



HAL
open science

Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques

Kathleen Solmont

► **To cite this version:**

Kathleen Solmont. Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques. Chimie organique. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR003 . tel-01757325

HAL Id: tel-01757325

<https://theses.hal.science/tel-01757325>

Submitted on 3 Apr 2018

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques

Présentée et soutenue par
Kathleen SOLMONT

Thèse soutenue publiquement le 16 Mars 2018
devant le jury composé de

Mme ANDRAUD Chantal	Directrice de Recherche Ecole Nationale Supérieure de Lyon	Rapportrice
Mme MAHUTEAU-BETZER Florence	Chargée de Recherche Institut Curie	Rapportrice
M. DURAND Philippe	Chargé de Recherche Institut de Chimie des Substances Naturelles	Examineur
M. ROMIEU Anthony	Professeur des universités Université de Bourgogne	Examineur
M. RENARD Pierre-Yves	Professeur des universités Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. HAEFELE Alexandre	Maître de Conférence Université de Rouen Normandie	Co-encadrant

Thèse dirigée par Pierre-Yves RENARD et co-encadrement par Alexandre HAEFELE, laboratoire COBRA UMR CNRS 6014





Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques

Présentée et soutenue par
Kathleen SOLMONT

Thèse soutenue publiquement le 16 Mars 2018
devant le jury composé de

Mme ANDRAUD Chantal	Directrice de Recherche Ecole Nationale Supérieure de Lyon	Rapportrice
Mme MAHUTEAU-BETZER Florence	Chargée de Recherche Institut Curie	Rapportrice
M. DURAND Philippe	Chargé de Recherche Institut de Chimie des Substances Naturelles	Examineur
M. ROMIEU Anthony	Professeur des universités Université de Bourgogne	Examineur
M. RENARD Pierre-Yves	Professeur des universités Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. HAEFELE Alexandre	Maître de Conférence Université de Rouen Normandie	Co-encadrant

Thèse dirigée par Pierre-Yves RENARD et co-encadrement par Alexandre HAEFELE, laboratoire COBRA UMR CNRS 6014



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Professeur Pierre-Yves Renard, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ces trois années et également pour m'avoir accordé toute sa confiance dans ce projet. Je lui suis aussi très reconnaissante pour le temps conséquent qu'il a pu m'accorder, notamment ces derniers mois, malgré de nombreuses casquettes à sa charge. J'ai beaucoup appris au sein de cette équipe, merci PY !

J'aimerais également remercier mon co-encadrant, le Docteur Alexandre Haefelé, pour m'avoir fait partager ses connaissances et pour sa disponibilité.

Je remercie aussi le Docteur Philippe Durand, Chargé de Recherche au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) à Gif-sur-Yvette, pour avoir accepté de collaborer avec nous sur ce projet scientifique, pour ses précieux conseils, sa forte disponibilité et son implication dans le projet malgré la distance.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger et d'évaluer mon projet.

Je souhaiterais remercier Ludo pour sa bonne humeur au quotidien, et ce, qu'importe les circonstances, son incommensurable patience, ses nombreux conseils, sa disponibilité à tout égard, son habileté en mécanique et pour ses petites blagues (pas) toujours rigolotes. Je remercie également Cyrille pour les conseils et les discussions scientifiques que l'on a pu avoir, Stéphane, Xavier et Thibault pour leur côté taquin.

Je remercie Christine pour sa disponibilité et ses conseils, qui a suivi mon projet pendant trois ans.

Je remercie également le personnel du plateau technique sans qui nous ne pouvons avancer sur nos projets : Tia² et Emilie (les reines incontournables de l'HPLC, qui dans la joie et la bonne humeur se rendent toujours disponibles), Patricia qui m'a beaucoup aidé et qui a grandement participé dans ce projet de thèse, Françoise et Albert.

Une attention particulière à mes collègues devenus mes amis : Roubi ou Roubax Jambax qui a toujours cru en moi, su me diriger vers les bonnes décisions et m'aider à me relever dans les moments les plus difficiles dans ce projet; mon Samsam (mon wingman) que j'admire pour son savoir qui dépasse mon imagination (« excusez-le de travailler ! »), qui a toujours su me faire rire avec sa nonchalance et pour tous les moments que l'on a pu passer ensemble, notamment au RECOB avec notre légendaire Poupousse (mon jumeau) que je remercie aussi chaleureusement pour sa gentillesse (malgré ses airs de bulldog), son naturel et sa franchise, Doctor P. pour son écoute, sa capacité à relativiser les choses du quotidien et son aptitude à faire de bonnes farces, Arnaud pour qui je ne pensais pas un jour ressentir autant d'admiration, Romain pain aux raisins et ses blagues à deux balles, et enfin ma Sovychao (ma super copine) pour tous les moments que l'on a pu passer ensemble aussi bien au labo qu'en dehors et pour nos délires de filles complètement folles.

J'aimerais maintenant m'adresser à mes colocataires de la cellule 255 : Dr. Freud (ou Dorri Dorra, Money penny...pardon Moneypony, Bella, ma bénédiction), qui a su me supporter pendant un et demi

avec mon humeur en dent de scie, une amie avec qui je suis sur la même « longueur d'onde » (pourtant tu fais des rhodamines et moi des BPO...), Olibrius pour son extrême gentillesse et son gagnam style en continu, Morgane qui a, elle, subi mes humeurs fâcheuses mais avec qui, malgré tout, j'ai passé des bons moments, Bouchra, Juliette, Yul ; sans oublier les voisins de la cellule 256 : Anissa, une personne à grand cœur avec qui j'ai énormément partagé de bons moments et de qui je ne garde que de bons souvenirs, Pierrick pour son côté (très) franc, Mégane pour nos duels sur Soul Calibur ; mais aussi Wiwi, Batoul, Sara, David, Kévin, Pauline, Matthieu, Florian, Masahiro, ; les nouveaux : Laura, Alexi et Margot ; et les anciens : Mehdi, Thibault, Killian, Pierre, Maha, Hassane, Aliona. Je remercie aussi toutes les personnes que j'aurai pu oublier par mégarde.

Enfin, je remercie ma famille sans qui je ne serais pas arrivée aujourd'hui à ce stade de ma vie, qui a su m'encourager et m'orienter dans chaque décision, qu'elle soit bonne ou mauvaise, et positiver quand je baissais les bras (« Pourquoi on tombe Bruce ? C'est pour mieux se relever ! »). J'espère qu'ils trouveront dans la réalisation de ce travail l'aboutissement de leurs efforts.

Je dédie ce manuscrit à mon papi Jo et ma tante Josie qui, de là-haut, je l'espère, sont fiers de moi.

« Maître, est l'échec »

Maître Yoda, Star Wars, épisode VIII, Les derniers Jedi.

« L'échec est le fondement de la réussite »

Lao-Tseu

Abréviations et anglicismes

En plus des abréviations listées ci-dessous, un certain nombre d'anglicismes ont volontairement été conservés et utilisés tout au long du manuscrit afin de ne pas dénaturer la signification originale de ces termes. Ils sont notés entre guillemets.

[¹⁸F]-FDG : *¹⁸F-fluorodesoxyglucose*

2,4-DNPH : *2,4-dinitrophénylhydrazine*

ACN : *acétonitrile*

ADN : *Acide DésoxyriboNucléique*

Arg : *Arginine*

Asp : *acide aspartique*

ATP : *Adénosine Tri-Phosphate*

BET : *Back Electron Transfer*

Bn : *benzyl*

BPO : *benzophénoxazines*

BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

BTAC : *chlorure de benzyltriéthylammonium*

CHAPS : *3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate*

CIEEL : *Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence.*

CRET : *Chemiluminescence Resonance Energy Transfer.*

CT : *Computerized Tomography*

CTAB : *bromure de cétyltriméthylammonium*

CTID : *Charge Transfer Induced Decomposition*

Cys : *Cystéine*

DCC : *N,N'-dicyclocarbodiimide*

DCM : *dichlorométhane*

DHF : *dihydrofurane*

DIPEA : *N, N-diisopropyléthylamine*

DMAP : *diméthylaminopyridine*

DMF : *diméthylformamide*

DMNE : *1,4-diméthynaphtalène*

DMSO : *Dimethyl sulfoxide*

DOTA : *1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid*

DTT : *dithiothréitol*

EDTA : *Éthylène Diamine Tétra-Acétique*

EMA : *European Medicines Agency*

ESI : *Electron Spray Ionisation*

ESIPT : *Excited-State Intramolecular Proton-Transfer*

EtOH : *Ethanol*

FDA : *Food and Drug Administration*

FRET : *Förster Resonance Energy Transfer = Transfer d'énergie de type Förster*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

Glu : *acide glutamique*

HEPES : *cide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique*

HMTA : *hexaméthylènetétramine*

HOMO : *Highest Occupied Molecular Orbital*

HRMS : *High Resolution Mass Spectroscopy*

i.e : exempli grātia = par exemple

i.e. : id est = c'est-à-dire

IR : *infra-rouge*

IRM : *Imagerie par Résonance Magnétique*

LDA : *diisopropylamidure de lithium*

LMCT : *Ligand-Metal Charge Transfer*

LRE : *Luciferin Regenating Enzyme*

LUMO : *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

Lys : *Lysine*

MeOH : *méthanol*

MLCT *Metal-Ligand Charge Transfer*

MOM : *methoxymethylether*

MRS : *Magnetic Resonance Spectroscopy*

NBS : *N-bromosuccinimide*

NCS : *N-chlorosuccinimide*

NTR : *nitroréductases*

oa-TOF : *orthogonal acceleration time-of-flight*

PABA : *alcool para-aminobenzylrique*

PABC : *oxycarbonyl para-aminobenzylrique*

PBS : *phosphate buffered saline = tampon phosphate salin*

PCC : *Chlorochromate de pyridinium*

PEG : *polyéthylène glycol*

PeT : *Photo-induced Electron Transfer*

PGA : *amidase de pénicilline G*

PHBA : *alcool para-hydroxybenzylrique*

PMA : *phosphomolybdic acid*

QD's : *Quantum Dots*

QY : *Quantum Yield = rendement quantique*

RMN : *Résonance Magnétique Nucléaire*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RP-HPLC : *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*

SN2 : *Substitution Nucléophile d'ordre 2*

SOD : *superoxyde dismutase*

TBAF : *fluorure de tétrabutylamonium*

TBDMS : *tert-butyldiméthylsilyl*

TBDPS : *tert-butyldiphénylesilyl*

TBET : *Through Bond Energy Transfer*

TEAA : *triéthylammonium acétate*

TEAB : *triéthylammonium bicarbonate*

TEMP : *Tomographie par Emission Mono-Photonique*

TEP : *tomographie par Emission de Positons*

TFA : *acide trifluoroacétique*

THF : *tétrahydrofurane*

TMS : *triméthylsilyl*

Val : *valine*

ϕ^{CL} : *rendement quantique de chimiluminescence*

ϕ^F : *rendement quantique de fluorescence*

Préambule

Ces travaux de thèse ont été réalisés du 1er Janvier 2015 au 31 décembre 2017 au sein de l'équipe de Chimie Bio-organique (Equipe 2 du Laboratoire COBRA, UMR CNRS 6014, Bâtiment 40) dirigée par le Professeur Pierre-Yves Renard. Cette thèse a été encadrée par le Professeur Pierre-Yves Renard (directeur de thèse) et le Dr. Alexandre Haefelé (co-encadrant de thèse).

Tous les travaux expérimentaux rapportés dans ce manuscrit sont issus de mon travail personnel sauf mention explicite du contraire. J'ai en particulier collaboré avec un post-doctorant du laboratoire, le Dr. Arnaud Chevalier, avec une ingénieure d'étude, Patricia Le Nahenec-Martel, et un collaborateur externe, le Dr. Philippe Durand (Chargé de recherche au sein de l'Institut de Chimie des Sciences Naturelles (ICSN), UPR CNR 2301) pour ce qui concerne le développement sondes chimiluminescentes à cœur phénolique.

Les caractérisations analytiques (RMN, HPLC, UV-vis, fluorescence, spectrométrie de masse (haute et basse résolutions) ont été effectuées par moi-même mais aussi par des personnels du COBRA.

L'ensemble des résultats expérimentaux sont rapportés dans les cahiers de laboratoire D54083, X039469 et X039523. Ces travaux ont été financés par des fonds ministériels (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

Ce mémoire de doctorat est constitué de trois chapitres. Le premier permet de placer notre projet dans son contexte avec une partie introductive sur les phénomènes de luminescence. Les deux suivants sont consacrés à l'élaboration de systèmes fondés sur la chimiluminescence et visant une détection d'activités enzymatiques. Il rassemble l'ensemble des résultats obtenus lors de mes trois années de thèse dont la majorité a été dédiée au travail expérimental de synthèse et d'analyse.

Sommaire

CHAPITRE I. LUMIERE ET IMAGERIE MOLECULAIRE	19
I. L'IMAGERIE MOLECULAIRE	21
1. Introduction à l'imagerie moléculaire	21
2. Les différents types d'imagerie moléculaire	23
2.1 Les techniques de type macroscopique	24
2.1.1 La tomodensitométrie	24
2.1.2 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	24
2.1.3 L'imagerie par ultrasons	25
2.2 Les techniques de type microscopique et l'imagerie optique	26
2.2.1 Les techniques d'imagerie radio-isotopique	26
2.2.2 L'imagerie optique	28
II. LUMIERE ET LUMINESCENCE	30
1. La lumière	30
2. La luminescence	31
III. PRINCIPES GENERAUX DE FLUORESCENCE	33
1. Processus et généralités	33
2. La pro-fluorescence	36
2.1 Principe général	36
2.2 Les modulations de la fluorescence	38
2.2.1 Le transfert d'électron photoinduit (ou PeT pour <i>Photo-induced electron Transfer</i>)	38
2.2.2 Le transfert de charge photoinduit (ou ICT pour <i>Intramolecular Charge Transfer</i>)	38
2.2.3 Le transfert de proton photoinduit	39
3. Le transfert d'énergie de type <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)</i>	40
IV. BIOLUMINESCENCE ET CHIMILUMINESCENCE	41
1. Luminescence dans la nature : la bioluminescence	41
1.1 Histoire	41
1.2 Exemples d'applications	45
2. Du processus biochimique au processus chimique : la chimiluminescence	49
3. Le motif 1,2-dioxétane	50
3.1 Synthèse du motif 1,2-dioxétane	50
3.2 Les mécanismes de déclenchement de chimiluminescence	51
3.2.1 Le mécanisme CIEEL	51
3.2.2 Le mécanisme CTID	52
3.3 Relation structure-stabilité : influence des substituants sur la stabilisation thermique du motif 1,2-dioxétane	53
3.3.1 Sélection des groupements stabilisants	54
3.3.2 Sélection du chromophore et du déclencheur	55

4.	<i>Conjugaison aux fluorophores organiques</i>	59
4.1	Transfert d'énergie à travers l'espace de type <i>Chemiluminescence Resonance Energy Transfer</i> (CRET).....	59
4.2	Transfert d'énergie à travers les liaisons de type <i>Through Bond Energy Transfer</i> (TBET) 61	
V.	INTRODUCTION AU PROJET DE THESE	62
CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT DE SONDES CHIMILUMINESCENTES A PLATEFORME DE TYPE PHENOL POUR UNE DETECTION DANS LE PROCHE IR		
65		
I.	ETAT DE L'ART	67
1.	<i>Présentation des avancées sur le motif 1,2-dioxétane à phénol : de la détection UV au proche IR</i>	67
1.1	Travaux du Prof. A.P. Schaap : commercialisation des premières plateformes chimiluminescentes et amélioration de leur efficacité.....	67
1.2	Travaux du Prof. M. Matsumoto : synthèse et développement d'un nouveau motif dioxétane.....	75
1.3	Travaux du Prof. D. Shabat : optimisation des dioxétanes du Prof. Schaap et extension de la chimiluminescence vers le proche IR pour des applications <i>in vivo</i>	79
2.	<i>Utilisation des lanthanides pour la chimiluminescence</i>	91
3.	<i>Les bras réactifs auto-immolables</i>	98
4.	<i>Présentation des travaux antérieurs au laboratoire</i>	103
4.1	Synthèse et évaluation d'une sonde chimiluminescente pour la détection de la Caspase-3	103
4.2	Synthèse et évaluation d'un hybride dioxétane-coumarine	106
4.3	Extension de la chimiluminescence vers le proche-IR : formation d'une première cassette « TBET » phénolique	108
II.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	110
1.	<i>Présentation de la voie de synthèse de nouvelles plateformes chimiluminescentes à cœur phénolique</i>	110
1.1	Synthèse de chimiluminophores : synthèse modèle d'une plateforme phénolique ..	111
1.1.1	Première stratégie : insertion d'un groupement fonctionnel <i>via</i> une réaction d' <i>ortho</i> -métallation	113
1.1.2	Deuxième stratégie : insertion d'un groupement fonctionnel <i>via ortho</i> -formylation 114	
1.1.3	Troisième stratégie.....	116
1.2	Choix et introduction d'un déclencheur de chimiluminescence.....	122
1.2.1	Introduction de groupement phosphates pour une détection de la phosphatase alcaline.....	122
1.2.2	Introduction de dérivés silylés pour une détection d'ions fluorures	127
1.2.3	Introduction d'un groupement nitro <i>via</i> un bras auto-immolable pour une détection de la nitro-réductase	129

