De plus, dans le cas de la photolyse de **69** dans un mélange PBS/MeOH, ce n'est pas un, mais deux produits que l'on peut observer. Cela peut être expliqué par le mécanisme de photolyse des coumarines passant par un intermédiaire carbocation réagissant ensuite avec un nucléophile. Dans le cas d'une photolyse dans l'eau, le sous-produit obtenu est un alcool (cf. Figure 71).

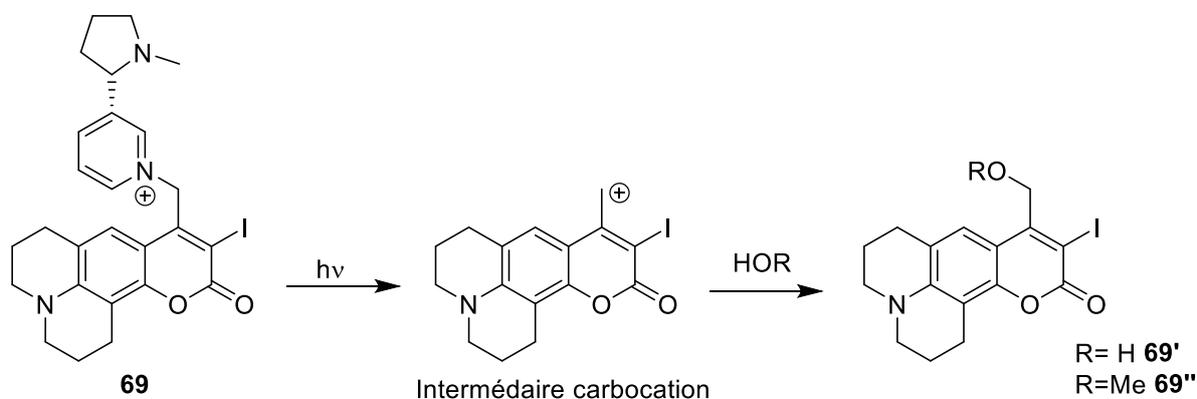


Figure 71: Mécanisme proposé de la photolyse de la coumarine **69**.

De ce fait, dans l'eau, l'alcool **69'** est peu soluble et précipite alors que dans les mélanges eau/solvant organique le sous-produit est soluble. Dans le cas du mélange PBS/MeOH, il y a deux sous-produits, le premier étant l'alcool **69'** obtenu après substitution nucléophile de type 2 (S_N2) par de l'eau et le second **69''** est obtenu après S_N2 par du méthanol. Pour finir, une courbe d'étalonnage de la nicotine a été réalisée par HPLC (concentration/aire sous le pic) permettant de montrer que dans du tampon phosphate, il n'y a qu'une seule réaction photochimique qui s'effectue. En effet, la coumarine **69** réalise un phénomène de photolyse avec un rendement de libération de la nicotine de 99 %.

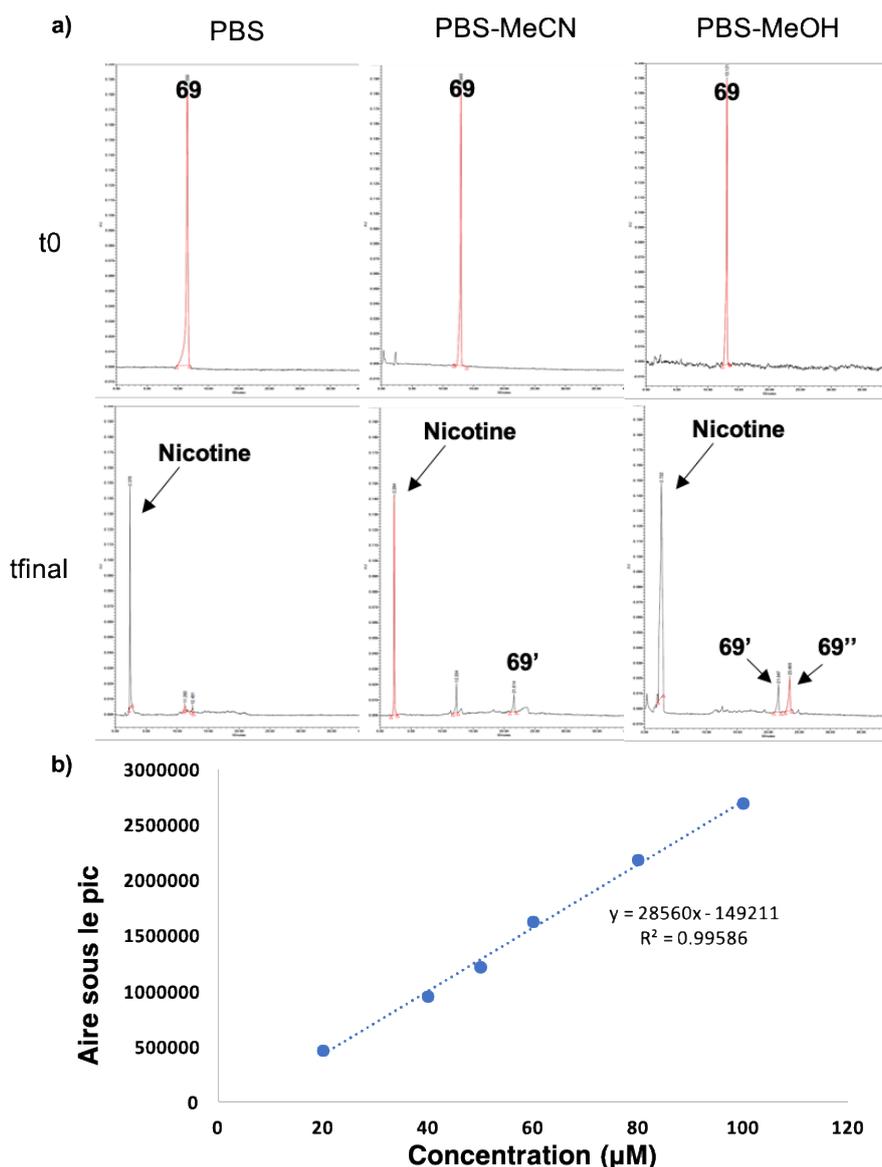


Figure 72: a) Chromatogramme effectué avant irradiation de la coumarine et après irradiation totale du composé 69 dans différents solvants permettant d'observer l'apparition des sous-produits de photolyse 69' et 69''. b) Courbe étalon représentant l'aire sous le pic en fonction de la concentration en nicotine.

Le rendement quantique de photolyse a ensuite été déterminé. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la coumarine DEACAS-*p*-méthoxybenzoïque comme référence. En effet, la réaction de photolyse de cette coumarine peut être suivie par spectroscopie UV-Visible ce qui permet une lecture rapide et précise du taux de produit converti. Toutefois, contrairement à la coumarine DEACAS, le suivi de la réaction de photolyse de la coumarine 69 par perte d'absorbance n'est pas suffisamment linéaire pour être fiable. Cela peut être expliqué par l'insolubilité du sous-produit de photolyse 69' dans l'eau, rendant la mesure imprécise. Ainsi,

le suivi de la réaction de photolyse de ce précurseur photolabile de la nicotine a été réalisé par analyse HPLC en comparant l'aire sous le pic à un temps donné t par rapport à celui obtenu à t_0 . Ensuite, les régressions linéaires des cinétiques de photolyse ont été tracées permettant de pouvoir déterminer le rendement quantique de photolyse de la coumarine **69**.

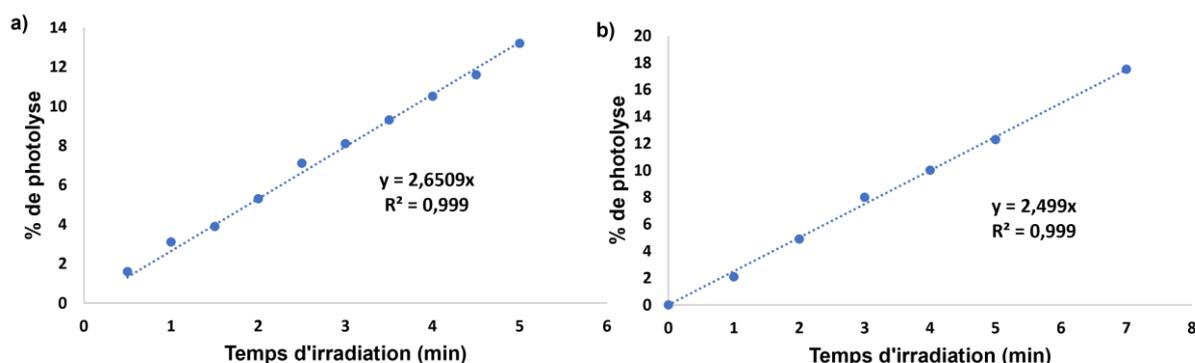


Figure 73: a) Régression linéaire de la cinétique de photolyse par irradiation à 430 nm à l'aide d'un équipement LED (de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics) de la référence et de la coumarine **69** à 48 μM . a) Le suivi de la réaction de photolyse de la référence effectuée par spectroscopie UV-Visible, b) le suivi de la réaction de photolyse de la coumarine **69** a été effectuée par HPLC.

Cependant, les absorbances et donc les coefficients d'extinction molaires des deux coumarines sont différents. On ne peut donc pas comparer directement les pentes de régression linéaire des deux composés comme cela a été réalisé pour DEACAS-Glutamate **19** qui a la même absorbance que la référence. En effet, ce que l'on observe lors des irradiations est l'efficacité de photolyse à un photon ($\varepsilon\Phi_i$). Pour déterminer le rendement quantique de ces composés, il est donc nécessaire de rajouter à l'Équation 12 utilisée au chapitre I, une pondération intégrée dans l'équation pour le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation (cf. Équation 13). Pour cette application, les irradiations ont été effectuées à 430 nm et le rendement quantique de photolyse de la coumarine **69** a été déterminé à 0.79 ce qui est un rendement quantique très important permettant d'obtenir une efficacité de photolyse à un photon de 9796 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Équation 13: Équation permettant de déterminer le rendement quantique de photolyse d'une molécule ayant un coefficient d'extinction molaire différent de celui de la référence.

$$\Phi_u(\text{molécule}) = \frac{\Phi_u(\text{référence}) \times \text{pente}(\text{molécule})}{\text{pente}(\text{référence})} \times \frac{\varepsilon_{430\text{nm}}(\text{référence})}{\varepsilon_{430\text{nm}}(\text{molécule})}$$

Toutefois, plus les coefficients d'extinction molaire des deux composés comparés sont proches, plus la mesure est précise. Or, à 430 nm, la référence et la coumarine **69** ont des coefficients d'extinction molaire respectifs de 40200 M⁻¹.cm⁻¹ et de 9600 M⁻¹.cm⁻¹. Cela implique que le facteur de correction implémenté dans l'Équation 13 est de quatre, augmentant considérablement les incertitudes. Pour plus de précision, il est nécessaire de recommencer ces mesures à une longueur d'onde où les deux molécules ont une absorbance plus proche.

6. Conclusion

Le développement d'un précurseur photolabile libérant efficacement la nicotine par excitation à 500 nm est complexe. Une première stratégie consistant à protéger la nicotine et développer un GPP excitable à 500 nm a été explorée. Cependant, le développement d'un tel GPP n'a pas pu aboutir suite à de nombreux problèmes de synthèse. Quant à la protection de la nicotine, trois groupements protecteurs différents ont été utilisés, mais aucun n'a permis une alkylation sélective du motif pyrrolidine de la nicotine. Ainsi, une seconde stratégie reposant sur l'introduction d'un atome lourd sur une coumarine pour libérer la nicotine par sa fonction pyridine a été réalisée menant à l'obtention du précurseur photolabile de la nicotine **69**. Ce dernier libère efficacement la nicotine avec un très bon rendement quantique de photolyse et va très prochainement être testé par nos collaborateurs. Lors de cette synthèse, un second précurseur photolabile a été développé de manière fortuite. Cependant, ce dimère de coumarine semble instable et difficile à purifier ce qui rend son utilisation trop complexe pour envisager de poursuivre son application biologique.

Chapitre IV

IV. Développement de nouveaux groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique

L'utilisation de groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique reste limitée en partie en raison de leur faible efficacité de photolyse et du manque de disponibilité de ces outils photochimiques. En effet, contrairement aux sondes fluorescentes ayant une forte disponibilité commerciale, les groupements protecteurs photolabiles sensibles à deux photons sont très peu présents sur le marché. Il y a certes, certains précurseurs photolabiles disponibles commercialement, mais ils sont généralement peu efficaces et donc nécessitent l'usage de hautes concentrations pour chaque application augmentant considérablement le coût des manipulations.

Il est donc nécessaire de développer des précurseurs photolabiles ayant une meilleure sensibilité à l'excitation à deux photons pour pouvoir profiter pleinement de ses avantages et potentiellement remplacer les outils commerciaux moins efficaces. Un des projets de ma thèse a donc été le développement et la caractérisation de nouveaux groupements protecteurs photolabiles plus sensibles à l'excitation à deux photons.

1. Etat de l'art

Depuis les années 2000, le développement de composés sensibles à l'excitation bi-photonique a donné lieu à de nombreux travaux d'ingénierie moléculaire, présentés dans plusieurs revues^{122,205,82}. Dans ce paragraphe nous allons nous focaliser sur les travaux les plus récents.

Notre laboratoire s'est distingué avec le développement d'une plateforme biphényle ayant permis de développer le composé PMNB-Glu⁹³ en 2008 et l'ANBP-GABA⁹² en 2012, ayant respectivement une section efficace de photolyse à deux photons ($\delta_a \Phi_{bi}$) à 800 nm de 3.2 GM et 11 GM (cf. Figure 74, molécule **1-2**). Notre groupe a également développé en 2008, le BNSF, un chromophore quadripolaire composé d'un cœur fluorène reliant deux groupements o-

nitrophénéthyles permettant de libérer deux molécules de glutamate avec une efficacité de 5 GM à 800 nm (cf. Figure 74, molécule **3**). En 2016, le groupe de Kobayashi a développé un précurseur photolabile du calcium à partir d'un dérivé *o*-nitrobenzyle à conjugaison étendue par l'ajout d'un motif benzofurane en position *para* du groupement nitro²⁰⁶ (cf. Figure 74, molécule **4**). Ce dernier présente une efficacité de photolyse à deux photons de 20 GM à 740 nm. La même année, c'est une fonction diméthylaniline qui a été introduite en position *para* de la fonction nitro d'un groupement *o*-nitrobenzyle permettant d'obtenir un composé libérant du calcium avec une efficacité à deux photons de 7.8 GM à 800 nm²⁰⁷ (cf. Figure 74, molécule **5**). A la même période, le groupe d'Ellis-Davis a développé le composé BIST-NB, un groupement protecteur photolabile utilisant un cœur thiophène et arborant deux extrémités *o*-nitrobenzyles. Ce dernier peut libérer deux ions calcium avec une efficacité de photolyse à deux photons d'environ 80 GM à 775 nm²⁰⁸ (cf. Figure 74, molécule **6**).

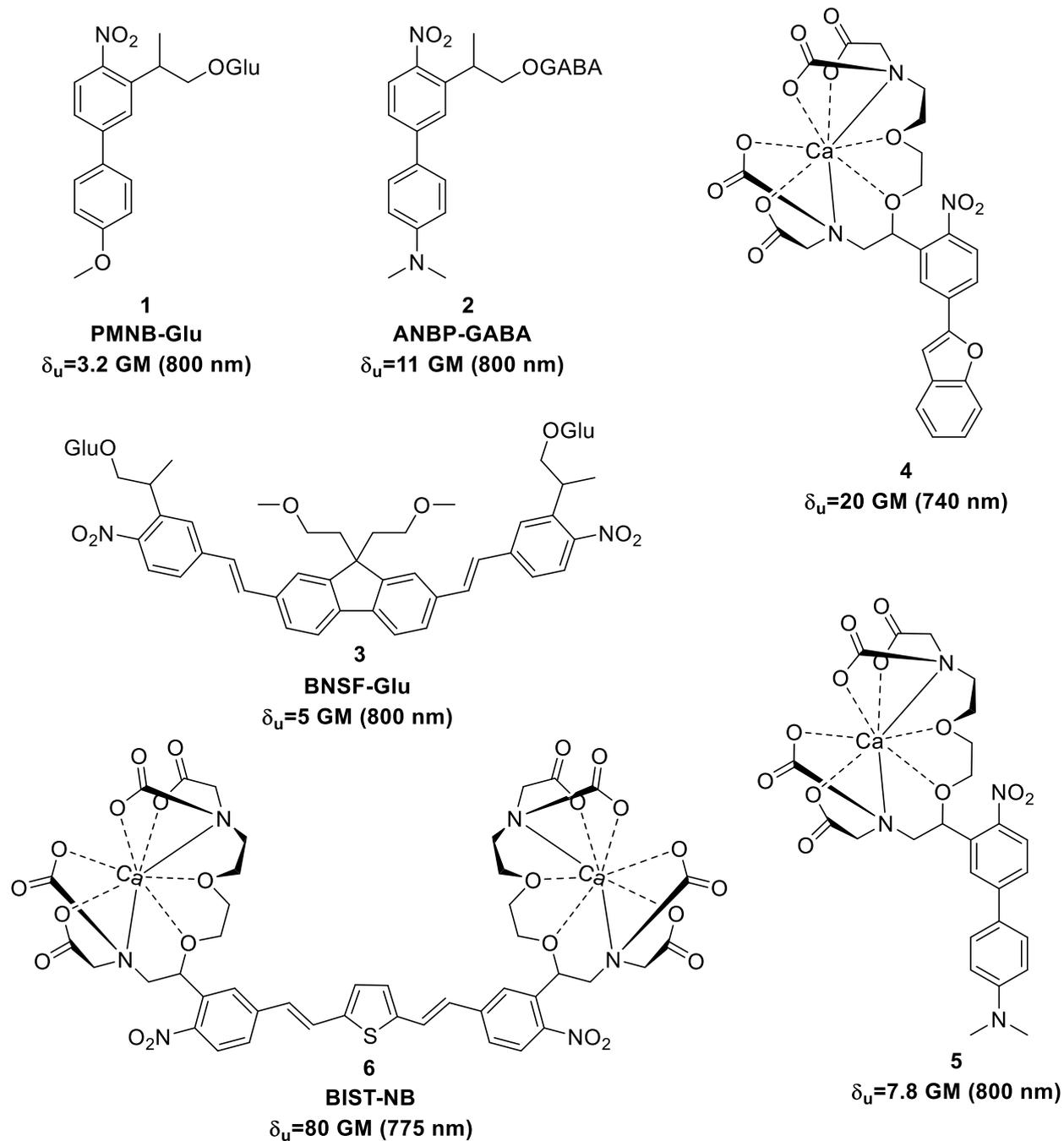


Figure 74: Structures des différents groupements protecteurs photolabiles de la famille des *o*-nitrobenzyles et *o*-nitrophénéthyles sensibles à l'excitation bi-photonique développés ces dernières années. (Glu = acide glutamique, GABA = acide gama-aminobutyrique).

Les groupements protecteurs photolabiles de la famille des quinolines²⁰⁹ ont également été sujets à de nombreux travaux d'ingénierie moléculaire afin d'améliorer leurs sensibilités à deux photons. En effet, dès 2014 le groupe de Dalko s'est particulièrement illustré avec le développement de deux quadrupoles constitués de deux motifs 8-diméthylamine-quinoline liés par deux positions différentes et permettant de libérer de l'acide acétique avec une efficacité de 0.07 GM et 0.40 GM²¹⁰ (cf. Figure 75, molécule **1-2**). L'année suivante, le même groupe identifie la position 5 comme une position intéressante à substituer et a ainsi développé une quinoline avec une efficacité de photolyse à deux photons de 2 GM à 730 nm²¹¹ (cf. Figure 75, molécule **3**). En 2020, le groupe de Dore a réalisé des modifications sur la 8-cyano-7-hydroxyquinolin-2-ylmethyl (CyHQ)²¹² en introduisant des groupements électroattracteurs ou électrodonneurs en position 4. Ces modifications ont permis de développer des dérivés quinolines pouvant libérer de l'acide homopiperonylique avec une efficacité à deux photons allant jusqu'à 2.64 GM²¹³ (cf. Figure 75, molécule **4**).

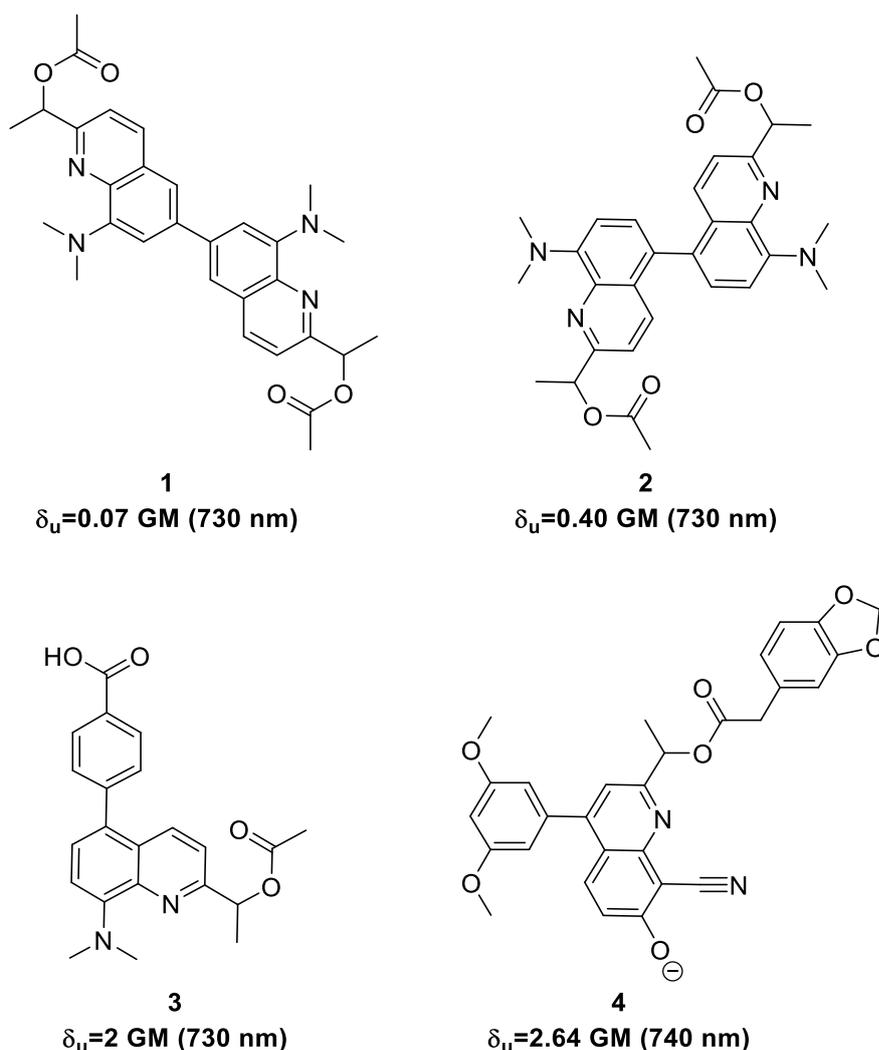


Figure 75: Structures des différents groupements protecteurs photolabiles de la famille des quinolines sensibles à l'excitation bi-photonique développés ces dernières années.

Les groupements protecteurs de type coumariniques ont également connu de nombreuses modifications structurales. En 2013, le groupe d'Ellis-Davis a développé le DEAC-450 pouvant libérer du glutamate avec une efficacité de 0.5 GM à 900 nm¹⁴⁴ (cf. Figure 76, molécule **1**). Les groupes de Katan et d'Abe ont, quant à eux, développé des coumarines au système π étendu. Ainsi, un nitrophényle a été placé en position 3 de la 7-hydroxycoumarine et un groupement *N*-diméthylaminophényle a été placé en position 3 de la coumarine DEAC. Ces dernières présentent respectivement une section efficace de photolyse à deux photons de 3.4 GM à 710 nm²¹⁴ et 1.1 GM à 750 nm¹⁶⁵ (cf. Figure 76, molécule **2-3**). En 2018, le groupe de Zhu a introduit des groupements styrènes en position 3 menant au développement de la

coumarine DEACAS avec une efficacité de photolyse à deux photons de 40 GM à 740 nm¹⁶⁴ (cf. Figure 76, molécule **4**). L'année suivante, le groupe de Blanchard-Desce présente de nouvelles coumarines au système π étendu par l'addition de groupements électroattracteurs tels que le benzothiazole et reliés par des alcènes ou encore des fluorènes¹⁶⁶. Ce travail a permis de développer une coumarine relarguant une molécule de glycine avec une efficacité de photolyse à deux photons de 442 GM à 740 nm (cf. Figure 76, molécule **5**). Cette efficacité de photolyse est de loin la meilleure décrite à ce jour dans la littérature.

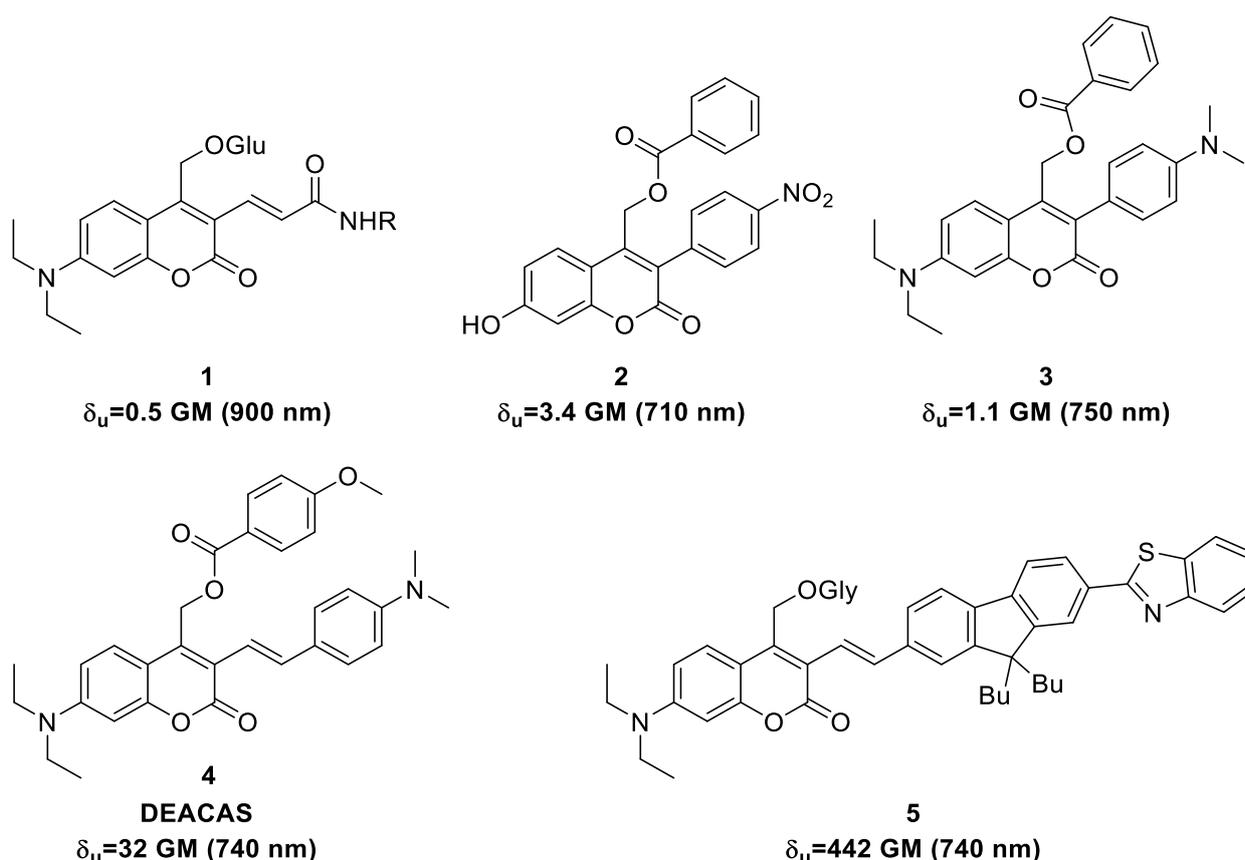


Figure 76: Structures des différents groupements protecteurs photolabiles de la famille des coumarines sensibles à l'excitation bi-photonique développés ces dernières années. Glu = acide glutamique, Gly = Glycine.

Enfin, une autre stratégie consistant à utiliser une « antenne » présentant de très bonnes sections efficaces d'absorption à deux photons et pouvant transférer l'énergie lumineuse à un groupement protecteur photolabile a été explorée²¹⁵. Néanmoins, cet état de l'art fera abstraction de cette stratégie qui reste assez éloignée de notre problématique (cf. Figure 77).

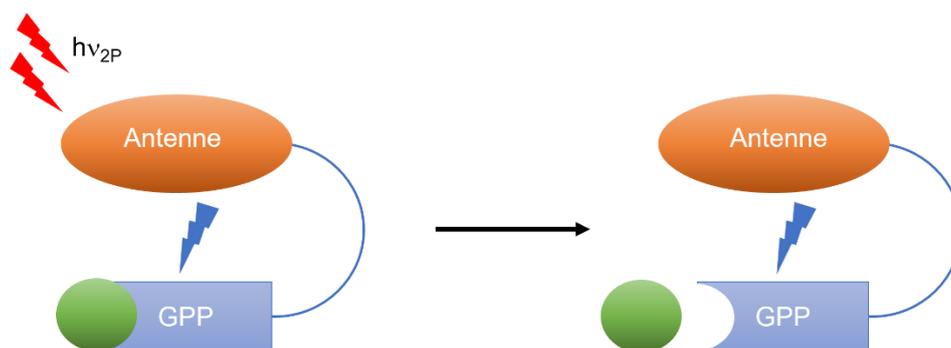


Figure 77: Utilisation d'une antenne pour capter le rayonnement lumineux à deux photons et transmettre son énergie à un groupement protecteur photolabile pour déclencher la photolyse de la molécule protégée.

2. Développement d'une nouvelle série de coumarine à la structure rigidifiée

2.1 Découverte d'une réaction domino permettant de développer la série des coumarines rigidifiées par une réaction 5-exo-dig

C'est dans ce contexte qu'une nouvelle série de coumarines à la structure rigidifiée a été développée au laboratoire en collaboration avec Juliane Chaud. En effet, l'alcyne placé sur la coumarine **25** est idéalement situé pour engendrer une cyclopalladation 5-exo-dig suivie d'un couplage de Suzuki permettant d'obtenir le composé **26**. A noter qu'aucun couplage direct (issus d'une réaction de couplage de Suzuki direct de l'ester boronique sur **24**) n'a été détecté ni par analyse HPLC ni par analyse RMN.

Toutefois, le composé **26** est obtenu sous forme d'un mélange des deux diastéréoisomères **26a** (Z/E) et **26b** (E/E) avec un ratio 8/2 en faveur de **26a** (cf. Figure 78). Cela est surprenant, car mécanistiquement parlant, l'étape d'insertion 1,2 du palladium sur l'alcyne ne peut former que l'isomère cis **26a** (cf. Figure 79). Cependant, on observe que le composé **26a** s'isomérisé en **26b** au contact de la lumière. Ainsi, une isomérisation quasi complète et irréversible du composé peut être observée en irradiant le mélange d'isomères à l'aide d'une excitation lumineuse à 430 nm (LED de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics).

La réaction de cyclopalladation 5-exo-dig intègre donc un alcène supplémentaire dans la conjugaison du chromophore. De plus, la formation d'un cycle à 5 chaînons rigidifie le squelette de la coumarine permettant un meilleur alignement des orbitales π . De ce fait, ces modifications structurales apportées au chromophore coumarinique nous ont semblé très intéressantes pour l'élaboration de nouveaux groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique.

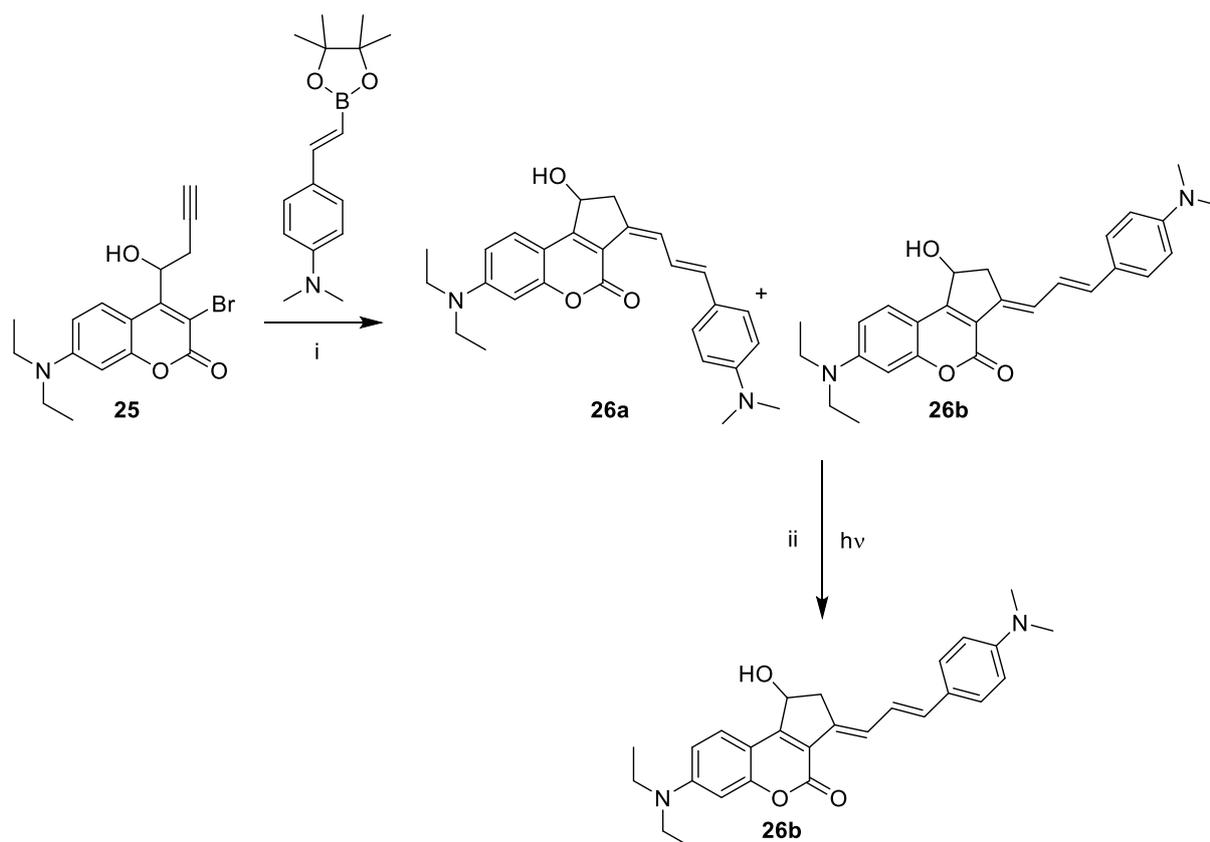


Figure 78: Réaction domino 5-exo-dig-Suzuki suivie d'une photo-isomérisation permettant l'obtention de la coumarine **26b**. i K_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, DME/ H_2O (8/2 in vol.), 105 °C, 45 min, 53%, ii $h\nu$ (430 nm, 200 mW.cm²), CH_2Cl_2 , TA, 1 h, quant.