1.3	Extension de la chimiluminescence vers le proche infra-rouge : utilisation du cœur phénolique comme antenne par introduction d'un complexe de lanthanide.....	133
2.	<i>Conclusion et perspectives à ces travaux</i>	135

**CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT DE SONDAS CHIMILUMINESCENTES A CŒUR NAPHTOLIQUE :
FORMATION D'UNE CASSETTE « TBET » HYDROSOLUBLE.....139**

I.	ETAT DE L'ART	141
1.	<i>Présentation bibliographique</i>	141
1.1	Exemples de fonctionnalisations des motifs 1,2-dioxétanes pour une extension de chimiluminescence vers le proche IR	141
1.1.1	Les sondes chimiluminescentes à cœur naphtolique.....	141
1.1.2	Autres modifications structurales	147
1.2	Exemples de cassettes de type TBET.....	149
1.3	Les benzo[a]phénoxazines : méthodes d'hydrosolubilisation	154
2.	<i>Présentation des travaux antérieurs au laboratoire</i>	157
2.1	Première stratégie : Extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR via un transfert d'énergie à travers l'espace.....	157
2.2	Deuxième stratégie : extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR via un transfert d'énergie à travers les liaisons.....	160
2.2.1	Conception d'un chimiluminophore à cœur naphtolique pour l'introduction d'un motif fluorescent <i>via</i> un groupement de type triflate	160
2.2.2	Modification du groupement protecteur et introduction d'un motif fluorescent <i>via</i> un atome d'halogène	163
2.2.2.1	Synthèse	163
2.2.2.2	Déclenchement de chimiluminescence par détection d'ions fluorures : preuve de concept	
II.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	169
1.	<i>Première stratégie : modification du groupement protecteur par introduction d'un groupement de type méthoxyéther (MOM)</i>	169
2.	<i>Deuxième stratégie : introduction d'un groupement de type benzyle</i>	176
2.1	Synthèse du chimiluminophore	176
2.1	Choix et introduction d'un déclencheur de chimiluminescence.....	178
2.1.1	Première stratégie : introduction de l'acétylène en amont du déclencheur.....	178
2.1.2	Deuxième stratégie : introduction du déclencheur en amont de l'acétylène	182
3.	<i>Valorisation du chimiluminophore à cœur naphtol</i>	186
4.	<i>Extension de la chimiluminescence vers le proche IR : synthèse et introduction de fluorophore de type benzo[a]phénoxazine</i>	187
4.1	Synthèse de fluorophores	188
4.2	Synthèse de la cassette chimiluminescente par introduction d'une version hydrosoluble du Nile red	191
4.3	Caractéristiques photophysiques : spectres d'absorption et d'émission	192
5.	<i>Conclusion et perspectives à ces travaux</i>	194

CHAPITRE IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	197
I. CONCLUSION GENERALE	199
1. <i>Sondes à cœur phénolique</i>	200
2. <i>Sondes à cœur naphtholique</i>	203
II. PERSPECTIVES.....	206
1. <i>Fin du projet</i>	206
2. <i>Vers une stratégie plus convergente</i>	208
 CHAPITRE V. EXPERIMENTAL SECTION	 213
I. GENERAL PROCEDURES	215
1. <i>Chemicals and reagent</i>	215
2. <i>Instrument</i>	215
3. <i>Methods</i>	216
3.1 HPLC systems.....	216
II. UNPUBLISHED EXPERIMENTAL DATA	217
1. <i>Synthesis of phenol chemiluminescent platform</i>	217
2. <i>Synthesis of naphthol chemiluminescent platform</i>	228
2.1 Protection with methoxymethylether (MOM) group	229
2.2 Protection with benzyl (Bn) group	233
2.3 Synthesis of naphthol platform from 1,2-dioxetane decomposition	241
3. <i>Synthesis of water-soluble Nile red derivatives</i>	243

Chapitre I. Lumière et imagerie moléculaire

I. L'imagerie moléculaire

1. Introduction à l'imagerie moléculaire

La mise sur le marché de produits pharmaceutiques ou galéniques nécessite la conception d'un modèle biologique fiable en amont du développement industriel. Afin de rendre ce modèle opérationnel, de multiples essais aux stades précliniques et cliniques sont réalisés sur un nombre croissant d'animaux cobayes. Il s'agit alors d'un processus à durée étendue, coûteux et très réglementé par diverses agences telles que l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé (ANSM), l'Agence Européenne des Médicaments (EMA pour European Medicines Agency) ou encore la Food and Drug Administration (FDA). Néanmoins, le nombre de médicaments approuvés par ces agences, notamment la FDA, ne cesse de diminuer ces dernières décennies¹ (Figure I.1) malgré l'essor de nouvelles technologies telles que la nanothérapie (substitut de la chimiothérapie²), ou encore la bio-impression, technique qui permettrait de remplacer les cobayes animaux.

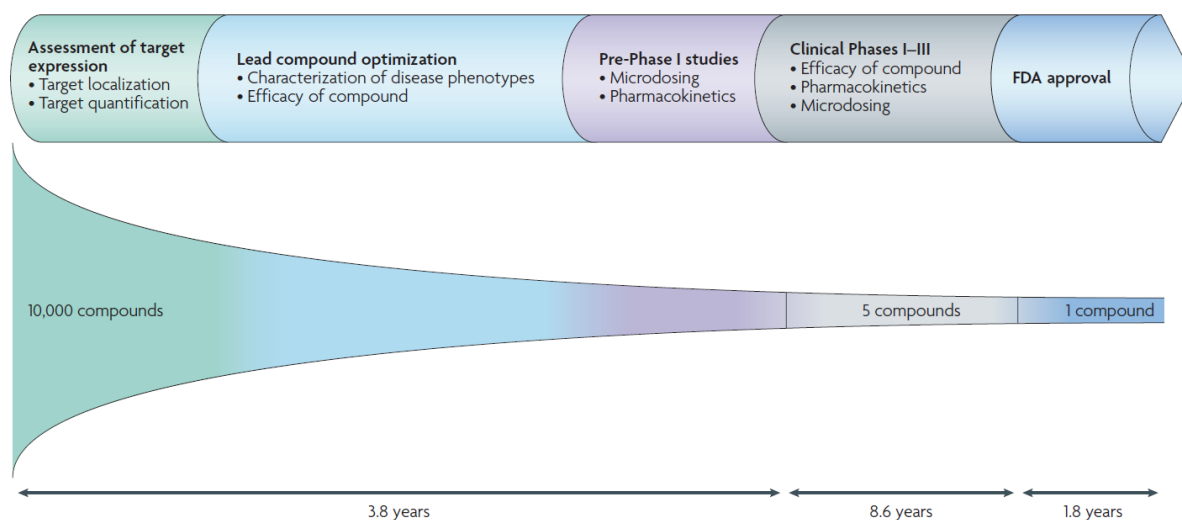


Figure I.1 : Processus de mise sur le marché de médicaments^{1b}

Dans le but de pallier les conséquences financières sur la production de médicaments, l'utilisation massive de cobayes ainsi que les distorsions et différences de comportement inter-animales ou les différences entre le modèle animal et le modèle humain, l'imagerie moléculaire peut être un complément à moindre coût. Cette méthode fait appel à la biologie moléculaire, la chimie, l'informatique, l'ingénierie, et la médecine (Figure I.2). Elle donne accès à une image complète de l'organisme d'étude, de manière non invasive, à différents points chronologiques et permet ainsi une meilleure compréhension de la pathologie, et un suivi dans le temps des effets des médicaments. Elle contourne ainsi la majorité des limitations des techniques *in vitro* classiques. De plus, elle intervient

¹ a) P. R. Contag *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 555. b) J. K. Willmann, N. van Bruggen, L. M. Dinkelborg, S. S. Gambhir *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 591. c) R. Weissleder, M. C. Schwaiger, S. S. Gambhir, H. Hricak *Science Translational Medicine* **2016**, 8, 355ps16.

² A. Ediriwickrema, W. M. Saltzman *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, 1, 64.

aussi bien dans la détection et l'évaluation de l'évolution de tumeurs en oncologie³ ou de tout processus lié à la maladie, que dans l'étude de mécanismes biologiques visant à une compréhension significative des interactions du vivant. Par ailleurs, l'imagerie moléculaire connaît aujourd'hui de grandes avancées avec des techniques telles que la tomographie par émission de positons (TEP) ou encore la tomographie par émission mono-photonique (TEMP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) – techniques devenues des outils classiques dans le domaine clinique – les imageries par fluorescence, bioluminescence et chimiluminescence ainsi que dans la thérapie génique. Le monde scientifique contribue désormais à développer d'avantages de nouvelles méthodes, plus sensibles, et à améliorer la spécificité et la compatibilité aux études *in vivo* des agents chimiques d'imagerie.

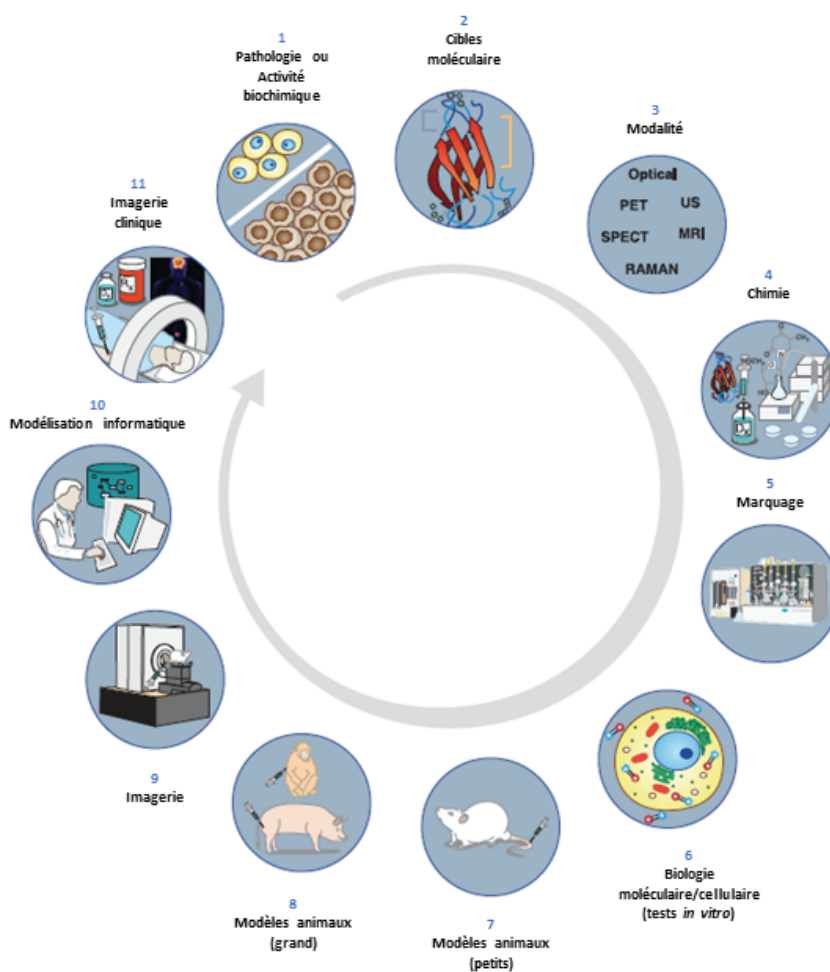


Figure I.2 : Représentation schématique des étapes clés impliquées dans une étude d'imagerie moléculaire⁴

Dans cette première partie introductive, nous nous attacherons à présenter brièvement les différentes techniques d'imagerie ayant connu un essor ces vingt dernières années en insistant plus particulièrement sur l'imagerie optique.

³ U. Mahmood, R. Weissleder *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2, 489.

⁴ M. L. James, S. S. Gambhir *Physiol. Rev.* **2012**, 92, 897.

2. Les différents types d'imagerie moléculaire

Comme présenté dans le paragraphe précédent, l'imagerie moléculaire constitue un véritable outil dans le domaine clinique. Ainsi, suivant la cible à visualiser, les résolutions spatiale et temporelle nécessaires et le type d'informations requises, les chercheurs comme les médecins ont le choix parmi cinq modalités d'imagerie⁴ : la tomodensitométrie ou l'imagerie par rayon X (CT pour *Computerized Tomography* en Anglais), l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), l'imagerie nucléaire qui comprend la Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP) et la Tomographie par Emission de Positons (TEP), l'échographie et l'imagerie optique qui regroupe la fluorescence, la bioluminescence et la chimiluminescence. Ces modalités sont souvent distinguées suivant deux catégories. La première regroupant la tomodensitométrie, l'IRM et l'échographie, donne des informations de type anatomique/structurale, et est largement utilisée dans les domaines clinique et préclinique. La deuxième catégorie, bien plus utilisée en recherches clinique et fondamentale, renseigne sur un aspect microscopique et permet ainsi d'observer des phénomènes à l'échelle cellulaire voire moléculaire. Elle réunit la TEP, la TEMP et l'imagerie optique. Comme chacune de ces modalités a ses avantages et ses limitations (Figure I.3), d'autres techniques les couplant les unes aux autres, appelées multimodales, telles que le PET-CT, le PET-MRI ont vu le jour. En effet, en complétant les faiblesses des unes par les bénéfices des autres, il a été possible d'améliorer sensiblement les données de reconstruction et de visualisation.

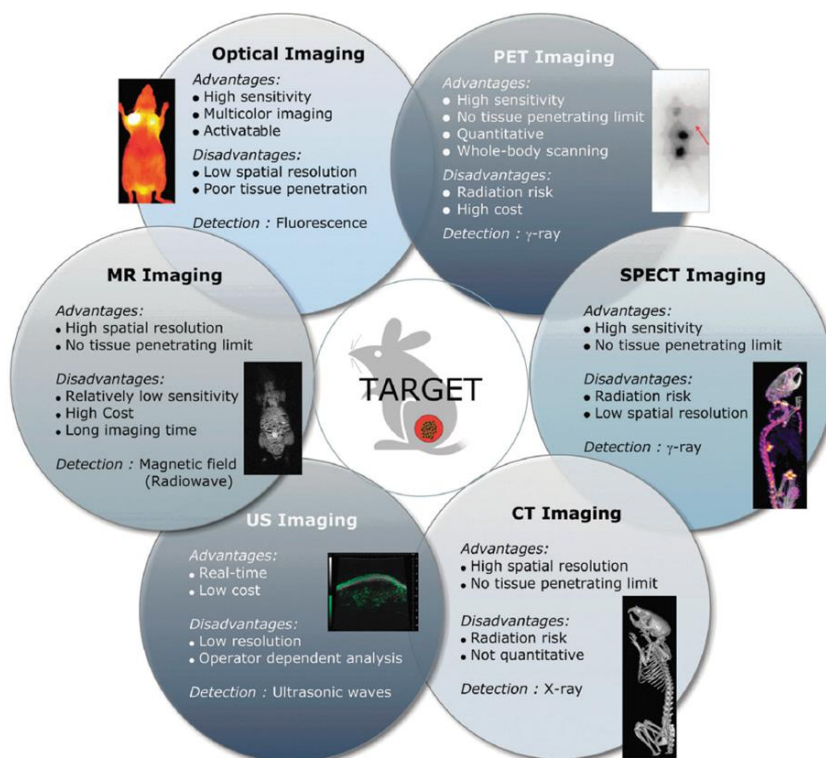


Figure I.3 : Représentation schématique des modalités de l'imagerie moléculaire⁵

⁵ D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656.

2.1 Les techniques de type macroscopique

2.1.1 La tomодensitométrie

La tomодensitométrie (CT pour Computational Tomography) repose sur la capacité des tissus à absorber des rayons X lorsque qu'ils passent à travers le corps. Elle constitue ainsi un outil morphologique extrêmement utile. Elle a notamment permis d'identifier certaines pathologies telles que l'embolie pulmonaire⁶ et l'ischémie.⁷ Malgré des bonnes résolution et sensibilité, un temps d'acquisition rapide et une facilité d'utilisation, cette technique est limitée par une forte exposition aux irradiations et une faible qualité de contraste des tissus mous, ce qui nécessite l'administration d'une dose importante d'agents de contraste. Ces derniers, principalement à base d'iode, sont malheureusement non-spécifiques et par conséquent causent des problèmes de toxicité. En effet, pour délimiter de manière efficace les organes ou les tumeurs, la dose à injecter est de l'ordre du millimolaire, soit un million de fois plus qu'une dose d'agents chimiques injectée pour les analyses de type TEP et TEMP (cf partie 2.2.1). Néanmoins, cette technique est utilisée de manière usuelle en recherche clinique et est d'autant plus appréciée lorsqu'elle est couplée à une autre technique d'imagerie pour réaliser de la multimodalité.

2.1.2 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique basée sur le phénomène de relaxation magnétique des protons contenus dans les biomolécules telles que l'eau, les lipides ou les protéines, présentes à différentes concentrations dans les organes. En outre, il s'agit d'une technique similaire au principe théorique de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) fréquemment utilisée en chimie. Le corps étudié, alors placé dans un aimant, est exposé à un champ magnétique qui induit un alignement des spins nucléaires d'atomes contenus dans l'organisme. Des variations d'intensité du champ magnétique sont produites par impulsions électriques (ou radiofréquences) et conduisent au retour à l'équilibre de ces spins, état également appelé relaxation. Ce phénomène est alors mathématiquement et informatiquement traduit en une image haute résolution à trois dimensions et la différence de contraste obtenue est dépendante du temps de relaxation magnétique des tissus pris individuellement (temps de relaxations longitudinal (T1) et transversal (T2)).⁸ Les données transcrites donnent ainsi des informations aussi bien d'ordre structural, à travers l'observation des tissus-mous, que moléculaire, notamment grâce à l'avènement de nouveaux agents de contraste spécifiques, tels que le gadolinium sous forme chélaté– les ions gadolinium libres étant cytotoxiques – et d'autres nanoparticules paramagnétiques à métaux de transition (Mn²⁺ par exemple) ou encore, plus récemment, les nanoparticules d'oxydes ferreux.⁹ Ces agents de contraste, qui influencent le temps

⁶ R. D. Mallo, L. Salem, T. Lalani, D. R. Flum *J. Gastrointest. Surg* **2005**, *9*, 690.

⁷ P. D. Stein, S. E. Fowler, L. R. Goodman, A. Gottschalk, C. A. Hales, R. D. Hull, K. V. Leeper, J. Popovich, D. A. Quinn, T. A. Sos, H. D. Sostman, V. F. Tapson, T. W. Wakefield, J. G. Weg, P. K. Woodard *New Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2317.

⁸ J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín, M. A. Busquets *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1727.

⁹ Pour plus d'information concernant les agents de contrastes utilisés en IRM, voir : a) L. M. De Leon-Rodriguez, A. J. M. Lubag, C. R. Malloy, G. V. Martinez, R. J. Gillies, A. D. Sherry *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 948. b) la référence 5. c) P. Verwilt, S. Park, B. Yoon, J. S. Kim *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1791. d) T.-H. Shin, Y. Choi, S. Kim, J. Cheon *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4501.

de relaxation des molécules d'eau qui leur sont associées, et donc permettent de cibler des événements plus spécifiquement, permettent d'optimiser la sensibilité, bien qu'à ce jour trop faible (de l'ordre du millimolaire), et la différenciation des organes. Toutefois, la sensibilité semble être une problématique majeure pour la technique d'IRM car les agents employés sont responsables d'allergies (voire de chocs anaphylactiques) et sont la cause de pathologies telles que la fibrose néphrogénique systémique notamment chez les patients ayant une fonction rénale diminuée. L'IRM est de ce fait proscrite aux femmes enceintes.⁷

Notons que les agents de contraste pour l'IRM peuvent aussi bien agir en tant qu'agents multifonctionnels, à la suite de couplages à des fluorophores organiques ou à des complexes métalliques à ligands luminescents par exemple. Par conséquent, deux voire plusieurs propriétés peuvent être exploitées de façon simultanée par des techniques de multimodalité. Ce procédé semble être le cœur de nouvelles recherches pour pallier le manque de sensibilité de l'IRM et permettrait ainsi de travailler à des concentrations en agents plus faibles.¹⁰

Une variante de l'IRM, la Résonance Magnétique Spectroscopique (RMS ou MRS pour Magnetic Resonance Spectroscopy) est étudiée depuis une dizaine d'année et permet l'observation du métabolisme cérébral en temps réel.¹¹ Celle-ci repose également sur la relaxation des protons mais est plus efficace sur celle du ¹³C, la faible abondance naturelle de cet isotope étant justement exploitée. Cette technique est en pleine évolution et jouera très certainement un rôle important dans l'avenir de l'imagerie moléculaire.

2.1.3 L'imagerie par ultrasons

L'imagerie médicale par ultrasons ou échographie est une technique qui exploite les propriétés et le comportement des ondes sonores à haute fréquence (de l'ordre du MHz) lorsqu'elles passent à travers un tissu biologique. Lors de l'analyse d'un sujet, des signaux électriques sont convertis, par le biais d'une sonde ou transducteur, en ultrasons qui traversent le corps. Certaines de ces ondes sont par la suite réfléchies et renvoyées vers le transducteur pour être détectées et converties en retour en signaux électriques. Ces derniers sont alors traités informatiquement pour donner une image contrastée.⁴ Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, il est coutume d'employer, comme pour les techniques d'IRM et de tomodensitométrie, des agents de contraste qui sont administrés par voie intraveineuse. Bien qu'il en existe plusieurs types,¹² ceux entrant dans la catégorie de microbulles sont majoritairement utilisés. Ils sont constitués d'une capsule phospholipidique ou bio-polymérique remplie de gaz (air ou autres gaz à haut poids moléculaire comme les perfluorocarbures) et ont généralement un diamètre de l'ordre du micromètre (Figure I.4). La cape lipidique ou polymérique a pour rôle d'éviter toute fuite ou agrégation des microbulles dans l'organisme, et le cœur gazeux est

¹⁰ Pour plus d'information concernant les agents multimodaux, voir : a) L. Frullano, J. Zhu, C. Wang, C. Wu, R. H. Miller, Y. Wang *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 94. b) S. M. Vithanarachchi, M. J. Allen *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4148. c) Z. Hashim, M. Green, P. H. Chung, K. Suhling, A. Protti, A. Phinikaridou, R. Botnar, R. A. Khanbeigi, M. Thanou, L. A. Dailey, N. J. Commander, C. Rowland, J. Scott, D. Jenner *Nanoscale* **2014**, *6*, 8376.

¹¹ Pour plus d'information concernant le technique de MRS, voir : a) B. D. Ross, P. Bhattacharya, S. Wagner, T. Tran, N. Sailasuta *Am. J. Neuroradiol.* **2010**, *31*, 24. b) T. Rodrigues, J. Valette, A.-K. Bouzier-Sore *Front. Neuroenergetics* **2013**, *5*. c) M. Mishkovsky, A. Comment *Anal. Biochem.* **2017**, *529*, 270.

¹² N. Deshpande, A. Needles, J. K. Willmann *Clin. Radiol.* **2010**, *65*, 567.

littéralement responsable de l'augmentation du pouvoir échogénique de la substance injectée. Grâce à ce type d'agents de contraste, il a été possible de cibler spécifiquement des bio-molécules (récepteurs protéiniques responsables de diverses pathologies) par greffage en surface d'anticorps ou de peptides ciblant spécifiques.¹³ Ainsi, l'imagerie par ultrasons est une modalité unique puisqu'elle peut être employée aussi bien en imagerie diagnostique qu'en tant qu'outil thérapeutique. De plus, son faible coût, sa portabilité, sa facilité d'utilisation, l'absence d'irradiations ionisantes, ainsi que ses hautes résolutions temporelle et spatiale font de cette modalité une technique parfois préférée aux techniques classiques de l'imagerie moléculaire.

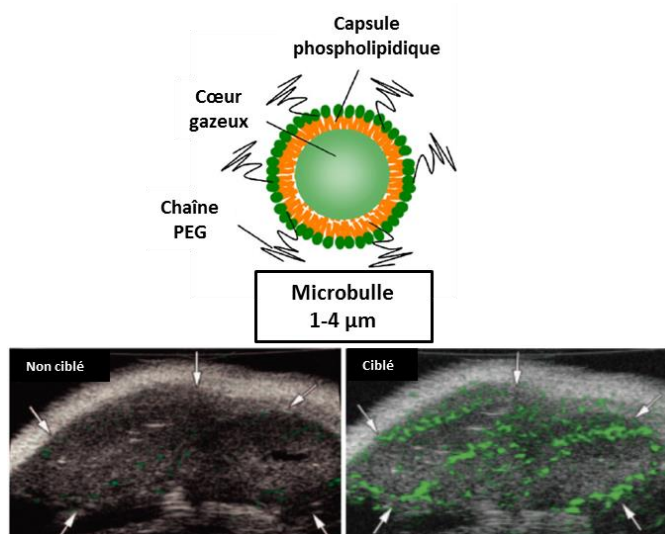


Figure 1.4 : Représentation schématique (en haut) d'une microbulle à base de phospholipides et de polyéthylène glycol (PEG) [le PEG apporte une contrainte stérique supplémentaire qui permet d'éviter l'agrégation des microbulles]¹² et Echographie (en bas) d'une angiogenèse tumorale au sein d'une souris après injection de microbulles non spécifiques (à gauche) et de microbulles spécifiques du récepteur du facteur de type II de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR2) (à droite)¹⁴

2.2 Les techniques de type microscopique et l'imagerie optique

2.2.1 Les techniques d'imagerie radio-isotopique

Parmi les techniques qui suscitent le plus d'intérêt ces vingt dernières années, figurent la Tomographie par Emission de Positons (TEP ou en anglais PET pour Positron Emission Tomography) et la Tomographie d'Emission Mono-Photonique (TEMP ou en anglais SPECT pour Single-Positron Emission Tomography). Elles sont, toutes deux, basées sur l'émission de rayonnements gamma provenant de radiotraceurs et permettent d'obtenir des images haute résolution de modifications biochimiques et de détecter, voire quantifier des biomolécules au sein d'un organisme vivant.

¹³ a) G. M. Lanza, S. A. Wickline *Curr. Probl. Cardiol.*, 28, 625. b) M. Smeenge, F. Tranquart, C. K. Mannaerts, T. M. de Reijke, M. J. van de Vijver, M. P. Laguna, S. Pochon, J. J. M. C. H. de la Rosette, H. Wijkstra *Invest. Radiol.* **2017**, 52, 419.

¹⁴ J. K. Willmann, R. Paulmurugan, K. Chen, O. Gheysens, M. Rodriguez-Porcel, A. M. Lutz, I. Y. Chen, X. Chen, S. S. Gambhir *Radiology* **2008**, 246, 508.

La TEP se caractérise par la détection de photons à haute énergie (511 keV) émis par annihilation d'un positon avec un électron. Ce choc produit simultanément deux photons de même énergie dans des directions opposées (Figure I.5).¹⁵ Les isotopes généralement sélectionnés pour l'imagerie par TEP ont des temps de vie comparables au temps nécessaire pour réaliser l'image. Les principales sondes utilisées sont marquées au ^{11}C ou au ^{18}F parce qu'elles sont fortement indiscernables de leurs équivalents non radiomarqués. En effet, le carbone est le constituant majoritaire d'un organisme vivant, son remplacement par du ^{11}C engendre donc très peu d'effet isotopique. De plus, l'utilisation du ^{18}F est très avantageuse : bien que non retrouvé dans les biomolécules, il peut facilement substituer un atome d'hydrogène ou une fonction hydroxyle – les atomes de fluor et d'hydrogène ont une taille similaire (1.20 et 1.35 Å respectivement), la perturbation stérique en est que très faible – sa forte électronégativité apporte souvent une activité supplémentaire à la sonde/médicament, et son temps de demi-vie relativement long facilite aussi bien sa manipulation en synthèse qu'en étude *in vivo* notamment par rapport au ^{11}C (110 minutes contre 20 min respectivement).¹⁶ Ainsi, la conception de sondes radiomarquées au ^{18}F pour l'imagerie TEP est en pleine expansion,¹⁷ et le principal radio-marqueur employé à l'heure actuelle en recherche clinique est le ^{18}F -fluorodesoxyglucose ([^{18}F]-FDG) qui permet de visualiser les cancers à travers la surconsommation du glucose par les cellules malignes.¹⁸

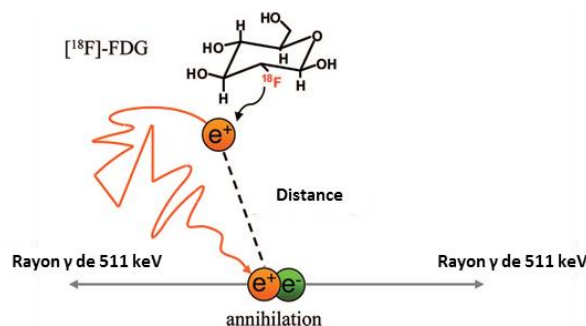


Figure I.5 : Représentation schématique de l'annihilation d'un positon par un électron¹⁹

Malgré ses limitations (forte exposition aux matériaux fissiles, coût important des installations et des produits, utilisation de cyclotron pour la production de radioisotopes, contraintes temporelles liées à la demi-vie du radioisotope, manque de précision spatiale lié au parcours moyens du positron avant son annihilation) la TEP reste très attractive, notamment grâce à sa forte sensibilité (de l'ordre du picomolaire), et est au cœur de nombreuses investigations dans les domaines clinique et recherche fondamentale.

¹⁵ J. van den Hoff *Amino Acids* **2005**, *29*, 341.

¹⁶ S. L. Pimlott, A. Sutherland *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 149.

¹⁷ Pour des revues récentes concernant les sondes radiomarquées au ^{18}F pour l'imagerie TEP, voir : a) H. S. Krishnan, L. Ma, N. Vasdev, S. H. Liang *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 15553. b) J. Clark, D. O'Hagan *J. Fluorine Chem.* **2017**.

¹⁸ O. Couturier, A. Luxen, J.-F. Chatal, J.-P. Vuillez, P. Rigo, R. Hustinx *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2004**, *31*, 1182.

¹⁹ S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501.

La TEMP est basée sur le même principe que la TEP. La différence réside dans la nécessité d'utiliser un système unique pour collecter et reconstruire les données. Effectivement, afin de restreindre les effets de dispersion (émission isotropique des rayons γ provenant directement des noyaux radioactifs) un collimateur est couplé au détecteur (γ -caméra). Ainsi, les photons ne suivant pas la direction imposée par le collimateur sont absorbés et ne participent pas à la formation de l'image 3D. Malheureusement, ceci nuit gravement à l'efficacité de détection et donc à la sensibilité de la technique.²⁰ Les noyaux radioactifs utilisés ont des périodes de décroissance bien plus longues (de quelques heures à plusieurs jours) que celles des isotopes employés pour la TEP, et sont commercialement disponibles sous forme de kit.²¹ Le technicium-99 métastable (^{99m}Tc) est le radioisotope le plus communément employé en médecine nucléaire du fait de ses propriétés physiques favorables à la technique ($t_{1/2} = 6 \text{ h}$, $E_{\text{rayon } \gamma} = 140 \text{ keV}$). Tout comme la TEP, la TEMP est limitée par sa forte exposition aux matériaux fissiles, mais reste tout de même utilisée en technique de routine dans les établissements médicaux notamment avec sa variante, la scintigraphie.