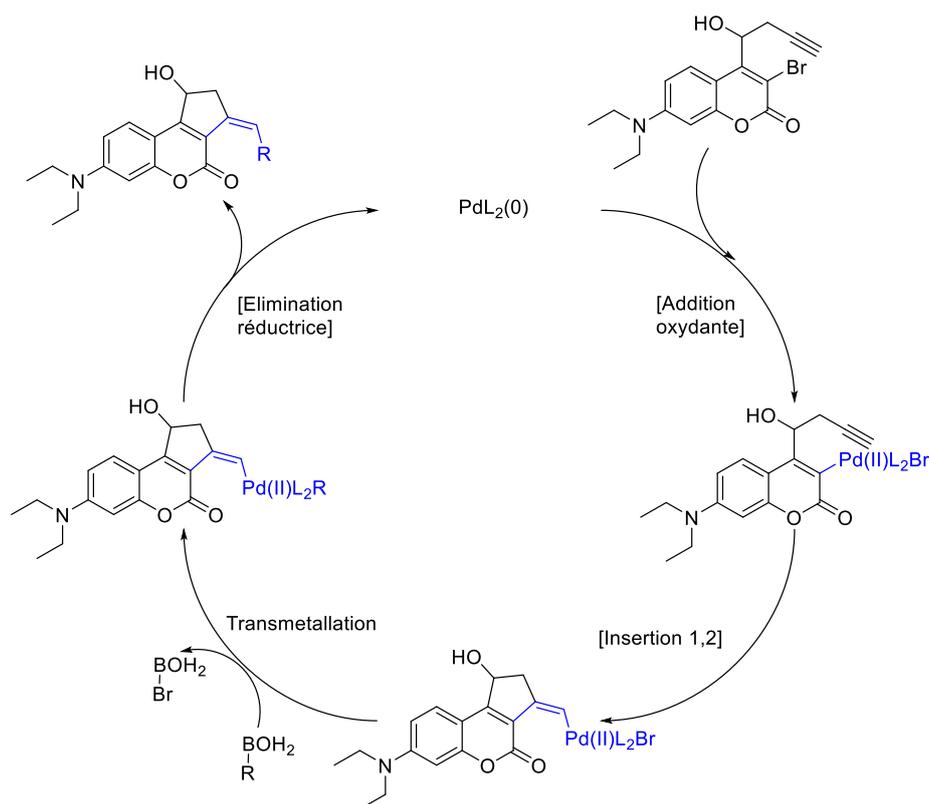


Figure 79: Mécanisme proposé de la réaction domino 5-exo-dig-Suzuki.

2.2 Ingénierie moléculaire effectuée sur la série des coumarines rigidifiées par une réaction 5-exo-dig

À la suite du développement du composé **26b**, nous avons décidé d'explorer cette réaction domino pour déterminer quelles modifications apporteraient de meilleures propriétés d'absorption à deux photons. Pour ce faire, la synthèse de deux nouvelles coumarines a été entreprise. En effet, la coumarine **74b** est issue de la même réaction domino que le composé **26b**, mais avec un alcène en moins dans le chemin de conjugaison. Ainsi, cette coumarine présente la même conjugaison que le composé DEACAS avec pour seule différence la rigidité apportée par le cycle à 5 atomes (cf. Figure 80). Cela permet de déterminer si la cyclisation intramoléculaire améliore les propriétés d'absorption à deux photons du chromophore. De la même manière, l'effet de la conjugaison supplémentaire peut être déterminé en comparant les propriétés photophysiques des coumarines **26b** et **74b**. Pour finir, la réaction de cyclopalladation peut être suivie d'une réaction de Sonogashira permettant

ainsi de préparer la coumarine **75b** et d'étudier l'impact d'une plus grande rigidité sur les propriétés d'absorption à deux photons de cette série de coumarines (cf. Figure 80). L'utilisation d'alcynes à la place d'alcènes pour connecter différents éléments d'un chromophore est généralement moins bonne, car le recouvrement des orbitales d'un carbone hybridé sp avec des carbones sp^2 voisins est plus faible que le recouvrement entre deux carbones sp^2 . Cependant, dans certains cas où le chromophore est contraint dans l'espace, l'utilisation d'un alcyne rend la structure encore plus rigide et bloque sa conformation, augmentant ainsi la conjugaison du chromophore^{216,217}.

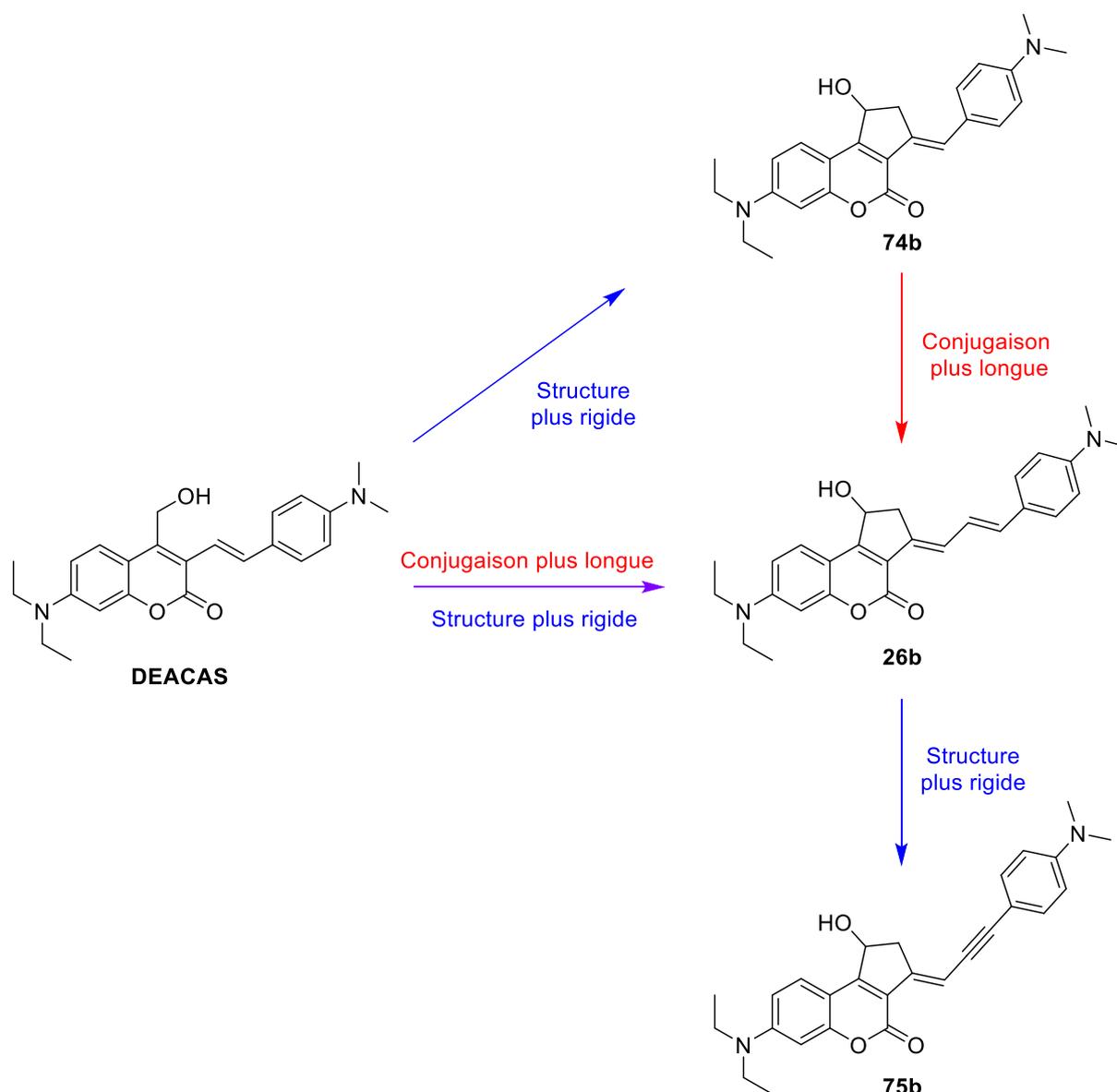


Figure 80: Ingénierie moléculaire effectuée lors de la conception de la série des coumarines rigidifiée par réaction 5-exo-dig.

2.3 Synthèse des coumarines rigidifiées par une réaction de type 5-exo-dig

La synthèse de chaque coumarine rigidifiée est initiée à partir de l'alcyne **25** issu d'une réaction de Barbier entre l'organozincique propargylique et l'aldéhyde **14** suivie d'une bromation en position 3 à l'aide de *N*-iodosuccinimide (cf. Figure 81). Ce dernier a ensuite permis d'obtenir les coumarines **26a** et **74a** à l'aide respectivement, d'une réaction domino 5-exo-dig suivie d'un couplage de Suzuki avec l'ester pinacolique d'acide boronique de *N,N*-diméthylaminostyrène **76** ou l'ester pinacolique d'acide boronique de *N,N*-diméthylaniline **77**. La coumarine **75a**, quant à elle, est obtenue par réaction domino 5-exo-dig-Sonogashira avec du *N,N*-diméthyl-4-éthynylaniline **78**. Ces deux réactions domino s'effectuent majoritairement, mais on peut également observer de la dégradation lors de la réaction et lors des purifications sur colonne de silice expliquant des rendements de 39, 23 et 47% respectivement pour les composés **26a**, **74a** et **75a**. A l'instar de la coumarine **26a**, ces derniers s'isomérisent également après irradiation à 430 nm ou au contact de la lumière ambiante. Les isomères trans **26b**, **73b** et **74b** ont ensuite été couplés à de l'acide *p*-méthoxybenzoïque afin de pouvoir aisément quantifier le relargage photo-induit de cet acide par analyse HPLC. Les coumarines **79**, **80** et **81** ont pu être obtenues après purification HPLC.

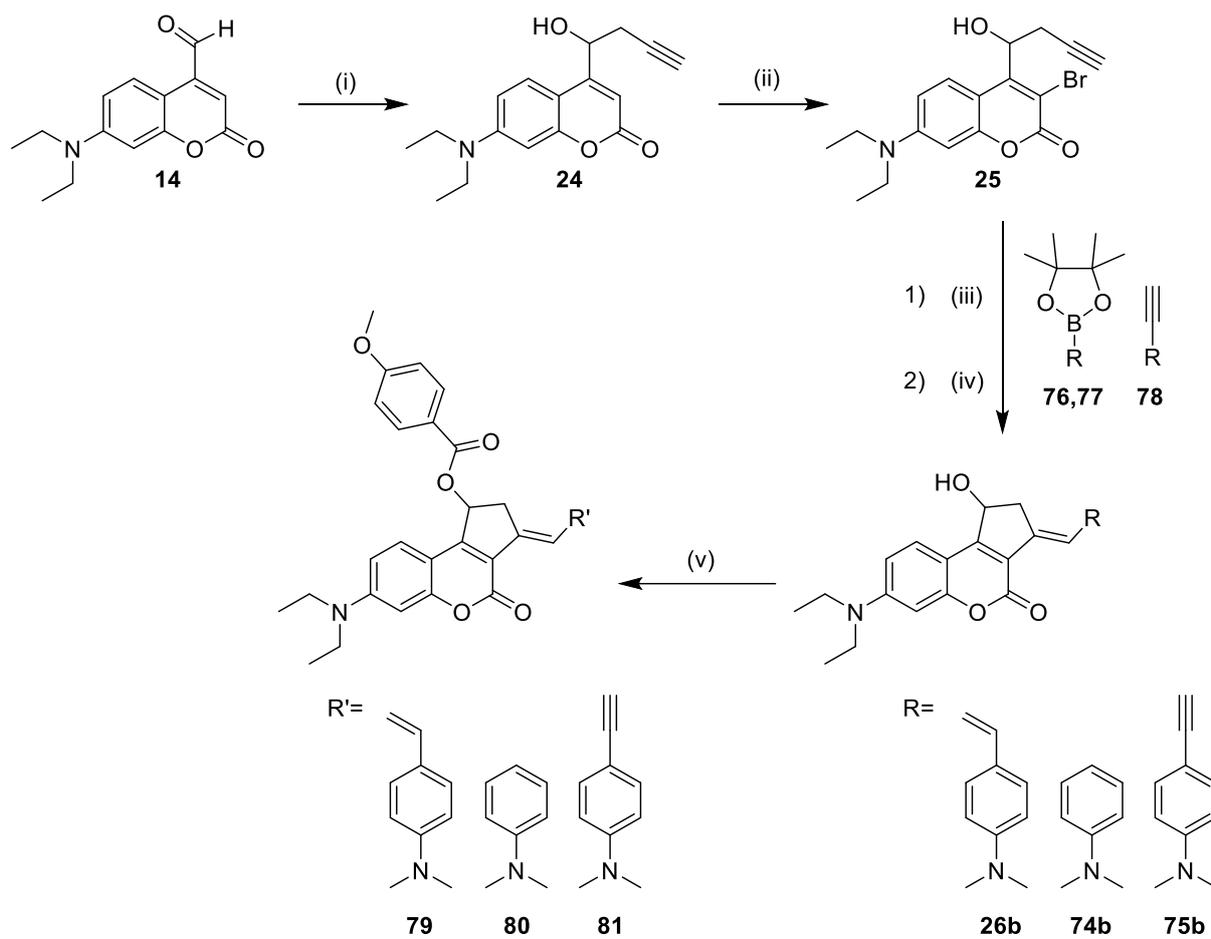


Figure 81: Synthèse des coumarines rigidifiées **79**, **80** et **81**. i) Bromure de propargyle, THF, 0 °C à TA, 90 min, 86% ;
 ii) NBS, acétate d'ammonium, MeCN, TA, 30 min, 93% ; iii) Composé **76** ou **77**, K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME, micro-onde 105
 °C, 45 min, 39%-23% (respectivement pour **26a** et **74a**) ou composé **78**, diisopropylamine, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, micro-onde, 120
 °C, 1 h, 47% ; vii) hv (430 nm), CH₂Cl₂ ou chloroforme, TA, 1h, quant. ; viii) Acide p-méthoxybenzoïque, DMAP, DIC, CH₂Cl₂, 0 °C
 à TA, 40.5 h à 3.5 jours, 67%-20%-38% (respectivement pour **79**, **80** et **81**).

3. Détermination des propriétés photochimiques et photophysiques des coumarines 5-exo-dig

3.1 Propriétés photophysiques et photochimiques un photon des coumarines rigidifiées par une réaction de type 5-exo-dig.

Les propriétés photophysiques de ces coumarines ont été étudiées au laboratoire. Ainsi, les trois coumarines rigidifiées montrent des absorbances très fortes avec des coefficients d'extinction molaire aux alentours de $40\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (cf. Tableau 4). A noter que seule la coumarine **80** montre un déplacement hypsochromique de son absorbance par rapport à la coumarine DEACAS avec une longueur d'onde maximale à 437 nm. Les deux autres composés, plus conjugués, présentent un déplacement bathochromique de leurs absorbances maximales allant jusqu'à 457 nm pour la coumarine **79**.

Des solutions à $20\ \mu\text{M}$ de ces composés ont été irradiées à l'aide d'un équipement LED de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics et la réaction de photolyse a été suivie par spectroscopie UV-Visible (cf. Figure 82) et HPLC (cf. Figure 83). Cette concentration a été choisie pour obtenir des solutions avec une densité optique aux alentours de 0.8 afin de pouvoir observer le phénomène de photolyse facilement tout en étant dans la limite de la linéarité de la loi de Beer-Lambert. Également, cela permet de ne pas être gêné par des sous-produits de la réaction de photolyse lorsque la concentration est trop grande (absorbance du sous-produit, dilution, etc.) ce qui aurait pu fausser les mesures.

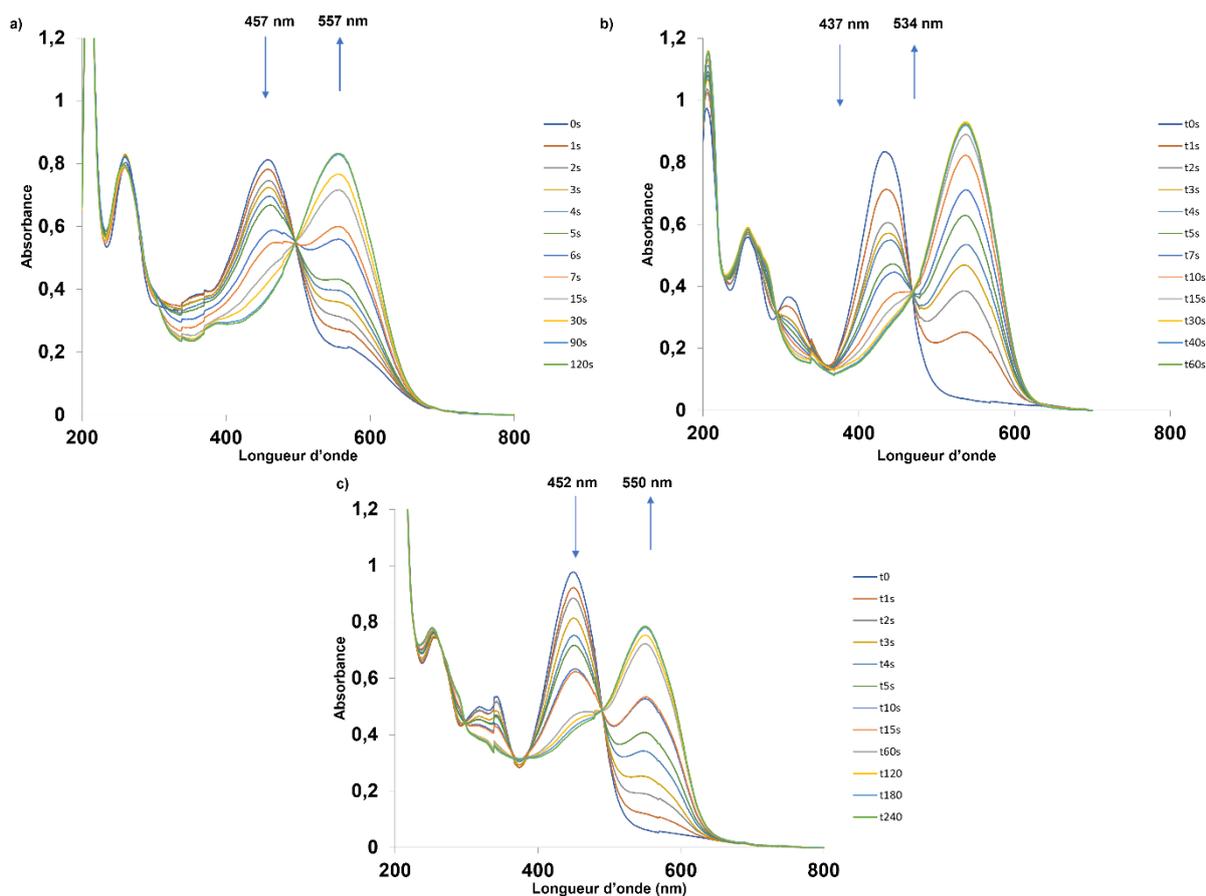


Figure 82: Suivi de la réaction de photolyse des coumarines rigidifiées par une cyclisation de type 5-exo-dig par spectroscopie UV-Visible. a) Suivi de la réaction de photolyse de la coumarine **79**, l'absorbance à 457 nm diminue tandis qu'une bande apparaît à 557 nm b) Suivi de la réaction de photolyse de la coumarine **80**, l'absorbance à 437 nm diminue tandis qu'une bande apparaît à 534 nm, c) Suivi de la réaction de photolyse de la coumarine **81**, l'absorbance à 452 nm diminue tandis qu'une bande apparaît à 550 nm.

Puis, une courbe d'étalonnage a été réalisée par HPLC (concentration/aire sous le pic) avec l'acide *p*-méthoxybenzoïque et a permis de déterminer le taux de photolyse pour chaque molécule (cf. Figure 83). En effet, certains groupements protecteurs photolabiles présentent plusieurs mécanismes après photoactivation n'amenant pas forcément à la réaction de photolyse. Par conséquent certains précurseurs photolabiles ne relarguent pas totalement la biomolécule après photoactivation. Cependant, ce n'est pas le cas des trois composés synthétisés qui relarguent presque totalement l'acide *p*-méthoxybenzoïque avec un taux de photolyse respectif de 98%, 99%, 99% pour les coumarines **79**, **80** et **81** (cf. Figure 83).

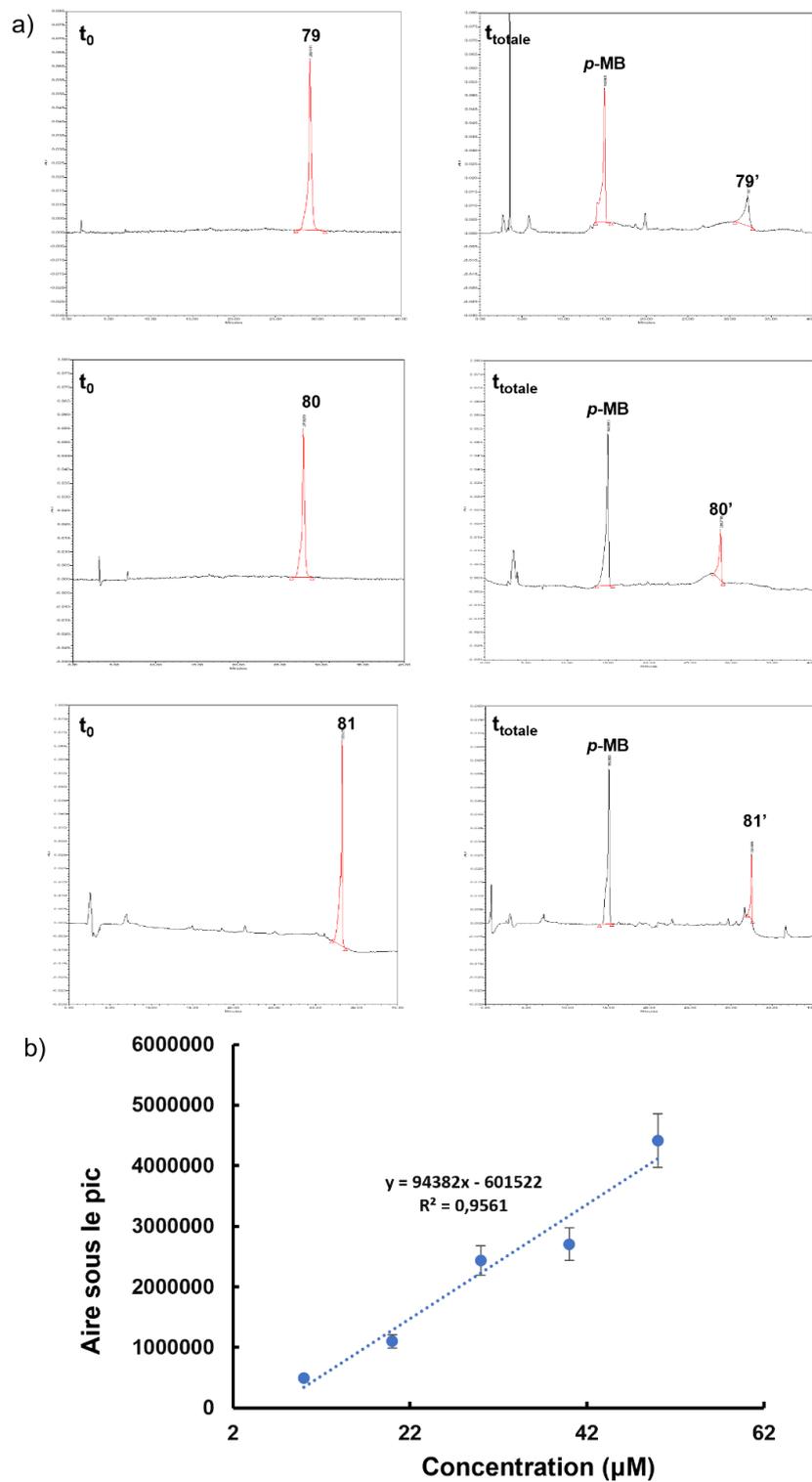


Figure 83: a) Chromatogrammes HPLC des composés **79**, **80** et **81** avant photolyse (t_0) et après photolyse totale (t_{totale}) donnant lieu à l'apparition d'un pic correspondant à l'acide *p*-méthoxybenzoïque (*p*-MB) et les sous-produits de photolyses **79'**, **80'** et **81'**. b) courbe de calibration par HPLC de *p*-MB permettant de déterminer qu'après photolyse totale des composés **79**, **80** et **81**, l'aire sous le pic de *p*-MB formé soit respectivement de 19,54, 19,79, 19,71 µM.

Lors de la photolyse, les absorbances aux longueurs d'onde maximales des composés diminuent et on peut observer l'apparition pour chaque molécule d'une nouvelle bande d'absorbance respectivement à 557 nm, 534 et 550 nm pour les coumarines **79**, **80** et **81** (cf. Figure 82). Cette nouvelle bande d'absorbance correspond à l'apparition du sous-produit de photolyse du groupement protecteur photolabile. Cela est très intéressant, car contrairement au sous-produit de la coumarine **DEACAS**¹⁶⁴, les sous-produits de photolyse présentent un déplacement bathochromique de leurs absorbances maximales. On peut ainsi proposer que le mécanisme de photolyse soit initié par une rupture hétérolytique de la liaison photolabile qui conduit à la formation d'un carbocation suivie d'une élimination d'un proton adjacent pour former un dérivé de type fulvène (cf. Figure 84). Pour confirmer cela, la structure du produit de photolyse **79'** a été déterminée par RMN ¹H et spectrométrie de masse. Cependant, ces produits étant très peu solubles dans les solvants d'analyse RMN classiques, les structures des sous-produits de photolyse **80'** et **81'** ont été confirmées seulement par spectrométrie de masse. Malheureusement, ces sous-produits ne sont pas fluorescents ce qui aurait pu être utile pour quantifier le relargage de biomolécules²¹⁸.

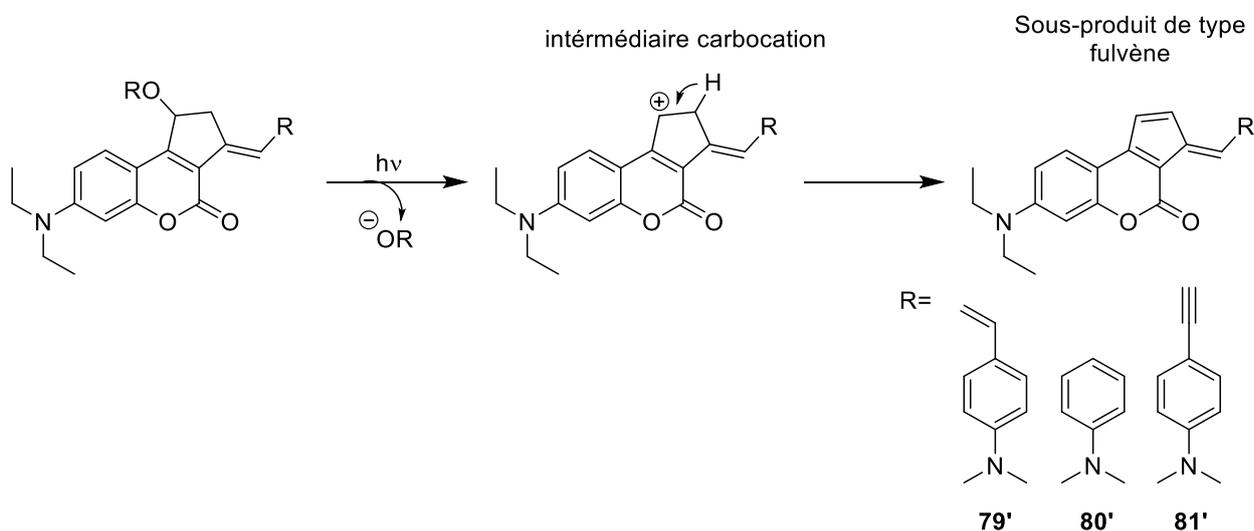


Figure 84: Mécanisme de photolyse proposé pour la série des coumarines 5-exo-dig permettant l'obtention des sous-produits de types fulvènes **79'**, **80'** et **81'**.

3.2 Propriétés photochimiques des coumarines rigidifiées par réaction 5-exo-dig

Les rendements quantiques de photolyse des trois composés synthétisés ont été déterminés en comparant leurs cinétiques de photolyse à celle de la référence (DEACAS-*p*-méthoxybenzoïque) lors d'une irradiation à 430 nm par un système de LED (de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics) (cf. Figure 85). Le suivi du pourcentage de photolyse a été réalisé par spectroscopie UV-Visible. En effet, de la même manière que pour DEACAS-Glutamate **19**, le changement d'absorbance du sous-produit de photolyse des coumarines **79**, **80** et **81** permet de suivre la réaction photochimique. Pour cela, il suffit de comparer la diminution d'absorbance à la longueur d'onde maximale du composé avec la diminution d'absorbance à la même longueur d'onde induite lors d'une photolyse totale. Évidemment, une lecture par spectroscopie UV-Visible ne peut s'effectuer que si l'absorbance du sous-produit de photolyse est différente de celle du groupement protecteur photolabile et que la perte d'absorbance induite par la photolyse est grande. De plus, ce type de lecture permet de réaliser plus aisément un grand nombre de mesures permettant une meilleure fiabilité comparé aux autres moyens de lecture (par HPLC ou RMN par exemple).

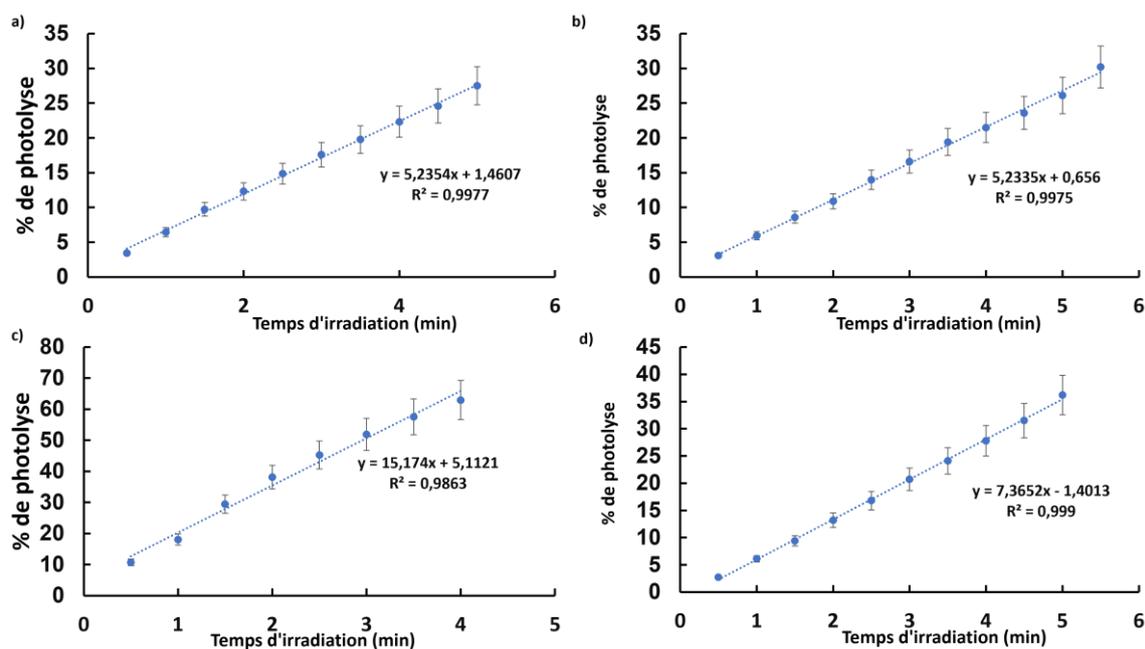


Figure 85: Régression linéaire de la cinétique de photolyse par irradiation à 430 nm à l'aide d'un équipement LED (de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics) de la référence et des composés **79**, **80** et **81**. a) Régression linéaire de la cinétique de photolyse de la référence, b) Régression linéaire de la cinétique de photolyse de la molécule **79**, c) Régression linéaire de la cinétique de photolyse de la molécule **80**, d) Régression linéaire de la cinétique de photolyse de la molécule **81**.

Une fois les cinétiques de photolyse réalisées pour chaque composé, les rendements quantiques ont pu être déterminés. De la même manière que pour le précurseur photolabile de la nicotine **69**, les absorbances et donc les coefficients d'extinction molaire de chaque composé sont différents. Il est donc nécessaire d'utiliser l'Équation 13.

Équation 13 : Équation permettant de déterminer le rendement quantique de photolyse Φ_u d'une molécule ayant un coefficient d'extinction molaire différent de celui de la référence.

$$\Phi_u(\text{molécule}) = \frac{\Phi_u(\text{référence}) \times \text{pente}(\text{molécule})}{\text{pente}(\text{référence})} \times \frac{\varepsilon_{430\text{nm}}(\text{référence})}{\varepsilon_{430\text{nm}}(\text{molécule})}$$

Ainsi, les composés **79** et **81** ont un rendement quantique de photolyse légèrement supérieur à la référence ($\Phi_u=0.2$) avec respectivement un rendement quantique de 0.27 et 0.26 (cf. Tableau 4). La coumarine **80** présente un rendement de photolyse beaucoup plus important que les deux autres coumarines avec un rendement quantique de 0.57.

3.3 Propriétés à deux photons des coumarines rigidifiées par réaction 5-exo-dig

La détermination de la section efficace de photolyse à deux photons (δ_u) s'effectue de manière similaire à la méthode utilisée précédemment pour déterminer les rendements quantiques de photolyse. En effet, une référence dont on connaît précisément la section efficace de photolyse à deux photons doit être utilisée. A l'instar des caractérisations à un photon, la coumarine DEACAS-*p*-méthoxybenzoïque a également été utilisée comme référence.

Pour ce faire une solution de la référence est diluée de préférence dans le même solvant que celui utilisé pour la référence. Généralement, les solutions sont préparées à des densités optiques inférieures à 0.4 afin d'optimiser les variations de concentration lors de la photolyse par excitation à deux photons. Le relargage étant très localisé (fL) pour que la photolyse soit facilement quantifiable, le nombre total de molécules à irradier doit être faible. C'est pour cette même raison que les volumes irradiés doivent eux aussi être le plus petit

possible, typiquement inférieurs à 100 μL . Ensuite la solution a été irradiée à différentes puissances du laser d'excitation et le pourcentage de produit photolysé est déterminé par spectroscopie UV-Visible. Cela permet de vérifier que la relation quadratique entre le pourcentage de photolyse et la puissance au carré s'applique aux conditions utilisées. Si l'on trace le graphe du logarithme du pourcentage de photolyse en fonction du logarithme de la puissance du laser utilisé, on obtient une droite ayant théoriquement un coefficient directeur de deux (cf. Équation 14).