2.2.2 L'imagerie optique

Pendant de nombreuses années, la biologie utilisait la microscopie optique comme outil fondamental pour l'observation des tissus à l'échelle du micromètre. Cependant, le phénomène de dispersion de la lumière empêchait de recueillir des informations sur les événements cellulaires et réduisait donc fortement l'imagerie biologique à une observation en surface. La création et le développement de nouvelles technologies optiques et électroniques ainsi que l'avènement et la synthèse de molécules fluorescentes ont permis d'ouvrir les possibilités d'imagerie en profondeur. Aujourd'hui, l'imagerie optique exploite les différentes propriétés de la lumière telles que l'absorption, l'émission, la réflexion, la diffraction ou encore la fluorescence comme source de contraste. Elle compte trois techniques : la fluorescence, la bioluminescence et la chimiluminescence qui se différencient par la source excitatrice utilisée. Cette modalité a connu de grandes avancées avec principalement la fluorescence, technique la plus utilisée actuellement qui a été mise en avant via la découverte de la protéine fluorescente d'*Aequoria Victoria* (Green Fluorescent Protein – GFP).²² La bioluminescence est elle aussi en plein essor depuis la découverte des couples luciférine/luciférase, couples substrat/enzyme responsables de la luminescence des lucioles ou encore de certaines espèces marines. Elle est à l'origine de nombreuses recherches dans le domaine du génie génétique pour le suivi et la compréhension des interactions protéine-protéine en temps réel par exemple.²³ Cependant, ce type de manipulation n'est pour le moment pas transposable du petit animal à l'Homme, puisque nécessitant une ingénierie génétique de l'organisme à observer, la technique ne peut donc être exploitée qu'au stade préclinique. Tout d'abord destinée à la recherche fondamentale, la chimiluminescence est aujourd'hui au cœur de nombreux exemples *in vitro* et *in vivo* aussi bien par l'utilisation de molécules inorganiques qu'organiques que nous présenterons dans ce chapitre. L'intérêt de ces trois techniques réside dans leur propriété non invasive ainsi que dans l'emploi de composés plus stables pouvant donner facilement des informations à l'échelle cellulaire en contraste avec les techniques énumérées précédemment. De plus, l'instrumentation est peu encombrante et à moindre coût, ce qui constitue

²⁰ C. M. Gomes, A. J. Abrunhosa, P. Ramos, E. K. J. Pauwels *Adv. Drug Del. Rev.* **2011**, *63*, 547.

²¹ S. Adak, R. Bhalla, K. K. Vijaya Raj, S. Mandal, R. Pickett, S. K. Luthra *Radiochim. Acta* **2012**, *100*, 95.

²² O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223.

²³ H. Zhao, T. C. Doyle, O. Coquoz, F. Kalish, B. W. Rice, C. H. Contag *J. Biomed. Opt.* **2005**, *10*, 1.

un atout supplémentaire. L'imagerie optique est de ce fait une alternative plus attractive que les techniques classiques de l'imagerie moléculaire.

Néanmoins, bien que le problème de la dispersion ait pu être atténué par les avancées technologiques il n'en demeure pas moins présent. En effet d'un tissu à un autre, les indices de réfraction diffèrent et les photons servant de source excitatrice ainsi que ceux émis (*i.e.* par les sondes luminescentes) sont fortement perturbés par le milieu. A cela sont ajoutées la forte absorption et la diffusion de la lumière par les tissus (Figure I.6), rendant difficile l'analyse au-delà de 0.5 cm de profondeur dans le domaine du visible (*i.e.* 450 - 600 nm). Il est donc important de travailler dans un domaine spectral supérieur dans lequel l'absorption par les tissus, notamment l'hémoglobine, est réduite. Cependant, au-delà de 900 nm, les molécules d'eau absorbent fortement, une gamme spectrale est donc définie. Cette gamme est dite « fenêtre d'imagerie » *in vivo* et est comprise entre 650 et 900 nm.

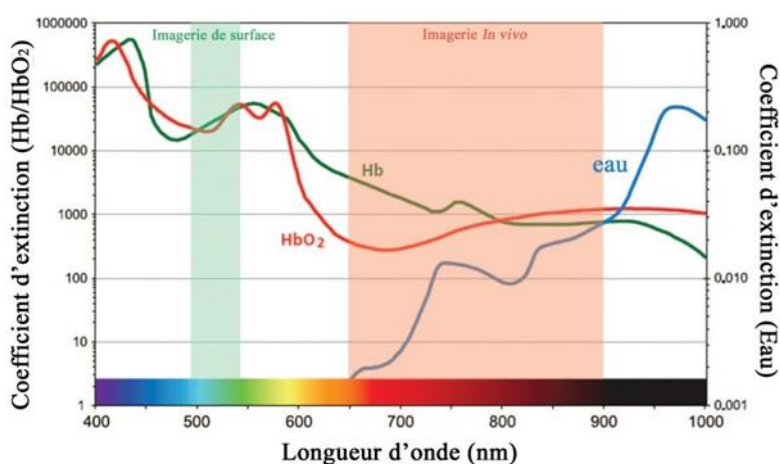


Figure I.6 : Graphique représentant le coefficient d'extinction de l'hémoglobine, de l'oxyhémoglobine et de l'eau en fonction de la longueur d'onde. ²⁴

Une autre limitation majeure est l'auto-fluorescence des tissus en grande partie due à l'hémoglobine mais aussi à d'autres bio-analytes tels que les coenzymes (*e.g.* les flavines), les acides aminés (*e.g.* le tryptophane), ou encore les bases de l'ADN. Comme le démontre la Figure I.7, les organes de l'organisme d'étude (*i.e.* une souris ici) deviennent quasiment indiscernables à la lumière dans le proche IR. Le signal sur bruit est alors augmenté et la sensibilité améliorée. L'utilisation de molécules absorbant et émettant dans le proche infra-rouge (IR) semble donc être la solution à l'ensemble de ces problématiques.

²⁴ H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620.

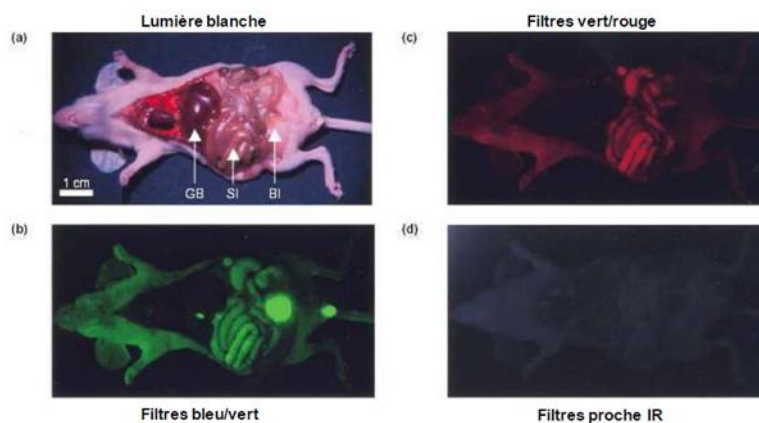


Figure I.7 : Imagerie de souris démontrant l'auto-fluorescence des tissus à différentes longueur d'onde²⁵

Bien que l'imagerie optique soit en pleine évolution, avec l'élaboration de nouvelles sondes pro-fluorescentes par exemple, elle est encore limitée à l'aide à la chirurgie (*e.g.* une sonde constituée d'un marqueur spécifique des zones tumorales à un fluorophore peut être utilisée par un chirurgien pour visualiser la zone à opérer,²⁶ ce type de sondes est commercialisée par exemple par la société Fluoptics). Des solutions, comme celles permettant de s'affranchir de la lumière excitatrice, pourront accroître l'utilité de ces techniques d'imagerie optique.

II. Lumière et luminescence

1. La lumière

La lumière est essentielle à la vie, elle intervient directement dans le cycle de la respiration chez les plantes, la photosynthèse. Celle-ci nous fournit le dioxygène dont nous avons besoin et consomme le gaz carbonique que nous émettons. Pendant des siècles, l'Homme s'est interrogé sur le phénomène de lumière. Certains peuples y ont vu une incarnation divine et d'autres l'assimilait à la forme parfaite d'une flamme. Ce n'est qu'au XVII^e siècle, que l'Homme compris la nature et la provenance de la lumière, avec notamment la théorie ondulatoire : Huyghens (1629-1695) émet l'hypothèse que la lumière est un phénomène vibratoire qui se propage par ondes. Quelques années plus tard, Maxwell (1831-1879) propose une seconde théorie selon laquelle la lumière est le résultat de la propagation d'une onde électromagnétique étant la seule, parmi les autres ondes électromagnétiques découvertes par Hertz (1857-1894), à pouvoir être vue par l'œil humain. Effectivement, la rétine contient des récepteurs sensibles aux longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm. Au-delà de ces longueurs d'onde correspondent les rayons infrarouges (*i.e.* $800 \text{ nm} < \lambda < 1 \text{ mm}$), les micro-ondes ($1 \text{ mm} < \lambda < 10 \text{ m}$), les ondes radio ($\lambda > 10 \text{ m}$) tandis que les longueurs d'onde inférieures correspondent aux

²⁵ J. V. Frangioni *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626.

²⁶ <http://www.fluoptics.com/>

rayonnements ultraviolets ($10 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$), rayons X ($5 \text{ pm} < \lambda < 10 \text{ nm}$) et rayons γ ($\lambda < 5 \text{ pm}$) (Figure I.8).

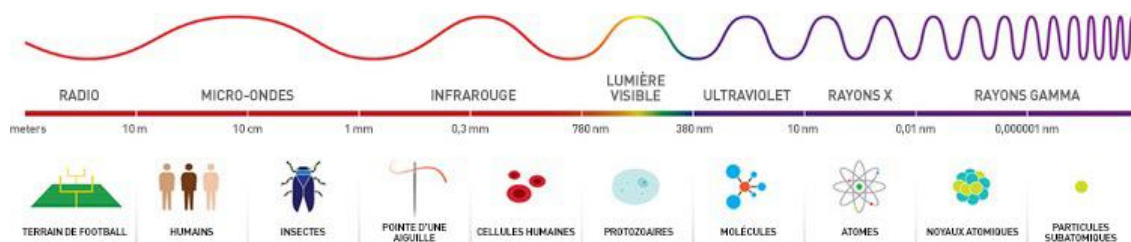


Figure I.8 : Représentation schématique du spectre électromagnétique²⁷

A la fin du XIX^e siècle, Planck (1858-1947) montre que l'énergie lumineuse ne s'échange pas avec la matière de façon continue mais seulement par amas d'énergie appelés *quanta*, plus communément connus sous le nom de photons, et dont l'énergie E est établie selon la relation $E = h\nu$ (*i.e.* h la constante de Planck, et ν la fréquence de rayonnement).

2. La luminescence

Le terme luminescence a été introduit en 1888 par le physicien allemand Eilhart Wiedemann comme étant l'émission de lumière « froide ». Elle correspond plus exactement à l'émission d'un rayonnement électromagnétique qui n'est pas d'origine thermique (Figure I.9). Elle s'oppose donc à l'incandescence qui désigne à l'émission de lumière par des corps chauffés à haute température (*e.g.* le soleil, un feu de bois). Avant l'introduction du mot luminescence, le terme phosphorescence était plus couramment utilisé notamment pour définir l'émission de lumière par un corps. Ce fut qu'au milieu du XIX^e siècle que le phénomène a été qualifié comme étant le résultat d'un apport énergétique menant des atomes ou des molécules dans un état excité. Cet état est d'énergie supérieure à celles que ces corps possèdent dans leur état normal ou fondamental et le retour à cet état initial s'accompagne d'une émission lumineuse (Figure I.9).

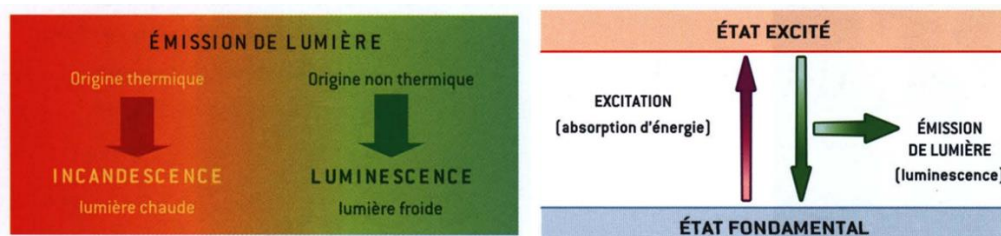


Figure I.9 : Représentations schématiques des phénomènes de luminescence et d'incandescence (à gauche) et du principe de luminescence (à droite)²⁸

²⁷ Illustration issue du site internet teachnuclear.ca

²⁸ B. Valeur *Lumière et luminescence: ces phénomènes lumineux qui nous entourent*, Belin, 2005.

De nombreux composés sont recensés comme étant luminescents. Ils peuvent être de nature²⁹ :

- Organique : tels que les composés aromatiques (*e.g.* naphthalène, anthracènes, ...), la fluorescéine, les rhodamines, les coumarines, les oxazines, les cyanines, les polyènes, les acides aminés (*e.g.* tryptophane, phénylalanine, tyrosine), ...
- Inorganique : tels que l'ion uranyle (UO_2^+), les ions lanthanides (*e.g.* Eu^{3+} , Tb^{3+} , ...), les surfaces dopées par quelques métaux pour le domaine de l'optique (*e.g.* Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, ...), les nanocristaux (*i.e.* Quantum Dots (QD's)) à base de ZnS, CdS, ZnSe, ...
- Organométallique : tels que les complexes de ruthénium (*e.g.* $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$), les complexes de lanthanides (*e.g.* Eu^{3+} , Tb^{3+} , ...), ...
- Bioorganique : tels que les protéines, les oligonucléotides, les coenzymes, ...

La luminescence existe sous différentes formes qui se distinguent par le mode d'excitation (Tableau I.1). On peut citer la photoluminescence qui regroupe la fluorescence et la phosphorescence, toutes deux résultant d'une absorption de photons, les phénomènes de bioluminescence et de chimiluminescence qui, comme évoqué précédemment, sont induits par réaction enzymatique et chimique respectivement.

Type de luminescence	Mode d'excitation
Fluorescence	Photons
Phosphorescence	Photons
Bioluminescence	Réaction biochimique (<i>i.e.</i> enzymatique)
Chimiluminescence	Réaction chimique
Triboluminescence	Friction, rupture, déformation
Sonoluminescence	Ultrasons
Radioluminescence	Rayons X, rayonnements α , β et γ
Cathodoluminescence	Electrons accélérés
Electroluminescence	Champ électrique

Tableau I.1 : Types de luminescence²⁹

Les autres types de luminescence peuvent être rencontrés dans la vie quotidienne comme le cas de l'électroluminescence utilisée pour les télévisions ou le tableau de bords des voitures.

Dans la suite de notre discussion, nous nous intéresserons uniquement aux phénomènes de fluorescence, de bioluminescence et chimiluminescence.

²⁹ B. Valeur, M. N. Berberan-Santos *Molecular Fluorescence, Second Edition*, Wiley, 2012.

III. Principes généraux de fluorescence

1. Processus et généralités

La fluorescence et la phosphorescence se définissent comme étant la conséquence de l'absorption d'un photon par une espèce qui la conduit dans un état excité. Dans le cas de la fluorescence, l'état excité est de même état de spin que l'état fondamental, à l'opposé de la phosphorescence qui résulte d'un changement d'état de spin.

Il est commun de représenter les différents processus impliqués dans le phénomène de fluorescence par le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure I.10).