Équation 14: Relation entre la puissance du laser utilisée P (mW) et le pourcentage de photolyse à deux photons.

$$\log(\% \text{ de photolyse}) = 2 \log(P)$$

Chaque molécule a été caractérisée à 740 nm et 800 nm, car ces valeurs sont proches des longueurs d'onde d'absorbance à deux photons maximales de la référence DEACAS-*p*-méthoxybenzoïque. La relation quadratique entre la puissance au carré et le pourcentage de photolyse a été déterminée à ces longueurs d'onde avec chacune des coumarines **79**, **80**, **81** et la référence (cf. partie expérimentale). Une fois les dépendances quadratiques confirmées, la référence et les composés étudiés sont irradiés à la même puissance et à la même longueur d'onde pendant différentes durées. De la même manière qu'une irradiation à un photon, la cinétique de la photolyse à deux photons d'un composé est dans un premier temps linéaire puis, généralement au-dessus de 20% de photolyse, la cinétique de la réaction décroît. Le graphique présentant le pourcentage de photolyse en fonction du temps est ensuite tracé pour les deux molécules et une régression linéaire est effectuée sur la partie linéaire des deux courbes (cf. Figure 86). La section efficace de photolyse à deux photons de la molécule à tester est ensuite déterminée à partir de l'Équation 15 :

Équation 15: Equation permettant de déterminer la section efficace de photolyse à deux photons (δ_u) d'une molécule par comparaison avec une référence.

$$\delta_u(\text{molécule}) = \frac{\delta_u(\text{référence}) \times \text{pente}(\text{molécule})}{\text{pente}(\text{référence})}$$

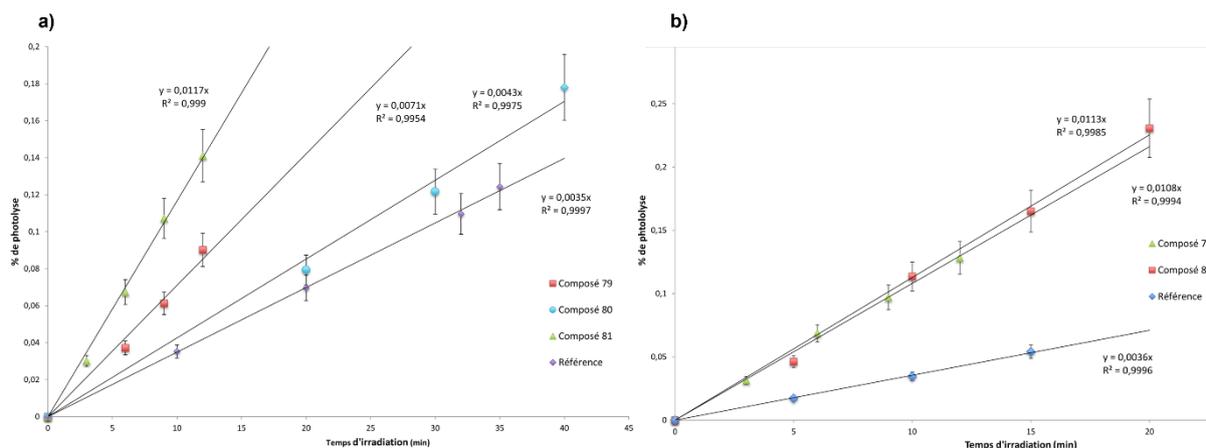


Figure 86: Photolyse par excitation à deux photons des coumarines **79**, **80** et **81** à 740 nm pour le graphique a) et 800 nm pour le graphique b).

Les résultats montrent que les composés **79**, **80** et **81** présentent respectivement une section efficace de photolyse à deux photons de 63, 42 et 125 GM à 740 nm (cf. Tableau 4). A noter qu'à 800 nm, seules les coumarines **79** et **81** sont sensibles avec des efficacités respectives de 23 GM et 29 GM. Ainsi, on peut déduire que, pour tous ces composés, la rigidité augmente la sensibilité à deux photons puisqu'ils présentent tous à 740 nm des efficacités supérieures à la référence ($\delta_u=32$ GM). L'extension de la conjugaison semble également impacter fortement la sensibilité à deux photons, notamment, avec l'ajout d'un alcyne dans la conjugaison. Ces résultats semblent confirmer que l'utilisation d'alcynes comme liens entre deux parties d'un chromophore restreint dans l'espace bloque d'autant plus la molécule dans une conformation où les orbitales π sont mieux alignées. A noter que le déplacement hypsochromique de la coumarine **80** induit potentiellement une baisse des longueurs d'onde d'excitation à deux photons du composé. Cela pourrait expliquer pourquoi les résultats de cette coumarine sont légèrement moins bons qu'attendu. En effet, l'efficacité de photolyse à deux photons (δ_u) est le produit de la section efficace d'absorption à deux photons (noté δ_a) et le rendement quantique de photolyse (Φ_u). Il est donc surprenant que la coumarine **80** avec un rendement quantique trois fois supérieur à la référence, soit à peine plus sensible à deux photons à 740 nm et très peu sensible à 800 nm. On peut donc supposer que cette coumarine possède des absorbances maximales à deux photons en dessous de 740 nm.

Malheureusement, le laser pulsé utilisé lors de cette expérience ne peut descendre en dessous de 740 nm avec une puissance suffisante pour effectuer ces expériences, ne nous permettant pas de confirmer nos suppositions.

Tableau 4: Résumé des propriétés photophysiques et photochimiques de la référence et des coumarines **79**, **80** et **81**.

Coumarine	Abs. λ_{\max} (nm)/ ϵ_{\max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	Fluo λ_{\max} / Φ_F	Φ_u	δ_u (740/800 nm) (GM)
DEACAS	446/41000	510/0.02	0.2	32/8
79	457/39000	609/0.016	0.27	63/23
80	437/42500	588/0.042	0.57	42/NR
81	556/0.018	550/36800	0.26	125/29

4. Modification de la série des coumarines rigidifiées par réaction 5-exo-dig

La série des coumarines 5-exo-dig présente des sections efficaces de photolyse à deux photons très intéressantes permettant d'envisager une utilisation en biologie. Cependant, la cyclisation intramoléculaire rend le chromophore encore plus hydrophobe. L'ajout de simples chaînes oligoéthylène glycol, en utilisant l'ester pinacolique d'acide boronique de *p*-aminostyrène **17** a montré ses limites pour solubiliser la coumarine DEACAS ayant une structure moins hydrophobe. Néanmoins, une autre stratégie possible pour augmenter la solubilité dans l'eau d'une molécule est de conjuguer un groupement solubilisant au chromophore en réalisant des réactions de cycloaddition alcyne azoture catalysée par le cuivre (CuAAC).

La réaction domino de cyclopalladation suivie d'un couplage pallado-catalysé ne nécessite pas un alcyne terminal. Ce dernier peut donc être substitué avec un groupement arborant un alcyne afin d'y coupler un groupement solubilisant. Ainsi, un groupement phényléthyne a été choisi, car il peut facilement être introduit sur l'alcyne **24** par une réaction

de Sonogashira. De plus, l'intérêt de ce composé est que, lorsque la réaction de cyclisation va s'effectuer, le groupement phényléthyne sera également conjugué au reste de la molécule permettant ainsi d'améliorer ses propriétés photophysiques en augmentant la longueur de la conjugaison. Le groupement phényléthyne a donc été couplé à la coumarine **24** par un couplage de Sonogashira avec du (4-iodophényl)éthynyl)triméthylsilane (cf. Figure 87). La coumarine a ensuite été bromée en position 3 à l'aide de N-bromosuccinimide pour obtenir le composé **83** qui a ensuite été couplé à l'ester boronique **17**. Cependant, bien que le composé **84** semble être présent, l'analyse RMN du brut réactionnel montre une grande partie de dégradation et très peu de produit formé.

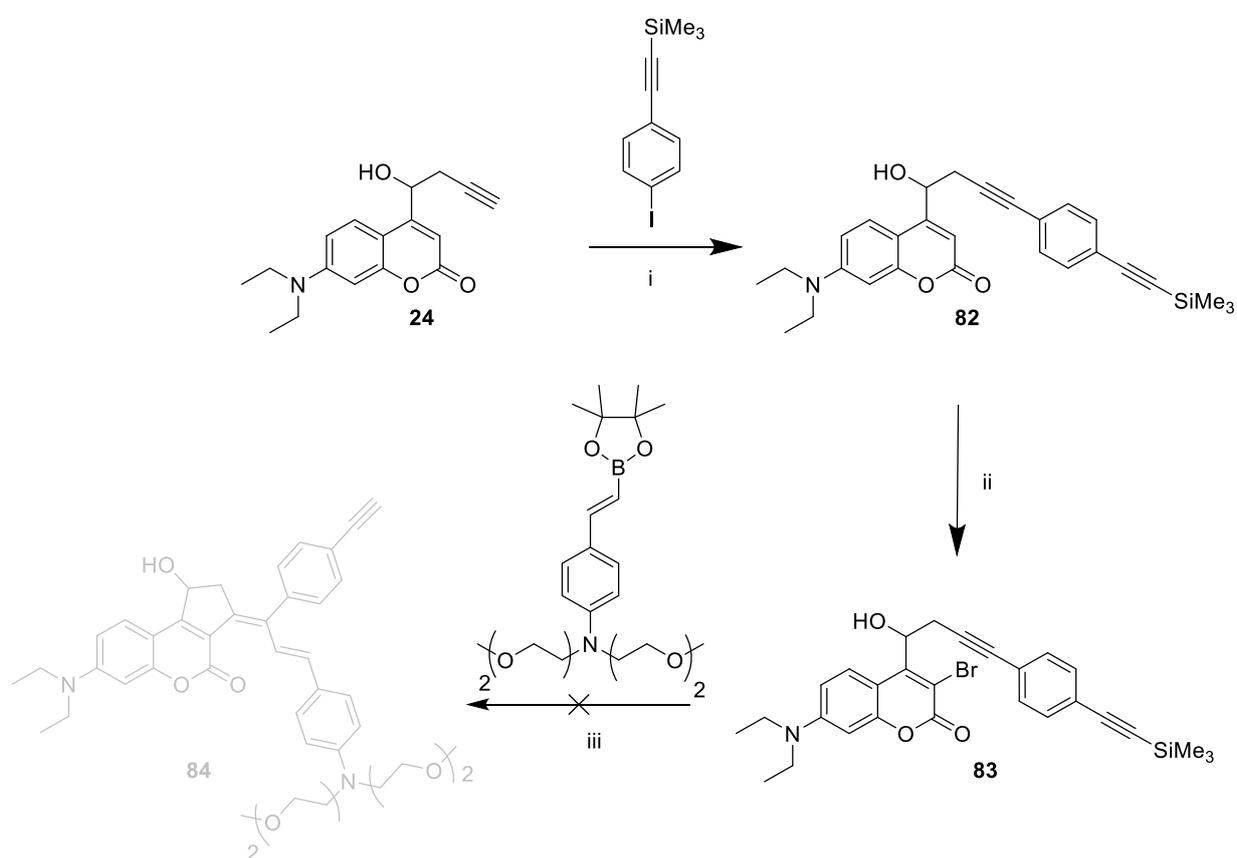


Figure 87: Synthèse d'un dérivé soluble de la série des 5-exo-dig-coumarine-Suzuki à l'aide d'un groupement phényléthyne. i : Et_3N , CuI , $\text{Pd}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2$, THF, 40°C , 2 h, 79%, ii : NBS, NH_4OAc , MeCN, TA, 30 min, 85%, iii : K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DME/ H_2O : 3/1, 105°C , 45 min.

La réaction de cyclisation 5-exo-dig suivie d'un couplage de Suzuki ne permet pas d'obtenir le produit désiré en quantité suffisante. Nous avons donc décidé d'utiliser une autre réaction n'impliquant pas l'ester boronique **17**, car nous supposons que ce dernier se dégrade ou qu'avec le substrat **83**, la réaction domino 5-exo-dig-Suzuki ne se réalise pas. Ainsi, l'idée d'utiliser un couplage de Sonogashira pour insérer un alcyne terminal a été envisagée et une réaction domino 5-exo-dig-Sonogashira a été réalisée avec la coumarine **83** en utilisant dans un premier temps l'alcyne le plus simple possible, le triméthylsilyléacétylène. Cependant, lorsque l'on réalise cette réaction, trois produits sont observés (la formation de ces trois produits a été confirmée par analyses RMN et HPLC) (cf. Figure 88). Les trois produits présentent un déplacement bathochromique de leurs absorbances indiquant qu'une modification du chromophore de la coumarine a été réalisée. Deux d'entre eux ont une absorbance légèrement plus déplacée vers le rouge que le troisième produit. Cela laisse supposer que ces deux produits sont les composés **85a** et **85b** où le groupement phényléthyne est conjugué. Le troisième, dont l'absorbance maximale est légèrement moins déplacée, pourrait venir d'un couplage direct de Sonogashira sur l'intermédiaire **83**.

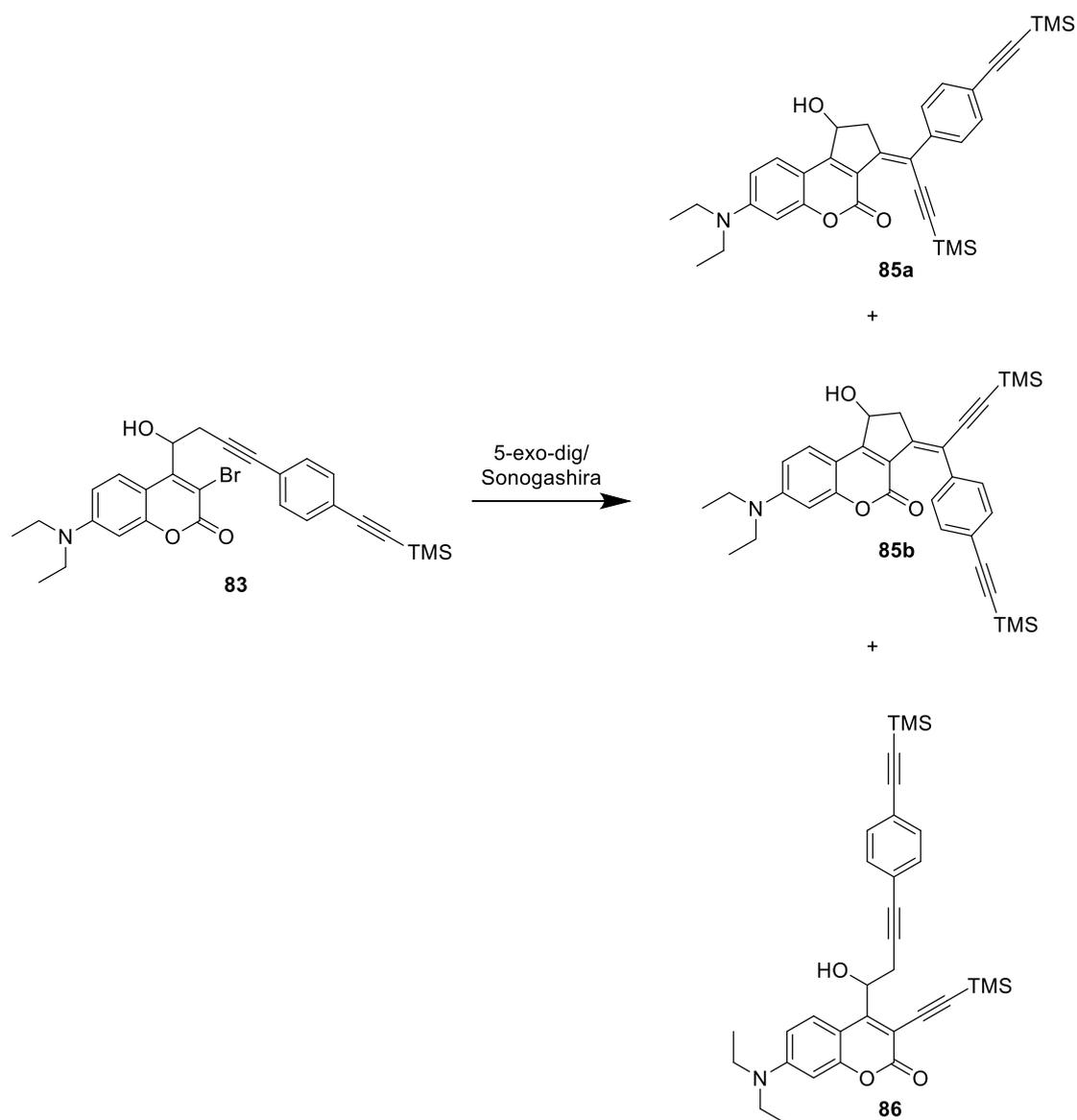


Figure 88: Obtention de trois produits lors du couplage 5-exo-dig-Sonogashira réalisé avec la molécule **83** et de l'acétylène protégé.

Des tentatives d'isomérisation des coumarines **85a** et **85b** ont été réalisées. Cependant, la conversion d'un isomère en un autre n'a pas pu être observée. En effet, après irradiation à l'aide d'une excitation à 220, 330 ou 430 nm (équipement LED de type LUMO 43 de chez Atlas Photonics) aucun changement n'a été observé. Une isomérisation par la température est également à exclure. En effet, un échantillon du brut a été placé à température ambiante (25 °C), un autre à 4 °C et un autre à -30 °C, mais aucune différence n'a été observée. Une isomérisation en présence d'iode²¹⁹ a été également tentée menant à la

dégradation du produit. Bien qu'un des deux isomères soit majoritaire, les proportions du second ne peuvent être modifiées. Nous avons ensuite vérifié si la proportion des différents isomères pouvait être modifiée après déprotection des groupements silanes présents sur les isomères **85a** et **85b**. Cependant, la déprotection des groupements TMS par une solution de carbonate de potassium dans le méthanol a mené à la dégradation des composés.

5. Conclusion

Le développement de nouveaux groupements protecteurs photolabiles sensibles à l'excitation bi-photonique devrait permettre des applications en biologie plus sophistiquées des GPPs. Ainsi, trois nouvelles coumarines ont été synthétisées à l'aide de réactions dominos permettant d'obtenir un squelette conjugué et rigide ce qui n'avait jamais été réalisé précédemment. En effet, les coumarines **79**, **80** et **81** présentent des sections efficaces de photolyse (σ_u) à 740 nm faisant partie des meilleures parmi celles des GPPs décrits dans la littérature. Notamment la coumarine **81** avec son efficacité de photolyse de 125 GM à 740 nm. Ce composé a une structure relativement simple et accessible et présente une alternative crédible au dérivé de coumarine développé par le groupe de Blanchard-Desce¹⁶⁶ présentant une section efficace de 442 GM à 740 nm (cf. Figure 76). De plus, la série des coumarines rigidifiées par une réaction 5-exo-dig est moins hydrophobe et peut potentiellement être plus facilement appliquée en biologie. Malheureusement, les premières tentatives pour la rendre soluble que nous avons réalisées, dans un premier temps en ajoutant un groupement phényléthylène et dans un second temps des groupements carboxylates (cf. Figure 50), n'ont pour le moment pas été fructueuses. Pour finir, ce travail d'ingénierie moléculaire a été publié en 2021 dans un journal scientifique à comité de lecture (Organic Letters)²²⁰.

Chapitre V

V. Conclusion générale et perspectives

La synthèse de GANBP-Glutamate a marqué le début de ce travail de thèse en initiant la collaboration avec l'équipe du Dr. Philippe Isope. Malheureusement, ce composé n'a pas donné de résultats satisfaisants. En effet, ce composé ne libère pas efficacement le glutamate par excitation à deux photons sur tranches de cervelet vraisemblablement en raison d'une faible pénétration du composé dans ces tissus. Suite à cela, la synthèse de la coumarine DEACAS-Glutamate a été réalisée et testée par nos collaborateurs. Cette dernière semble très intéressante à un et deux photons sur tranches de cervelet. Néanmoins, il reste à confirmer ces résultats sur une gamme de concentration bien définie de ce composé. Toutefois, si ces résultats se révèlent être positifs cela marquera un tournant marquant dans l'application de précurseurs photolabiles du glutamate en neurosciences. En effet, l'efficacité de photolyse de ce composé laisse présager que ce dernier devrait pouvoir être utilisé à des concentrations de l'ordre de la dizaine de micromolaires, réduisant ainsi considérablement les coûts des manipulations nécessitant l'usage des précurseurs photolabiles du glutamate. Cependant, pour optimiser son utilisation par les biologistes, le développement d'une version plus soluble dans l'eau devra être réalisé.

Ensuite, l'élaboration d'un analogue photolabile de la nicotine permettant l'utilisation d'autres outils photochimiques absorbants dans le bleu (400-450 nm) a également été entreprise. Ce projet en collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Vitale a permis l'élaboration d'un précurseur photolabile de la nicotine utilisable à 500 nm avec une très bonne efficacité de photolyse à un photon. Ce composé a été confié à nos collaborateurs et sera prochainement testé sur culture de cellules chromaffines. Un second groupement protecteur photolabile a également été synthétisé de manière fortuite. Ce dernier ne peut pas être utilisé comme précurseur photolabile de la nicotine puisqu'il est difficilement purifiable et se dégrade en solution dans l'eau à -20 °C.

Pour finir, une série de coumarines à la structure rigidifiée a été réalisée en utilisant des réactions dominos pallado-catalysées. Ainsi, trois composés ont été synthétisés et leurs propriétés photophysiques et photochimiques ont été caractérisées. Les résultats révèlent que la rigidification apportée par la formation d'un cycle à cinq chaînons sur des GPPs de type 4-méthylcoumarynyle peut améliorer les propriétés à un photon. De plus, les propriétés à deux photons sont grandement impactées par cette rigidification avec une efficacité de photolyse remarquable. Le développement de tels composés est très intéressant, puisqu'ils montrent d'excellentes propriétés à deux photons avec une structure pouvant être modifiée. Cela devrait permettre de rendre ce type de structure plus soluble dans l'eau pour développer de nouveaux précurseurs photolabiles de biomolécules. Cependant, les premiers essais de fonctionnalisation de ces structures ont déjà été réalisés au laboratoire et il semble que ces composés, notamment le composé **81** de type ène-yne, soient particulièrement sensibles aux conditions acides empêchant l'utilisation de certains groupements protecteurs. De ce fait, d'autres stratégies pour augmenter leurs solubilités dans l'eau devront être utilisées pour tirer pleinement potentielles de cette nouvelle série de coumarines.

Lors de ces travaux de thèse, de nouvelles coumarines pouvant libérer efficacement le glutamate ou d'autres biomolécules par excitation mono ou bi-photonique ont été développées. Une fois les problèmes de solubilités résolus, ces molécules pourront grandement améliorer l'utilisation des GPPs en biologie. De plus, un précurseur de la nicotine a été développé avec une synthèse courte et efficace et des propriétés de libération de la nicotine par excitation monophotonique très importantes. Cette dernière sera testée très prochainement par nos collaborateurs et si les résultats sont satisfaisants, elle pourrait offrir une alternative avantageuse aux précurseurs photolabiles de la nicotine commerciaux.

Publications réalisées durant cette thèse :

- Morville, C*, Chaud, J.*, Bolze, F. & Specht, A. Photolytical reactions for light induced biological effectors release: on the road to the phototherapeutic window. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 101, 291–304, (2021). doi:10.1007/s10847-021-01071-9.

- Morville, C.* Chaud, J.* Bolze, F. Garnier, D. Chassaing, S. Blond, G & Specht, A. Two-Photon Sensitive Coumarinyl Photoremovable Protecting Groups with Rigid Electron-Rich Cycles Obtained by Domino Reactions Initiated by a 5- exo -Dig Cyclocarbopalladation. *Org. Lett.* 23, 7580–7585 (2021).doi: 10.1021/acs.orglett.1c02778

- Abou Nakad, E., Chaud, J., Morville, C., Bolze, F. & Specht, A. Monitoring of uncaging processes by designing photolytical reactions. *Photochem.Photobiol. Sci.* 19, 1122-1133 (2020) doi:10.1039/D0PP00169D.

Présentation réalisées durant cette thèse:

Poster : Synthesis and application of 2-photon sensitive caged glutamate. Clément Morville, Théo Rossi, Théo Gagneux, Philippe Isope, Frédéric Bolze, Alexandre Specht – RSC poster twitter Conférence 02-03-2021

Partie expérimentale et références

VI. Experimental part

1. General procedures and general equipment

All manipulation of light sensitive compounds (reactions, purifications, photophysical studies) were performed in the dark with a RGB LED projector MEIKEE (25W) set on the red light (~ 630 nm) and without parasitic light in particular from computer screens.

The reagents and anhydrous solvents used for the synthesis were ordered to Sigma-Aldrich, TCI EUROPE, Acros Organics or Alfa Aesar. All commercial reagents were used without any further purification except dichloromethane (CH₂Cl₂) (distilled over CaH₂ under an argon atmosphere) and THF (distilled over sodium/benzophenone under an argon atmosphere) before use.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded at 400, 500 or 700 and 100, 125 or 175 MHz, respectively using the following NMR spectrometers: 400 MHz Bruker Avance III, 500 MHz Bruker Avance III and 700 MHz Bruker equipped with a TCI Z-gradient cryoprobe and an Avance III-HD console. Chemical shifts (δ) are indicated in ppm with respect to the NMR solvents residual signal (CDCl₃: 7.26 ppm, CD₂Cl₂: 5.32 ppm for ¹H NMR and CDCl₃: 77.16 ppm, CD₂Cl₂: 54.00 ppm for ¹³C NMR). The attributions are given in the following manner: chemical shift followed in parenthesis: (s, br, d, t, q, m, dd, dq corresponding respectively to singlet, broad, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, doublet of a doublet, doublet of a quadruplet), number of protons, and coupling constant in Hz.

The LCMS mass spectra were carried out using an Agilent 1200 SI/ QTOF 6520 spectrometer coupled to a Hypersil Gold C18 1.9 μm particle size and 1x30 mm dimension and the ESI spectra were performed using an Agilent 1200 SL spectrometer MicroTOF (Bruker) equipped with an electrospray source.

Thin Layer Chromatography (TLC) were realized using aluminum plates covered with silica gel 60 F254 Merck. Column chromatography were done on silica gel (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) Merck. Some purifications were performed using thin layer chromatography plates from Miles Scientific (Silica gel GF, UV254, 20x20 cm, 1500 micron). Flash chromatography purifications were performed using a combiflashRf from Teledyne ISCO.

HPLC analysis were realized on a high-performance chromatography system from Waters® (Waters1525 pump with Waters 2996 detector) equipped with Thermo Betabasics 5-micron (4.6, 250 nm) analytical column. Analysis were done using a gradient starting from 100% mQ H₂O acidified with 0.01% of TFA and reaching 100% acetonitrile in 30 min. HPLC purification were realized over a series of high-performance chromatography Waters (Waters 600 double body pump with Waters 2996 detector, equipped with a Thermo Betabasics 5-microns (10, 250 mm) column. The HPLC purifications were done using a gradient starting from 100% mQ H₂O acidified with 0.01% of TFA and reaching 100% acetonitrile in 30 min.

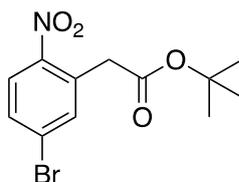
For the microwave heated reactions, a Monowave 300 from Anton Paar was used.

For the isomerization, the source of irradiation is a Lumos 43 from Atlas Photonics based on UV-led technology, with a typical output of 200 mW/cm² and the wavelength of irradiation was set to 430 nm.

2. Chemical synthesis

2.1 Synthesis of photolabile glutamate precursors

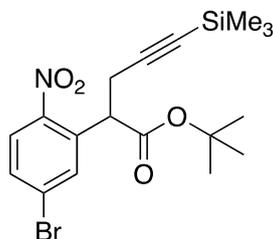
Synthesis of tert-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)acetate (2)



In an ice-cold solution of t-BuOK (2.77 g, 24.75 mmol, 5.0 eq.) in 12 mL of anhydrous DMF was slowly added a solution of 4-nitrobenzene (1.00 g, 4.95 mmol, 1.0 eq.) and tert-butylchloroacetate (1.05 mL, 6.93 mmol, 1.4 eq.) in 10 mL of anhydrous DMF. The mixture was stirred for two hours at room temperature under argon atmosphere. When all reactants were consumed a 5% HCl aqueous solution was added at 0 °C. The solution was then filtered and washed with water. Then the solid was dissolved in CH₂Cl₂ and the solution was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to afford 1.53 g (97%) of pure product as a yellowish solid.

R_f = 0.57 (Heptane/EtOAc: 8/2 in vol.). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 2H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.5, 147.8, 136.2, 132.4, 131.5, 128.2, 126.7, 82.2, 40.8, 28.0.

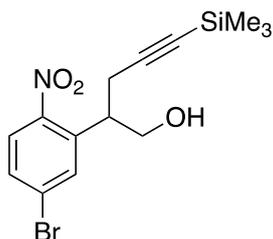
Synthesis of tert-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)-5-(trimethylsilyl)pent-4-ynoate (3)



To a solution of tert-butyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)acetate (2.00 g, 6.33 mmol, 1.0 eq.) in 50 mL of anhydrous acetonitrile was added at 0 °C dibenzilideneundecene (DBU) (1.1 mL, 7.6 mmol, 1.2 eq.). The dark violet solution was stirred at this temperature for 10 min then (3-bromoprop-1-yn-1-yl)trimethylsilane (1.0 mL, 7.06 mmol, 1.1 eq.) was added and the solution allowed to warm at room temperature and stirred at this temperature for 24 h. The reaction mixture was then concentrated under vacuum and quenched with water and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give a yellow oil. Purification by automated flash chromatography (Simply Connect C18, 24 g, water/MeCN: 10:0 to 0:10 in 30 min, 35 mL/min) was carried out to afford 2.21 g (82%) of pure product as a yellowish solid.

R_f = 0.47 (Heptane/EtOAc: 8:2 in vol.)¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 4.23 (dd, J = 8.8, 5.3 Hz, 1H), 3.04 (dd, J = 17.2, 5.3 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 17.2, 8.8 Hz, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.09 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.2, 148.1, 135.0 (2S), 135.0, 131.5, 127.7, 126.5, 103.0, 88.4, 82.7, 47.7, 28.0, 23.4, 0.0.

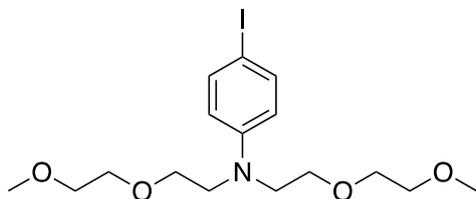
Synthesis of methyl 2-(5-bromo-2-nitrophenyl)-5-(trimethylsilyl)pent-4-ynoate (4)



To a solution of tert-butyl-2-(2-amino-5-bromophenyl)-5-trimethylsilyl)pent-4-ynoate (773 mg, 1.95 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL of freshly distilled THF at 0 °C was slowly added a 1M solution of DIBAL-H in hexane (5.85 mL, 5.85 mmol, 3.0 eq.). The reaction mixture was stirred at this temperature for 3 h. Then 10 mL of ethyl acetate was added and the organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed under vacuum. The crude product was purified using column chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc : 10:0 to 8:2 in vol.) to afford 387 mg (56%) of the pure product.

R_f = 0.7 (Heptane/EtOAc 5:5 in vol.) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 4.02 – 3.89 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 2.76 – 2.62 (m, 2H), 0.11 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.5, 137.8, 132.5, 130.9, 127.4, 125.9, 103.2, 88.4, 64.6, 40.4, 22.9, 0.0.

Synthesis of 8-(4-iodophenyl)-2,5,11,14-tetraoxa-8-azapentadecane (6)

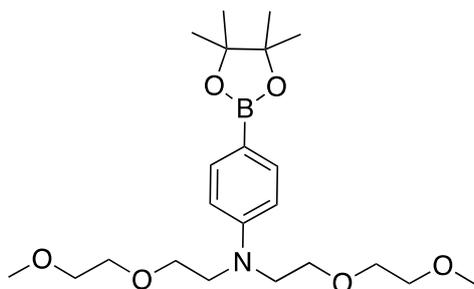


In a solution of (2,5,11,14-tetraoxa-8-azapentadecan-8-yl)benzene (0.45 g, 1.51 mmol, 1.0 eq.) and ammonium acetate (11 mg, 0.15 mmol, 0.1 eq.) in 15 mL of dry MeCN at 0 °C was added N-iodosuccinimide (0.37 g, 1.66 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred at this

temperature for 5 min then water was added and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layers were washed with brine and dried over MgSO₄ and solvents were removed under reduced pressure to afford 0.68 g (99%) of product as a green oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44 – 7.39 (m, 2H), 6.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.62 – 3.49 (m, 16H), 3.38 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 147.4, 137.7, 114.1, 92.1, 72.6, 70.6, 68.3, 59.1, 50.9. MS (ESI): [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₂₇INO₄⁺: 424.0985; found 424.0985

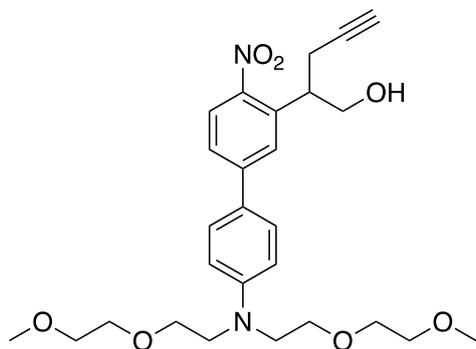
Synthesis of 2-(4'-(bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)pent-4-yn-1-ol (7):



In a solution of 8-(4-iodophenyl)-2,5,11,14-tetraoxa-8-azapentadecane (0.75 g, 1.79 mmol, 1.00 eq.) in 10 mL of anhydrous DMSO were added bis(pinacolato)diboron (0.50 g, 1.94 mmol, 1.10 eq.) and potassium acetate (0.23 g, 2.29 mmol, 1.30 eq.). Then three freeze-pump-thaw cycle were applied and PdCl₂(PPh₃)₂ (37 mg, 0.05 mmol, 0.03 eq.) was added and a last cycle was carried out. The solution was heated at 80 °C overnight. When all starting material was consumed water was added and the solution was extracted three times with ethyl acetate. Organics layer was then washed with a brine solution and dried over MgSO₄ and solvent was removed under reduced pressure to afford a dark oil. The crude product was purified using silica chromatography (EtOAc/ Heptane: 2:8 in vol.) to afford 386 mg (52%) of the pure product.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.63 – 3.50 (m, 16H), 3.38 (s, 6H), 1.26 (s, 12H).

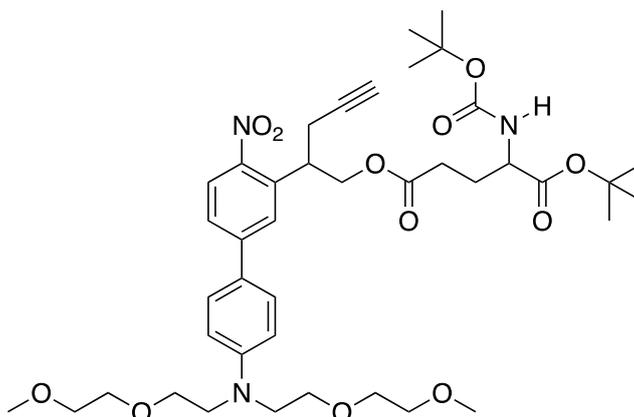
Synthesis of EANBP-Alkyne (8)



2-(5-bromo-2-nitrophenyl)-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-ol (135 mg, 0.38 mmol, 1.00 eq.), 1-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-4-(2,5,11,14-tetraoxa-8-azapentadecan-8-yl)benzene (193 mg, 0.46 mmol, 1.20 eq.) and K_2CO_3 (131 mg, 0.94 mmol, 2.50 eq.) were dissolved in 10 mL of a mixture of Toluene/EtOH/ H_2O (7:2:1). Three freeze-pump-thaw cycle were performed and $Pd(PPh_3)_4$ (22 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq.) was introduced and a last freeze-pump-thaw cycle was performed. The mixture was heated in a microwave at 80 °C for 45 min. Then the solution was extracted with CH_2Cl_2 and solvents were removed under reduced pressure. The brown crude oil was treated with a 1M TBAF solution in THF (0.38 mL, 0.38 mmol, 1.00 eq.) at room temperature for 1 h. Water was added and the solution was extracted with CH_2Cl_2 , the organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (Heptane/EtOAc : 5:5 to 0:10 in vol.) to afford the pure product as an orange oil (93 mg, 49%).

$R_f = 0.41$ (EtOAc). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.50 – 7.46 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.81 – 6.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.03 (br, 2H), 3.80 (m, 1H), 3.67 – 3.64 (m, 8H), 3.63 – 3.59 (m, 4H), 3.55 – 3.52 (m, 4H), 2.83 – 2.68 (m, 2H), 2.02 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 148.5, 148.0, 145.9, 136.3, 128.4, 126.1, 126.0, 125.7, 124.8, 112.2, 81.7, 72.1, 70.8, 68.5, 65.2, 59.2, 51.1, 40.7, 21.5, 2.0.