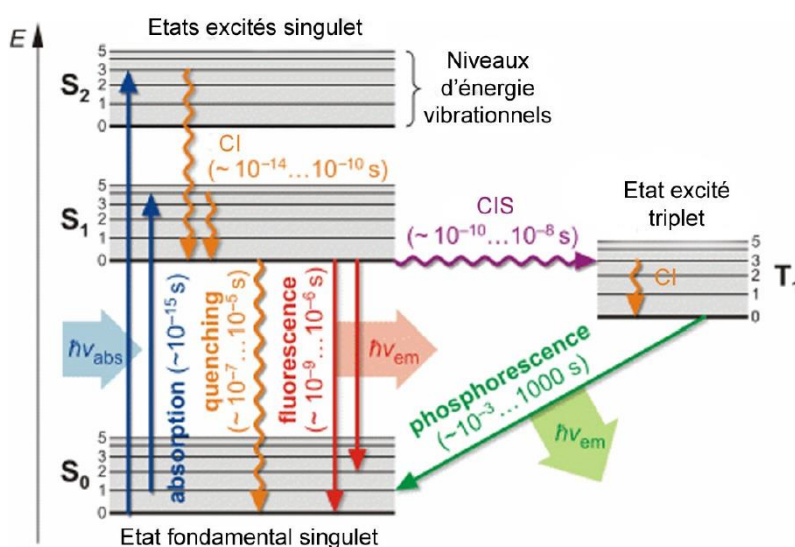


Figure I.10 : Diagramme de Perrin-Jablonski et illustration de la position relative des spectres d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence³⁰

A température ambiante, une espèce est à l'état fondamental, noté S_0 . L'absorption d'un photon conduit un électron vers un état singulet excité S_n (*i.e.* noté S_2 sur la Figure I.10, pour simplifier l'explication) suivi d'une conversion interne (*i.e.* CI) rapide, de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-10} s. Il s'agit d'une transition non radiative entre deux états électroniques de même multiplicité de spin. En solution, cette transition est suivie d'une relaxation vibrationnelle vers le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique final, S_1 . C'est à partir de cet état excité que l'espèce peut suivre différentes voies de désexcitation :

- Une désexcitation non radiative : le même processus de conversion interne peut avoir lieu de l'état S_1 vers l'état S_0 , mais est moins efficace que la conversion évoquée précédemment, en raison d'une trop grande différence d'énergie. En revanche, des interactions avec d'autres molécules peuvent conduire à une telle désexcitation non radiative ;

³⁰ Illustration adaptée de la référence 29

- La fluorescence : l'émission de photons qui accompagne la relaxation de l'état S_1 vers l'état S_0 . Le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'onde plus élevées que le spectre d'absorption, en raison d'une perte d'énergie par relaxation vibrationnel à l'état excité. Notons que l'émission de fluorescence a lieu, sauf exception, à partir de l'état S_1 , ainsi la longueur d'onde d'émission ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation ;
- Un croisement inter-système : un processus non radiatif entre deux systèmes vibrationnels appartenant à des états électroniques de multiplicités différentes : état singulet S_1 vers état triplet T_1 . Il est en principe interdit mais le couplage spin-orbite (*i.e.* couplage entre le moment magnétique orbital et le moment magnétique de spin) peut être suffisamment important pour le rendre possible. Dans le cas d'espèces comportant des halogènes, ce couplage est augmenté et le croisement inter-système favorisé. Ce phénomène est appelé effet d'atome lourd.
- Une désexcitation à partir de l'état T_1 : en solution à température ambiante, la désexcitation non radiative de l'état T_1 vers l'état S_0 est favorisée par rapport à la désexcitation radiative (*i.e.* la phosphorescence), puisque ce passage est en théorie interdit. Néanmoins, à basse température et/ou dans un milieu rigide, les collisions sont inhibées et la phosphorescence peut être observée. Comme l'état T_1 est de niveau énergétique plus bas que l'état S_1 , le spectre de phosphorescence se situe à des longueurs d'onde plus élevées que celui de fluorescence
- Une inhibition de fluorescence : également appelée *quenching*. Elle peut être causée par des collisions de l'espèce excitée avec d'autres molécules ou atomes l'environnant, telles que le dioxygène, les amines, les halogènes, un autre fluorophore, voire le solvant. Des phénomènes d'*auto-quenching* peuvent aussi avoir lieu, notamment dans des milieux trop concentrés. Cette inhibition peut être associée à une augmentation du nombre de collisions entre molécules ou à la formation d'excimères (*i.e.* complexation d'au moins deux fluorophores identiques) ou d'exciplexes (*i.e.* complexation d'au moins deux fluorophores différents)
- Un transfert d'énergie : qui consiste à transférer l'énergie vers un accepteur qui la dissipe de façon non radiative ou qui émet à sa propre longueur d'onde. Ce processus est associé à un transfert dipôle-dipôle ayant lieu à courte distance. Dans le cas de la fluorescence, le terme FRET pour *Förster Resonance Energy Transfer* (*i.e.* transfert d'énergie par résonance de type Förster en français) ou *Fluorescence Resonance Energy Transfer* est régulièrement employé.

La fluorescence est communément associée à cinq grandeurs photophysiques : le déplacement de Stokes, le rendement quantique, la durée de vie, la brillance et le coefficient d'extinction molaire (Figure I.11). Le déplacement de Stokes correspond à la différence entre les *maxima* d'absorption et d'émission d'une espèce. Il est exprimé en nombre d'onde (*i.e.* cm^{-1}) et a son importance dans la conception de sondes ou de cassettes fluorescentes. Effectivement, pour une valeur faible, un

phénomène d'auto-*quenching* peut avoir lieu, surtout lorsqu'un grand nombre de fluorophores sont incorporées sur la biomolécule.

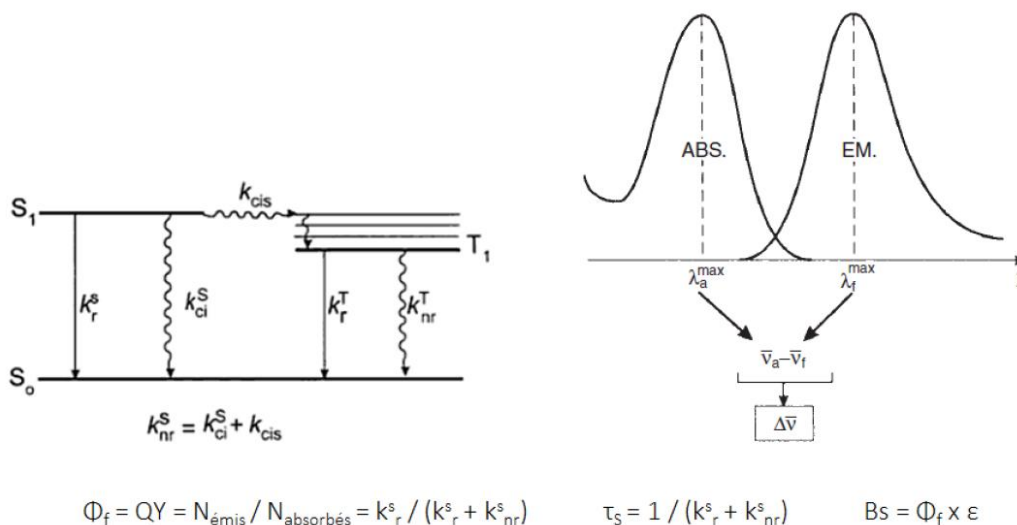


Figure I.11 : Représentation schématique des grandeurs associées à la fluorescence²⁹

Le paramètre qualifiant le mieux l'efficacité de luminescence d'un fluorophore est le rendement quantique de fluorescence, noté Φ^{FL} ou QY. Il correspond à la fraction de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés, et dépend des constantes de vitesses des transitions radiatives et non radiatives (*i.e.* k_r^s et k_{nr}^s respectivement). Ces constantes permettent également de définir la durée de vie τ_s de l'état excité S_1 d'un fluorophore. Et enfin, la brillance, notée B_s , qui qualifie l'intensité de luminescence d'un fluorophore et qui correspond au produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire (*i.e.* ϵ exprimé en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, paramètre retrouvé grâce à la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \times l \times C$, avec A l'absorbance à la longueur d'onde λ ; l trajet optique ; C la concentration de la solution), est la valeur qui permet de mieux comparer les fluorophores entre eux.

Les fluorophores constituent une grande famille. Certaines biomolécules endogènes, telles que les acides aminés dont la chaîne latérale est aromatique (*e.g.* phénylalanine), les cofacteurs ou encore l'hémoglobine (*i.e.* grâce à l'hème ferrique) possèdent une fluorescence intrinsèque. La majorité des entités fluorescentes sont obtenues par voies synthétiques et correspondent à des systèmes polycycliques aromatiques contraints. La Figure I.12 représente une vue d'ensemble des fluorophores organiques les plus connus en fonction de leur longueur d'onde d'émission et de leur brillance.

Pour des applications *in vivo*, l'entité fluorescente doit remplir quelques conditions : posséder des longueurs d'onde d'excitation et d'émission non-invasives pour les systèmes biologiques et situés dans la « fenêtre d'imagerie » *in vivo*, une bonne photostabilité ainsi que de grands rendement quantique et coefficient d'extinction molaire. Par ailleurs, cette molécule doit être peu toxique pour l'organisme et de petite taille pour une meilleure bio-distribution.³¹

³¹ Pour une revue récente sur la conception fluorophores proche infra-rouge, voir : I. Martinić, S. V. Eliseeva, S. Petoud *J. Lumin.* **2017**, *189*, 19.

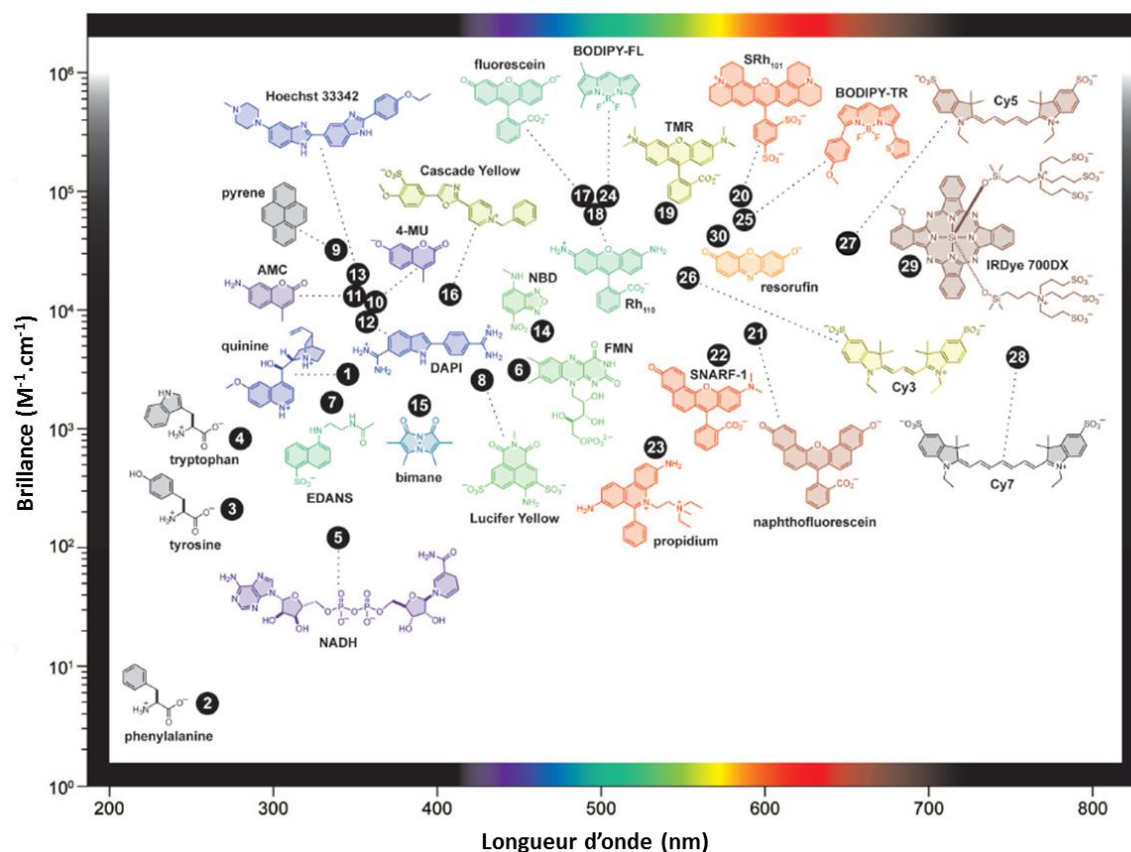


Figure I.12 : Représentation schématique des familles de fluorophores organiques en fonction de leur brillance et de leur longueur d'onde d'émission³²

2. La pro-fluorescence

2.1 Principe général

L'une des applications de la fluorescence les plus recherchées pour la détection de bioanalytes, repose sur l'utilisation d'un système dont l'émission lumineuse est exacerbée par un événement biologique ou chimique ciblé. Un tel système est connu sous le nom de sonde activable, ou sonde fluorogénique ou encore sonde intelligente. La terminologie de pro-fluorophore a été introduite par Raines en 2005, et est associée à un fluorophore sur lequel différents aménagements fonctionnels, tels que la substitution d'une fonction chimique par une autre, induisent une modulation ou une extinction de fluorescence selon divers processus (*e.g.* par transfert d'électron photoinduit, également appelé PeT pour *Photo-induced Electron Transfer*). De cette façon, le rapport signal sur bruit est fortement augmenté puisque ces sondes ne produisent un signal qu'après reconnaissance de l'analyte ciblé. Le signal lumineux peut être engendré après la rupture ou la formation d'une liaison chimique (covalente ou non), ou encore à la suite d'une réaction en cascade (Figure I.13). Dans tous les cas, la nature de détection peut être de type « OFF-ON » fondée sur l'apparition d'un signal lumineux à l'opposé d'une

³² L. D. Lavis, R. T. Raines *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142.

détection de type « ON-OFF » (*i.e.* cas plus rare), ou de type ratiométrique qui est assimilée à un déplacement bathochrome ou hypsochrome des *maxima* d'excitation/émission.³³

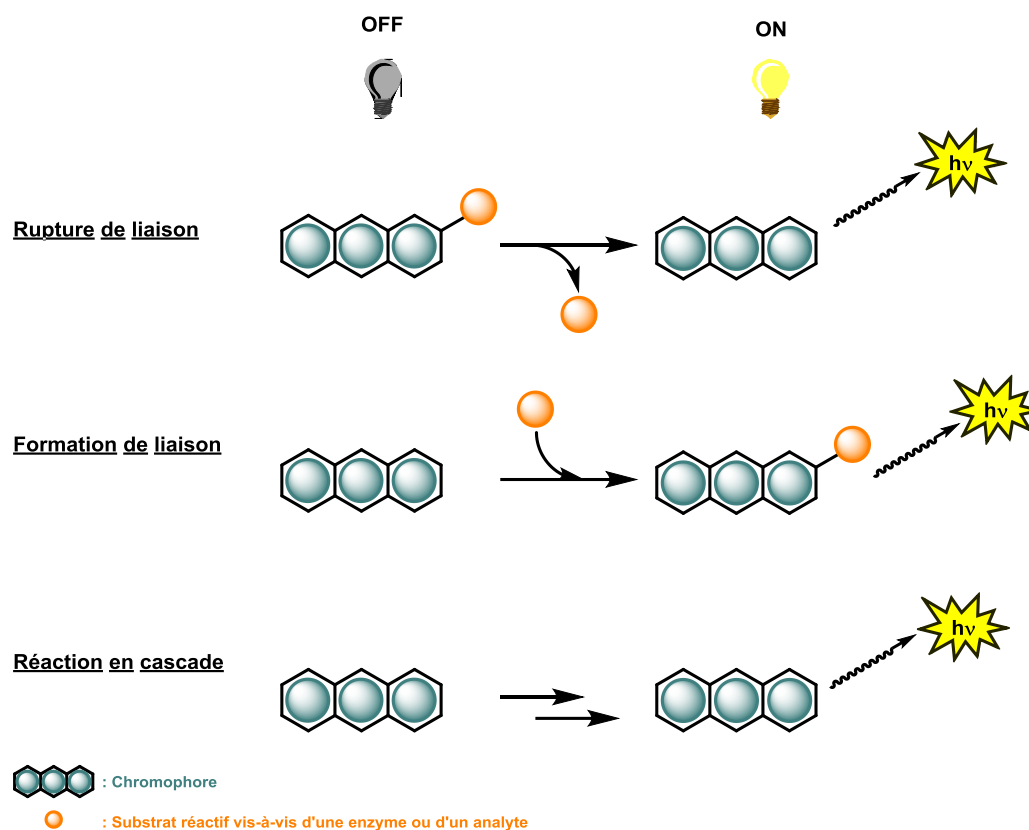


Figure I.13 : Représentation schématique des différents types de déclenchement de pro-fluorescence

L'avantage d'un tel système réside dans l'utilisation d'un seul chromophore contrairement aux sondes fluorescentes fondées sur un transfert d'énergie de type FRET, par exemple. Notons tout de même que la pro-fluorescence, notamment l'utilisation de sondes de type « OFF-ON » (*i.e.* classe de sondes la plus exploitée), n'est pas une technique suffisamment efficace. En effet, le Prof. O. S. Wolfbeis a soulevé de nombreux points quant à la conception de sondes pour la détection ou le marquage d'analytes d'intérêt : la spécificité des sondes n'est pas complète puisqu'elles peuvent être affectées par des phénomènes propres à la cellule tels la force ionique, la température, le pH et même certains ions que sont le Fe(II) ou le Ca(II). De plus, pour la majorité des sondes visant des applications *in vivo*, proposées dans la littérature, la limite de détection est supérieure à 1 ppm.³⁴

³³ Pour plus d'information sur la pro-fluorescence, voir : a) J. B. Grimm, L. M. Heckman, L. D. Lavis *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 1. b) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng, F. Li *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 192. c) X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590. d) J. Zhou, H. Ma *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6309. e) B. M. Luby, D. M. Charron, C. M. MacLaughlin, G. Zheng *Adv. Drug Del. Rev.* **2017**, *113*, 97.

³⁴ O. S. Wolfbeis *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9864.

2.2 Les modulations de la fluorescence

La fluorescence peut être modulée suivant différents mécanismes. Nous pouvons distinguer les phénomènes permettant d'induire une extinction de fluorescence (*e.g.* le PeT) de ceux conduisant à un déplacement des longueurs d'onde d'émission (*e.g.* l'ESIPT). Nous allons donc présenter brièvement chacune des possibles modulations.

2.2.1 Le transfert d'électron photoinduit (ou PeT pour *Photo-induced electron Transfer*)

Le PeT est sans aucun doute le phénomène le plus mis en œuvre dans la conception de sondes fluorogéniques. Il se traduit par une inhibition de la fluorescence par un motif « quancheur » (*i.e.* accepteur d'énergie), suivant un mécanisme oxydatif ou réducteur. La présence d'un groupement électro-attracteur (*e.g.* un groupement nitro) ou d'un groupement donneur (*e.g.* un groupement amino) sur la « quancheur » de la sonde permet à ce mécanisme d'opérer. Comme représenté sur la Figure I.14, il qui peut être expliqué via la théorie des orbitales frontières. Dans le cas d'un PeT oxydatif, l'électron excité (*i.e.* à la suite d'une excitation photonique) est transféré de l'orbitale LUMO du fluorophore (*i.e.* noté D) vers l'orbitale LUMO du « quancheur » (*i.e.* noté A) avant de revenir à l'état fondamental via un mécanisme non radiatif. Dans le cas d'un PeT réducteur, un électron de l'orbitale HOMO du quancheur (*i.e.* noté D cette fois) vient occuper l'orbitale HOMO du fluorophore (*i.e.* noté A) et empêche l'électron excité qui occupe l'orbitale LUMO du fluorophore de revenir à l'état fondamental.

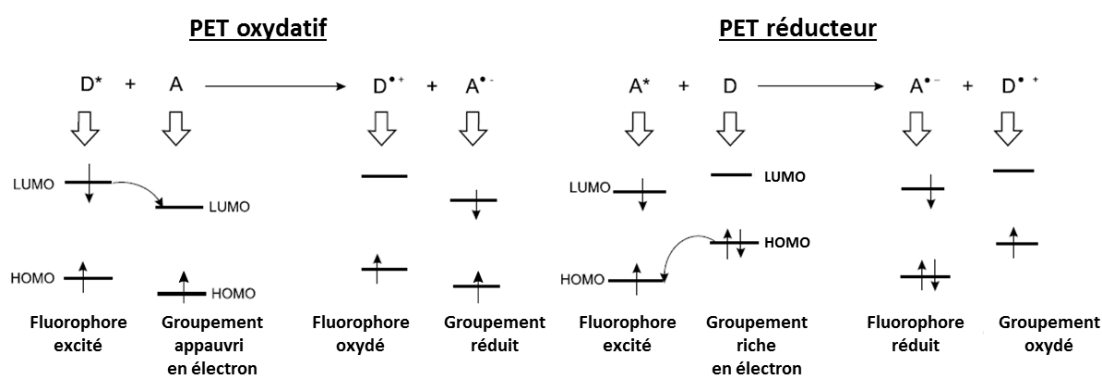


Figure I.14 : Représentation schématique du mécanisme du PeT²⁹

2.2.2 Le transfert de charge photoinduit (ou ICT pour *Intramolecular Charge Transfer*)

Les fluorophores possèdent des moments dipolaires différents à l'état excité et à l'état fondamental : le moment dipolaire est généralement plus important à l'état excité. La présence d'un groupement électro-attracteur (*e.g.* de types carbonyl ou nitrile) et d'un groupement électro-donneur (*e.g.* amine) sur le fluorophore constitue un système dit « push-pull » qui exalte d'autant plus le moment dipolaire de l'espèce fluorescente. Le transfert de charge correspond alors à l'équilibre atteint lorsque les molécules d'un solvant polaire environnant stabilisent l'état excité du fluorophore polarisé. Cet

équilibre induit un déplacement des longueurs d'onde d'émission vers les valeurs les plus élevées, qui va de pair avec la polarité du solvant : plus le solvant est polaire plus l'effet bathochrome augmente.

Cette modulation est à la base des sondes ratiométriques notamment pour la détection de cations métalliques.³⁵

2.2.3 Le transfert de proton photoinduit

En milieux aqueux, la densité électronique d'un fluorophore comportant des fonctions acides et/ou basiques se voit modifiée lors de son excitation. Dans certains cas, le caractère acide du donneur de proton (*i.e.* un groupement hydroxyle par exemple) ou le caractère basique de l'accepteur de proton (*i.e.* un atome d'azote hétérocyclique par exemple) peut être exalté à l'état excité par rapport à l'état fondamental. Ce transfert peut être inter ou intra moléculaire (on parle alors d'ESIPT, pour *Excited-State Intramolecular Proton-Transfer*). La Figure I.15 illustre un exemple de sonde fondée sur l'ESIPT proposée par l'équipe du Prof. J. Zhao.³⁶

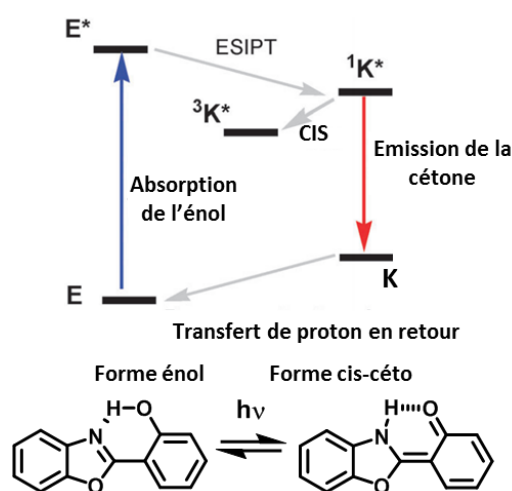


Figure I.15 : Représentation schématique du phénomène d'ESIPT³⁶

Le cas particulier d'interaction intermoléculaire avec les molécules d'eau est causé par le phénomène de transfert de proton photoinduit et est à l'origine d'une modification des spectres d'absorption et d'émission de certains fluorophores. Les sondes à pH, par exemple, sont en général fondées sur ce principe de fluorescence. Elles permettent de cartographier la dynamique du pH intracellulaire afin de mieux comprendre le fonctionnement de l'organisme ou de détecter ses dysfonctionnements, tels que

³⁵ X.-L. Ni, S. Wang, X. Zeng, Z. Tao, T. Yamato *Org. Lett.* **2011**, *13*, 552.

³⁶ J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo, P. Yang *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803.

la production anormale d'espèces acides responsable de nombreuses maladies. Nous pouvons citer quelques exemples utilisant les coumarines³⁷ ou les rhodamines.³⁸

3. Le transfert d'énergie de type *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)

A l'opposé des sondes pro-fluorescentes, celles fondées sur un transfert de type FRET sont constituées de deux chromophores : un donneur d'énergie et un accepteur. Le donneur est excité et transfère son énergie de façon non radiative vers l'état excité du chromophore accepteur. Pour que le mécanisme opère efficacement, les deux chromophores doivent être suffisamment proches spatialement (*i.e.* d'une distance inférieure ou égale à 10 nm) et un bon recouvrement des spectres d'émission et d'absorption des donneur et accepteur, respectivement, est nécessaire (Figure I.16).

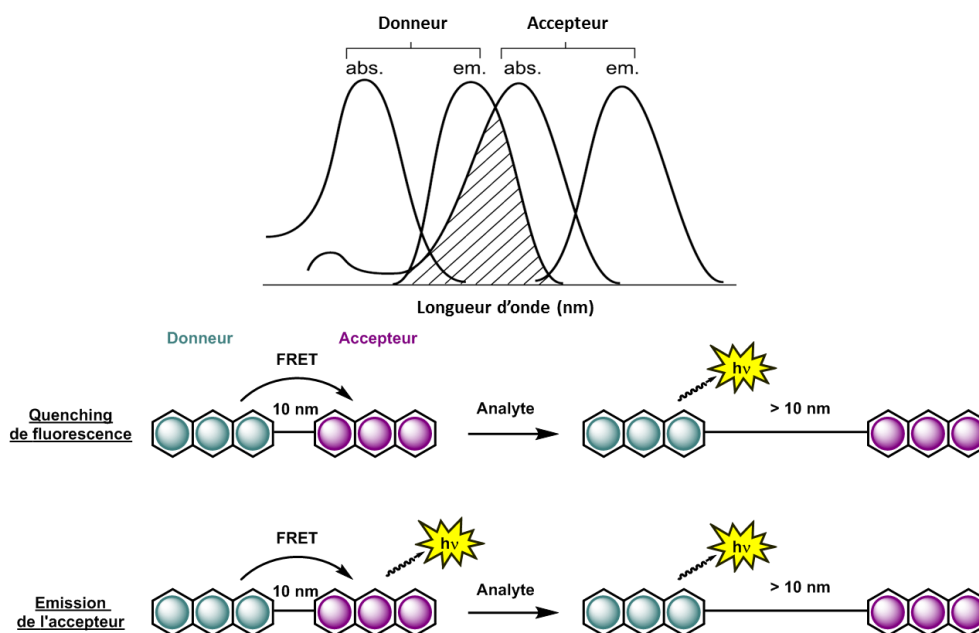


Figure I.16 : Représentation schématique du phénomène de FRET²⁹

Par interaction ou reconnaissance avec l'analyte cible, les deux partenaires s'éloignent (*i.e.* par rupture d'une liaison covalente) ce qui a pour conséquence d'annuler le transfert de type FRET. Dans le cas où l'accepteur induit une extinction de fluorescence du donneur (l'accepteur est alors appelé *quencheur*, l'énergie qu'il récupère est libérée de façon non radiative), celle-ci est retrouvée après réaction avec l'analyte. Un autre cas est possible : l'accepteur peut transformer l'énergie qui lui est transmise en une

³⁷ a) S. Mizukami, S. Watanabe, K. Kikuchi *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1465. b) M. Lee, N. G. Gubernator, D. Sulzer, D. Sames *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8828.

³⁸ Q. A. Best, R. Xu, M. E. McCarroll, L. Wang, D. J. Dyer *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3219.

énergie lumineuse lui étant propre, et seule la détection de l'analyte permet de retrouver la luminescence du donneur.³⁹

Nous verrons plus tard que le transfert d'énergie entre un donneur et accepteur peut suivre d'autres mécanismes (e.g. le transfert à travers les liaisons).

D'autres mécanismes, tels que la formation d'exciplexes, sont responsables du *quenching* de fluorescence.⁴⁰

IV. Bioluminescence et chimiluminescence

1. Luminescence dans la nature : la bioluminescence

1.1 Histoire

Le phénomène de bioluminescence a été pour la première fois établi en 1885 par un pharmacien français, Raphaël Dubois, lorsque celui-ci étudiait un coléoptère produisant de la lumière (Pyrophorus). Il put ainsi observer que cette émission lumineuse nécessitait la présence de deux composés hydrosolubles : une première molécule thermiquement stable extraite à l'eau chaude, nommée luciférine (*i.e.* en référence à Lucifer), et une deuxième (*i.e.* une enzyme) extraite à l'eau froide car thermosensible, la luciférase. Il en conclut que la bioluminescence était la conséquence d'une catalyse oxydative de la luciférine par la luciférase (Figure I.17).

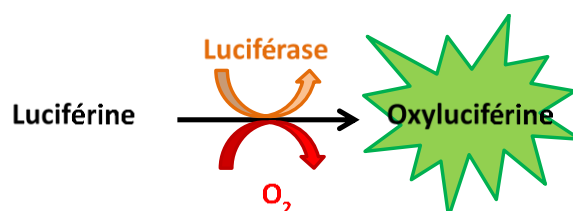


Figure I.17 : Représentation schématique de la bioluminescence selon R. Dubois

La bioluminescence a alors longtemps été cantonnée au couple luciférine/luciférase jusqu'à la découverte, en 1962, de l'Aequorine et de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) chez la méduse *Aequoria Victoria*, qui a valu le Prix Nobel de Chimie en 2008 aux Dr. O. Shimomura, Pr. M. Chalfie et Pr. R. Tsien. La lumière émise par cette espèce marine est due à un transfert énergétique entre un complexe protéinique Ca²⁺-dépendant (*i.e.* Aequorine) et la GFP (Figure III.2).⁴¹ D'après le Dr. Shimomura, la

³⁹ Pour des exemples de sondes FRET, voir : a) K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4562. b) A. Chevalier, C. Massif, P.-Y. Renard, A. Romieu *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1686.

⁴⁰ Pour une revue sur les donnant les principes de *quenchings* dynamique et statique, voir : M. K. Johansson, R. M. Cook *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3466.

⁴¹ a) O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223. b) H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant *Biochemistry* **1974**, 13, 2656. c) A. Tsuji, M. Matsumoto, M. Maeda, L. J. Kricka, P. E. Stanley, Editors *Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress and Perspectives*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., **2005**.

photoprotéine Aequorine est constituée de deux unités : une apo-protéine, apoaequorine, sur laquelle se trouvent des sites d'affinité pour le calcium, ainsi qu'un chromophore, la cœlenterazine. En présence de dioxygène, la cœlenterazine **A** est oxydée un dérivé peroxyde **B** qui s'incorpore à l'apoaequorine. Par réaction avec des ions Ca^{2+} , la protéine subit un changement conformationnel qui induit une oxydation de la cœlenterazine **B** en un intermédiaire riche en énergie de type dioxétanone **C** qui se décompose pour libérer du monoxyde de carbone et une forme excitée de la cœlenteramide **D** (*i.e.* état singulet excité). Le retour à l'état fondamental de celle-ci s'accompagne d'une émission lumineuse dans le bleu (*i.e.* $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) et le reste de la protéine assure le transfert de bioluminescence de type *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (*i.e.* BRET) vers la GFP, ce qui donne une lumière verte (*i.e.* $\lambda_{\text{max}} = 509 \text{ nm}$).⁴²

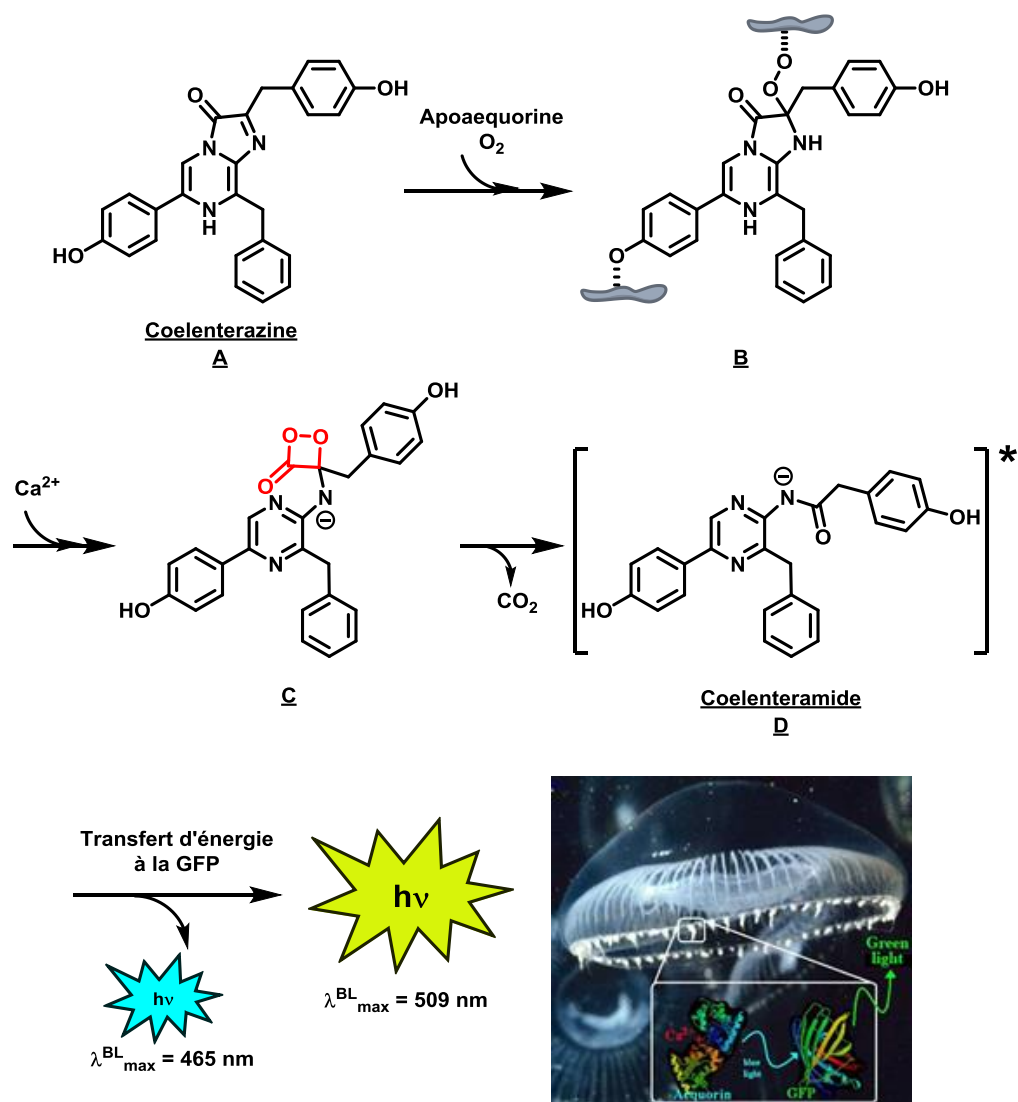


Figure I.18 : Représentation schématique du mécanisme de bioluminescence appliqué aux méduses *Aequoria Victoria*

Après cette découverte, autant d'espèces bioluminescentes, majoritairement marines, que de couples luciférine/luciférase ont été recensés. Notons donc que les luciférines ne constituent pas une seule et

⁴² Pour une revue récente sur la cœlenterazine, voir : T. Jiang, L. Du, M. Li *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 466.

même molécule mais une famille de composés chimiques, chacun étant spécifique à une luciférase. Il a été montré que les êtres vivants capables d'émettre de la lumière utilisent un mécanisme de bioluminescence à des fins de camouflage, d'attraction, de répulsion ou encore de communication.