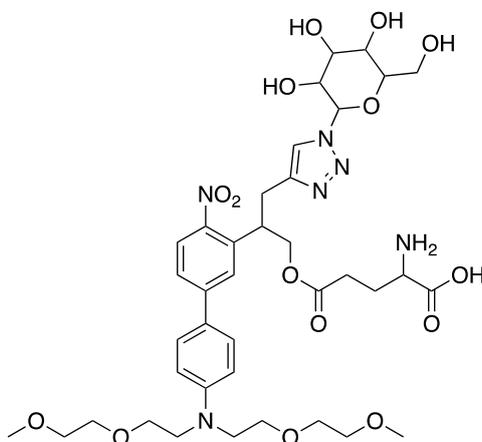
Synthesis of EANBP-Glutamate-OtBu (9)



In a solution EANBP-Alkyne (93 mg, 0.19 mmol, 1.00 eq.) in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂ were added at 0 °C 5-(tert-butoxy)-4-[[[(tert-butoxy)carbonyl]amino]-5-oxopentanoic acid (113 mg, 0.37 mmol, 2.00 eq.), DIC (43 μL, 0.28 mmol, 1.50 eq.) and DMAP (1 mg, 0.01 mmol, 0.05 eq.). After 1 h of stirring the solution was allowed to warm at room temperature and the reaction was stirred overnight. When all starting materials were consumed a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and solvent was removed under vacuum. The orange crude oil was then purified using silica gel (Heptane/ EtOAc 3:7 to 5:5 in vol.) to afford 83 mg (56 %) of pure product as an orange oil.

R_f = 0.6 (EtOAc) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 2.0, 1.7 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.05 (br, 1H), 4.53 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.16 (br, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.69 - 3.64 (m, 8H), 3.63 - 3.60 (m, 4H), 3.55 - 3.52 (m, 4H), 3.39 (s, 6H), 2.75 (m, 2H), 2.43 - 2.26 (m, 2H), 2.02 (m, 1H), 2.03 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.88 - 1.78 (m, 1H), 1.44 (s, 5H), 1.44 (s, 4H), 1.42 (s, 5H), 1.42 (s, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 171.4, 171.4, 148.5, 147.7, 145.9, 135.3, 128.4, 125.9, 125.8, 125.0, 112.2, 82.3, 80.8, 72.1, 71.4, 70.8, 68.5, 66.0, 59.2, 53.4, 51.1, 37.3, 30.3, 29.8, 28.4, 28.1, 22.0, 14.3. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₄₁H₆₀N₃O₁₂⁺: 786.4177, found: 786.4135

Synthesis of GAMBP-Glutamate (10)

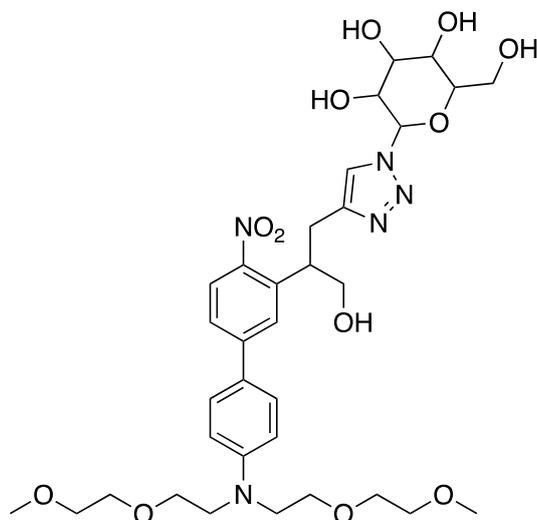


EANBP-Alkyne-Glutamate (70 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq.), 1-Azido-1-deoxy- β -D-Glucopyranoside (22 mg, 0.11 mmol, 1.2 eq.), Na_2CO_3 (2 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq.), proline (2 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq.) and ascorbic acid (2 mg, 0.01 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in a mixture of DMF, Water and *t*-butanol (0.22/0.22/3 mL). The mixture was degassed by three freeze–pump–thaw cycles then copper sulfate (2 mg, 0.01 mmol, 0.1 eq.) was added and a last freeze–pump–thaw cycles were performed. Then the mixture was stirred at 65 °C overnight. After the reaction is completed, the mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. Then this product was dissolved in freshly distilled CH_2Cl_2 (2 mL) and TFA (1 mL) and stirred at room temperature for 6 h. Then solvents were removed under reduced pressure and diethyl ether was added and the supernatant was removed. Then solvent was removed and dried over vacuum and the crude product was purified on HPLC and lyophilized to afford 54 mg (74%) of pure product.

^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7.91 (s, 0.5H), 7.90 (s, 0.5H) 7.87 (d, J = 8.5 Hz, 0.5H), 7.86 (d, J = 8.5 Hz, 0.5H) 7.75 (d, J = 2.0 Hz, 0.5H), 7.73 (d, J = 2.0 Hz, 0.5H), 7.62 (m, 1H), 7.60 – 7.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.53 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.92 – 3.81 (m, 3H), 3.71 – 3.60 (m, 14H), 3.57 – 3.52 (m, 6H), 3.51 – 3.44 (m, 1H), 3.36 (s, 6H), 2.50 (h, J = 5.9, 4.8 Hz, 2H), 2.20 – 2.10 (m, 1H), 2.09 – 1.99 (m, 2H). ^{13}C NMR (126

MHz, MeOD) δ 173.5(2s), 171.8, 149.9, 149.4 (2s), 147.2, 147.2, 146.1, 137.1 (2s), 129.2, 126.8, 126.6, 126.5, 125.8, 123.5, 113.5, 89.5, 89.5, 81.1, 78.5(2s), 78.5, 74.0(2s), 73.1, 71.5, 70.9, 69.7, 68.1(2s), 62.4, 59.2, 52.0, 40.2(2s), 31.8, 30.5, 29.0, 26.7, 23.7. MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{38}H_{54}N_6O_{15}^+$: 835.3725, found: 835.3690.

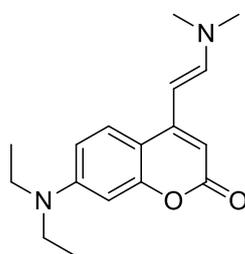
Synthesis of GAMBP (11)



EANBP-Alkyne (20 mg, 0.040 mmol, 1 eq.), 1-Azido-1-deoxy- β -D-Glucopyranoside (10 mg, 49 μ mol, 1.2 eq.), Na_2CO_3 (1 mg, 9 μ mol, 0.2 eq.), proline (1 mg, 4 μ mol, 0.2 eq.) and ascorbic acid (1 mg, 6 μ mol, 0.1 eq.) were dissolved in a mixture of DMF/Water/*t*-butanol (0.11:0.14:1.48 mL). The mixture was degassed by three freeze-pump-thaw cycles then copper sulfate (1 mg, 48 μ mol, 0.1 eq.) was added and a last freeze-pump-thaw cycles was performed. Then the mixture was stirred at 65 °C and kinetic control were carry out by HPLC until all starting material disappear. After the reaction is completed, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (three times). The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The reaction products were purified using silica gel column chromatography (EtOAc to $CH_2Cl_2/MeOH$: 9:1 in vol.) to give 16 mg (57%) of the target compound as an orange oil.

$R_f = 0.14$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1: in vol.). ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.87 (s, 0.5H), 7.86 (s, 0.5H), 7.84 (d, $J = 8.5$ Hz, 0.5H), 7.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 0.5H), 7.73 (d, $J = 2.0$ Hz, 0.5H), 7.71 (d, $J = 2.0$ Hz, 0.5H), 7.58 – 7.53 (m, 3H), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.51 (m, 1H), 3.94 – 3.80 (m, 5H), 3.70 – 3.59 (m, 14H), 3.56 – 3.50 (m, 6H), 3.50 – 3.38 (m, 2H), 3.36 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN) δ 149.6, 149.5, 146.1, 138.3(2s), 129.1, 126.8, 126.3, 126.0, 125.0, 113.1, 88.5, 80.1, 77.9, 73.4(2s), 72.6, 71.2, 70.7, 69.1, 65.7, 65.6, 62.3, 59.0, 51.6, 42.8(2s), 28.4. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_{12}^+$: 706.33, found: 706.33.

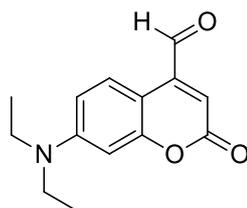
Synthesis of (E)-7-(Diethylamino)-4-[2-(dimethylamino)vinyl]-2H-chromen-2-one (13)



To a solution of 7-(diethylamino)-4-methyl-2H-chromen-2-one (6.0 g, 25.94 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (60 mL) was added DMF-DMA (6.95 mL, 51.88 mmol, 2.0 eq.). The reaction mixture was refluxed for 16 h and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added. The product was extracted three times with CH_2Cl_2 , dried over Na_2SO_4 , filtered and solvents were removed under vacuum to afford a brownish solid in quantitative yield. The product was used without any further purification.

$R_f = 0.35$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$: 3:7 in vol.) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.22 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 3.40 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.99 (s, 6H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

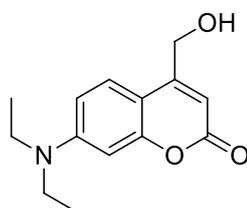
Synthesis of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (14)



In a solution of (E)-7-(Diethylamino)-4-[2-(dimethylamino)vinyl]-2H-chromen-2-one (3.71 g, 12.96 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL of a mixture THF/H₂O (1:1 in vol.) was slowly added at 0°C NaIO₄ (8.31 g, 38.87 mmol, 3.0 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 h and when all starting material was consumed the solution was filtered and washed with CH₂Cl₂. The filtrate was then concentrated under vacuum and a diluted using a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The aqueous layer was extracted four times with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed under vacuum to afford the product in quantitative yield.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.03 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 3.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

Synthesis of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (15)

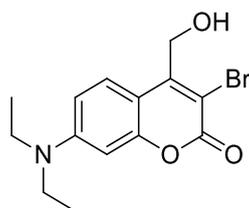


To a solution of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 eq.) in 80 mL of THF at 0 °C was slowly added NaBH₄ (62 mg, 1.63 mmol, 2.0 eq.). Then the solution was allowed to warm at room temperature and stirred for 5 h at room

temperature. Then a saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added and the organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were dried with MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified using silica gel chromatography (Heptane/EtOAc: 10:0 to 7:3 in vol.) to afford 120 mg (60%) of pure product.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.51 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

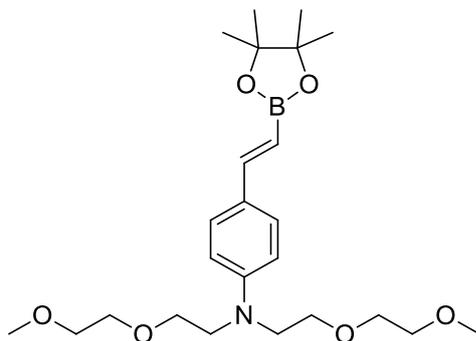
Synthesis of 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (16)



To a solution of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (240 mg, 0.97 mmol, 1.0 eq.) in 2 mL of dried acetonitrile were added NBS (185 mg, 1.04 mmol, 1.1 eq.) and NH_4OAc (8 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.). The solution was stirred at room temperature for 30 min and quenched with water and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent were removed with vacuum. The product was used purified using silica gel (Heptane/ EtOAc: 10:0 to 6:4 in vol.) to afford 240 mg (76 %) of the pure product as a yellow solid.

$R_f = 0.6$ (Heptane/EtOAc: 4:6 in vol.) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.96 (m, 2H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.25 (m, 1H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.5, 155.3, 151.1, 151.0, 126.6, 109.5, 107.7, 105.4, 97.5, 61.8, 45.0, 12.6. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd: 326.0386; found: 326.0392.

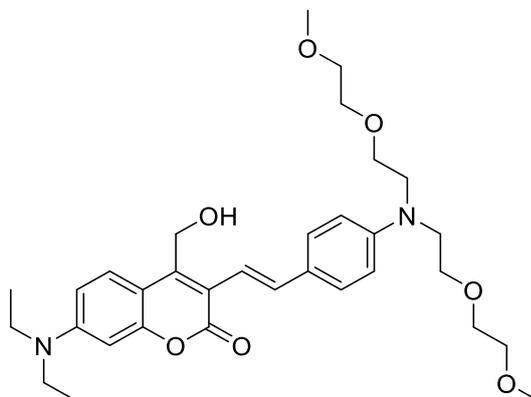
Synthesis of (E)-N,N-bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline (17)



To a solution of 1-iodo-4-(2,5,11,14-tetraoxa-8-azapentadecan-8-yl)benzene (530 mg, 1.25 mmol, 1.0 eq.) in 4 mL of anhydrous toluene were added diisopropylamine (0.72 mL, 5.00 mmol, 4.0 eq.) and Vinylboronic acid pinacol ester (0.30 mL, 1.75 mmol, 1.4 eq.). Two freeze-pump-thaw cycle were carried out and Bis(tri-tert-butylephosphine)palladium(0) (64 mg, 0.13 mmol, 0.1 eq.) was added and a last freeze-pump-thaw cycle was performed. The reaction was stirred at 90 °C for 2 h and when all starting material was consumed, the solvent was removed under reduced pressure and the residue were poured in a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted three times with CH₂Cl₂. Then combined organic layers were dried over Na₂SO₄ to afford the product as a dark violet oil. The crude product was purified on a silica pad, washed with Heptane then eluted with ethyl acetate to afford 520 mg (92%) of pure product as an orange-brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.89 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 3.66 – 3.57 (m, 12H), 3.55 – 3.50 (m, 4H), 3.38 (s, 6H), 1.30 (s, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.8, 148.5, 129.4, 128.7, 125.9, 111.6, 83.2, 72.1, 70.8, 68.6, 59.2, 51.1, 25.0. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₄₁BNO₆⁺: 450.3027, found: 450.3064.

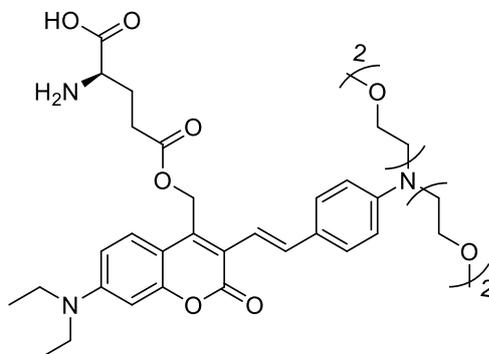
Synthesis of (E)-3-(4-(bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)styryl)-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (18)



To a microwave tube were added, 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (32 mg, 0.14 mmol, 1.00 eq.), K_2CO_3 (19 mg, 0.14 mmol, 1.00 eq.) and a solution of (E)-N,N-bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline (80 mg, 1.8 mmol, 1.3 eq.) in 2 mL of DME. Then 2 mL of water was added and two freeze-pump-thaw cycle were applied and $Pd(PPh_3)_4$ (3 mg, 2 μ mol, 0.02 eq.) was introduced. Then a last freeze-pump-thaw was carried out and the flask was heated at 105 °C and stirred during 45 min using a microwave apparatus. Then a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was added and the product was extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel (Heptane/EtOAc: 7:3 to 5:5 in vol.) to afford the product (60%) as an orange oil.

$R_f = 0.6$ (EtOAc) 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.63 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.40 – 7.37 (m, 2H), 7.00 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 6.69 – 6.65 (m, 2H), 6.61 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.67 – 3.57 (m, 12H), 3.56 – 3.51 (m, 4H), 3.41 (q, $J = 7.1, 4H$), 3.38 (s, 6H) 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 161.7, 154.8, 149.8, 147.7, 144.5, 135.2, 128.2, 126.0, 118.4, 116.0, 111.7, 109.0, 108.6, 97.6, 72.0, 70.6, 68.5, 59.1, 57.9, 51.0, 44.8, 29.7, 12.54. MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{44}N_2O_7^+$: 568.3227, found: 568.3211.

Synthesis of (E)-2-ammonio-5-((3-(4-(bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)styryl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methoxy)-5-oxopentanoate (19)

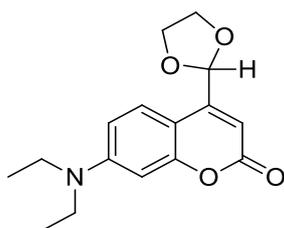


To a solution of (E)-3-(4-(bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amino)styryl)-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (20 mg, 0.035 mmol, 1.00 eq.) in 2 mL of CH₂Cl₂ were added at 0 °C 5-(tert-butoxy)-4-[[[(tert-butoxy)carbonyl]amino]-5-oxopentanoic acid (21.3 mg, 0.070 mmol, 2.00 eq.), DIC (8.2 μL, 0.053 mmol, 1.50 eq.) and DMAP (0.2 mg, 1.8 μmol, 0.05 eq.). After one hour of stirring the solution was allowed to warm at room temperature and the reaction mixture was stirred overnight. When all starting materials were consumed a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and solvent was removed under vacuum. The orange crude oil was then diluted in 1 mL of dried CH₂Cl₂ and 0.5 mL of TFA was added and the solution was stirred for 16h at room temperature. Then solvents were fastly removed using vacuum and purified using HPLC prep (Water 0.1% TFA/ MeCN : 10:0 to 0:10) during 30 min to afford 17 mg (53 %) of the pure product.

¹H NMR (700 MHz, DMSO) δ 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.57 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.34 (m, 1H), 3.60 – 3.52 (m, 13H), 3.46 (m, 8H), 3.26 (s, 6H), 2.03 (m, 2H), 1.96 – 1.90 (m, 2H), 1.15 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ¹³C NMR (176 MHz, DMSO) δ 176.9, 171.7, 160.1, 154.0, 149.7, 147.7, 140.9, 134.3, 128.0, 126.4, 124.8, 117.8, 115.9, 111.5, 109.3, 107.8,

96.5, 71.3, 69.7, 67.9 67.8, 58.5, 58.1, 50.2, 44.0, 25.5, 24.6, 12.4. MS (ESI) : m/z [M+Na]⁺ calcd for C₃₃H₄₃N₃NaO₈⁺: 720.3472; found : 720.3491.

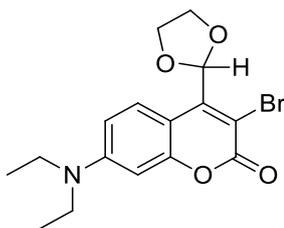
Synthesis of 7-(diethylamino)-3-{2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl}-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (20)



In a round bottom flash were added 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (1.583 g, 6.45 mmol, 1 eq.), toluene (30 mL), ethylene glycol (0.43 mL, 7.75 mmol, 1.2 eq.) and *p*TsOH (111.1 mg, 0.65 mmol, 0.1 eq.). The mixture was heated up overnight and the water was removed by a Dean Stark apparatus. After 16h the mixture was concentrated under vacuum to remove toluene and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ and poured into water. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by chromatography column (CH₂Cl₂/Heptane: 8:2 to 9:1 in vol.) to afford 1.77 g (95%) of pure product.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.08 (s, 4H), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 162.3, 156.8, 150.6, 150.5, 126.2, 108.6, 106.1, 105.7, 99.8, 97.7, 65.3, 44.7, 12.4.

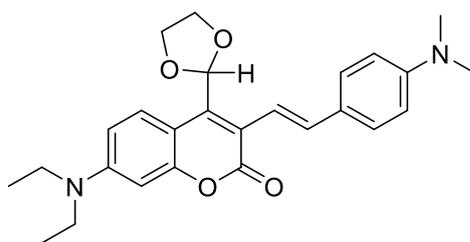
Synthesis of 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one (21)



To a solution of 7-(diethylamino)-3-{2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl}-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (1.05 g, 3.63 mmol, 1 eq.) in 30 mL of dry MeCN was added NH_4OAc (28 mg, 0.36 mmol, 0.1 eq.) and NBS (711 mg, 4 mmol, 1.1 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 1h30. Then the mixture was poured into water and extracted using EtOAc. The organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified using column chromatography (CH_2Cl_2 /Heptane: 0:10 to 8:2) to afford 0.82 g (62%) of pure product.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.38 – 4.28 (m, 2H), 4.19 – 4.10 (m, 2H), 3.40 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 158.0, 155.3, 150.3, 145.9, 126.7, 108.9, 107.6, 106.2, 104.2, 97.4, 65.4, 44.8, 12.4

Synthesis of 7-(diethylamino)-3-[(E)-2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl]-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one (22)

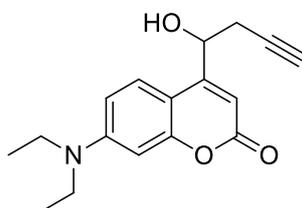


A dry round bottom flask was charged with 4-ethenyl-N,N-dimethylaniline (72 mg, 0.49 mmol, 1.80 eq.) and 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one (100 mg, 0.27 mmol, 1.00 eq.). The flask was degassed and filled with Ar three times then, dried toluene (1.35 mL) and Et_3N (0.04 mL, 0.27 mmol, 1.00 eq) were added. The flask was frozen, degassed and filled with Ar two times then tetrakis(triphenylphosphine)palladium (15.7 mg, 0.014 mmol, 0.05 eq) was added and a last freeze-pump-thaw cycle was applied. The flask was

allowed to warm up to room temperature and then heated up to 100 °C and stirred overnight. Then water was added and extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (Heptane/CH₂Cl₂ 10:0 to 1:9) to afford the pure product.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.55 (dd, J = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.35 – 4.26 (m, 2H), 4.13 – 4.02 (m, 2H), 3.40 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 2.99 (s, 5H), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 6H).

Synthesis of 7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (24)



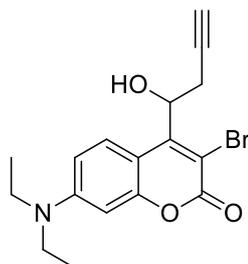
Activation of Zn dust:

Dust Zn (2 g) was washed with diluted HCl (2M), H₂O (3x), EtOH (x2) and dried diethyl ether anhydrous (x2).

Activated zinc (1.79 g, 27.3 mmol, 6.4 eq.) was suspended in 14 mL of freshly distilled THF and propargylbromide (1.27 mL, 11.4 mmol, 2.7 eq.) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1h30 then the resulting solution of 3-bromopropyne zinc in THF was slowly added to the aldehyde (1.05 g, 4.27 mmol, 1 eq.) under Ar. The solution was stirred at room temperature for 1h30. When all starting material were consumed, the reaction was stopped by adding a saturated aqueous solution of NH₄Cl and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified on column chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc: 10:0 to 9:1 in vol.) to afford 829 mg (68%) as a pure product.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.37 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.51 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.10 (dd, $J = 7.1, 4.7$ Hz, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.33 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.77 (dd, $J = 4.7, 2.7$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 4.7, 2.7$ Hz, 1H), 2.61 (dd, $J = 7.2, 2.7$ Hz, 1H), 2.56 (dd, $J = 7.2, 2.6$ Hz, 0H), 2.07 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

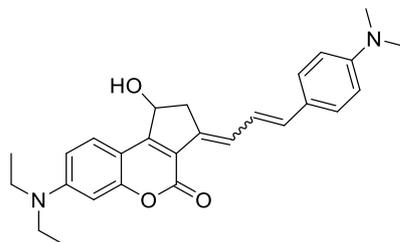
Synthesis of 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (25)



To a solution of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (894 mg, 3.62 mmol, 1eq) in dry acetonitrile (18 mL) were added NBS (707 mg, 3.98 mmol, 1.1 eq.) and NH_4OAc (28 mg, 0.36 mmol, 0.1 eq.). The reaction mixture was then stirred for 40 min and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added and extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified using column chromatography (Heptane/ EtOAc: 10:0 to 5:5 in vol.) to afford 1.05 g (92%) of pure product.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.56 (dd, $J = 9.4, 2.7$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.58 (m, 1H), 3.39 (q, $J = 7.1$ Hz, 6H), 2.89 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.10 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 158.3, 155.4, 152.8, 150.6, 127.8, 108.9, 106.4, 104.3, 97.5, 79.6, 73.8, 71.7, 44.8, 26.1, 12.6. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrNO}_3^+$: 364.0543, found: 364.0530.

Synthesis of (E)-7-(diethylamino)-3-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate (26)



Under an argon atmosphere, a microwaved tube was filled with N,N-dimethyl-4-[(E)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline (91 mg, 0.33 mmol, 1.3 eq.), K₂CO₃ (35.3 mg, 0.26 mmol, 1 eq.), and 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (93 mg, 0.26 mmol, 1 eq.). To this was added 1,2-dimethoxyethane (3 mL) and distilled water (1 mL). The mixture was degassed by two “freeze-pump-thaw” cycles before adding tetrakis(triphenylphosphine)palladium (3.5 mg, 3 μmol, 0.02 eq.) and a last cycle was applied. The tube was allowed to warm up to room temperature and was heated at 105 °C during 45 min using a microwave apparatus. The reaction mixture was then poured into NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The product was purified on preparative TLC (EtOAc/heptane 5:5 in vol.) to afford 42.5 mg (39%) of product as a reddish solid. The product was diluted in 25 mL of CH₂Cl₂ and irradiated using a LED-apparatus for 2h to afford the trans product in quantitative yield.

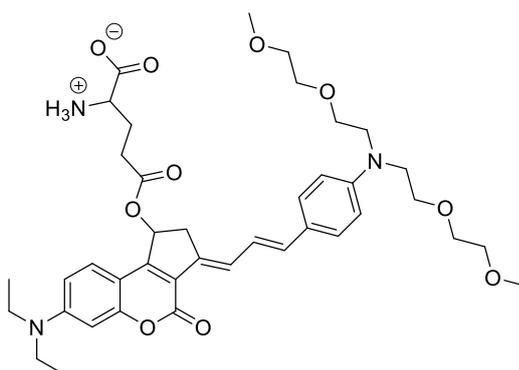
Cis Isomer (26a):

Rf = 0.74 (EtOAc/heptane 5:5 in vol.), ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.67 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 6.73–6.66 (m, 3H), 6.59 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.54–6.49 (m, 2H), 5.46 (dd, J = 7.9, 2.9 Hz, 1H), 3.38–3.30 (m, 5H), 2.97 (s, 6H), 2.82 (m, 1H), 1.18 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159.5 (2C), 156.5, 155.1, 150.4, 150.0, 135.4, 133.3, 127.7, 126.1, 124.0, 122.6, 120.1, 112.7, 109.3, 107.2, 97.7, 72.8, 44.9, 40.7, 29.8, 12.7.

Trans Isomer (26b):

^1H NMR (700 MHz, CD_2Cl_2) δ 7.98 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.77 (m, 1H), 6.67 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.64 – 6.60 (m, 2H), 6.59 – 6.56 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.60 – 3.53 (m, 1H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.96 (s, 7H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H), ^{13}C NMR (176 MHz, CD_2Cl_2) δ 166.2, 164.3, 159.1, 156.9, 152.1, 151.0, 150.7, 136.1, 134.0, 132.3, 128.0, 126.5, 126.1, 124.3, 122.7, 122.6, 122.2, 114.3, 112.8, 109.8, 107.2, 97.9, 74.4, 56.1, 45.3, 40.7, 37.0, 12.8. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5^+$: 565.2697, found : 565.2701.

Synthesis of tert-butyl 2-[[tert-butoxy]carbonylamino]-5-[[3Z]-7-(diethylamino)-4-oxo-3-[(2E)-3-[4-(2,5,11,14-tetraoxa-8-azapentadecan-8-yl)phenyl]prop-2-en-1-yl (32)

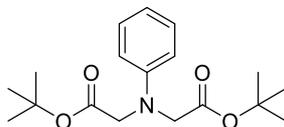


Under an argon atmosphere, a microwaved tube was filled with N,N-dimethyl-4-[(E)-1-[(E)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]-4-(2,5,11,14-tetraoxa-8-

azapentadecan-8-yl)benzene (81.4 mg, 0.18 mmol, 1.3 eq.), K_2CO_3 (20.8 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.), and 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (55 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.). To this was added 1,2-dimethoxyethane (3 mL) and distilled water (1 mL). The mixture was degassed by two "freeze-pump-thaw" cycles before adding tetrakis(triphenylphosphine)palladium (17.5 mg, 15 μ mol, 0.1 eq.) and a last cycle was applied. The tube was allowed to warm up to room temperature and was heated at 105 °C during 45 min using a microwave apparatus. The reaction mixture was then poured into $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under vacuum. Then the crude product was diluted in 2 mL of anhydrous CH_2Cl_2 and 5-(tert-butoxy)-4-[[tert-butoxy]carbonyl]amino-5-oxopentanoic acid (21.34 mg, 0.07 mmol, 2.00 eq.), DIC (8.2 μ L, 53 μ mol, 1.50 eq) and DMAP (0.21 mg, 1.8 μ mol, 0.05 eq.) were added at 0°C. After one hour of stirring the solution was allowed to warm at ambient temperature and the reaction was stirred overnight. When all starting materials were consumed a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was added and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and solvent was removed under vacuum. The orange crude oil was then purified using HPLC prep (Water 0.1% TFA/ MeCN: 40/60) to afford 4.4 mg (10%) of pure product.

NMR: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 7.04 (s, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.67 – 6.58 (m, 3H), 6.43 (s, 1H), 5.09 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 3.76 – 3.31 (m, 34H), 3.22 – 3.13 (m, 1H), 2.97 – 2.80 (m, 2H), 2.47 (qd, J = 15.4, 13.7, 7.9 Hz, 3H), 2.24 (d, J = 20.9 Hz, 2H), 1.91 (s, 1H), 1.44 (dd, J = 13.4, 5.2 Hz, 18H), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 171.3, 170.3, 157.7, 155.2, 154.4, 150.2, 149.2, 143.9, 132.2, 132.1, 126.9, 124.5, 124.5, 123.2, 122.5, 121.0, 113.2, 108.6, 108.6, 97.0, 81.4, 81.3, 78.9, 70.9, 69.5, 66.7, 58.1, 51.6, 44.1, 27.0, 26.9, 11.4.

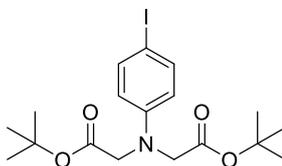
Synthesis of di-tert-butyl 2,2'-(phenylazanediyl)diacetate (35)



To a solution of aniline (800 mg, 8.6 mmol, 1.0 eq.) in 8 mL of DMF were added TBAI (317 mg, 859 μ mol, 0.1 eq.), tert-butyl bromoacetate (2.8 mL, 18.9 mmol, 2.2 eq.) and DIPEA (3.3 mL, 18.9 mmol, 2.2 eq.). The reaction was then heated using a microwave apparatus at 120 °C for 1h. Then a saturated aqueous solution of NH_4Cl was added and the solution was extracted using CH_2Cl_2 . The organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent were removed using vacuum. The crude product was purified using silica column chromatography (Heptane/AcOEt : 10:0 to 9:1 in vol.) to afford 2.3 g (81%) of pure product.

Rf = 0.55 (Heptane/AcOEt 7:3 in vol.) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (m, 2H), 6.74 (m, 1H), 6.58 (m, 2H), 4.00 (s, 4H), 1.45 (s, 18H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 148.2, 129.6, 117.9, 112.2, 81.6, 54.2, 28.2. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NO}_4^+$: 322.2013 found 322.2022 , m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NNaO}_4^+$: 344.1832 found 344.1847.

Synthesis of di-tert-butyl 2,2'-(4-iodophenyl)azanediyl)diacetate (36)

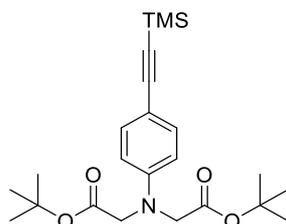


To a solution of di-tert-butyl 2,2'-(phenylazanediyl)diacetate (843 mg, 2.6 mmol, 1.0 eq.) in 25 mL of MeCN were added at 0 °C ammonium acetate (20.2 mg, 262 μ mol, 0.1 eq.) and NIS (708 mg, 3.2 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature

for 20h. Then a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added and extracted three times using CH₂Cl₂. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed under vacuum. The crude product was purified over a silica pad (Heptane/AcOEt 10:0 to 8:2 in vol.) to afford 1.1 g (91%) of pure product.

R_f = 0.65 (Heptane/AcOEt 7:3 in vol.) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (m, 2H), 6.36 (m, 2H), 3.96 (s, 4H), 1.45 (s, 18H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 147.7, 137.6, 114.4, 81.7, 79.2, 54.3, 28.1. MS (ESI): m/z [M+H]⁺ calc. for C₁₈H₂₇INO₄⁺: 448.0979 found 448.0980, m/z [M+Na]⁺ calc. for C₁₈H₂₆INNaO₄⁺: 470.0799 found 470.0810.

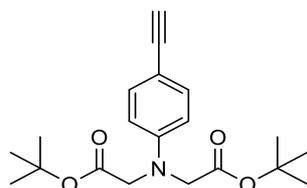
Synthesis of di-tert-butyl 2,2'-((4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl) azanediyl)diacetate
(37)



To a solution of di-tert-butyl 2,2'-((4-iodophenyl)azanediyl)diacetate (100 mg, 224 μmol, 1.0 eq.) in 1 mL of anhydrous THF were added triethylamine (47 μl, 335 μmol, 1.5 eq.) and ethynyltrimethylsilane (47 μl, 335 μmol, 1.5 eq.). Then two freeze-pump-thaw were carried out. Then PdCl₂(PPh₃)₂ (16.4 mg, 22.4 μmol, 0.1 eq.) and CuI (4.3 mg, 22.4 μmol, 0.1 eq.) were added and a last freeze-pump-thaw cycle was applied. The resulting solution was heated at 40 °C for 2h using a microwave apparatus. Then a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added and extracted three times using CH₂Cl₂. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed under vacuum. The crude product was purified over a silica pad (Heptane/AcOEt 10:0 to 8:2 in vol.) to afford 92 mg (99%) of pure product.

$R_f = 0.65$ (Heptane/AcOEt 8:2 in vol.) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.00 (s, 4H), 1.44 (s, 18H), 0.22 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 169.6, 147.3, 133.0, 105.9, 95.6, 91.5, 81.8, 81.6, 54.3, 27.9, 0. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{NO}_4\text{Si}^+$: 418.2408 found 418.2421, m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NNaO}_4\text{Si}^+$: 440.2228 found 440.2243

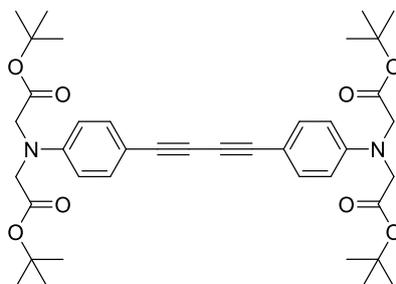
Synthesis of di-tert-butyl 2,2'-((4-ethynylphenyl)azanediyl)diacetate (38)



To a solution of tert-butyl (4-ethynylphenyl)glycinate (900 mg, 3.9 mmol, 1.0 eq.) in 8 mL of DMF were added tert-butyl 2-bromoacetate (632 μ l, 4.3 mmol, 1.1 eq.), TBAI (144 mg, 389 μ mol, 0.1 eq.) and DIPEA (746 μ l, 4.3 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was heated at 140 $^{\circ}$ C for 1h using a microwave apparatus. Then a saturated aqueous solution of NH_4Cl was added and extracted using CH_2Cl_2 . The organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent were removed using vacuum. The crude product was purified using a silica pad (Heptane/AcOEt 10:1 to 9:1 in vol.) to afford the 1.2 g (91%) of pure product.

Rf = 0.48 (Heptane/AcOEt 7:3 in vol.) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 6.50 (m, 2H), 4.00 (s, 4H), 1.45 (s, 18H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 169.7, 148.3, 133.3, 111.9, 110.8, 84.8, 82, 75.1, 54.4, 28.1 MS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_4^+$: 346.2013 found 346.2019, m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4^+$: 368.1832 found 368.1845.