Aujourd'hui, le terme de bioluminescence est instinctivement associé à la luciole et donc à la luciférine correspondante, la D-luciférine. Nous avons représenté son mécanisme biochimique en Figure I.19 dans le but d'une meilleure compréhension de son mode d'action.⁴³ Ainsi, en présence d'ATP et d'ions Mg^{2+} , la D-luciférine **A** est convertie en son dérivé adénylé **B** par catalyse par la luciférase qui lui est propre, F-Luc. La luciférine-adénylate **B** est ensuite oxydée pour conduire à l'intermédiaire peroxyde **C** qui cyclise pour former l'intermédiaire dioxétanone **D** riche en énergie. La décarboxylation issue de la décomposition de la dioxétanone **D** engendre la formation d'une espèce **E** à l'état excité (*i.e.* état singulet excité) qui en revenant à l'état fondamental est accompagnée d'une émission lumineuse à 560 nm et de l'oxyluciférine **F**.⁴⁴ Celle-ci est convertie en un dérivé cyano-benzothiazole **G** par catalyse par l'enzyme régénérante de luciférine (*i.e.* LRE), puis l'addition de D-cystéine permet de régénérer la D-luciférine **A**.⁴⁵

⁴³ M. Matsumoto *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem.* **2004**, 5, 27.

⁴⁴ O. Shimomura, Editor *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific, **2006**.

⁴⁵ S. M. Marques, J. C. G. Esteves da Silva *IUBMB Life* **2009**, 61, 6.

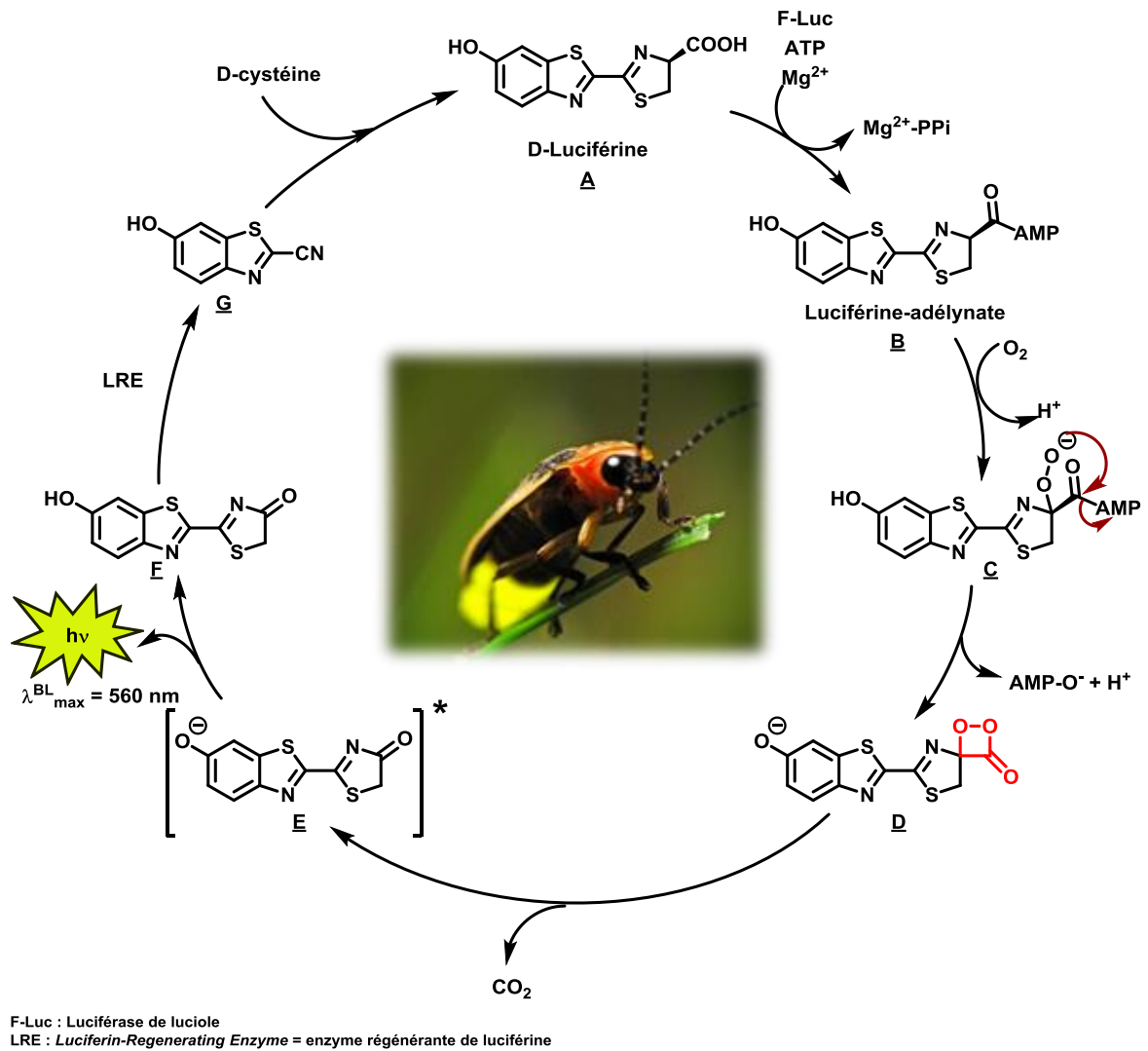


Figure I.19 : Représentation schématique du mécanisme de bioluminescence appliqué à la D-luciférine⁴³

Tout comme le mécanisme, la longueur d'onde d'émission de bioluminescence est liée à l'habitat de l'espèce qui émet. Comme l'indique la Figure I.20, les espèces marines émettent plutôt dans le bleu (*i.e.* 450 à 500 nm) contrairement aux espèces terrestres qui bioluminescent majoritairement dans l'orange (*i.e.* 550 à 600 nm).

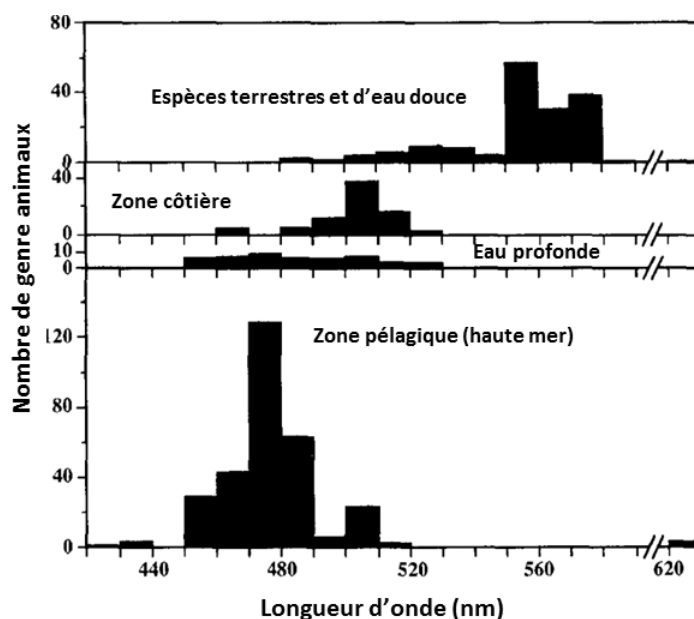


Figure I.20 : Représentation schématique de la répartition des longueurs d'onde d'émission d'espèces bioluminescentes en fonction de la zone d'habitat⁴⁶

Ce principe de luminescence donnée par la nature a fortement inspiré de nombreux scientifiques à développer des petites molécules susceptibles de suivre un mécanisme similaire après activation par un analyte ou une enzyme. Nous allons justement voir quelques exemples d'applications.

1.2 Exemples d'applications

Le principal avantage de la bioluminescence repose sur l'absence d'une source d'excitation externe en opposition avec la technique de fluorescence. Il en résulte un bruit de fond extrêmement bas et une sensibilité largement augmentée (*i.e.* la détection est possible jusqu'à l'atto- (10^{-18}) ou la zeptomole (10^{-21})).⁴⁷ Ainsi, ce phénomène a été mis à profit dans le domaine bioanalytique (*i.e.* domaine qui requiert une forte sensibilité), pour la détection d'ATP, par exemple, lors de contrôle d'hygiène et d'analyse alimentaire.⁴⁸ Ce type d'analyse, aujourd'hui disponible sous forme de kit d'ATP-métrie, permet de mettre en évidence l'activité microbienne ou bactérienne. Les applications les plus exploitées, aujourd'hui, entrent dans la catégorie de l'imagerie optique. Les efforts se sont notamment très concentrés sur la luciférine de luciole. Effectivement, en raison de sa petite taille, de son émission proche de la « fenêtre d'imagerie » *in vivo* et de la facilité de fonctionnalisation chimique, la D-luciférine est la luciférine la plus étudiée depuis ces quinze dernières années. Elle est l'origine du développement de nouvelles molécules fondées sur son squelette benzothiazole. La conception de ce type de molécules peut être divisée en deux catégories :

⁴⁶ J. W. Hastings *Gene* **1996**, *173*, 5.

⁴⁷ D. Champiat, A. Roux, O. Lhomme, G. Nosenzo *Cell Biol. Toxicol.* **1994**, *10*, 345.

⁴⁸ A. Roda, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 307.

- Une première qui consiste en l'élaboration d'analogues de la D-luciférine pour faciliter l'imagerie *in vivo* (*i.e.* par aménagements fonctionnels pour une augmentation de la longueur d'onde d'émission vers le proche IR). Dans cette catégorie nous pouvons citer les travaux du groupe du Prof. Urano sur la conception de cassettes bioluminescentes composées d'un donneur, la D-luciférine, et d'un accepteur, un fluorophore proche IR, et fondées sur un transfert d'énergie de type *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* pour BRET, à l'image du transfert de type FRET (Figure I.21). Le principe est le suivant : la cassette est injectée chez le petit animal porteur de la luciférase (*i.e.* à la suite d'une transplantation de cellules exprimant la luciférase). Une fois reconnue par son enzyme, la luciférine modifiée suit le mécanisme de bioluminescence et transfert son énergie vers le fluorophore auquel elle est conjuguée. Deux des cassettes, **BODIPY 650/665 X-AL** et **Cy7 COOMe-AL** représentées dans la Figure I.21, ont montré des émissions allant jusqu'à 679 et 772 nm respectivement.

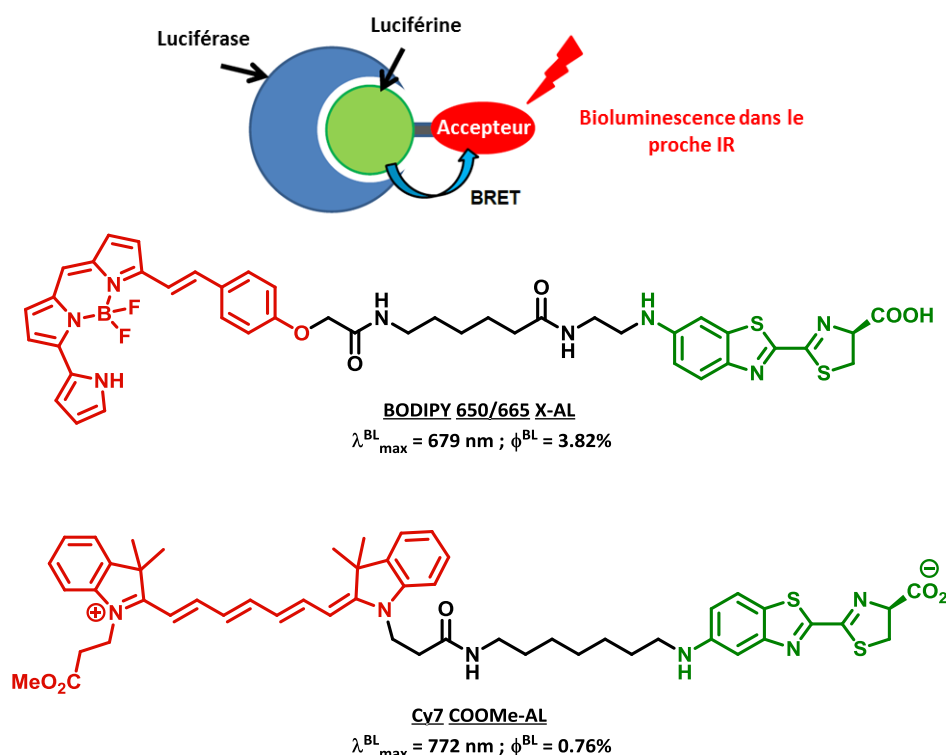


Figure I.21 : Représentations schématique de quelques sondes de type BRET proposées par le groupe du Prof. Urano⁴⁹

Une deuxième catégorie qui réside dans la conception de sondes bioluminogéniques (*i.e.* principe de « cage » similaire à un système « OFF-ON » présenté dans la partie Chapitre I.III.2 de chapitre) visant une détection des différents processus biochimiques *in vitro* et *in vivo* (Figure I.22). Cette catégorie de molécules a notamment été utilisée dans la détection d'activité enzymatique de type

⁴⁹ R. Kojima, H. Takakura, T. Ozawa, Y. Tada, T. Nagano, Y. Urano *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1175.

phosphatase alcaline,⁵⁰ β -galactosidase,⁵¹ hydrolase des amides d'acides gras,⁵² ou encore β -lactamase.⁵³ Elle a également été impliquée dans l'évaluation de la perméabilité de transporteurs membranaires par conception d'une sonde constituée de la luciférine (*i.e.* le bioluminophore), d'une chaîne poly-arginine (*i.e.* le transporteur), et d'un bras disulfure (*i.e.* le déclencheur). Dans ce cas, si la sonde pénètre la cellule, elle est clivée par le glutathion, libérant luciférine qui, en présence de luciférase émet de la lumière.⁵⁴

⁵⁰ a) W. Miska, R. Geiger *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1987**, *25*, 23. b) W. Miska, R. Geiger *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, *4*, 119.

⁵¹ T. S. Wehrman, G. von Degenfeld, P. O. Krutzik, G. P. Nolan, H. M. Blau *Nat. Methods* **2006**, *3*, 295.

⁵² D. M. Mofford, S. T. Adams, G. S. K. K. Reddy, G. R. Reddy, S. C. Miller *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8684.

⁵³ H. Yao, M.-K. So, J. Rao *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7031.

⁵⁴ L. R. Jones, E. A. Goun, R. Shinde, J. B. Rothbard, C. H. Contag, P. A. Wender *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6526.