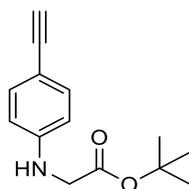
Synthesis of tetra-tert-butyl 2,2',2'',2'''-((buta-1,3-diyne-1,4-diylbis(4,1-phenylene))bis(azanetriyl))tetraacetate. (39)



To a solution of di-tert-butyl 2,2'-((4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)azanediyl)diacetate (92 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) in 1 mL of freshly distilled THF was added a 1M solution of TBAF in THF (0.3 ml, 0.3 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred for 16h at room temperature. Then water was added and extracted three times using CH₂Cl₂. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed under vacuum. The crude product was purified over a silica pad (Heptane/AcOEt 10:0 to 8:2 in vol.) to afford 64 mg (55%) of pure product.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37 (m, 4H), 6.50 (m, 4H), 4.01 (s, 8H), 1.46 (s, 36H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.6, 148.4, 133.8, 111.9, 110.7, 82.1, 72.8, 54.4. MS (ESI): m/z [M+H]⁺ calc. for C₄₀H₅₃N₂O₈⁺: 689.3796 found 689.3812

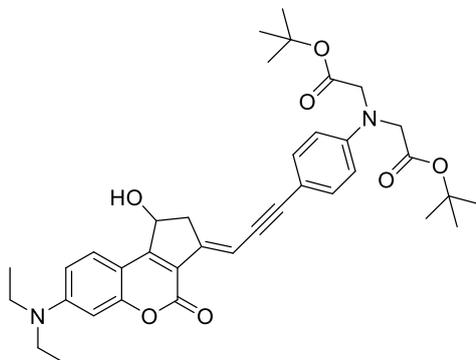
Synthesis of tert-butyl (4-ethynylphenyl)glycinate (41)



To a solution of 4-ethynylaniline (500 mg, 4.3 mmol, 1.0 eq.) in 4 mL of anhydrous DMF were added tert-butyl 2-bromoacetate (1.3 mL, 8.5 mmol, 2.0 eq.), TBAI (158 mg, 427 μmol, 0.1 eq.) and DIPEA (1.5 mL, 8.5 mmol, 2.0 eq.). The reaction was then heated at 140 °C for 1h using a microwave apparatus. Then a saturated aqueous solution of NH₄Cl was added and extracted using CH₂Cl₂. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed under vacuum. The product was used without further purification.

R_f = 0.48 (Heptane/AcOEt 7:3 in vol.) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33 (t, J = 9.1 Hz, 2H), 6.50 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 4.00 (s, 2H), 1.45 (s, 9H). MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calc. for C₁₄H₁₈NO₂⁺ : 232.1332 found 232.1328.

Synthesis of di-tert-butyl 2,2'-((4-(3-(7-(diethylamino)-1-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydrocyclopenta[c] chromen-3(2H)-ylidene)prop-1-yn-1-yl)phenyl)azanediyl)(Z)-diacetate (42)



To a solution of 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (70.3 mg, 193 μmol , 1.0 eq.) in 6 mL of freshly distilled diisopropylamine was added di-tert-butyl 2,2'-((4-ethynylphenyl)azanediyl)diacetate (100 mg, 289 μmol , 1.5 eq.). Then two freeze-pump-thaw were carried out. Then $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (14.1 mg, 19.3 μmol , 0.1 eq) and CuI (7.4 mg, 38.6 μmol , 0.2 eq.) were added and a last freeze pump thaw was applied. The reaction mixture was heated at 120 $^\circ\text{C}$ for 1h using a microwave apparatus. Then a saturated aqueous solution of NH_4Cl was added and extracted three times using CH_2Cl_2 . The organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent were removed using vacuum. The crude product was purified using TLC prep (AcOEt/Heptane 8:2 in vol.) to afford 31 mg (26%) of pure cis product. The product was diluted in 25 mL of CH_2Cl_2 and irradiated using a LED-apparatus for 2h to afford the trans product.

$R_f = 0.44$ (Heptane/AcOEt 5:5 in vol.)

Isomère cis :

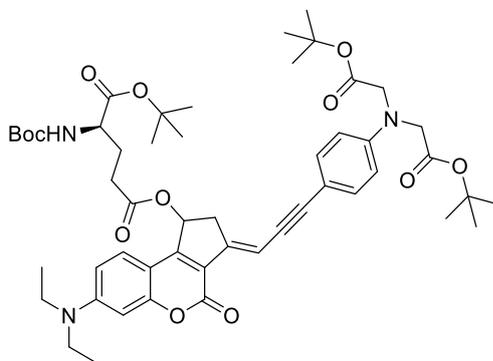
^1H NMR (700 MHz, CD_2Cl_2) δ 7.77 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.66 (dd, $J = 8.8$, 2.3 Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.52 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.38 (m, 1H), 4.04 (s, 4H), 3.46 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.26 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 1.50 (s, 18H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (176 MHz, CD_2Cl_2) δ 169.6, 159.9, 157.6, 157.1, 151.2, 147.7, 143.8, 132.4, 126.8, 118.4,

113.2, 111.9, 109, 106.3, 100.6, 96.9, 96.2, 87.5, 81.7, 71.7, 54.3, 44.8, 44.4, 27.9, 12.3. MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calc. for $C_{37}H_{45}N_2O_7^+$: 629.3221 found 629.3228 , m/z $[M+Na]^+$ calc. for $C_{37}H_{41}N_2NaO_7^+$: 651.3041 found 651.3041.

Isomère trans:

1H NMR (700 MHz, CD_2Cl_2) δ 7.74 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.36 (m, 2H), 6.70 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 6.60 (m, 2H), 6.57 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.35 (m, 1H), 4.05 (s, 4H), 3.52 (m, 1H), 3.48 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 2.91 (m, 1H), 1.50 (s, 18H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (176 MHz, CD_2Cl_2) δ 169.5, 158.7, 157.7, 156.9, 151.1, 147.5, 133, 126.5, 118.4, 112.6, 112.5, 111.9, 109.2, 106.5, 101.4, 97.3, 96.7, 87.1, 81.8, 72.1, 54.3, 40.9, 30.6, 27.8, 12.3. MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calc. for $C_{37}H_{45}N_2O_7^+$: 629.3221 found 629.3228 , m/z $[M+Na]^+$ calc. for $C_{37}H_{41}N_2NaO_7^+$: 651.3041 found 651.3041.

Synthesis of (E)-5-(3-(3-(4-(bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino) phenyl)prop-2-yn-1-ylidene)-7-(diethylamino)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta [c]chromen-1-yl) 1-(tert-butyl) (tert butoxycarbonyl) glutamate (43)



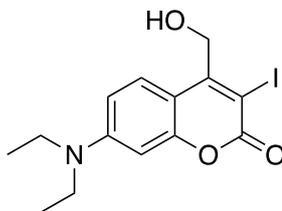
To a solution of di-tert-butyl 2,2'-((4-(3-(7-(diethylamino)-1-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydrocyclopenta[c] chromen-3(2H)-ylidene)prop-1-yn-1-yl)phenyl)azanediyl)(Z)-diacetate in 5 mL of freshly distilled CH_2Cl_2 were added 5-(tert-butoxy)-4-((tert-butoxycarbonyl) amino)-5-oxopentanoic acid (16 mg, 52 μ mol, 1.1 eq.), la DMAP (2.9 mg, 24 μ mol, 0.5 eq.) and Et_3N (15 μ l, 0.10 mmol, 2.2 eq.). The solution was cooled at 0 °C and EDC (10 mg, 52 μ mol, 1.1 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 30 min and then the solution was allowed to warm at room temperature and the reaction was stirred for 16h. The reaction was monitored

using HPLC. Then EDC, triethylamine and 5-(tert-butoxy)-4-((tert-butoxycarbonyl) amino)-5-oxopentanoic acid were added amount wised until all starting material was consumed. The solution was then treated using a pH=5 aqueous solution of citric acid and extracted three time using CH₂Cl₂. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and solvent was removed using vacuum. The crude product was purified using TLC prep (Heptane/AcOEt 5:5 in vol.) to afford the pure product.

Rf = 0.51 (Heptane/AcOEt, 5:5) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 3H), 6.73 (m, 1H), 6.60 (m, 1H), 6.55 (d, 1H), 6.53 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.01 (s, 4H), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.42 (m, 2H), 2.20 (s, 2H), 1.92 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 1.46 (s, 27H), 1.42 (s, 9H), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

2.2. Synthesis of photolabile nicotine precursors

Synthesis of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-3-iodo-2H-chromen-2-one (45) :

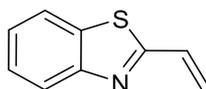


To a stirred solution of 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (100 mg, 0,40 mmol, 1 eq.) in 3 mL of CHCl₃ at 0 °C were added successively N-iodosuccinimide (101 mg, 0.44 mmol, 1.1 eq.) and BF₃.Et₂O (25 μL, 0.20 mmol, 0.5 eq.). The resulting mixture was allowed to warm up to room temperature, and stirred in the dark for 2 h. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, then extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The

crude was purified using column chromatography of silica gel (Heptane/EtOAc, 10:0 to 7.5:2.5), to give 101 mg (67%) of pure product as a bright yellow solid.

R_f = 0.4 (heptane/EtOAc: 5:5 in vol.) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.52 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.34 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.1, 155.9, 155.8, 151.0, 126.6, 109.2, 107.8, 97.1, 83.1, 77.4, 77.1, 76.7, 66.8, 44.8, 12.5. MS (ESI) [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₆INNaO₃⁺: 393.0073, found 393.0074.

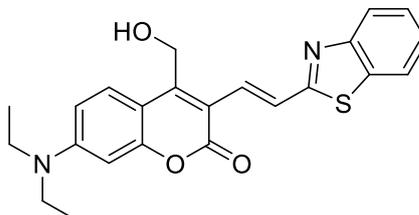
Synthesis of 2-ethenyl-1,3-benzothiazole (47):



To a solution of 2-chlorobenzothiazole (400 mg, 2.36 mmol, 1.00 eq.) in distilled isopropanol (15 mL) was added potassium vinyl trifluoroborate (473.8 mg, 3.54 mmol, 1.50 eq.) and ET₃N (0.33 mL, 2.36 mmol, 1.00 eq.). The solution was degassed using two “freeze-pump-thaw cycles, then PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (86.3 mg, 0.12 mmol, 0.05 eq.) was added, and a last freeze pump thaw cycle was carried out. The solution was heated at 90°C using a microwave apparatus for 1h. The reaction was cooled to room temperature, concentrated using vacuum and water was added and extracted three times using CH₂Cl₂. Then organic layer was dried over Na₂SO₄ and solvent was removed under vacuum to afford the product in quantitative yield.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (ddd, J = 8.2, 1.2, 0.7 Hz, 1H), 7.83 (ddd, J = 8.0, 1.3, 0.7 Hz, 1H), 7.45 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.36 (ddd, J = 8.0, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 17.5, 10.9 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 5.75 (d, J = 10.9 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.1, 153.6, 134.3, 131.4, 126.3, 125.6, 123.3, 123.2, 121.6. MS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₉H₈NS⁺ : 162.0377 found 162.0375

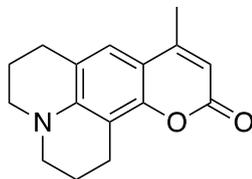
Synthesis of 3-[(E)-2-(1,3-benzothiazol-2-yl)ethenyl]-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (48)



In a Schlenk tube were introduced under argon atmosphere lithium chloride (10 mg, 0.24 mmol, 1.7 eq.), tetra-nbutylammonium chloride (43 mg, 0.15 mmol, 1.1 eq.), NaHCO₃ (35 mg, 0.42 mmol, 3 eq.), 2-ethenyl-1,3-benzothiazole (25 mg, 0.15 mmol, 1.1 eq.) and 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-3-iodo-2H-chromen-2-one (52 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.) The powders were freeze-dried in the Schlenk for 2 h. The flask was then immediately connected to a Schlenk line, purged and refilled with argon 3 times, then dry DMF was added and argon was bubbled into the mixture for 15 minutes. Finally, Pd(OAc)₂ (5 mol%) was added, the tube was sealed with a screw cap, and the mixture heated to 130 °C (microwave) until completion of the reaction. Upon cooling down to room temperature, the reaction was quenched with water, filtered and the purple solid was washed using water.

¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz), δ (ppm): 8.08 (ddd, J = 8.1, 1.2, 0.6 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 7.97 (ddd, J = 8.1, 1.2, 0.6 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.51 (ddd, J = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.42 (ddd, J = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 9.3, 2.6 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 5.69 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.48 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.15 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

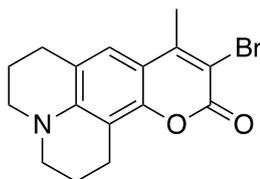
Synthesis of 9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one (52):



To a solution of 8-hydroxyjulolidine (2.04g, 10.78 mmol, 1 eq.) in 50 mL of anhydrous toluene was added methylacetoacetate (1.28 mL, 11.86 mmol, 1.1 eq.) and chlorotitanium triisopropoxide (21.56 mL, 21.56 mmol, 2.00 eq.). The reaction mixture was refluxed overnight. Then water was added and the solution was filtered. The aqueous layer was then extracted three times using CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and solvent were removed using vacuum. The solid was recrystallized in ethanol as solvent and heptane as co-solvent to afford 1.70 g (62%) of yellow crystal.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.79 (q, *J* = 1.1 Hz, 1H), 3.22 – 3.13 (m, 4H), 2.79 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.74 – 2.68 (m, 2H), 2.22 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H), 1.94 – 1.84 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.5, 153.0, 151.0, 145.8, 121.7, 117.9, 108.9, 108.2, 106.7, 49.9, 49.5, 27.7, 21.6, 20.7, 20.5, 18.5.

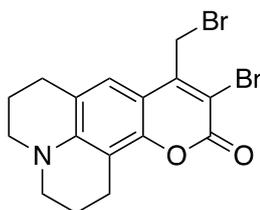
Synthesis of 10-bromo-9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one (53):



To a solution of 9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one (500 mg, 1,96 mmol, 1.0 eq.) in a mixture 1/1 MeCN/THF was added NBS (383 mg, 2,15 mmol, 1.1eq.) and NH₄OAc (15 mg, 0,2 mmol, 0.1eq.). The solution was stirred at room temperature for 1h. Then a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added and extracted using CH₂Cl₂. The organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and solvent was removed using vacuum to afford the pure product in quantitativ yield.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (s, 1H), 3.17 (m, 4H), 2.76 – 2.68 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 1.95 – 1.82 (m, 4H).¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.3, 151.5, 149.6, 145.9, 122.2, 118.6, 108.8, 106.5, 105.2, 49.9, 49.5, 27.8, 21.5, 20.6, 20.4, 19.2. MS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₁₇BrNO₂⁺ : 334.0443 found 334.0440.

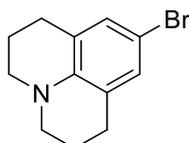
Synthesis of 10-bromo-9-(bromomethyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one (54):



To a solution of 10-bromo-9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one (210 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous 8 mL of THF cooled to – 40 °C, was added a 1M LiHMDS solution in THF (0.82 mL, 0.82 mmol, 1.3 eq.) dropwise. The solution was stirred for 1 hour, then cooled at –78 °C. A solution of N-bromosuccinimide (123 mg, 0,69 mmol, 1.1 eq.) in 3 mL of anhydrous THF was added dropwise, and the mixture was stirred at –78 °C for 2 hours. The mixture was treated with a 0.1M of aqueous HCl solution and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography (Heptane/EtOAc/CH₂Cl₂: 9:1:0 to 8:1:1) to yield the product 40 mg (15%) of pure product as an orange solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.02 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.33 – 3.22 (m, 4H), 2.89 – 2.75 (m, 4H), 1.97 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.2, 150.1, 148.7, 146.4, 121.5, 119.1, 106.7, 106.2, 105.2, 50.0, 49.5, 27.8, 26.9, 21.3, 20.4. MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{NO}_2^+$: 411.9548, found 411.9547 .

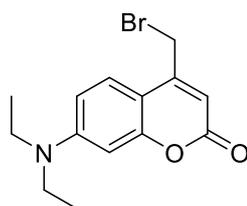
Synthesis of 7-bromo-1-azatricyclo[7.3.1.0^{5,13}]trideca-5,7,9(13)-triene (56):



To a solution of Julolidine (210 mg, 1.21 mmol, 1.0 eq.) in 3 mL of anhydrous MeCN was slowly added at 0 °C a solution of NBS (215 mg, 1.21 mmol, 1.0 eq.) in 1mL. The solution was allowed to warm at room temperature and stirred for 3h. Then a saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added and extracted three times with CH_2Cl_2 . The organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent were removed under vacuum to afford the product in quantitativ yield.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.90 (s, 1H), 3.17 – 3.11 (m, 2H), 2.76 – 2.70 (m, 2H), 2.01 – 1.94 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 176.8, 141.9, 129.2, 123.6, 107.2, 49.9, 27.6, 21.9.

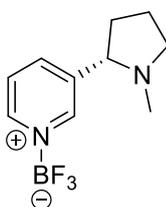
Synthesis of 4-(bromomethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (58) :



To a solution of 4-(hydroxymethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (250 mg, 1.01 mmol, 1.0 eq.) was added dropwise PBr_3 (0.19 mL, 2.02 mmol, 2.0 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched by saturated NaHCO_3 , and aqueous phase was extracted by CH_2Cl_2 three times. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated under vacuum. The crude product was purified using flash chromatography (heptane/AcOEt 0 :10 to 10:0 in vol. in 25 min) to afford 147 mg (50%) of pure product.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.41 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 4.18 (s, 2H), 3.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 0.99 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 161.7, 156.7, 150.9, 150.3, 125.4, 109.2, 108.7, 106.2, 97.9, 44.8, 27.1, 12.5.

Synthesis of trifluoro({3-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridin-1-ium-1-yl})boranuide (60):

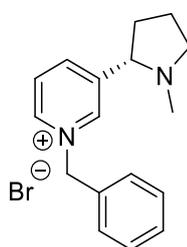


To a solution of (-)-Nicotine (0.5 mL, 3.13 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (10 mL) was added boron trifluorate diethyl etherate (0.5 mL, 3.95 mmol, 1.2 eq.). The solution was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was then removed under vacuum and the solid

was triturated using diethyl ether (3X) and CH₂Cl₂ once in order to get 461 mg of pure product as a yellow oil. (64% of yield)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 8.70 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 8.65 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 7.99 (dt, *J* = 8.0, 2.2 Hz, 1H), 7.51 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 0.8 Hz, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.31 (m, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.59 – 2.48 (m, 1H), 2.41 – 2.32 (m, 1H), 2.32 – 2.19 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 268.7, 267.7, 255.0, 246.7, 242.5, 185.3, 174.4, 156.7, 143.2, 139.4

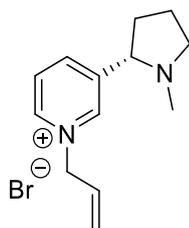
Synthesis of 1-benzyl-3-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridin-1-ium (63)



Nicotine (0.5 mL, 3.08 mmol, 1 eq.) was slowly added in 4 mL of acetic acid. Then the solution was cooled at 0°C and benzyl bromide (0.44 mL, 3.70 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion. The solution was stirred for 3 days. Then solvent was then removed in vacuo and 5 mL water was added. The solution was neutralized with excess solid sodium carbonate and extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent then removed in vacuo. The residue was purified on a small column of silica, washing with CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH 9.5:0.5 in vol. then eluted with CH₂Cl₂/MeOH : 9:1 in vol. to afford the 186 mg (24%) of product as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.51 (m, 1H), 9.49 (m, 1H), 8.34 (dt, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.89 (m, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 7.21 (m, 3H), 6.17 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.48 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.07 (ddd, *J* = 9.6, 7.6, 2.5 Hz, 1H), 2.34 – 2.19 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.84 – 1.63 (m, 2H), 1.51 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 146.3, 143.9, 143.6, 133.3, 129.7, 129.5, 129.4, 128.2, 66.6, 63.7, 56.6, 40.3, 35.6, 23.1.

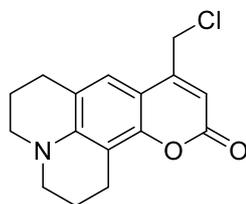
Synthesis of 3-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]-1-(prop-2-en-1-yl)pyridin-1-ium (64)



To a solution of trifluoro({3-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridin-1-ium-1-yl})boranuide (58 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) in 5 ml of anhydrous MeCN was added allyl bromide (26 μ L, 0.3 mmol, 1.2 eq.) The solution was refluxed for 24 h then solvent was removed and the crude product was triturated with diethyl ether (3x), then CH₂Cl₂ (3x) to afford 20.4 mg (40%) of product as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 9.29 (s, 1H), 9.07 (dd, J = 6.1, 1.5 Hz, 1H), 8.92 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 8.1, 6.1 Hz, 1H), 6.25 (ddt, J = 16.9, 10.2, 6.6 Hz, 1H), 5.67 (dq, J = 16.9, 1.2 Hz, 1H), 5.59 (dd, J = 10.2, 1.2 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 6.6, 1.4 Hz, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.49 – 3.37 (m, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.72 (m, 1H), 2.54 – 2.30 (m, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 147.3, 145.0, 135.4, 131.2, 130.0, 124.8, 69.8, 65.1, 57.7, 39.7, 32.2, 22.8.

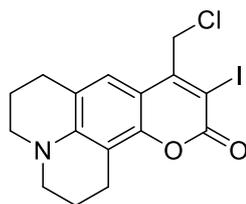
Synthesis of 6-(chloromethyl)-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0^{2,7}.0^{13,17}]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (66)



To a solution of 8-hydroxyjulolidine (2.0 g, 10.57 mmol, 1.0 eq) in 30 mL of anhydrous toluene was added a 1M in hexane of chlorotitanium triisopropoxide (21.14 mL, 21.14 mmol, 2.0 eq.) and ethyl 4-chloroacetoacetate (1.58 mL, 11.62 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was refluxed overnight, then solvent was removed and the crude product was purified using flash chromatography (Heptane/ AcOEt: 10/0 to 0/10 in vol. in 25 min).

R_f: 0.5 (Heptane/AcOEt: 5/5 in vol.). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.18 (m, 4H), 2.78 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.91 – 1.85 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 162.0, 151.5, 150.0, 146.1, 121.1, 118.3, 108.1, 106.9, 106.0, 49.9, 49.5, 41.6, 27.8, 21.5, 20.6, 20.4

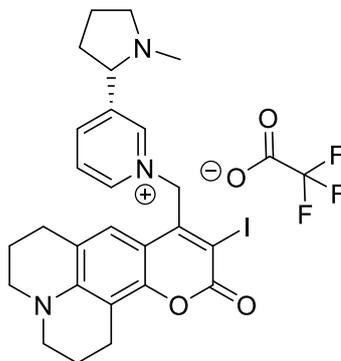
Synthesis of 6-(chloromethyl)-5-iodo-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0^{2,7}.0^{13,17}]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (67)



To a solution of 6-(chloromethyl)-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0^{2,7}.0^{13,17}]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (250 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL of distilled CH₂Cl₂ was added TFA (0.11 mL, 1.47 mmol, 1.5 eq.). Then a solution of NIS (330 mg, 1.47 mmol, 1.5 eq.) in 10 mL of dried acetonitrile was added over 10 min at room temperature. After 2h of stirring a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added and extracted three times with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and solvent was removed under vacuum. The crude product was purified using flash chromatography (C18 column: acidified Water/MeCN 0:10 for 2 min then 10:0 to 6:4 in 10 min then 6:4 for 20 min then 6:4 to 0:10 for 25 min) to afford (52%) of pure product.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.32 – 3.22 (m, 4H), 2.84 (m, 4H), 2.03 – 1.93 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.98, 153.05, 150.90, 146.54, 121.86, 118.89, 106.49, 83.88, 49.98, 49.53, 46.51, 27.79, 21.38, 20.40. MS (ESI) calcd for C₁₆H₁₅ClINO₂⁺: 414.9836; found 414.9837

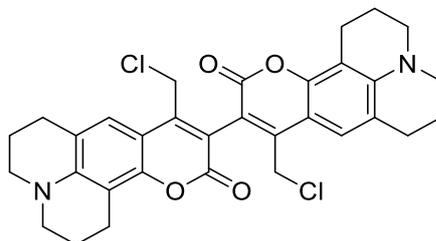
Synthesis of 1-({5-iodo-4-oxo-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,7.0¹³,17]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-6-yl)methyl)-3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin-1-ium trifl (69)



To a solution of 6-(chloromethyl)-5-iodo-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,7.0¹³,17]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (19 mg, 0.046 mmol, 1.0 eq.) in 1 mL of DMF were added TBAI (8 mg, 0.023 mmol, 0.5 eq.) and trifluoro[3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin-1-ium-1-yl]boranuide (42 mg, 0.180 mmol, 4.0 eq.) in 0.5 mL of dried acetonitrile. The solution was stirred in the dark for 16h at 60 °C and when all starting material was consumed the solvent were removed using vacuum. Then the product was purified using HPLC prep (analytical gradient) to afford 22 mg (73%) of pure product.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 9.10 (s, 1H), 9.00 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 8.88 (d, J = 8.2, 1H), 8.30 (dd, J = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.20 – 6.09 (m, 2H), 3.92 (br, 1H), 3.42 (br, 1H), 3.34 (m, 4H), 2.84 (s, 3H), 2.72 (dt, J = 15.3, 5.7 Hz, 3H), 2.59 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.44 – 2.19 (m, 4H), 1.93 (dq, J = 11.0, 5.6 Hz, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 162.8, 162.7, 161.2, 150.5, 148.0, 147.6, 146.9, 145.8, 144.6, 138.9, 134.5, 129.7, 121.4, 120.9, 117.5, 115.0, 107.8, 106.2, 83.2, 63.7, 56.6, 49.7, 49.1, 27.1, 21.4, 20.4, 19.6 (x2), 19.3. MS (ESI): m/z [M]⁺ calculated for C₂₆H₂₉I N₃O₂⁺: 442,1299; found 442.1304.

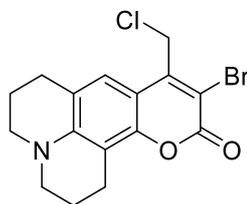
Synthesis of 6-(chloromethyl)-5-[6-(chloromethyl)-4-oxo-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,⁷.0¹³,¹⁷]heptadeca-1(17),6,8-trien-5-yl]-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,⁷. (71)



To a solution of 6-(chloromethyl)-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,⁷.0¹³,¹⁷]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (100 mg, 0.34 mmol, 2.0 eq.) in 9 mL of a mixture CH₂Cl₂/MeCN 1:1 was added NIS (130 mg, 0.58 mmol, 1.7 eq.) and the reaction was stirred at room temperature for 1h. Then a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was introduced and extracted three time using CH₂Cl₂. The crude product was purified using silica column chromatography (Heptane/AcOEt: 0/10 to 5/5 in vol.) to afford 18.5 mg (18%) of pure product.

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.18 (s, 2H), 4.57 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 4.39 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 3.33 – 3.28 (m, 8H), 2.90 – 2.80 (m, 8H), 1.99 (m, 8H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂) δ 184.5, 175.1, 172.9, 170.1, 146.1, 142.5, 136.8, 130.3, 129.7, 73.7, 73.3, 62.9, 51.5, 45.3, 44.3, 44.1. MS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₃₂H₃₀Cl₂⁺ : 576.1583, found 576.1661 .

Synthesis of 5-bromo-6-(chloromethyl)-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,⁷.0¹³,¹⁷]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (73)



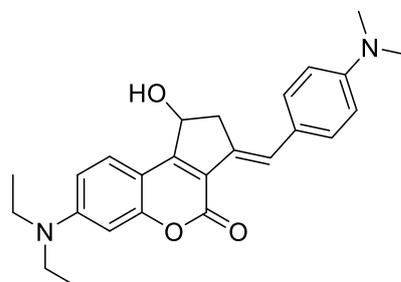
To a solution of 6-(chloromethyl)-3-oxa-13-azatetracyclo[7.7.1.0²,⁷.0¹³,¹⁷]heptadeca-1(17),2(7),5,8-tetraen-4-one (130 mg, 0,45 mmol, 1.0 eq.) in 5 mL of distilled dichloromethane was added NH₄OAc (3.5 mg, 0.045 mmol, 0.1 eq.). Then a solution of NBS (95.8 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq.) in 5 mL of dried acetonitrile was slowly add at room temp. After 2h of stirring a

saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent was removed under vacuum. The crude product was used without further purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.03 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.29 – 3.21 (m, 4H), 2.81 (m, 4H), 1.95 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 177.4, 158.2, 150.1, 148.3, 146.4, 121.7, 119.2, 106.6, 106.3, 105.5, 50.0, 40.8, 29.6, 27.8, 21.3, 20.4.

2.3 Synthesis of highly sensitive coumarin PPG

(3Z)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)benzylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one (74):



Under an argon atmosphere, a microwave tube was filled with 4-(N,N-dimethylamino)phenylboronic acid pinacol ester (97 mg, 0.4 mmol, 1.3 eq.), K_2CO_3 (41.7 mg, 0.302 mmol, 1.00 eq.), and 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **7** (110 mg, 0.302 mmol, 1.00 eq.). To this was added 1,2-dimethoxyethane (3 mL) and distilled water (1 mL). Three “freeze-pump-thaw” cycles were performed before adding tetrakis(triphenylphosphine)palladium (7 mg, 6 μ mol, 0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition. The tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved at 105 °C during 45 min. The solution turned dark brownish. The reaction mixture was poured into $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The product was purified by preparative TLC (EtOAc/Heptane 6:4 in vol.) to afford 27.6 mg (23%) of pure compound as a reddish solid. The product was diluted in 25 mL of CH_2Cl_2 and irradiated at 430 nm using a LED-apparatus for 2h to afford the trans product in quantitative yield.

Cis Isomer (74a):

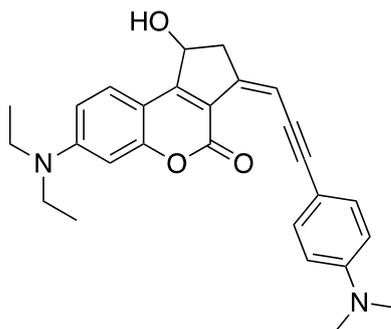
R_f = 0.31 (1:1 EtOAc/heptane in vol.). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.78 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.64 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.61 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (dd, J = 7.0, 5.1 Hz, 1H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.29 (ddd, J = 14.6, 7.0, 1.5 Hz, 1H), 2.94 (s, 6H), 2.87 – 2.82 (m, 1H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 159.8, 157.3, 157.2, 150.7, 149.4, 130.4, 130.1, 126.5 (2 C) 123.4, 119.8, 111.5, 109.0, 106.8, 97.5,

72.8, 46.9, 45.0, 40.7, 12.7. MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calculated for $C_{25}H_{29}N_2O_3$: 405.2173, found: 405.2176.

Trans Isomer (74b):

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.68 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.59 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.46 (dd, $J = 7.9, 3.1$ Hz, 1H), 3.47 (ddd, $J = 17.1, 7.9, 2.1$ Hz, 1H), 3.38 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.96 (s, 6H), 2.94-2.93 (m, 1H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 159.7, 156.4, 154.0, 150.3, 149.1, 132.8, 130.0, 127.0, 126.1, 123.8, 120.8, 112.5, 109.2, 107.2, 97.7, 73.5, 44.9, 41.2, 40.6, 12.7.

Synthesis of (3Z)-7-(diethylamino)-3-{3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-yn-1-ylidene}-1-hydroxy-1H,2H,3H,4H-cyclopenta[c]chromen-4-one (75)



In a microwave vial was added under argon 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (32 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq.), 4-ethynyl-N,N-dimethylaniline (19 mg, 0.13 mmol, 1.5 eq.) and 3 mL of distilled diisopropylamine. Then two freeze-pump-thaw cycle were carried out and $Pd(Cl)_2(PPh_3)_2$ (6 mg, 0.01 mmol, 0.1 eq.) and CuI (3 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq.) were added and a last cycle was performed. The solution was heated at 120 °C for 1 h using microwave apparatus. The reaction mixture was allowed to cool at room temperature and a saturated aqueous solution of NH_4Cl was added and extracted three times with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure. Then the product was diluted in ethyl acetate and the resulting diisopropylamine salt was filtered and solvent was removed under vacuum. The crude was purified using TLC prep (Heptane/EtOAc: 5:5) to afford the pure 13 mg (35%) of pure product.

The compound was then diluted in CH₂Cl₂ and irradiated using LED setup at 430 nm for 2h to afford the full trans-isomer compound.

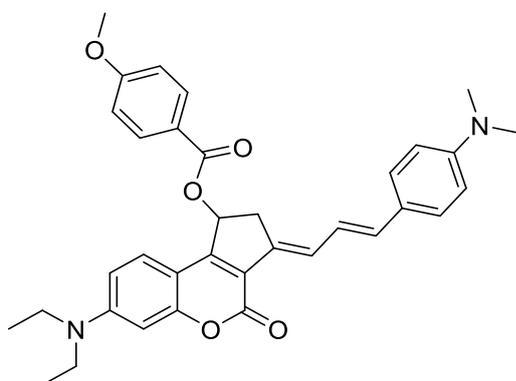
Cis Isomer (75a):

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 6.65 – 6.60 (m, 2H), 6.58 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.76 (m, 1H), 5.35 (dd, *J* = 7.4, 3.9 Hz, 1H), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.25 (ddd, *J* = 16.4, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.81 (ddd, *J* = 16.4, 3.9, 2.0 Hz, 1H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 159.5, 157.6, 157.6, 151.1, 150.0, 142.8, 132.8, 127.0, 118.9, 112.0, 111.6, 109.1, 106.6, 101.6, 97.6, 97.3, 87.2, 72.0, 45.0, 44.5, 40.4, 12.6. MS (ESI) calcd for C₂₇H₃₀N₂O₃: 428.2100, found 428,2105.

Trans Isomer (75b):

¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.34 – 7.32 (m, 2H), 6.69 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.66 – 6.63 (m, 2H), 6.62 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.50 (ddd, *J* = 18.0, 7.7, 2.3 Hz, 2H), 3.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.98 (s, 3H), 2.93 – 2.89 (m, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (176 MHz, CDCl₃) δ 159.0, 157.1, 157.0, 151.0, 150.1, 146.4, 132.6, 126.6, 119.0, 112.0 (2x), 109.3, 106.8, 102.9, 97.8, 87.1, 72.5, 45.0, 41.1, 40.4, 12.6.

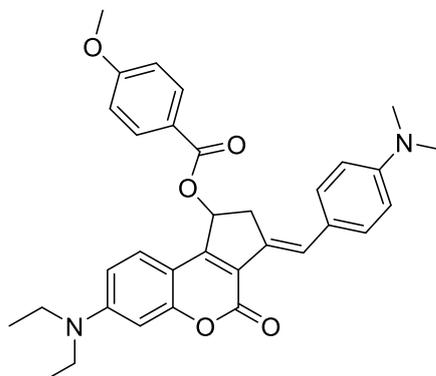
E)-7-(diethylamino)-3-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate (79):



In a dark room, (3E)-7-(diethylamino)-3-[(2E)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-ylidene]-1-hydroxy-1H,2H,3H,4H-cyclopenta[c] chromen-4-one 11 a (29.5 mg, 0.069 mmol, 1.0 eq.), 4-methoxybenzoic acid (12.5 mg, 0.08 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (0.8 mg, 7 μ mol, 0.1 eq.) were dissolved in 3 mL of distilled CH₂Cl₂. DIC (21 μ L, 0.14 mmol, 2.0 eq.) was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 18h, some starting materials were still seen on TLC. 4-Methoxybenzoic acid (5 mg, 0.03 mmol, 0.5 eq.) and DIC (5 μ L, 0.03 mmol, 0.5 eq.) were added again at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 4h30 stirring, some starting materials were still seen on TLC hence, again, 4-methoxybenzoic acid (10.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) and DIC (10.7 μ L, 0.07 mmol, 1.0 eq.) were added at 0 °C. The mixture was further stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 19h stirring, the reaction was completed as revealed by TLC analysis and the volatile compounds were removed under reduced pressure. The product was purified by preparative HPLC to give 26 mg (67 %) of pure product.

R_f = 0.74 (EtOAc /heptane 1:1 in vol). ¹H NMR (700 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.77 (m, 1H), 6.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.64–6.60 (m, 2H), 6.59 – 6.56 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.60–3.53 (m, 1H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.96 (s, 7H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (176 MHz, CD₂Cl₂): δ 166.2, 164.3, 159.1, 156.9, 152.1, 151.0, 150.7, 136.1, 134.0, 132.3, 128.0, 126.5, 126.1, 124.3, 122.7, 122.6, 122.2, 114.3, 112.8, 109.8, 107.2, 97.9, 74.4, 56.1, 45.3, 40.7, 37.0, 12.8. MS (ESI): m/z [M+H]⁺ calculated for C₃₅H₃₇N₂O₅: 565.2697, found : 565.2701.

(3E)-7-(diethylamino)-3-[[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]-4-oxo-1H,2H,3H,4H-cyclopenta[c]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate (80):

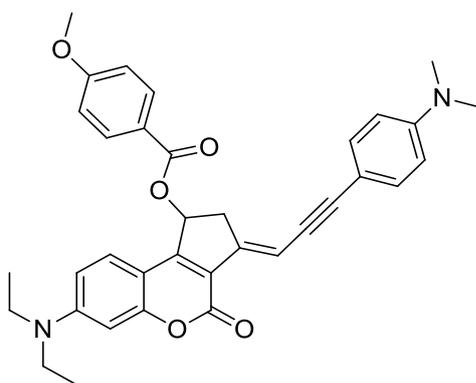


In a dark room, (3E)-7-(diethylamino)-3-[[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]-1-hydroxy-1H,2H,3H,4H-cyclopenta[c]chromen-4-one (54 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq.), 4-methoxybenzoic acid (24.4 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (1.6 mg, 0.013 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in 4.5 mL of distilled CH₂Cl₂ then DIC (42 μ L, 0.27 mmol, 2 eq.) was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 18h stirring, some starting materials were still seen on TLC. Therefore, 4-methoxybenzoic acid (24.4 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and DIC (42 μ L, 0.27 mmol, 2 eq.) were added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 6h30 stirring, some starting materials were still seen on TLC and 4-methoxybenzoic acid (24.4 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and DIC (42 μ L, 0.27 mmol, 2 eq.) were again added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 64h stirring, the reaction was completed as revealed by TLC analysis. The solvent was removed under vacuum. The product was purified by preparative HPLC to give the title compound 3b as a dark reddish solid (14.1 mg, 20%)

R_f = 0.67 (1:1 EtOAc/heptane in vol.), ¹H NMR (700 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.97 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.56 (br s, 1H), 7.41 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.94–6.90 (m, 4H), 6.64 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.60–6.57 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.70–3.65 (m, 1H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.10–3.05 (m, 1H), 3.01 (s, 6H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (176 MHz, CD₂Cl₂): δ 166.1, 164.3, 159.2, 156.9, 151.6, 151.1, 147.8, 135.1, 132.3, 130.5, 126.1, 123.5 (br, 2C), 122.6, 122.5, 114.9, 114.3, 109.8, 107.0, 97.8, 74.8, 56.0, 45.4, 42.2, 38.9, 12.8. MS (ESI): m/z

[M+2H]²⁺ calculated for C₃₃H₃₆N₂O₅: 270,1312, found: 270.1312; m/z [M+H]⁺ calculated for C₃₃H₃₅N₂O₅: 539.2540, found: 539.2562.

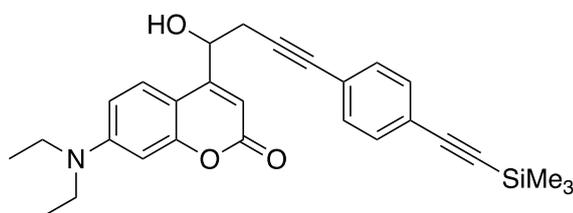
Synthesis of (3Z)-7-(diethylamino)-3-{3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-yn-1-ylidene}-4-oxo-1H,2H,3H,4H-cyclopenta[c]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate (81)



To a solution of (3E)-7-(diethylamino)-3-{3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-yn-1-ylidene}-1-hydroxy-1H,2H,3H,4H-cyclopenta[c]chromen-4-one (27mg, 0.063 mmol, 1.0 eq.) in 2 mL of anhydrous CH₂Cl₂ was added 4-methoxybenzoic acid (12 mg, 0.079 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (1 mg, 0.007 mmol, 0.1 eq.). The solution was cooled at 0 °C and DIC (20 μ L, 0.13 mmol, 2.0 eq.) was introduced and the solution was stirred at this temperature for 30 min. Then the solution was allowed to warm at room temperature and stirred overnight. Then solvent were removed using vacuum and the crude product was purified on TLC prep (Heptane/EtOAc: 7:3) to afford 4 mg (11%) of pure product.

¹H NMR (700 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.04 – 8.01 (m, 2H), 7.44 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.36 – 7.33 (m, 2H), 6.98 – 6.95 (m, 2H), 6.71 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 6.69 – 6.65 (m, 3H), 6.64 – 6.61 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.64 (ddd, J = 18.4, 7.7, 2.4 Hz, 1H), 3.46 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.05 (m, 1H), 3.01 (s, 6H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (176 MHz, CD₂Cl₂) δ 165.5, 163.8, 158.4, 156.7, 154.1, 151.1, 150.1, 146.7, 132.4, 131.8, 126.0, 122.0, 120.3, 113.7, 111.7, 110.3, 109.4, 106.3, 102.2, 97.9, 97.4, 86.6, 73.0, 55.5, 44.8, 40.0, 38.2, 12.2. MS (ESI) calcd for C₃₅H₃₆N₂O₅: 562,2468, found 562.2449.

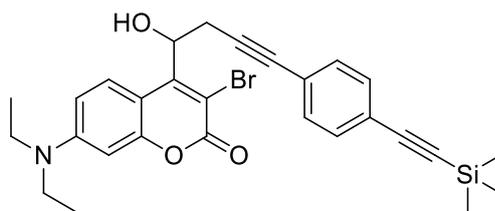
7-(diethylamino)-4-(1-hydroxy-4-{4-[2-(trimethylsilyl)ethynyl]phenyl}but-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (82)



In 5 mL of freshly distilled THF was added 7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (180.0 mg, 0.63 mmol, 1.00 eq), 1-ethynyl-4-iodobenzene (276 mg, 0.95 mmol, 1.50 eq.), triethylamine (0.13 mL, 0.95 mmol, 1.50 eq.). Three freeze-pump-thaw cycle were carried out and Pd(Cl)₂(PPh₃)₂ (22 mg, 0.03 mmol, 0.05 eq.) and CuI (24 mg, 0.13 mmol, 0.20 eq.) were added and a last freeze-pump-thaw cycle was performed. Then the solution was heated in microwave apparatus at 40°C for 2 h. When all starting material was consumed, the solution was diluted with a saturated aqueous solution of NH₄Cl and the aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated with vacuum to afford a yellow oil. The crude product was purified using silica gel (Heptane/EtOAc: 10:0 to 6:4 in vol.) to afford 228 mg (79%) of pure product as an orange solid.

R_f = 0.23 (Heptane/ EtOAc: 6:4 in vol.) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.46 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.37 – 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.29 – 7.26 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 5.22 (dd, *J* = 7.3, 4.8 Hz, 1H), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 5H), 3.02 (dd, *J* = 17.0, 4.8 Hz, 1H), 2.88 (dd, *J* = 17.0, 7.3 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.25 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.7, 156.5, 156.4, 150.5, 131.9, 131.6, 125.0, 123.1, 122.9, 108.7, 106.2, 105.7, 104.7, 98.0, 96.2, 87.1, 83.8, 68.2, 44.8, 28.9, 12.5, 0.0.

Synthesis of 7-(diethylamino)-4-(1-hydroxy-4-{4-[2-(trimethylsilyl)ethynyl]phenyl}but-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (83)



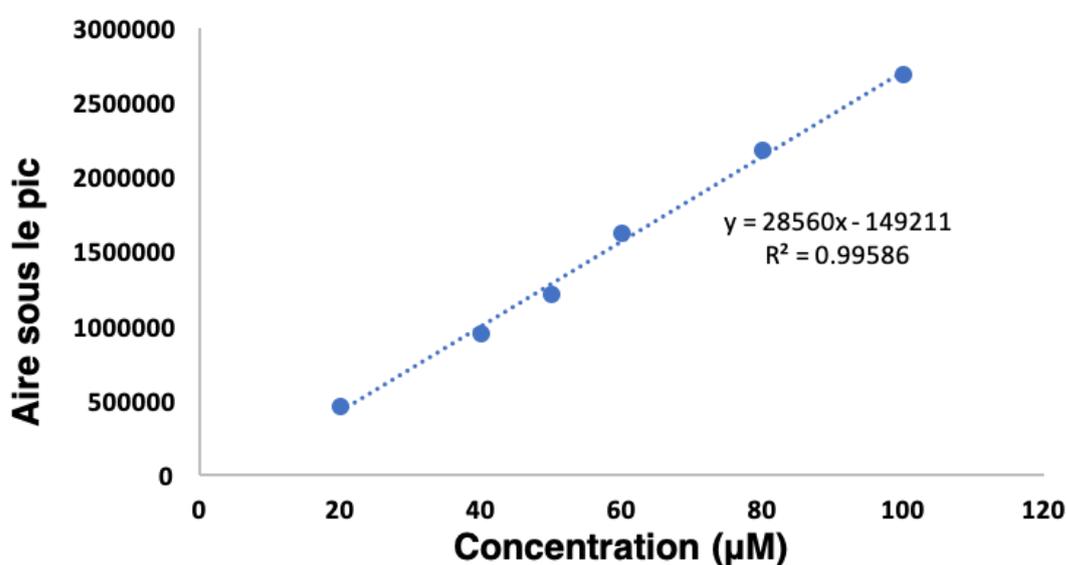
To a solution of 7-(diethylamino)-4-(1-hydroxy-4-{4-[2-(trimethylsilyl)ethynyl]phenyl}but-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one (228 mg, 0.5 mmol, 1 eq.) in 2 mL of dry acetonitrile were added NBS (70 mg, 0.39 mmol, 1.1 eq.) and NH₄OAc (4 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq.). The solution was stirred for 30 min and quenched a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and solvent were removed with vacuum. The product was used purified using silica gel (Heptane/ EtOAc: 10:0 to 6:4 in vol.) to afford 227 mg (85%) of the pure product as a yellow solid.

R_f = 0.36 (Heptane/EtOAc : 6:4 in vol.) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.29 – 7.25 (m, 2H), 7.22 – 7.17 (m, 3H), 6.48 (dd, J = 9.3, 2.7 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 3.31 (q, J = 7.1 Hz, 6H), 3.06 (dd, J = 16.9, 8.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 16.9, 5.8 Hz, 1H), 1.11 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.15 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.5, 155.1, 153.6, 150.4, 131.7, 131.4, 128.1, 123.3, 122.6, 108.9, 106.6, 104.7, 103.8, 97.2, 96.0, 87.2, 83.0, 73.8, 44.7, 27.0, 12.5, 0.0.

2.4 1P and 2P characterization of new PPG

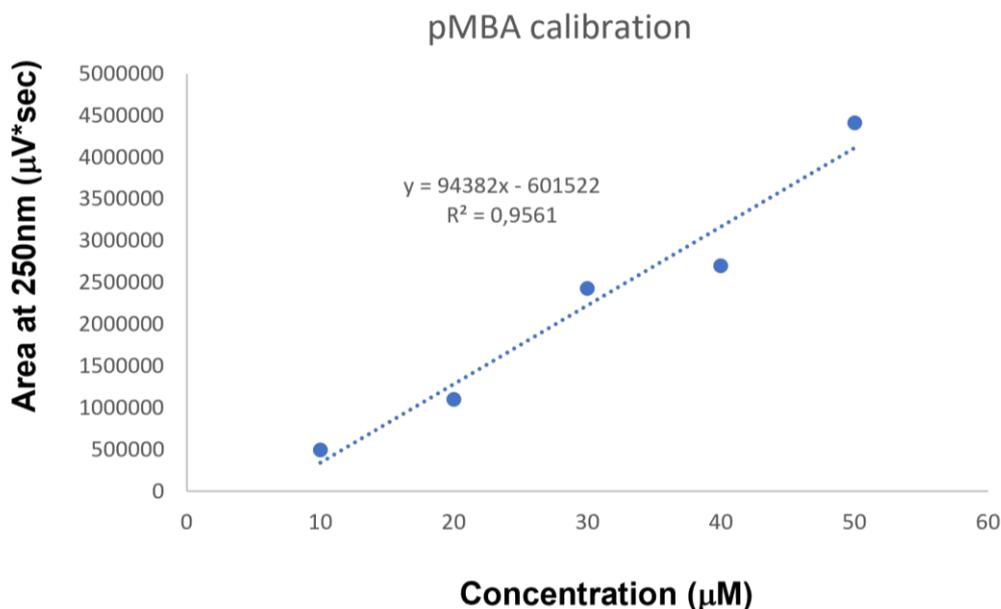
One photon-photolysis

A solution of compound **69** (at 71 μM) in PBS at 25 °C was exposed to a LUMOS 43 LED source (Atlas Photonics Inc.) at 430 nm (Typical optical output: 200 mW/cm²). The reaction was monitored by UV and aliquots of samples (100 μL) were analyzed by HPLC to determine the percentage of released nicotine using a calibration curve.



For **69** at 71 μM irradiated 90s area of the nicotine peak at 250 nm: 18639322 $\mu\text{V/s}$ leading to a 70.49 μM nicotine release (99.3% release).

A solution of compound **79-81** (at 20 μM) in in MeOH/H₂O 9:1 in vol. at 25°C was exposed to a LUMOS 43 LED source (Atlas Photonics Inc.) at 430 nm (Typical optical output: 200 mW/cm²). The reaction was monitored by UV and aliquots of samples (100 μL) were analyzed by HPLC to determine the percentage of released *p*-MBA using a calibration curve.



For **79** at 20 µM irradiated 120s area of the p-MBA peak at 250 nm : 1242970 µV/s leading to a 19,54 µM p-MBA release (97,8% release)

For **80** at 20 µM irradiated 60s area of the P-MBA peak at 250 nm : 1266600 µV/s leading to a 19.79 µM of p-MBA release (99.1% release)

For **81** at 20 µM irradiated 240s area of the P-MBA peak at 250 nm : 1250100 µV/s leading to a 19.71 µM of p-MBA release (98.6% release)

The quantum yield for the photoconversion for DEACAS-Glutamate **19**, **79**, **80** and **81** were determined in MeOH/H₂O 9:1 in vol. at 25°C by comparison with **DEACAS-p-methoxybenzoic acid (ref)** ($\Phi = 0.2$) of the same concentration (20 µM) as reference. Light (430 ± 0.2 nm) from a 1000 W Hg lamp from Hanovia was focused on the entrance slit of a monochromator for photolysis for **79**, **80**, **81** and **19** was exposed to a LUMOS 43 LED source (Atlas Photonics Inc.) at 430 nm (Typical optical output: 200 mW/cm²). The reaction was monitored by UV spectroscopy on 1 mL 20 µM solutions of **ref**, **19**, **79**, **80** and **81**. To determine the extent of the photolytic conversions difference spectrum (t_{irr}-t₀) were used. Full photolysis was confirmed by HPLC analysis. The absorbance evolution at 450 nm (for **ref**, **79** and **81**) and 430 nm (for **80**) were plotted to follow the uncaging kinetics (k_{sample} for

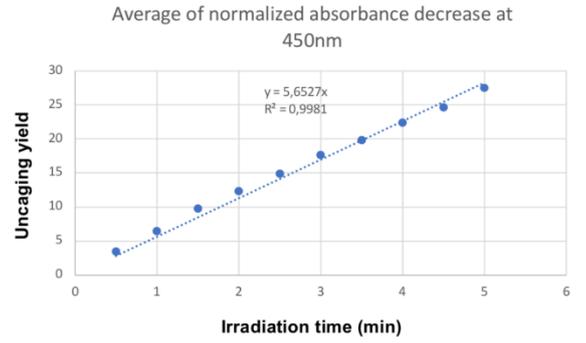
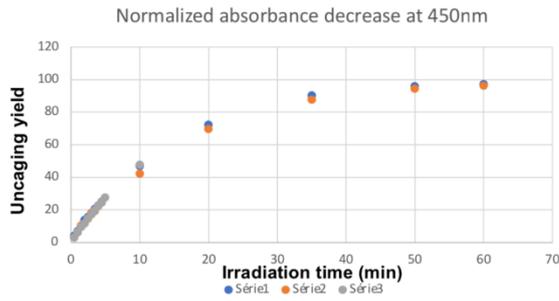
19,79,80,81 and k_{ech} for **ref**), values were normalized. Determination of the ϵ values at the excitation wavelength, measured in the solvent of the photolysis, then allowed the determination of the Φ_{sample} . The quantum yield was then determined using Equation 13 :

Equation 13: Equation to determine the quantum yield of uncaging of compounds with a different ϵ than the reference.

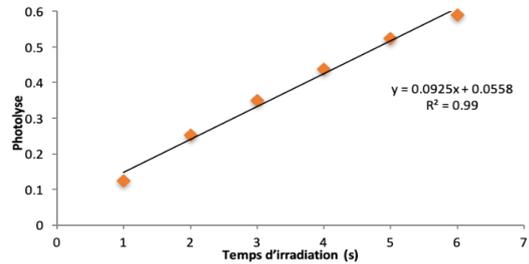
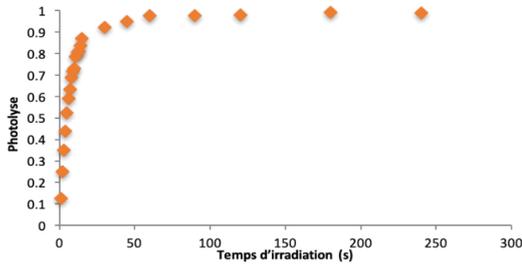
$$\phi_{\text{u}}(\text{compound}) = \frac{\phi_{\text{u}}(\text{ref}) \times \text{slope}(\text{compound})}{\text{slope}(\text{ref})} \times \frac{\epsilon_{430\text{nm}}(\text{ref})}{\epsilon_{430\text{nm}}(\text{compound})}$$

The quantum yield for the photoconversion for **69** was determined in PBS at 25°C by comparison with DEACAS-*p*-methoxybenzoic acid (**ref**) ($\Phi = 0.2$) of the same concentration (48 μM) as reference. Compounds were exposed to a LUMOS 43 LED source (Atlas Photonics Inc.) at 430 nm (Typical optical output: 200 mW/cm²). The reaction was monitored by UV spectroscopy on 1 mL 48 μM solution for the reference and to determine the extent of the photolytic conversions difference spectrum (t_{irr}-t₀) were used. The reaction was monitored using HPLC for the compound **69**, 1 mL 48 μM solutions were irradiated and 100 aliquots of samples (100 μL) were analyzed by HPLC to determine the percentage of released *nicotine* using a calibration curve. The disappearance of starting material at 260 nm was plotted to follow the uncaging kinetics (k_{sample} for **69**). Determination of the ϵ values at the excitation wavelength, measured in the solvent of the photolysis, then allowed the determination of the Φ_{sample} . The quantum yield was then determined using Equation 13 :

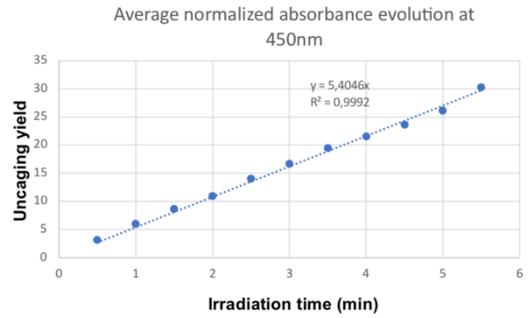
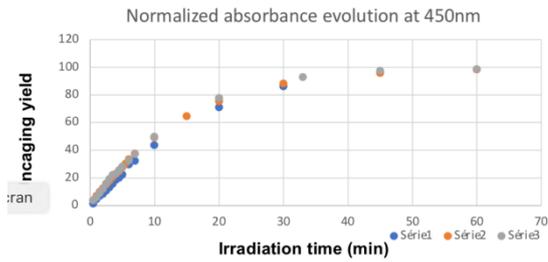
- Uncaging kinetics for **ref** ($\epsilon_{450\text{nm}} = 40200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):



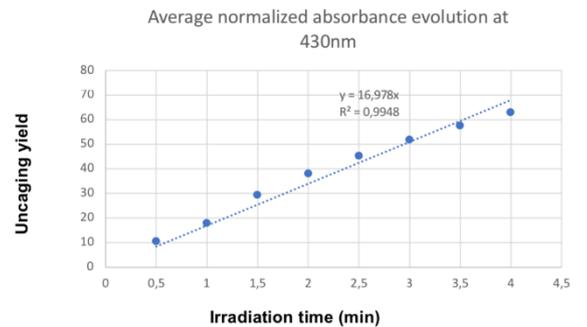
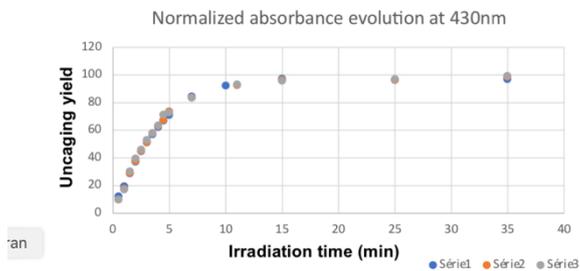
- Uncaging kinetics for **19** ($\epsilon_{450\text{nm}} = 40200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):



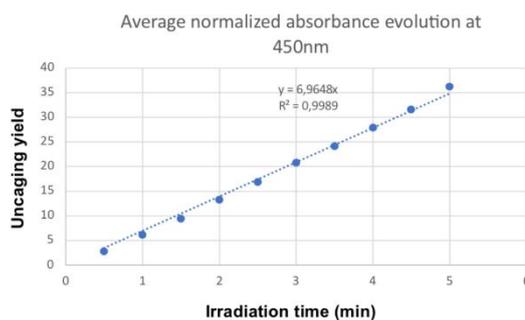
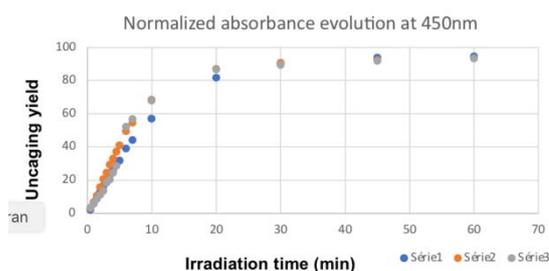
- Uncaging kinetics for **79** ($\epsilon_{450\text{nm}} = 28290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):



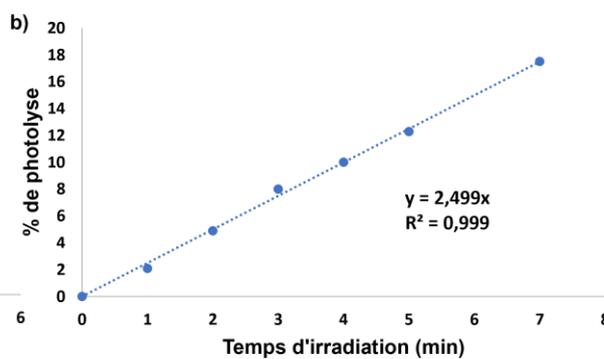
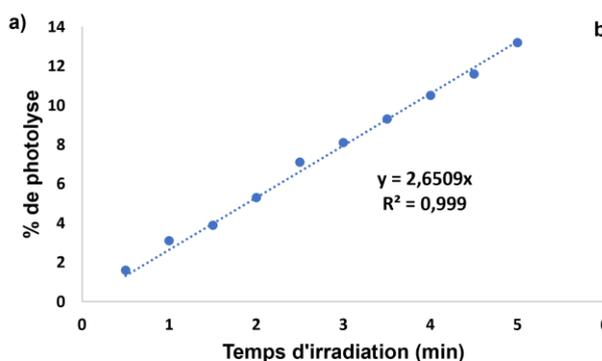
- Uncaging kinetics for **80** ($\epsilon_{430\text{nm}} = 42400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):



- Uncaging kinetics for **81** ($\epsilon_{450\text{nm}} = 38600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):



- a) Uncaging kinetics of **ref** ($\epsilon_{430\text{nm}} = 40200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b) Uncaging kinetics of **69** ($\epsilon_{430\text{nm}} = 9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)



Two-photon experiments

Two-photon photolysis experiments were performed on our home-made set-up at the "Plateforme d'Imagerie Quantitative" PIQ at the faculty of pharmacy (University of Strasbourg). The excitation source was a Ti:sapphire femtosecond laser Insight DS (680-1300 nm) with pulse width < 120 fs and a repetition rate of 80 MHz (Spectra-Physics). The excitation beam was collimated using a 5 cm lens in the center of a Hellma 105.202 – Ultra-Micro cells. The position of the two-photon focal point was verified using a solution of fluorescein and its two-photon induced fluorescence at 800 nm in the ultra-micro cell. The average laser power was measured using a Spectra Physique 407A power meter.

The reference compound and the studied compound were dissolved in MeOH/H₂O 9:1 in vol. with the absorbance of both solution close to 0.4000 (at λ_{max}) matched using a Uvikon XL UV-vis spectrophotometer and two ultra-micro cells. First, the quadratic dependency of the photolysis percentage was verified at 740 and 800 nm. To do this, 100 μL of the solution of interest was irradiated for 45 min for **ref** and 20 min for compounds **79**, **80** and **81** with various average laser powers. The percentage of uncaging was calculated for each power by absorbance measurement. To avoid artifacts and remain in the initial linear regime, the percentage of uncaging should remain below 15%. The plot of Log (Photolysis) vs Log(Laser power) is linear in this range with a slope of 2 for a two-photon process.

Secondly, the kinetics of the two-photon process of the compound of interest compared to compound **1** allow the determination of the two-photon uncaging action cross-sections. Thus 100 μL of the solution (both reference and sample alternatively) is irradiated and analyzed by UV-vis spectroscopy after different times of irradiation, without modifying the laser excitation settings. The percentage of photolysis is plotted vs the irradiation time. A linear regression is then performed with uncaging percentages again lower than 15 % give access to the slope of the line. The two-photon uncaging action cross-section can be calculated using the following formula:

Équation 15: Equation to determine the 2-photon uncaging cross section of a molecule.

$$\delta u(\text{compound}) = \frac{\delta u(\text{ref}) \times \text{slope}(\text{compound})}{\text{pente}(\text{ref})}$$

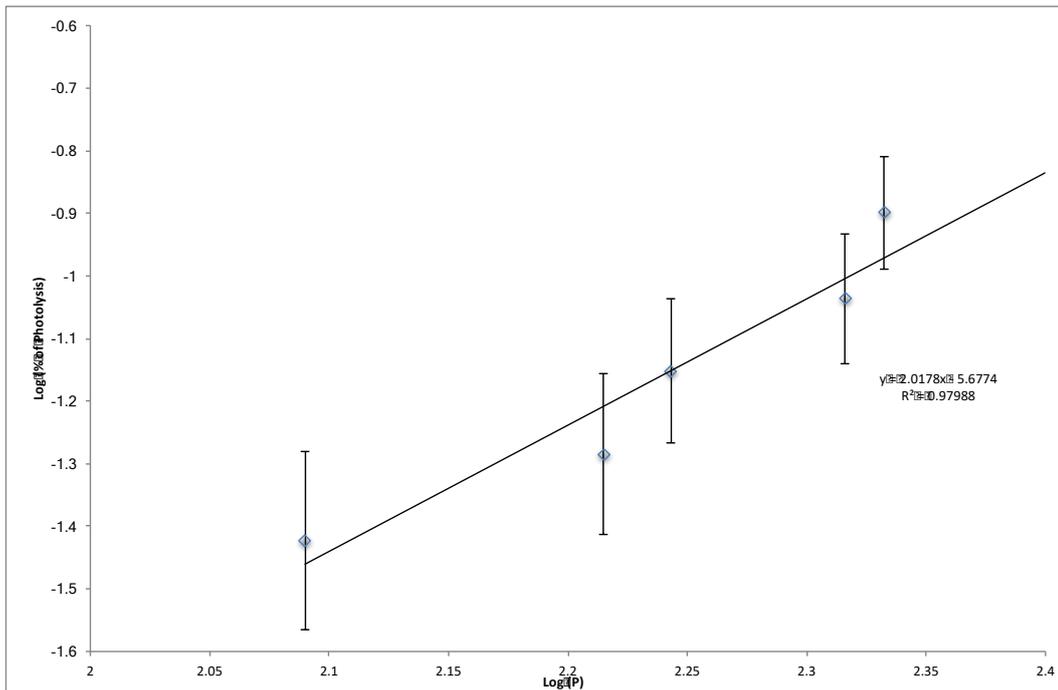
where δ_a is the two-photon absorption cross-section, Φ_u the uncaging quantum yield, slope is determined on the graph %uncaging vs time, C the concentration of the reference and the compound.

The precision of the uncaging action cross-section was estimated to 20% and all experiments were at least duplicated.

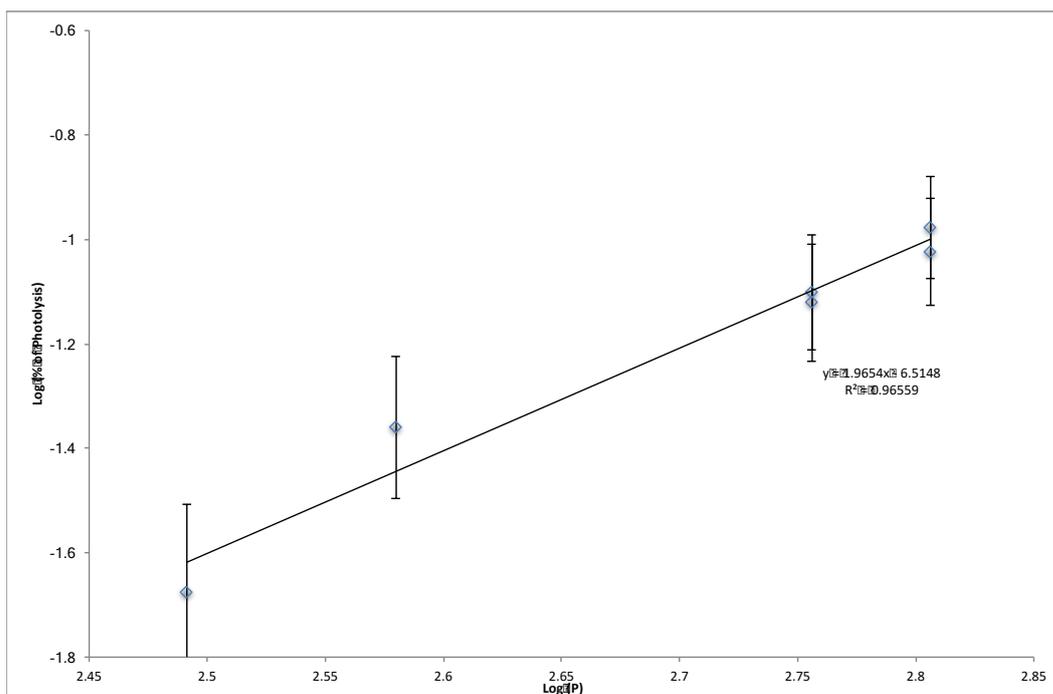
a) Determination of the quadratic dependency

- Quadratic dependency of compound **ref**

Quadratic dependency of photolysis at 740 nm using power beam into 123 mW and 420 mW:

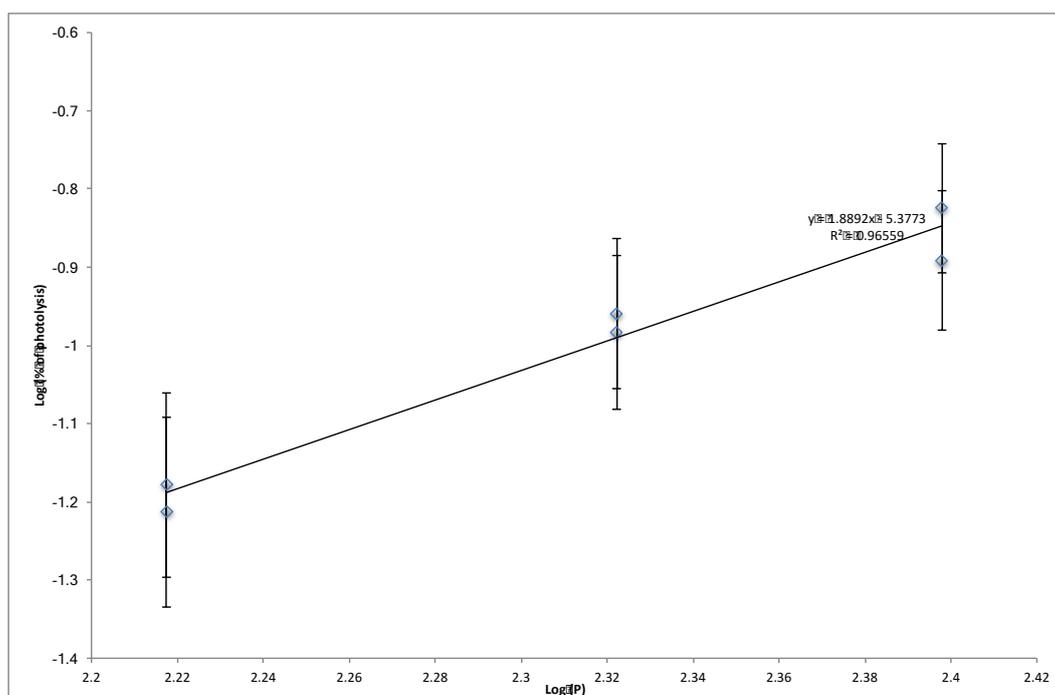


Quadratic dependency of photolysis at 800 nm using power beam into 310 mW and 640 mW:

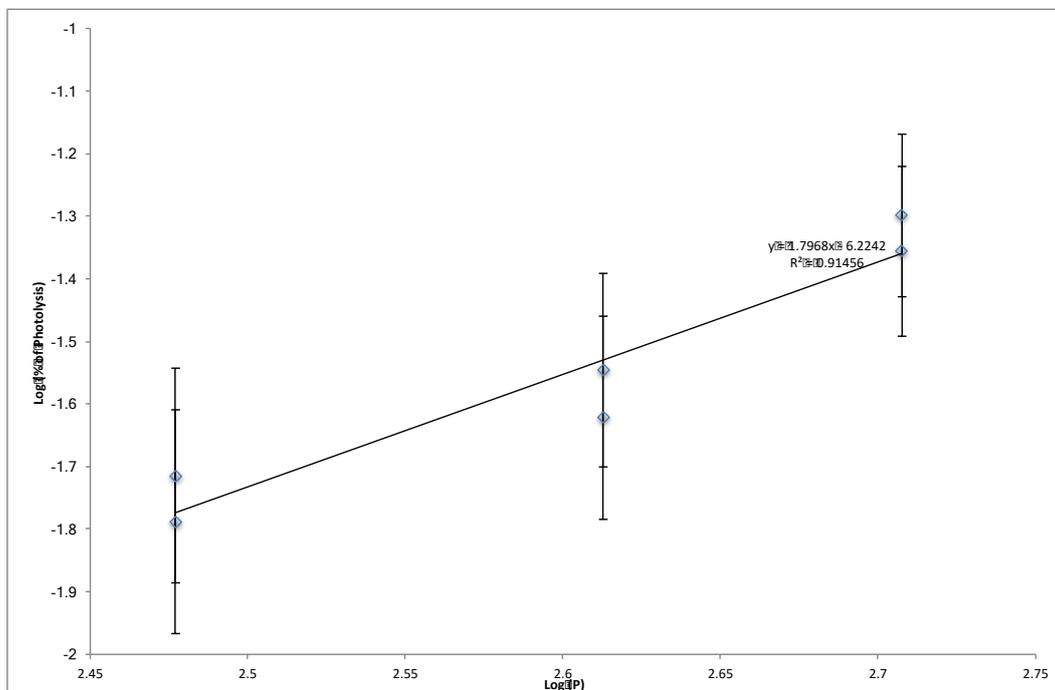


- Quadratic dependency of Compound 79:

Quadratic dependency of photolysis at 740 nm using power beam into 165 mW and 250 mW:

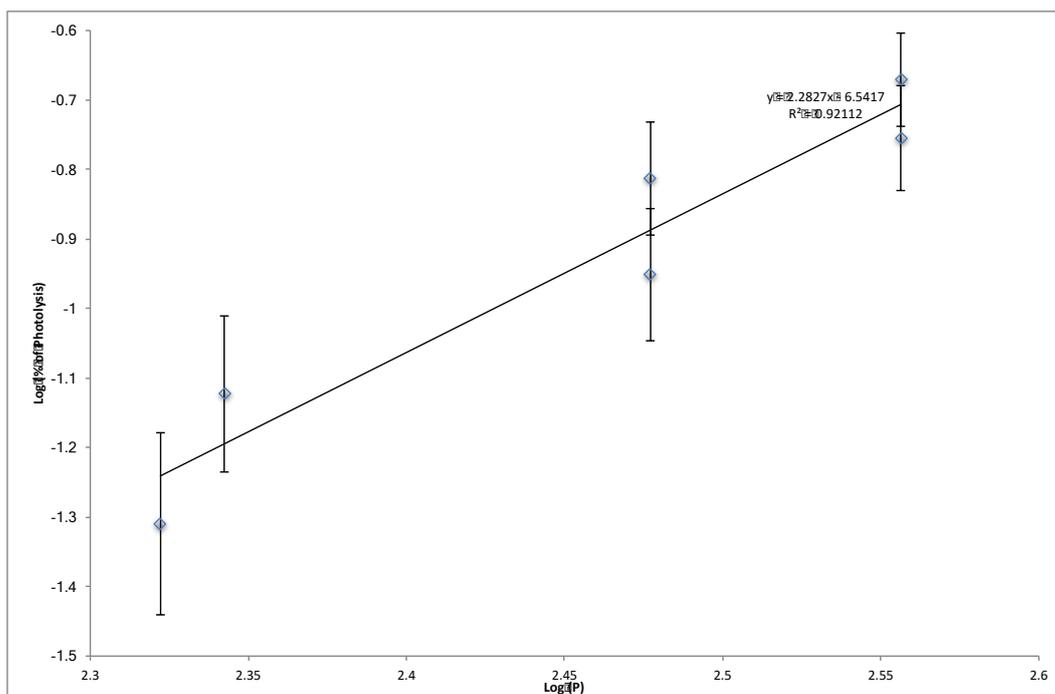


Quadratic dependency of photolysis at 800 nm using power beam into 410 mW and 590 mW:



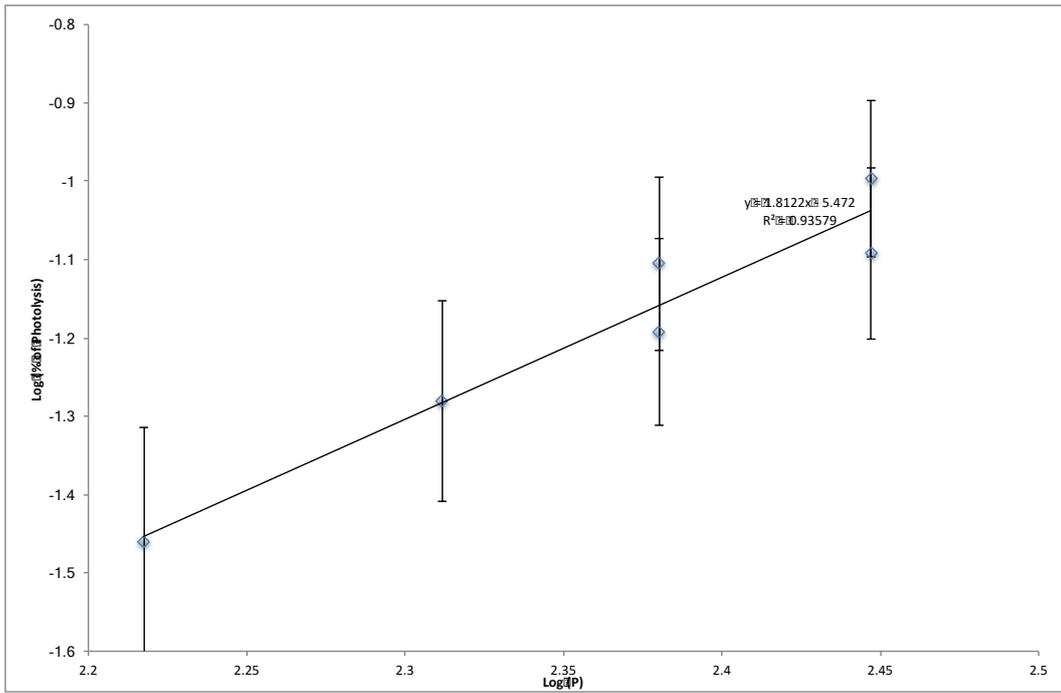
- Quadratic dependency of Compound **80**:

Quadratic dependency of photolysis at 740 nm using power beam into 210 mW and 360 mW:

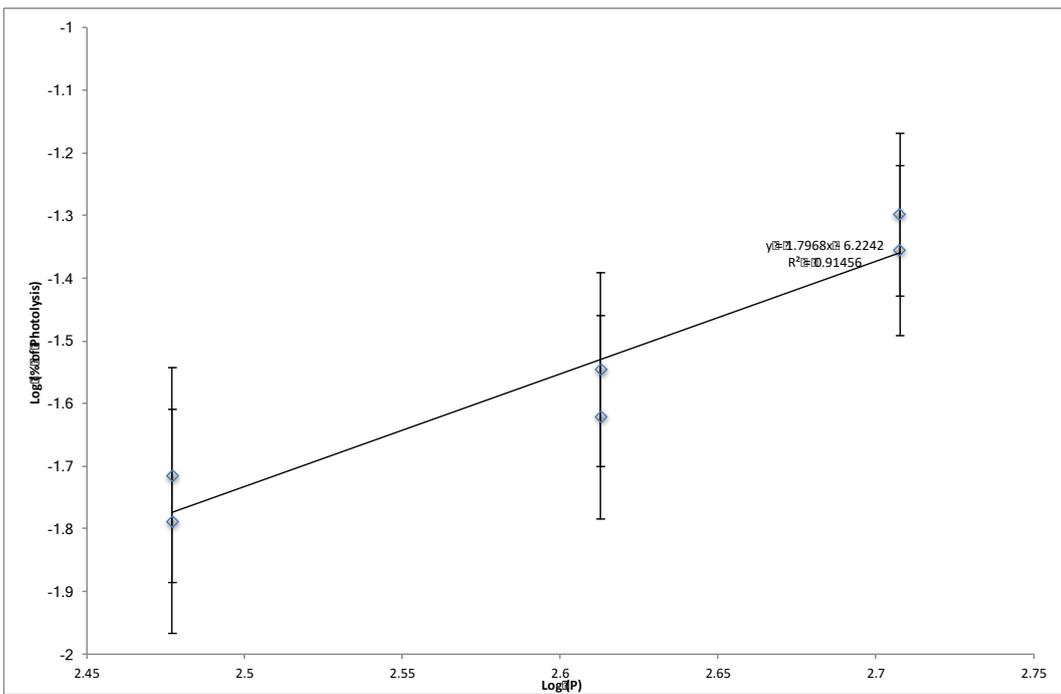


- Quadratic dependency of Compound **81**

Quadratic dependency of photolysis at 740 nm using power beam into 165 mW and 280 mW:



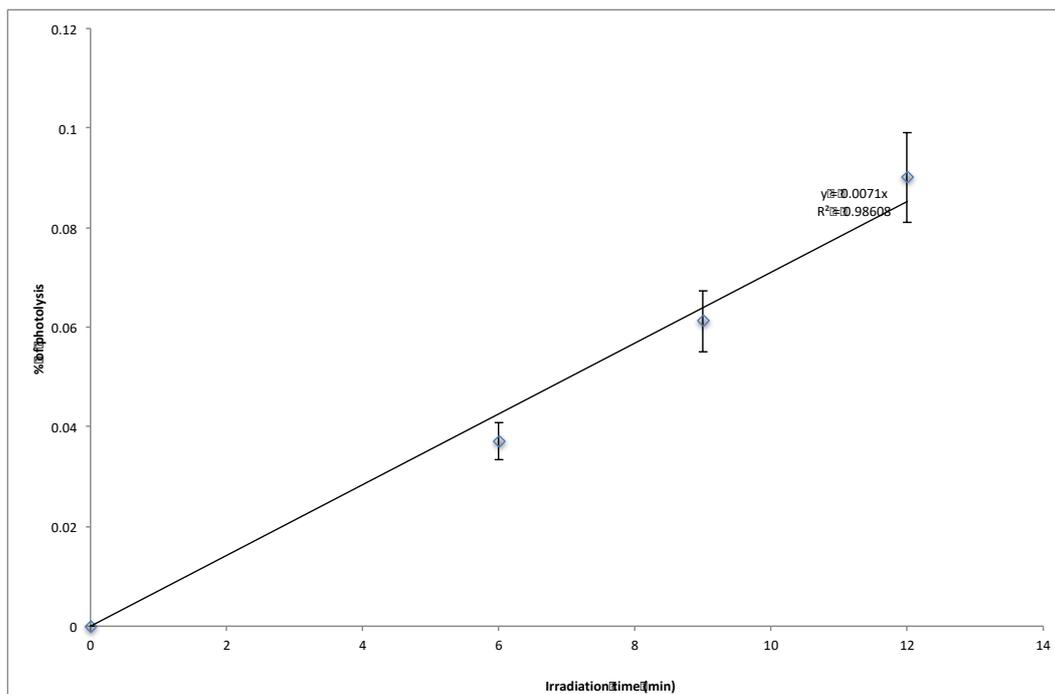
Quadratic dependency of photolysis at 800 nm using power beam into 300 mW and 510 mW:



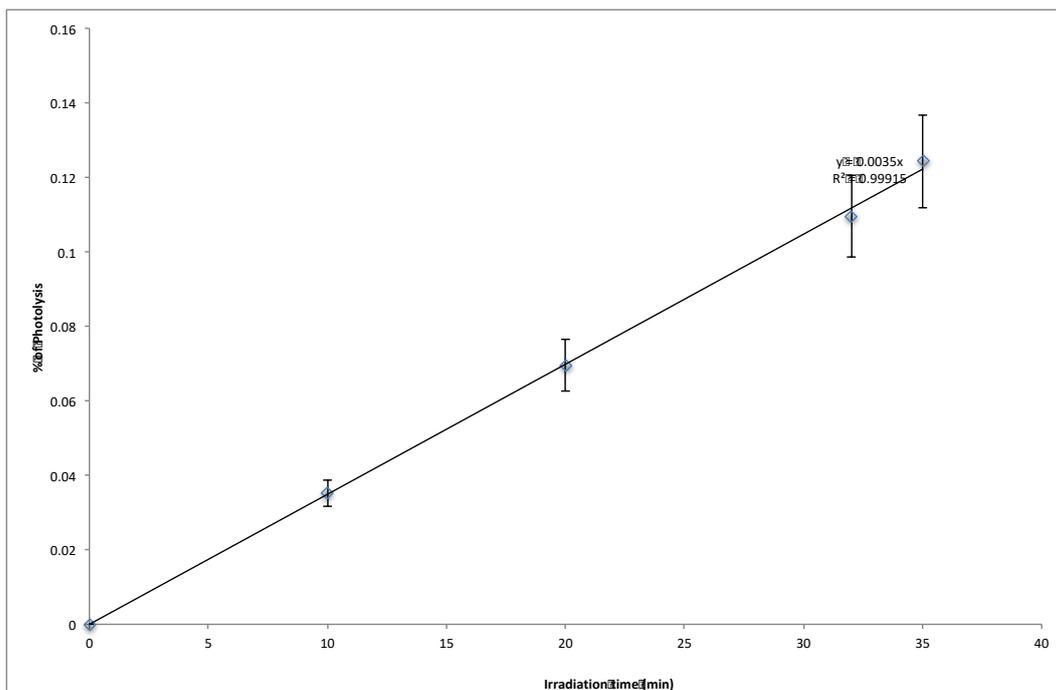
b) Kinetic of two photon photolysis

- Kinetic of photolysis of compound **79**

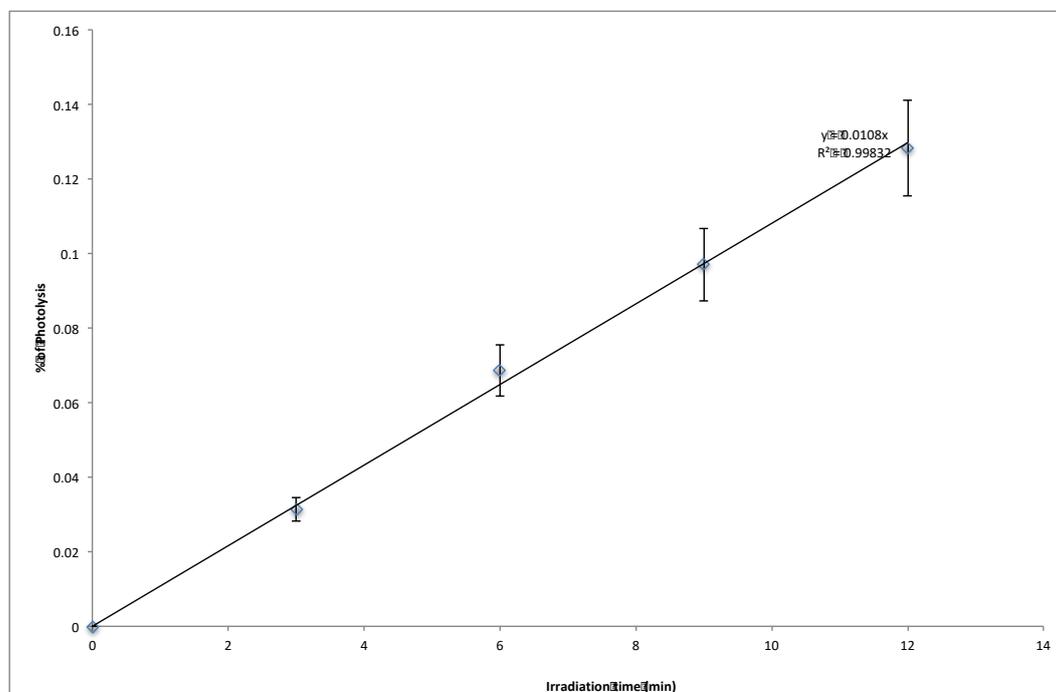
Kinetic of photolysis of compound **79** at 740 nm with a power beam of 210 mw



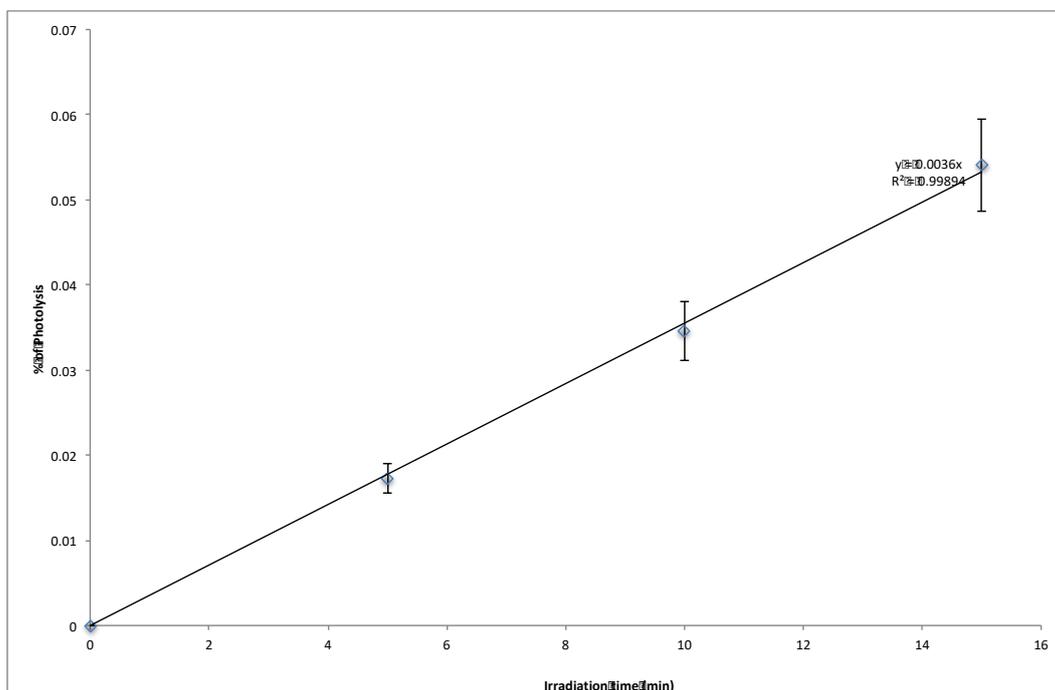
Kinetic of photolysis of compound **ref** at 740 nm in the same excitation settings



Kinetic of photolysis of compound **79** at 800 nm with a power beam of 510 mw

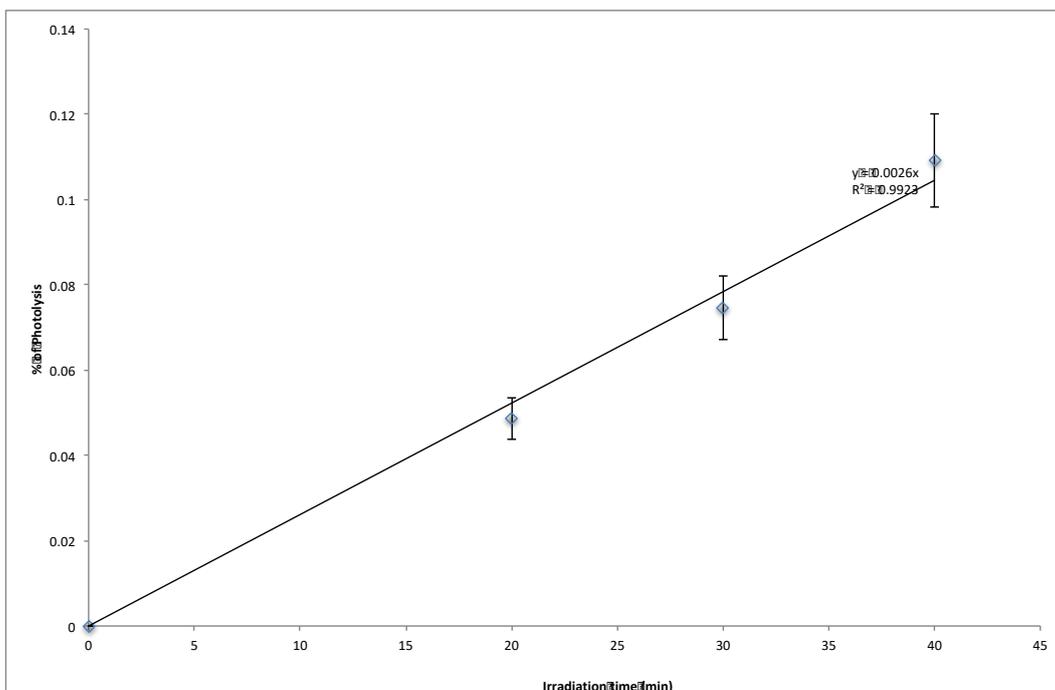


Kinetic of photolysis of compound **ref** at 800 nm in the same excitation settings

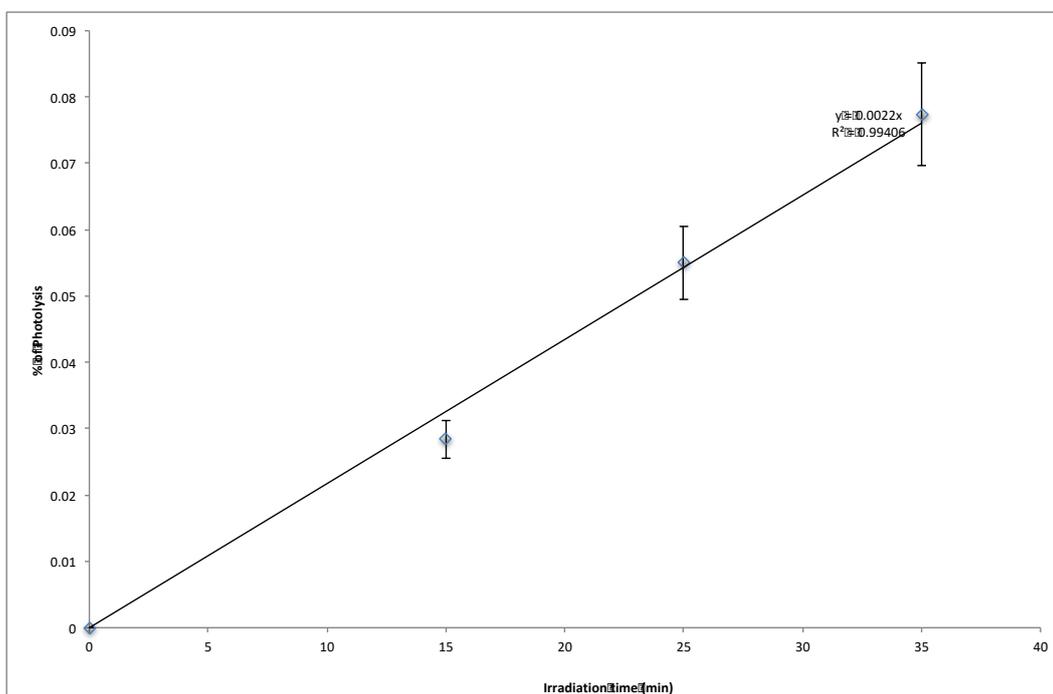


- Kinetic of photolysis of compound **80**

Kinetic of photolysis of compound **80** at 740 nm with a power beam of 220 mw

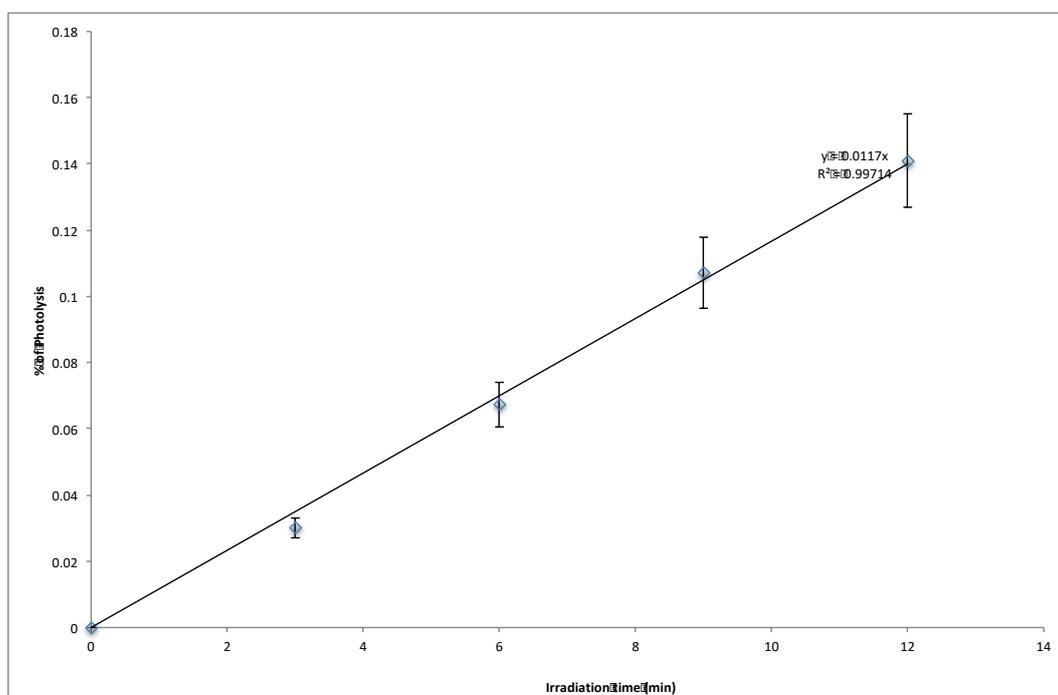


Kinetic of photolysis of compound **ref** at 740 nm in the same excitation settings

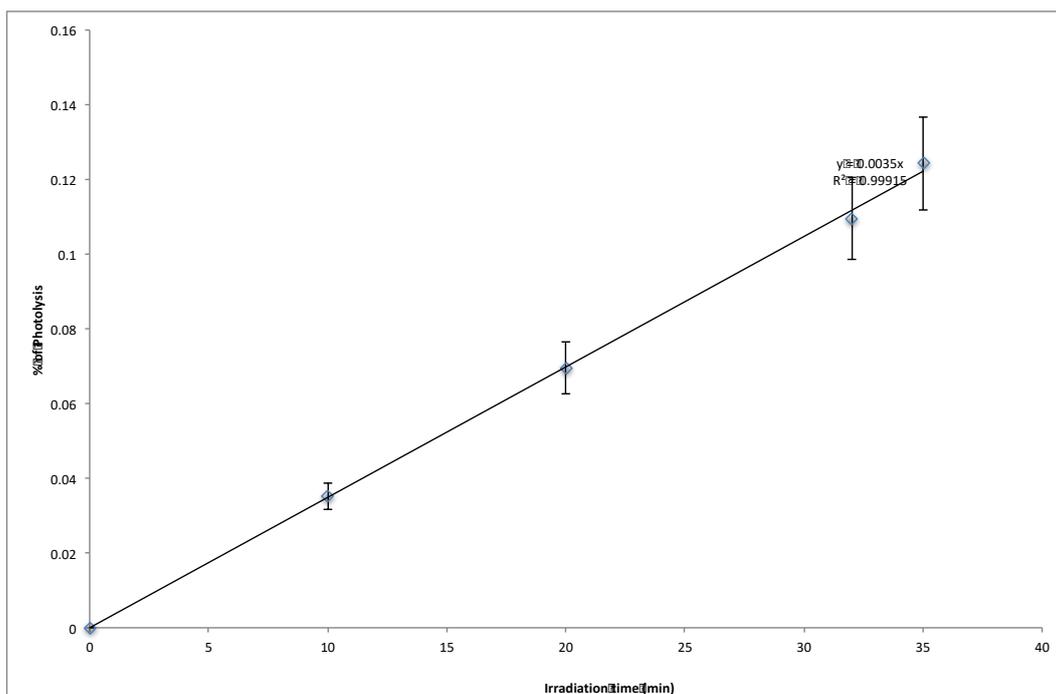


- Kinetic of photolysis of compound **81**

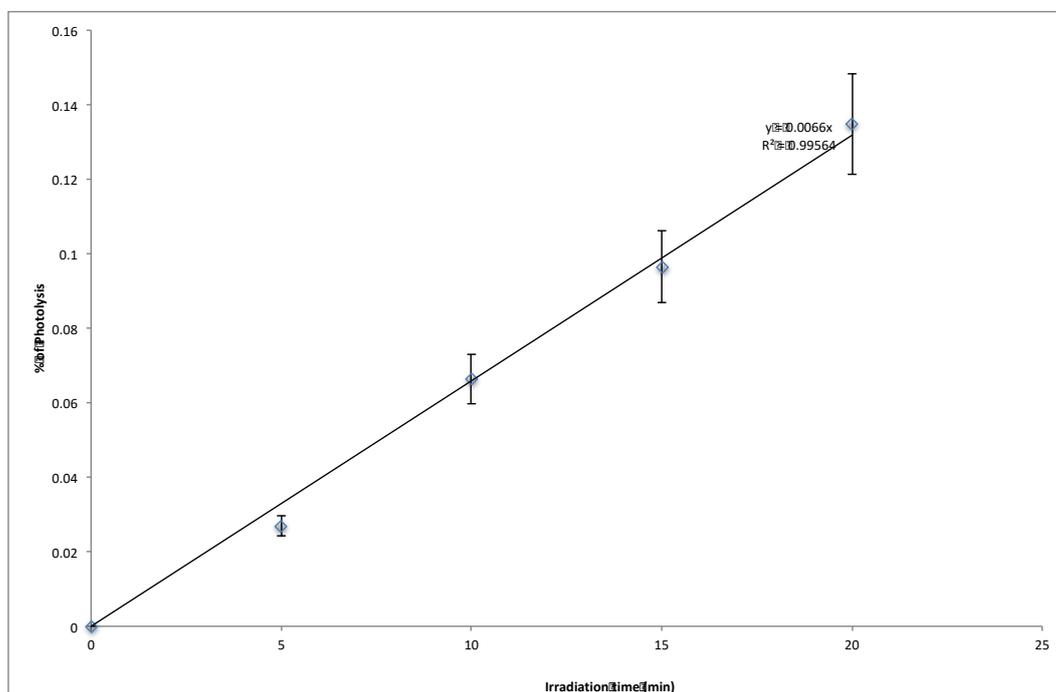
Kinetic of photolysis of compound **81** at 740 nm with a power beam of 220 mw



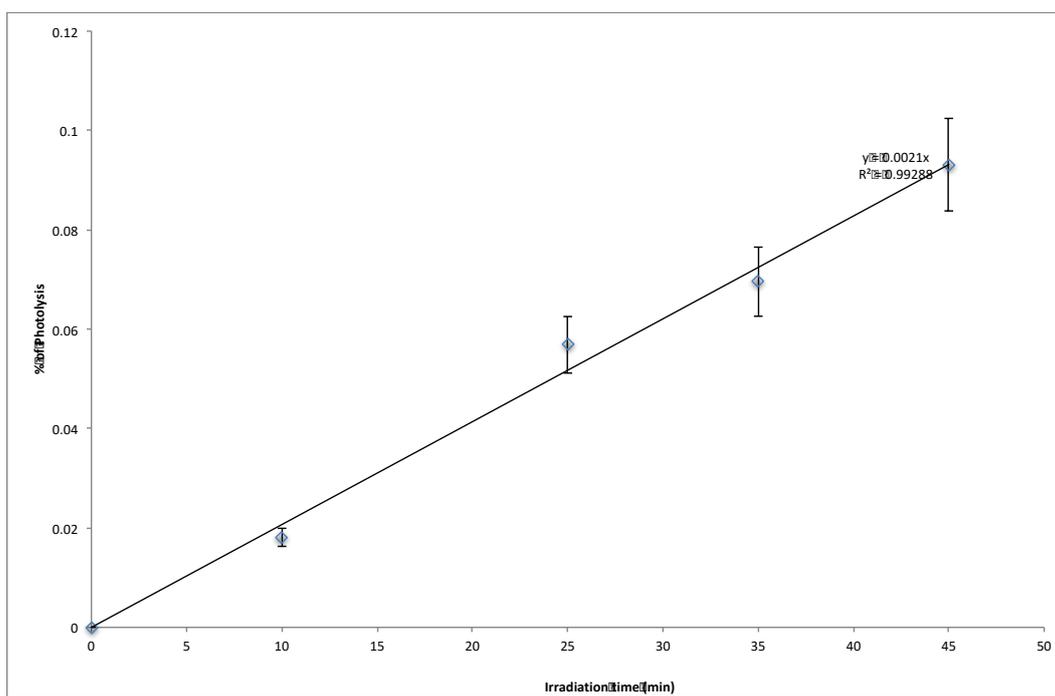
Kinetic of photolysis of compound **ref** at 740 nm in the same excitation settings



Kinetic of photolysis of compound **81** at 800 nm with a power beam of 500 mw



Kinetic of photolysis of compound **ref** at 800 nm in the same excitation settings



3. Références

1. *Neuroscience*. (Sinauer Associates, Publishers, 2004).
2. Vasilets, Larisa A. & Schwarz, W. Regulation of endogenous and expressed Na⁺/K⁺ pumps in *Xenopus* oocytes by membrane potential and stimulation of protein kinases. *J. Membran Biol.* **125**, (1992).
3. Mata, A. M. & Sepúlveda, M. R. Calcium pumps in the central nervous system. *Brain Research Reviews* **49**, 398–405 (2005).
4. Neher, E. & Sakmann, B. The Patch Clamp Technique. *SCIENTIFIC AMERICAN* **8** (1992).
5. Yobas, L. Microsystems for cell-based electrophysiology. *J. Micromech. Microeng.* **23**, 083002 (2013).
6. Bormann, J. Patch-clamp study of γ -aminobutyric acid receptor C1- channels in cultured astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5** (1988).
7. Southan, A. P. & Robertson, B. Patch-Clamp Recordings from Cerebellar Basket Cell Bodies and Their Presynaptic Terminals Reveal an Asymmetric Distribution of Voltage-Gated Potassium Channels. *J. Neurosci.* **18**, 948–955 (1998).
8. Silvia - 2009 - Enhanced long term microcircuit plasticity in the .pdf.
9. HODGKIN, A. L. & HUXLEY, A. F. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* **144**, 710–711 (1939).
10. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* **116**, 473–496 (1952).
11. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* **116**, 449–472 (1952).

12. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology* **116**, 497–506 (1952).
13. Catterall, W. A., Wisedchaisri, G. & Zheng, N. The chemical basis for electrical signaling. *Nat Chem Biol* **13**, 455–463 (2017).
14. Ghovanloo, M.-R., Aimar, K., Ghadiry-Tavi, R., Yu, A. & Ruben, P. C. Physiology and Pathophysiology of Sodium Channel Inactivation. in *Current Topics in Membranes* vol. 78 479–509 (Elsevier, 2016).
15. Kim, D. M. & Nimigean, C. M. Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a029231 (2016).
16. Raghavan, M., Fee, D. & Barkhaus, P. E. Generation and propagation of the action potential. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 160 3–22 (Elsevier, 2019).
17. Griggs, R. B., Yermakov, L. M. & Susuki, K. Formation and disruption of functional domains in myelinated CNS axons. *Neuroscience Research* **116**, 77–87 (2017).
18. Zhang, C. & Rasband, M. N. Cytoskeletal control of axon domain assembly and function. *Current Opinion in Neurobiology* **39**, 116–121 (2016).
19. Nave, K.-A. & Werner, H. B. Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 503–533 (2014).
20. Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A. & Dolphin, A. C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* **67**, 821–870 (2015).
21. Catterall, W. A., Lenaeus, M. J. & Gamal El-Din, T. M. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 133–154 (2020).

22. Mochida, S. Neurotransmitter Release Site Replenishment and Presynaptic Plasticity. *IJMS* **22**, 327 (2020).
23. Chanaday, N. L. & Kavalali, E. T. Presynaptic origins of distinct modes of neurotransmitter release. *Current Opinion in Neurobiology* **51**, 119–126 (2018).
24. Kavalali, E. T. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *12*.
25. Heuser, J. E. & Reese, T. S. EVIDENCE FOR RECYCLING OF SYNAPTIC VESICLE MEMBRANE DURING TRANSMITTER RELEASE AT THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION. *Journal of Cell Biology* **57**, 315–344 (1973).
26. Heuser, J. E. *et al.* Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *Journal of Cell Biology* **81**, 275–300 (1979).
27. Suh, Y. H., Chang, K. & Roche, K. W. Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Molecular and Cellular Neuroscience* **91**, 10–24 (2018).
28. Shaye, H. *et al.* Structural basis of the activation of a metabotropic GABA receptor. *Nature* **584**, 298–303 (2020).
29. Hurst, R., Rollema, H. & Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics* **137**, 22–54 (2013).
30. Hanada, T. Iontropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors. *Biomolecules* **10**, 464 (2020).
31. Tomita, S. Molecular constituents and localization of the ionotropic GABA receptor complex in vivo. *Current Opinion in Neurobiology* **57**, 81–86 (2019).
32. Nagel, G. Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science* **296**, 2395–2398 (2002).

33. Nagel, G. *et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 13940–13945 (2003).
34. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**, 1263–1268 (2005).
35. Zhang, W., Ge, W. & Wang, Z. A toolbox for light control of *Drosophila* behaviors through Channelrhodopsin 2-mediated photoactivation of targeted neurons: Control *Drosophila* behaviors by light. *European Journal of Neuroscience* **26**, 2405–2416 (2007).
36. Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A. & Svoboda, K. Channelrhodopsin-2–assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* **10**, 663–668 (2007).
37. Zhang, F. *et al.* Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**, 633–639 (2007).
38. Zhang, F. *et al.* Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci* **11**, 631–633 (2008).
39. Lin, J. Y., Knutsen, P. M., Muller, A., Kleinfeld, D. & Tsien, R. Y. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat Neurosci* **16**, 1499–1508 (2013).
40. Berndt, A., Lee, S. Y., Ramakrishnan, C. & Deisseroth, K. Structure-Guided Transformation of Channelrhodopsin into a Light-Activated Chloride Channel. *Science* **344**, 420–424 (2014).
41. Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K. & Hofmann, K. P. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 318–324 (2001).

42. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M. & Sexton, P. M. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 638–653 (2018).
43. Kim, J.-M. *et al.* Light-Driven Activation of β_2 -Adrenergic Receptor Signaling by a Chimeric Rhodopsin Containing the β_2 -Adrenergic Receptor Cytoplasmic Loops [†]. *Biochemistry* **44**, 2284–2292 (2005).
44. Li, P. *et al.* Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. *Mol Psychiatry* **20**, 1339–1349 (2015).
45. Oh, E., Maejima, T., Liu, C., Deneris, E. & Herlitze, S. Substitution of 5-HT_{1A} Receptor Signaling by a Light-activated G Protein-coupled Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 30825–30836 (2010).
46. Christie, J. M., Gawthorne, J., Young, G., Fraser, N. J. & Roe, A. J. LOV to BLUF: Flavoprotein Contributions to the Optogenetic Toolkit. *Molecular Plant* **5**, 533–544 (2012).
47. Duan, L. *et al.* Understanding CRY2 interactions for optical control of intracellular signaling. *Nat Commun* **8**, 547 (2017).
48. Bastien Goegan. Synthèse et application d'inducteurs de gènes photo-activables pour le contrôle in vivo de l'expression d'un gène. (Université de Strasbourg, 2017).
49. Goglia, A. G. & Toettcher, J. E. A bright future: optogenetics to dissect the spatiotemporal control of cell behavior. *Current Opinion in Chemical Biology* **48**, 106–113 (2019).

50. Schmidt, D., Tillberg, P. W., Chen, F. & Boyden, E. S. A fully genetically encoded protein architecture for optical control of peptide ligand concentration. *Nat Commun* **5**, 3019 (2014).
51. He, L. *et al.* Near-infrared photoactivatable control of Ca²⁺ signaling and optogenetic immunomodulation. *eLife* **4**, e10024 (2015).
52. Ma, G. *et al.* Optogenetic Control of Voltage-Gated Calcium Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 7019–7022 (2018).
53. O’Neill, P. R. & Gautam, N. Subcellular optogenetic inhibition of G proteins generates signaling gradients and cell migration. *MBoC* **25**, 2305–2314 (2014).
54. Liu, Q. *et al.* A Photoactivatable Botulinum Neurotoxin for Inducible Control of Neurotransmission. *Neuron* **101**, 863-875.e6 (2019).
55. Hill, J. R. & Robertson, A. A. B. Fishing for Drug Targets: A Focus on Diazirine Photoaffinity Probe Synthesis. *J. Med. Chem.* **61**, 6945–6963 (2018).
56. Mortensen, M. *et al.* Photo-antagonism of the GABAA receptor. *Nat Commun* **5**, 4454 (2014).
57. Adesnik, H., Nicoll, R. A. & England, P. M. Photoinactivation of Native AMPA Receptors Reveals Their Real-Time Trafficking. *Neuron* **48**, 977–985 (2005).
58. Langenbuch-Cachat, J. *et al.* Photoaffinity labeling of the acetylcholine binding sites on the nicotinic receptor by an aryldiazonium derivative. *Biochemistry* **27**, 2337–2345 (1988).
59. Hamouda, A. K., Jayakar, S. S., Chiara, D. C. & Cohen, J. B. Photoaffinity Labeling of Nicotinic Receptors: Diversity of Drug Binding Sites! *J Mol Neurosci* **53**, 480–486 (2014).

60. McKenzie, C. K., Sanchez-Romero, I. & Janovjak, H. Flipping the Photoswitch: Ion Channels Under Light Control. in *Novel Chemical Tools to Study Ion Channel Biology* (eds. Ahern, C. & Pless, S.) vol. 869 101–117 (Springer New York, 2015).
61. Regner, N. *et al.* Light-Switchable Hemithioindigo–Hemistilbene-Containing Peptides: Ultrafast Spectroscopy of the Z → E Isomerization of the Chromophore and the Structural Dynamics of the Peptide Moiety. *J. Phys. Chem. B* **116**, 4181–4191 (2012).
62. Petchprayoon, C., Yan, Y., Mao, S. & Marriott, G. Rational design, synthesis, and characterization of highly fluorescent optical switches for high-contrast optical lock-in detection (OLID) imaging microscopy in living cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**, 1030–1040 (2011).
63. Fujimoto, K., Kajino, M., Sakaguchi, I. & Inouye, M. Photoswitchable, DNA-Binding Helical Peptides Assembled with Two Independently Designed Sequences for Photoregulation and DNA Recognition. *Chem. Eur. J.* **18**, 9834–9840 (2012).
64. Bartels, E., Wassermann, N. H. & Erlanger, B. F. Photochromic Activators of the Acetylcholine Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**, 1820–1823 (1971).
65. Mourot, A. *et al.* Tuning Photochromic Ion Channel Blockers. *ACS Chem. Neurosci.* **2**, 536–543 (2011).
66. Fehrentz, T. *et al.* Optical control of L-type Ca²⁺ channels using a diltiazem photoswitch. *Nat Chem Biol* **14**, 764–767 (2018).
67. Stawski, P., Sumser, M. & Trauner, D. A Photochromic Agonist of AMPA Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5748–5751 (2012).

68. Laprell, L. *et al.* Optical control of NMDA receptors with a diffusible photoswitch. *Nat Commun* **6**, 8076 (2015).
69. Rovira, X. *et al.* OptoGluNAM4.1, a Photoswitchable Allosteric Antagonist for Real-Time Control of mGlu 4 Receptor Activity. *Cell Chemical Biology* **23**, 929–934 (2016).
70. Gorostiza, P. *et al.* Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 10865–10870 (2007).
71. Lester, H. A., Krouse, M. E., Nass, M. M., Wassermann, N. H. & Erlanger, B. F. A covalently bound photoisomerizable agonist: comparison with reversibly bound agonists at Electrophorus electroplaques. *Journal of General Physiology* **75**, 207–232 (1980).
72. Izquierdo-Serra, M. *et al.* Optical control of endogenous receptors and cellular excitability using targeted covalent photoswitches. *Nat Commun* **7**, 12221 (2016).
73. Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. & Kramer, R. H. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci* **7**, 1381–1386 (2004).
74. Tochitsky, I. *et al.* Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Chem* **4**, 105–111 (2012).
75. Lemoine, D. *et al.* Optical control of an ion channel gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 20813–20818 (2013).
76. Lin, W.-C. *et al.* A Comprehensive Optogenetic Pharmacology Toolkit for In Vivo Control of GABA A Receptors and Synaptic Inhibition. *Neuron* **88**, 879–891 (2015).
77. Browne, L. E. *et al.* Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 521–526 (2014).

78. Habermacher, C. *et al.* Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel. *eLife* **5**, e11050 (2016).
79. Harkat, M. *et al.* On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E3786–E3795 (2017).
80. Klán, P. *et al.* Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **113**, 119–191 (2013).
81. Pelliccioli, A. P. & Wirz, J. Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 441–458 (2002).
82. Morville, C., Chaud, J., Bolze, F. & Specht, A. Photolytical reactions for light induced biological effectors release: on the road to the phototherapeutic window. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* (2021) doi:10.1007/s10847-021-01071-9.
83. Kalbag, S. M. & Roeske, R. W. Photolabile protecting group for histidine. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 440–441 (1975).
84. Amit, B., Hazum, E., Fridkin, M. & Patchornik, A. A PHOTOLABILE PROTECTING GROUP FOR THE PHENOLIC HYDROXYL FUNCTION OF TYROSINE. *International Journal of Peptide and Protein Research* **9**, 91–96 (2009).
85. Engels, J. & Schlaeger, E. J. Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-benzyltriesters. *J. Med. Chem.* **20**, 907–911 (1977).
86. Kaplan, J. H., Forbush, B. & Hoffman, J. F. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium:potassium pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* **17**, 1929–1935 (1978).

87. Momotake, A., Lindegger, N., Niggli, E., Barsotti, R. J. & Ellis-Davies, G. C. R. The nitrodibenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells. *Nat Methods* **3**, 35–40 (2006).
88. Walker, J. W. Photolabile Protecting Groups for an Acetylcholine Receptor Ligand. Synthesis and Photochemistry of a New Class of o-Nitrobenzyl Derivatives and Their Effects on Receptor Functiont. 7.
89. Stutz, A. & Pitsch, S. Automated RNA-Synthesis with Photocleavable Sugar and Nucleobase Protecting Groups. *Synlett* **1999**, 930–934 (1999).
90. Hasan, A. *et al.* Photolabile protecting groups for nucleosides: Synthesis and photodeprotection rates. *Tetrahedron* **53**, 4247–4264 (1997).
91. Schelkle, K. M. *et al.* Light-Induced Protein Dimerization by One- and Two-Photon Activation of Gibberellic Acid Derivatives in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 2825–2829 (2015).
92. Specht, A. *et al.* The donor–acceptor biphenyl platform: A versatile chromophore for the engineering of highly efficient two-photon sensitive photoremovable protecting groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 578 (2012).
93. Gug, S. *et al.* Glutamate Photolabile Protecting Group with High One- and Two-Photon Uncaging Efficiencies. 8.
94. Givens, R. S., Matuszewski, B., Athey, P. S. & Stoner, M. R. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. 6.
95. Eckardt, T. *et al.* Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)methyl Derivatives. 2. Photocleavage of Selected (Coumarin-4-yl)methyl-Caged

- Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphates with Fluorescence Enhancement. *J. Org. Chem.* **67**, 703–710 (2002).
96. Skwarczynski, M. *et al.* Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**, 4492–4496 (2006).
97. Takaoka, K., Tatsu, Y., Yumoto, N., Nakajima, T. & Shimamoto, K. Synthesis and photoreactivity of caged blockers for glutamate transporters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**, 965–970 (2003).
98. Amit, B. & Patchornik, A. The photorearrangement of N-substituted ortho-nitroanilides and nitroveratramides. A potential photosensitive protecting group. *Tetrahedron Letters* **14**, 2205–2208 (1973).
99. Papageorgiou, G., Ogden, D. C., Barth, A. & Corrie, J. E. T. Photorelease of Carboxylic Acids from 1-Acyl-7-nitroindolines in Aqueous Solution: Rapid and Efficient Photorelease of L-Glutamate¹. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6503–6504 (1999).
100. Canepari, M., Nelson, L., Papageorgiou, G., Corrie, J. E. T. & Ogden, D. Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolinyl- and 4-methoxy-7-nitroindolinyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters. *Journal of Neuroscience Methods* **112**, 29–42 (2001).
101. Passlick, S. & Ellis-Davies, G. C. R. Comparative one- and two-photon uncaging of MNI-glutamate and MNI-kainate on hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neuroscience Methods* **293**, 321–328 (2018).
102. Zayat, L., Calero, C., Alborés, P., Baraldo, L. & Etchenique, R. A New Strategy for Neurochemical Photodelivery: Metal–Ligand Heterolytic Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 882–883 (2003).

103. Zayat, L., Salierno, M. & Etchenique, R. Ruthenium(II) Bipyridyl Complexes as Photolabile Caging Groups for Amines. 4.
104. Fino, E. RuBi-Glutamate: Two-photon and visible-light photoactivation of neurons and dendritic spines. *Front. Neural Circuits* **3**, (2009).
105. Rial Verde, E. M. Photorelease of GABA with visible light using an inorganic caging group. *Front. Neural Circuits* **2**, (2008).
106. Milburn, T. *et al.* Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand. *Biochemistry* **28**, 49–55 (1989).
107. Wieboldt, R. *et al.* Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 8752–8756 (1994).
108. Breitinger, H.-G. A., Wieboldt, R., Ramesh, D., Carpenter, B. K. & Hess, G. P. Synthesis and Characterization of Photolabile Derivatives of Serotonin for Chemical Kinetic Investigations of the Serotonin 5-HT₃ Receptor[†]. *Biochemistry* **39**, 5500–5508 (2000).
109. Wieboldt, R., Ramesh, D., Carpenter, B. K. & Hess', G. P. Synthesis and Photochemistry of Photolabile Derivatives of γ -Aminobutyric Acid for Chemical Kinetic Investigations of the γ -Aminobutyric Acid Receptor in the Millisecond Time Region⁺. 8.
110. Grewer, C., Jäger, J., Carpenter, B. K. & Hess, G. P. A New Photolabile Precursor of Glycine with Improved Properties: A Tool for Chemical Kinetic Investigations of the Glycine Receptor. *Biochemistry* **39**, 2063–2070 (2000).
111. Dodt, H.-U., Frick, A., Kampe, K. & Zieglgänsberger, W. NMDA and AMPA receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *European Journal of Neuroscience* **10**, 3351–3357 (1998).

112. Frick, A., Zieglgänsberger, W. & Dodt, H.-U. Glutamate Receptors Form Hot Spots on Apical Dendrites of Neocortical Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology* **86**, 1412–1421 (2001).
113. Eder, M., Zieglgänsberger, W. & Dodt, H.-U. Shining Light on Neurons - Elucidation of Neuronal Functions by Photostimulation. *Reviews in the Neurosciences* **15**, (2004).
114. Callaway, E. M. & Katz, L. C. Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 7661–7665 (1993).
115. Juzenas, P., Juzeniene, A., Kaalhus, O., Iani, V. & Moan, J. Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 745–748 (2002).
116. Sandell, J. L. & Zhu, T. C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *J. Biophoton.* **4**, 773–787 (2011).
117. Sudmeyer, T. *et al.* Efficient 2nd and 4th harmonic generation of a single-frequency, continuous-wave fiber amplifier. *Opt. Express* **16**, 1546 (2008).
118. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **401**, 273–294 (1931).
119. Kaiser, W. & Garrett, C. G. B. Two-Photon Excitation in Ca F 2 : Eu 2 +. *Phys. Rev. Lett.* **7**, 229–231 (1961).
120. Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G. & Anderson, H. L. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3244–3266 (2009).
121. He, G. S., Tan, L.-S., Zheng, Q. & Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **108**, 1245–1330 (2008).

122. Klausen, M. & Blanchard-Desce, M. Two-photon uncaging of bioactive compounds: Starter guide to an efficient IR light switch. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 100423 (2021) doi:10.1016/j.jphotochemrev.2021.100423.
123. Albota, M. Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Sections. *Science* **281**, 1653–1656 (1998).
124. Voogd - 2011 - Cerebellar Zones A Personal History.pdf.
125. Niswender, C. M. & Conn, P. J. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 295–322 (2010).
126. Bus, T. Genetic investigations into the role of ionotropic glutamate receptors in hippocampal learning. (2009).
127. Bhave, G. *et al.* Membrane Topology of a Metabotropic Glutamate Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 30294–30301 (2003).
128. Wilcox *et al.* - 1990 - Synthesis of photolabile precursors of amino acid .pdf.
129. Matsuzaki, M. *et al.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **4**, 1086–1092 (2001).
130. Denk, W. Two-photon scanning photochemical microscopy: mapping ligand-gated ion channel distributions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 6629–6633 (1994).
131. Matsuzaki, M. *et al.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **4**, 1086–1092 (2001).
132. Furuta, T. *et al.* Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 1193–1200 (1999).

133. Corrie, J. E. *et al.* Postsynaptic activation at the squid giant synapse by photolytic release of L-glutamate from a 'caged' L-glutamate. *The Journal of Physiology* **465**, 1–8 (1993).
134. Shembekar, V. R., Chen, Y., Carpenter, B. K. & Hess, G. P. A Protecting Group for Carboxylic Acids That Can Be Photolyzed by Visible Light [†]. *Biochemistry* **44**, 7107–7114 (2005).
135. Senda, N., Momotake, A. & Arai, T. Synthesis and Photocleavage of 7-[[Bis(carboxymethyl)amino]coumarin-4-yl]methyl-Caged Neurotransmitters. *BCSJ* **80**, 2384–2388 (2007).
136. Fedoryak, O. D., Sul, J.-Y., Haydon, P. G. & Ellis-Davies, G. C. R. Synthesis of a caged glutamate for efficient one- and two-photon photorelease on living cells. *Chem. Commun.* 3664 (2005) doi:10.1039/b504922a.
137. Ellis-Davies, G. C. R., Matsuzaki, M., Paukert, M., Kasai, H. & Bergles, D. E. 4-Carboxymethoxy-5,7-Dinitroindolinyl-Glu: An Improved Caged Glutamate for Expedient Ultraviolet and Two-Photon Photolysis in Brain Slices. *Journal of Neuroscience* **27**, 6601–6604 (2007).
138. Maier, W., Corrie, J. E. T., Papageorgiou, G., Laube, B. & Grever, C. Comparative analysis of inhibitory effects of caged ligands for the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience Methods* **142**, 1–9 (2005).
139. Kwon, H.-B. *et al.* Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci* **15**, 1667–1674 (2012).
140. Losonczy, A. & Magee, J. C. Integrative Properties of Radial Oblique Dendrites in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* **50**, 291–307 (2006).

141. Kozorovitskiy, Y., Saunders, A., Johnson, C. A., Lowell, B. B. & Sabatini, B. L. Recurrent network activity drives striatal synaptogenesis. *Nature* **485**, 646–650 (2012).
142. Herde, M. K. *et al.* Local Efficacy of Glutamate Uptake Decreases with Synapse Size. *Cell Reports* **32**, 108182 (2020).
143. Molnar, P. & Nadler, J. V. γ -Aminobutyrate, α -carboxy-2-nitrobenzyl ester selectively blocks inhibitory synaptic transmission in rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* **8** (2000).
144. Olson, J. P. *et al.* Optically Selective Two-Photon Uncaging of Glutamate at 900 nm. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5954–5957 (2013).
145. Gug, S. *et al.* Photolabile Glutamate Protecting Group with High One- and Two-Photon Uncaging Efficiencies. *ChemBioChem* **9**, 1303–1307 (2008).
146. Gug, S. *et al.* Molecular Engineering of Photoremovable Protecting Groups for Two-Photon Uncaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 9525–9529 (2008).
147. Richers, M. T., Amatrudo, J. M., Olson, J. P. & Ellis-Davies, G. C. R. Cloaked Caged Compounds: Chemical Probes for Two-Photon Optoneurobiology. *Angewandte Chemie International Edition* **56**, 193–197 (2017).
148. Papageorgiou, G., Ogden, D. & Corrie, J. E. T. An antenna-sensitized 1-acyl-7-nitroindoline that has good solubility properties in the presence of calcium ions and is suitable for use as a caged l-glutamate in neuroscience. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 423 (2008).
149. Cueto Diaz, E. *et al.* Cooperative Veratryle and Nitroindoline Cages for Two-Photon Uncaging in the NIR. *Chem. Eur. J.* **22**, 10848–10859 (2016).
150. Hammer, C. A. *et al.* Sensitized Two-Photon Activation of Coumarin Photocages. *J. Phys. Chem. Lett.* **9**, 1448–1453 (2018).

151. Richers, M. T., Passlick, S., Agarwal, H. & Ellis-Davies, G. C. R. Dendrimer Conjugation Enables Multiphoton Chemical Neurophysiology Studies with an Extended π -Electron Caging Chromophore. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 12086–12090 (2019).
152. Specht, A. *et al.* New Photoremovable Protecting Groups for Carboxylic Acids with High Photolytic Efficiencies at Near-UV Irradiation. Application to the Photocontrolled Release of L-Glutamate. *ChemBioChem* **7**, 1690–1695 (2006).
153. Aujard, I. *et al.* o-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation. *Chem. Eur. J.* **12**, 6865–6879 (2006).
154. Lovett-Barron, M. *et al.* Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* **15**, 423–430 (2012).
155. Herbivo, C., Omran, Z., Revol, J., Javot, H. & Specht, A. Synthesis and Characterization of Cell-Permeable Caged Phosphates that Can Be Photolyzed by Visible Light or 800 nm Two-Photon Photolysis. *ChemBioChem* **14**, 2277–2283 (2013).
156. Donato, L. *et al.* Water-Soluble, Donor-Acceptor Biphenyl Derivatives in the 2-(o-Nitrophenyl)propyl Series: Highly Efficient Two-Photon Uncaging of the Neurotransmitter γ -Aminobutyric Acid at $\lambda=800$ nm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 1840–1843 (2012).
157. Lin, W. & Lawrence, D. S. A Strategy for the Construction of Caged Diols Using a Photolabile Protecting Group. *J. Org. Chem.* **67**, 2723–2726 (2002).
158. Schmidt, R., Geissler, D., Hagen, V. & Bendig, J. Mechanism of Photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl Esters. *J. Phys. Chem. A* **111**, 5768–5774 (2007).

159. Pinheiro, A. V., Baptista, P. & Lima, J. C. Light activation of transcription: photocaging of nucleotides for control over RNA polymerization. *Nucleic Acids Research* **36**, e90–e90 (2008).
160. Gao, Z. *et al.* Photo-controlled release of fipronil from a coumarin triggered precursor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**, 2528–2535 (2017).
161. Kitamura, K. *et al.* Visible light-induced nitric oxide release from a novel nitrobenzene derivative cross-conjugated with a coumarin fluorophore. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **24**, 5660–5662 (2014).
162. Bao, C. *et al.* Styryl Conjugated Coumarin Caged Alcohol: Efficient Photorelease by Either One-Photon Long Wavelength or Two-Photon NIR Excitation. *Org. Lett.* **14**, 572–575 (2012).
163. Bojtár, M., Kormos, A., Kis-Petik, K., Kellermayer, M. & Kele, P. Green-Light Activatable, Water-Soluble Red-Shifted Coumarin Photocages. *Org. Lett.* **21**, 9410–9414 (2019).
164. Lin, Q. *et al.* Coumarin Photocaging Groups Modified with an Electron-Rich Styryl Moiety at the 3-Position: Long-Wavelength Excitation, Rapid Photolysis, and Photobleaching. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 3722–3726 (2018).
165. Chitose, Y. *et al.* Design and Synthesis of a Caged Carboxylic Acid with a Donor– π –Donor Coumarin Structure: One-photon and Two-photon Uncaging Reactions Using Visible and Near-Infrared Lights. *Org. Lett.* **19**, 2622–2625 (2017).
166. Klausen, M. *et al.* Dual-wavelength efficient two-photon photorelease of glycine by π -extended dipolar coumarins. *Chemical Science* (2019) doi:10.1039/C9SC00148D.
167. Dani, J. A. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biological Psychiatry* **49**, 166–174 (2001).

168. Hansen, S. B. *et al.* Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* **24**, 3635–3646 (2005).
169. Dani, J. A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. in *International Review of Neurobiology* vol. 124 3–19 (Elsevier, 2015).
170. Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods* **4**, 619–628 (2007).
171. Ellis-Davies, G. C. A chemist and biologist talk to each other about caged neurotransmitters. *Beilstein J. Org. Chem.* **9**, 64–73 (2013).
172. Peng, L., Silman, I., Sussman, J. & Goeldner, M. Biochemical Evaluation of Photolabile Precursors of Choline and of Carbamylcholine for Potential Time-Resolved Crystallographic Studies on Cholinesterases [†]. *Biochemistry* **35**, 10854–10861 (1996).
173. Peng, L., Wirz, J. & Goeldner, M. Synthesis and Characterization of Photolabile Compounds Releasing Noracetylcholine in the Microsecond Time Range. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 398–400 (1997).
174. Denk, W. Two-photon scanning photochemical microscopy: mapping ligand-gated ion channel distributions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 6629–6633 (1994).
175. Khiroug, L., Giniatullin, R., Klein, R. C., Fayuk, D. & Yakel, J. L. Functional Mapping and Ca²⁺ Regulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels in Rat Hippocampal CA1 Neurons. **8**.

176. Roerig, B., Nelson, D. A. & Katz, L. C. Fast Synaptic Signaling by Nicotinic Acetylcholine and Serotonin 5-HT₃ Receptors in Developing Visual Cortex. *J. Neurosci.* **17**, 8353–8362 (1997).
177. Kupchik, Y. M. *et al.* A novel fast mechanism for GPCR-mediated signal transduction—control of neurotransmitter release. *Journal of Cell Biology* **192**, 137–151 (2011).
178. Brown, E. B., Shear, J. B., Adams, S. R., Tsien, R. Y. & Webb, W. W. Photolysis of Caged Calcium in Femtoliter Volumes Using Two-Photon Excitation. *Biophysical Journal* **76**, 489–499 (1999).
179. Zayat, L. *et al.* A New Inorganic Photolabile Protecting Group for Highly Efficient Visible Light GABA Uncaging. *ChemBioChem* **8**, 2035–2038 (2007).
180. Salierno, M., Marceca, E., Peterka, D. S., Yuste, R. & Etchenique, R. A fast ruthenium polypyridine cage complex photoreleases glutamate with visible or IR light in one and two photon regimes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**, 418–422 (2010).
181. Filevich, O., Salierno, M. & Etchenique, R. A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity. *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**, 1248–1251 (2010).
182. Banala, S. *et al.* Photoactivatable drugs for nicotinic optopharmacology. *Nat Methods* **15**, 347–350 (2018).
183. Arvin, M. C. *et al.* Chronic Nicotine Exposure Alters the Neurophysiology of Habenulo-Interpeduncular Circuitry. *J. Neurosci.* **39**, 4268–4281 (2019).
184. Jin, X.-T., Tucker, B. R. & Drenan, R. M. Nicotine Self-Administration Induces Plastic Changes to Nicotinic Receptors in Medial Habenula. *eNeuro* **7**, ENEURO.0197-20.2020 (2020).

185. Passlick, S., Thapaliya, E. R., Chen, Z., Richers, M. T. & Ellis-Davies, G. C. R. Optical probing of acetylcholine receptors on neurons in the medial habenula with a novel caged nicotine drug analogue: nAChR-mediated Ca²⁺ signalling in medial habenula neurons. *J Physiol* **596**, 5307–5318 (2018).
186. Peterson, J. A. *et al.* Family of BODIPY Photocages Cleaved by Single Photons of Visible/Near-Infrared Light. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 7343–7346 (2018).
187. Goswami, P. P. *et al.* BODIPY-Derived Photoremovable Protecting Groups Unmasked with Green Light. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 3783–3786 (2015).
188. Rodat, T. *et al.* Restricted suitability of BODIPY for caging in biological applications based on singlet oxygen generation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10.1039/D0PP00097C (2020) doi:10.1039/D0PP00097C.
189. Seeman et Whidby - 1976 - The iodomethylation of nicotine. An unusual exampl.pdf.
190. Fournier, L. *et al.* Coumarinylmethyl Caging Groups with Redshifted Absorption. *Chem. Eur. J.* **19**, 17494–17507 (2013).
191. Zajac, M. A. An Application of Borane As a Protecting Group for Pyridine. *J. Org. Chem.* **73**, 6899–6901 (2008).
192. Hullio, A. A. & Mastoi, G. M. Nicotine-Based Ionic Liquid as a Green and Recyclable Catalyst for Morita Baylis-Hillman Reaction. 15.
193. Klán et al. - 2013 - Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and .pdf.
194. Asad, N. *et al.* Photochemical Activation of Tertiary Amines for Applications in Studying Cell Physiology. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 12591–12600 (2017).

195. McLain, D. E., Rea, Adam. C., Widegren, M. B. & Dore, T. M. Photoactivatable, biologically-relevant phenols with sensitivity toward 2-photon excitation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 2151–2158 (2015).
196. Tang, X. *et al.* Photorelease of Pyridines Using a Metal-Free Photoremovable Protecting Group. *Angew. Chem. Int. Ed.* anie.202005310 (2020) doi:10.1002/anie.202005310.
197. Sundararajan, C. & Falvey, D. E. Photolytic Release of Carboxylic Acids Using Linked Donor–Acceptor Molecules: Direct versus Mediated Photoinduced Electron Transfer to *N*-Alkyl-4-picolinium Esters. *Org. Lett.* **7**, 2631–2634 (2005).
198. Slanina, T. *et al.* In Search of the Perfect Photocage: Structure–Reactivity Relationships in *meso*-Methyl BODIPY Photoremovable Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 15168–15175 (2017).
199. Talekar, R. S., Chen, G. S., Lai, S.-Y. & Chern, J.-W. Nonreductive Deiodination of *ortho*-Iodo-Hydroxylated Arenes Using Tertiary Amines. *J. Org. Chem.* **70**, 8590–8593 (2005).
200. Kirpichnikov, M. A., Gorozhankin, S. K. & Grandberg, I. I. Reactions of 4-methyl-7-diethylaminocoumarin that proceed with electron transfer. *Chem Heterocycl Compd* **25**, 737–745 (1989).
201. O’Broin, C. Q., Fernández, P., Martínez, C. & Muñiz, K. *N*-Iodosuccinimide-Promoted Hofmann–Löffler Reactions of Sulfonimides under Visible Light. *Org. Lett.* **18**, 436–439 (2016).
202. Yuan, X. *et al.* NIS-promoted intermolecular bis-sulfenylation of allenamides *via* a two-step radical process: synthesis of 1,3-dithioethers. *Org. Chem. Front.* **7**, 2725–2730 (2020).
203. Hong, X. *et al.* Visible-Light-Activated Nanoparticle Photocatalyst of Iodine-Doped Titanium Dioxide. *Chem. Mater.* **17**, 1548–1552 (2005).

204. Yamaguchi, Y. *et al.* Evaluation of synthesized coumarin derivatives on aromatase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**, 2645–2649 (2017).
205. Weinstain, R., Slanina, T., Kand, D. & Klán, P. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials. *Chem. Rev.* **120**, 13135–13272 (2020).
206. Komori, N. *et al.* Design and synthesis of a new chromophore, 2-(4-nitrophenyl)benzofuran, for two-photon uncaging using near-IR light. *Chem. Commun.* **52**, 331–334 (2016).
207. Jakkampudi *et al.* - 2016 - Design and Synthesis of a 4-Nitrobromobenzene Deri.pdf.
208. Agarwal, H. K. *et al.* Calcium Uncaging with Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3687–3693 (2016).
209. Fedoryak, O. D. & Dore, T. M. Brominated Hydroxyquinoline as a Photolabile Protecting Group with Sensitivity to Multiphoton Excitation. *Org. Lett.* **4**, 3419–3422 (2002).
210. Dunkel, P. *et al.* Quinoline-derived two-photon sensitive quadrupolar probes. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 9899–9908 (2014).
211. Tran, C. *et al.* Two-Photon “Caging” Groups: Effect of Position Isomery on the Photorelease Properties of Aminoquinoline-Derived Photolabile Protecting Groups. *Org. Lett.* **17**, 402–405 (2015).
212. Davis, M. J. *et al.* Substituent Effects on the Sensitivity of a Quinoline Photoremovable Protecting Group to One- and Two-Photon Excitation. *J. Org. Chem.* **74**, 1721–1729 (2009).
213. Hennig, A.-L. K., Deodato, D., Asad, N., Herbivo, C. & Dore, T. M. Two-Photon Excitable Photoremovable Protecting Groups Based on the Quinoline Scaffold for Use in Biology. *J. Org. Chem.* **85**, 726–744 (2020).

214. Chitose, Y., Abe, M., Furukawa, K. & Katan, C. Design, Synthesis, and Reaction of π -Extended Coumarin-based New Caged Compounds with Two-photon Absorption Character in the Near-IR Region. *Chem. Lett.* **45**, 1186–1188 (2016).
215. Klausen, M., Dubois, V., Verlhac, J. & Blanchard-Desce, M. Tandem Systems for Two-Photon Uncaging of Bioactive Molecules. *ChemPlusChem* **84**, 589–598 (2019).
216. Drobizhev, M. *et al.* Understanding Strong Two-Photon Absorption in π -Conjugated Porphyrin Dimers via Double-Resonance Enhancement in a Three-Level Model. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15352–15353 (2004).
217. Frampton, M. J. *et al.* Synthesis, Crystal Structure, and Nonlinear Optical Behavior of β -Unsubstituted *m* *eso* – *m* *eso* *E*-Vinylene-Linked Porphyrin Dimers. *Org. Lett.* **7**, 5365–5368 (2005).
218. Chaud, J., Morville, C., Bolze, F. & Specht, A. Monitoring of uncaging processes by designing photolytical reactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10.1039.D0PP00169D (2020) doi:10.1039/D0PP00169D.
219. Wang, J.-L., Li, H.-J. & Wu, Y.-C. Divergent Synthesis of Marine Natural Products Siphonodictyal B, Corallidictyals C/D, and Liphagal Based on the Early Presence of an Aldehyde Group Instead of a Late-Stage Introduction. *J. Org. Chem.* **83**, 8716–8723 (2018).
220. Chaud, J. *et al.* Two-Photon Sensitive Coumarinyl Photoremovable Protecting Groups with Rigid Electron-Rich Cycles Obtained by Domino Reactions Initiated by a 5-*exo*-Dig Cyclocarbopalladation. *Org. Lett.* **23**, 7580–7585 (2021).

Résumé

Ce projet de thèse consiste à développer de nouveaux groupements protecteurs photolabiles (GPP) et de les adapter pour qu'ils puissent être utilisés en biologie, notamment, en neurosciences. Le projet principal de ce travail de thèse est de développer des précurseurs photolabiles du glutamate. Ainsi, deux GPPs sensibles à l'excitation bi-photonique ont été élaborés et utilisés pour libérer du glutamate sur tranches de cervelet par l'équipe du Dr. Philippe Isope. Une collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Vitale a ensuite été entreprise dans le but de développer un précurseur photolabile de la nicotine. Cela a mené au développement d'un GPP permettant de libérer la nicotine efficacement après excitation à un photon dans le vert. Pour finir, une nouvelle série de coumarines au squelette rigidifié a été développée au laboratoire à l'aide de réactions domino initiées par une carbopalladation 5-exo-dig suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura ou de Sonogashira. Ce travail d'ingénierie moléculaire par rigidification du squelette de ces coumarines a permis de développer des GPPs possédants d'excellentes sensibilités à l'excitation bi-photonique.

Mots clés : chimie biologie, chimie organique, excitation à deux photons, groupements protecteurs photolabiles, neurosciences, photochimie.

This thesis project consists in the development of new photoremovable protecting groups (PPGs) and their adaptations for different areas of neuroscience. The main aim involved the development of caged glutamate. Hence, two two-photon sensitive PPGs were synthesized and used to uncage glutamate on brain slices by Dr. Philippe Isope's team. An additional collaboration with the team of Dr. Nicolas Vitale was then undertaken to design a caged nicotine. This project led to an elaboration of a PPG able to uncage nicotine efficiently upon green irradiation. Finally, a series of highly rigidified coumarine based PPGs were developed using a 5-exo-dig carbopallation followed by a Suzuki-Miyaura or Sonogashira cross-coupling reactions. This work of molecular engineering led to the synthesis of highly two-photon sensitive PPGs.

Key words: chemical biology, organic chemistry, two-photon excitation, photoremovable protecting groups, neuroscience, photochemistry