Chapitre I. Lumière et imagerie moléculaire

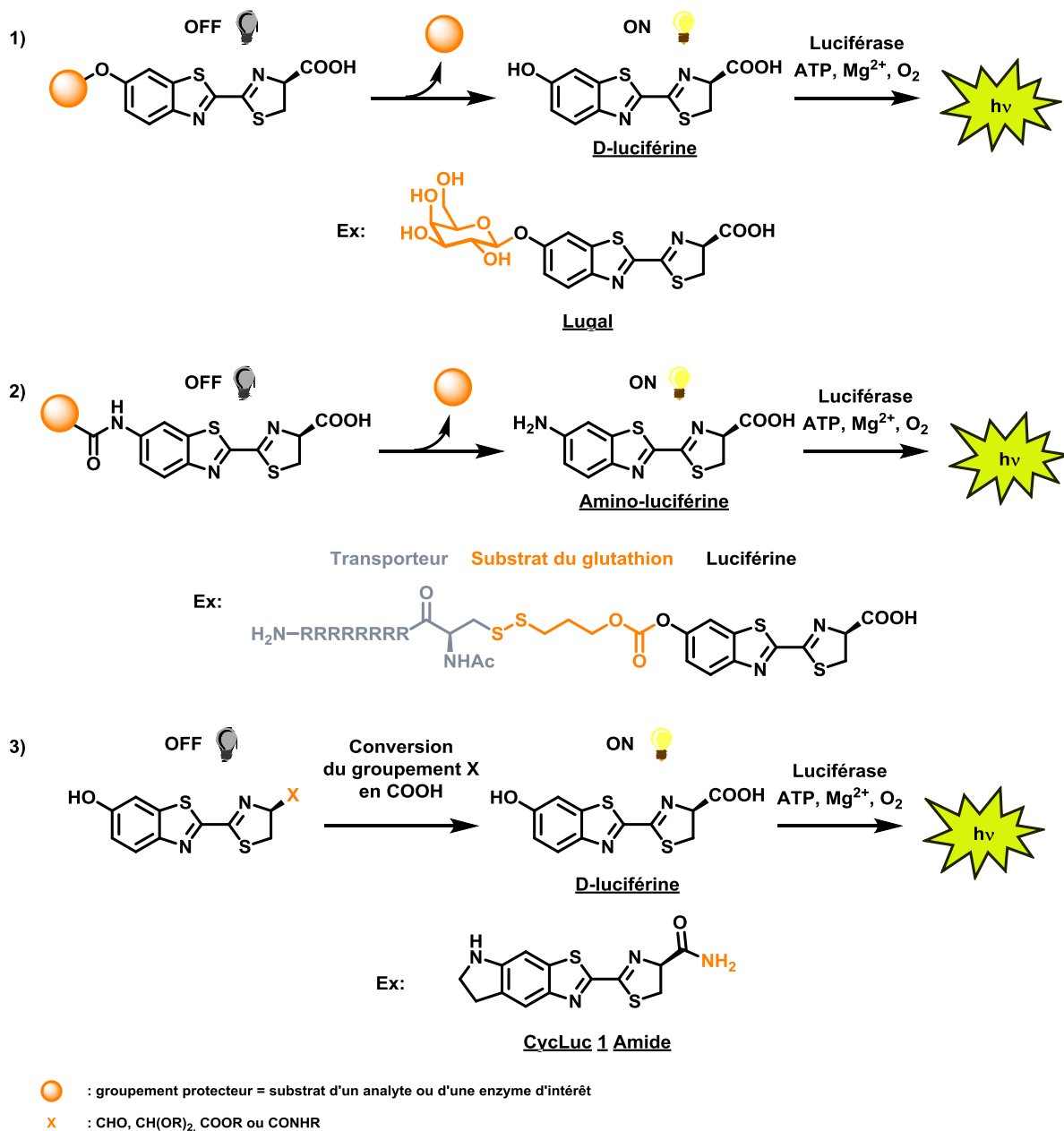


Figure I.22 : Représentation schématique des stratégies générales de sondes bioluminogéniques de type « cages »⁵⁵

Pour des applications *in vivo*, l'utilisation de telles molécules est assez contraignante puisqu'elles imposent à l'expérimentateur de réaliser de l'ingénierie génétique, par fusion de gènes rapporteurs, afin que l'organisme d'étude exprime la luciférase, et que le niveau en oxygène soit suffisant pour que la réaction ait lieu (*i.e.* ce qui exclue les milieux hypoxiques). Ceci remet en question la possibilité de transposer cette technique à l'Homme. La chimiluminescence, qui ne fait appel qu'à des réactions à partir de composés purement organiques, pourrait être alors une alternative.

⁵⁵ N. Hananya, D. Shabat *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16454.

2. Du processus biochimique au processus chimique : la chimiluminescence

La chimiluminescence reprend le même principe que la bioluminescence, c'est-à-dire une émission lumineuse à la suite d'une réaction chimique, mais, cette fois-ci, le mécanisme n'est pas d'origine physiologique mais est dit artificiel. La réaction de chimiluminescence la plus connue est sans nul doute celle qui est responsable de la luminescence du luminol (Figure I.23). Cette substance, outil indispensable pour la police scientifique, permet de mettre en évidence des substances physiologiques sur des scènes de crime. Pour que l'émission du luminol ait lieu, la réaction nécessite l'utilisation d'un catalyseur (e.g par le Fer(II) contenu dans les traces de sang) et du peroxyde d'hydrogène.

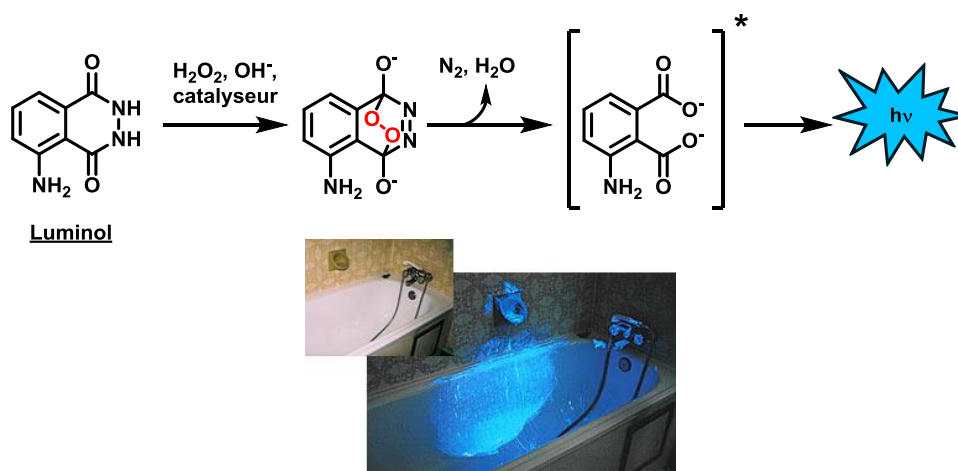
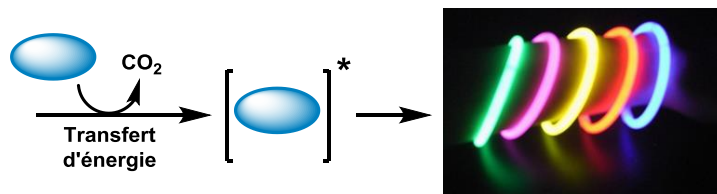
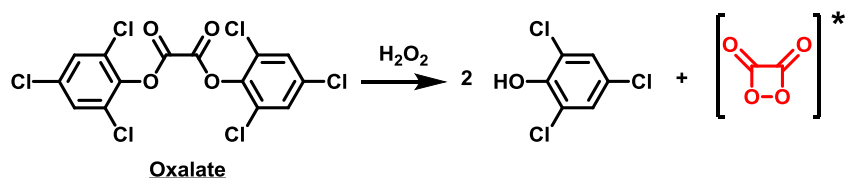


Figure I.23 : Représentation schématique du mécanisme de chimiluminescence du luminol⁵⁶

La chimiluminescence est également observée dans la vie quotidienne avec, par exemple, les bracelets luminescents commercialisés dans de nombreuses villes touristiques ou dans les fêtes foraines. Ces bracelets à double parois, contiennent le peroxyde d'hydrogène dans une paroi, un oxalate et un fluorophore dans l'autre. Lorsque l'on « craque » le bracelet, l'oxalate réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour conduire à une dioxétanedione à l'état excité qui transfère son énergie vers le fluorophore (Figure I.24). Celui-ci atteint alors un état excité et son retour à l'état fondamental libère une énergie lumineuse.

⁵⁶ Photographie issue du site internet : www.scenacriminis.com



: fluorophore

Figure I.24 : Représentation schématique du mécanisme de chimiluminescence

Chacune de ces entités fait intervenir la formation d'une dioxétanedione. Nous avons également vu un intermédiaire 1,2-dioxétanone dans les mécanismes de bioluminescence de la D-luciférine et de la cœlentérazine d'*Aequoria Victoria*. Ces motifs dérivent du 1,2-dioxétane qui, en se décomposant, permet à la molécule sur laquelle il est greffée, d'atteindre un niveau d'énergie suffisant pour générer une entité à l'état singulet excité qui, par retour à l'état fondamental, émet de la lumière. Notre projet est entièrement fondé sur cette entité riche en énergie. Nous allons donc, dans la suite du manuscrit, nous focaliser sur ce motif, et décrire les caractéristiques qui lui sont propres ainsi que les avancées notoires qui ont contribué à l'essor de la technique de chimiluminescence.

3. Le motif 1,2-dioxétane

3.1 Synthèse du motif 1,2-dioxétane

Le motif 1,2-dioxétane est généré à partir de l'oxygène à l'état singulet *in situ* par cycloaddition [2+2] sur une oléfine riche en électron. Celui-ci peut être préparé selon différentes méthodes. Nous avons vu, dans le cas du luminol, par exemple, une méthode purement chimique qui met en jeu une oxydation par le peroxyde d'hydrogène en présence de soude et d'un catalyseur qui conduit, dans ce cas à une cycloaddition [4+2]. Cependant, ces conditions sont bien trop drastiques pour des applications *in vivo*. La méthode la plus connue repose sur l'utilisation d'un photosensibilisateur (*e.g.* le bleu de méthylène, le rose bengal, la tétraphénylporphyrine) qui par irradiation génère l'oxygène singulet. Différents photosensibilisateurs peuvent être utilisés, chacun ayant des caractères photophysiques différents (Figure I.25). A l'opposé des fluorophores, les photosensibilisateurs doivent favoriser au maximum le transfert d'énergie non radiatif pour réaliser le passage de l'oxygène d'un état triplet vers un état singulet. Ceci explique la structure particulière du Rose bengal : les atomes de chlore et d'iode favorisent les transferts d'énergie non radiatifs. Il est important de noter que la nature du solvant a également son importance dans la réaction de formation du motif 1,2-dioxétane. En effet, d'un solvant à un autre, le temps de demi de l'oxygène singulet diffère. En milieu aqueux, par exemple, l'oxygène singulet se désactive rapidement en interagissant avec les liaisons oxygène-hydrogène. Il est

également très sensible vis-à-vis des liaisons carbone-hydrogène, son temps de demi-vie est donc plus important dans un solvant ne comportant pas d'atome d'hydrogène (e.g. 7 000 μs dans le CDCl_3 contre 3.1 μs dans l'eau).⁵⁷

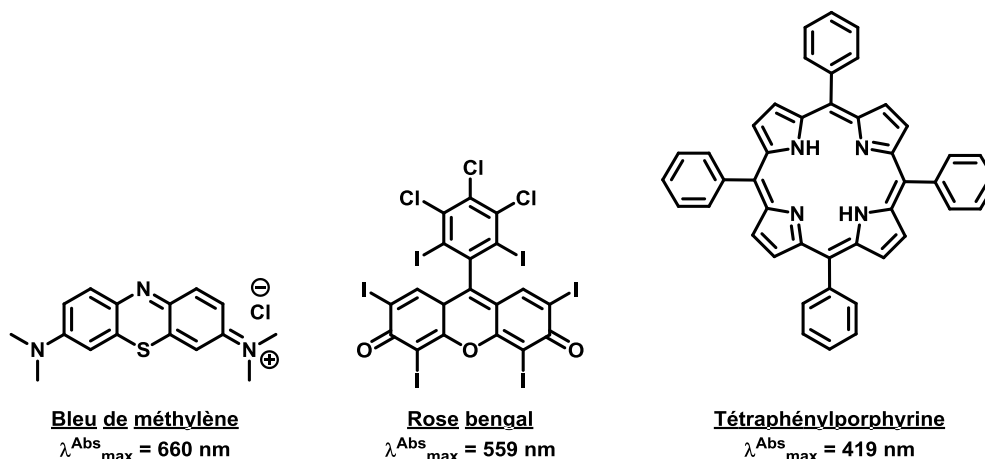


Figure I.25 Représentation schématique de quelques photosensibilisateurs

Une autre méthode plus rarement utilisée, fait appel à la formation d'un trioxaphosphétane à partir d'un phosphite et de l'ozone.⁵⁸ L'oxaphosphénate peut se décomposer en donnant le phosphate et l'oxygène singulet. Nous verrons que cette alternative peut s'avérer très utile notamment lorsque les précurseurs utilisés pour la formation du motif 1,2-dioxétane sont photosensibles.

3.2 Les mécanismes de déclenchement de chimiluminescence

La décomposition thermique ou chimique du motif 1,2-dioxétane conduisant à l'émission lumineuse est majoritairement décrite selon un mécanisme de type CIEEL pour *Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence*. Cependant, un second mécanisme dit CTID pour *Charge Transfer Induced Decomposition*, a récemment été introduit dans la littérature et pourrait remettre en question le mécanisme précédent. Nous allons donc détailler, ci-après, chacun des mécanismes de déclenchement.

3.2.1 Le mécanisme CIEEL

Ce mécanisme a été pour la première fois décrit en 1979 par le Prof. Schuster.⁵⁹ Il procède comme suit : une reconnaissance enzymatique ou chimique ou encore une instabilité thermique, induit la

⁵⁷ C. Schweitzer, R. Schmidt *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1685.

⁵⁸ L. M. Stephenson, M. B. Zielinski *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5819.

⁵⁹ G. B. Schuster *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 366.

formation d'un donneur d'électron (*i.e.* généralement un phénolate) qui transfère un électron vers le motif 1,2-dioxétane (*i.e.* la source d'énergie) (Figure I.26). La déstabilisation de ce dernier conduit à une rupture homolytique de la liaison oxygène-oxygène puis de la liaison carbone-carbone. Un transfert d'électron en retour (*i.e.* BET pour *Back Electron Transfer*) s'effectue ensuite vers le phénol qui le conduit dans un état excité. Son retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission lumineuse.

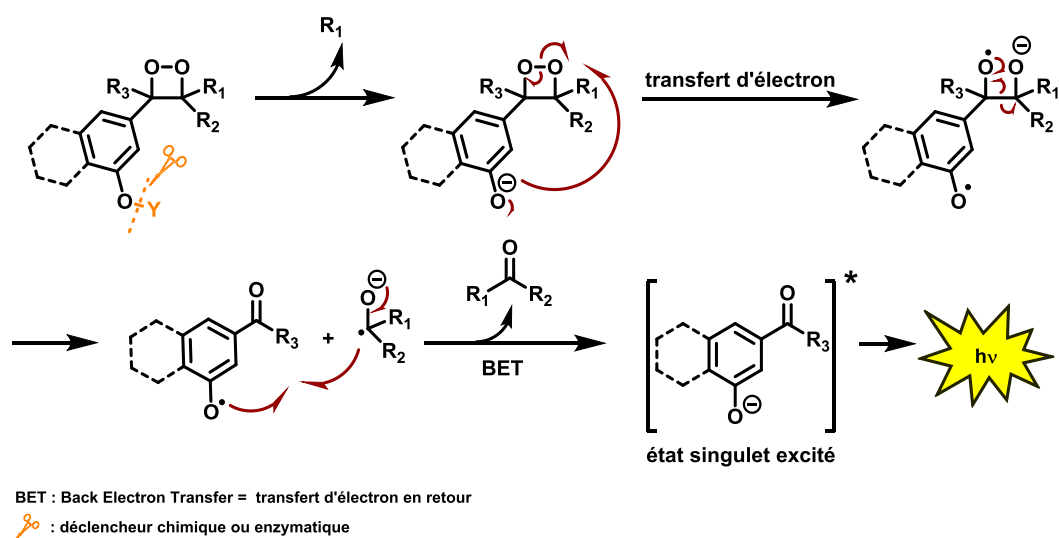


Figure I.26 : Représentation schématique du mécanisme CIEEL

3.2.2 Le mécanisme CTID

Ce mécanisme a été à maintes reprises revendiqué par le groupe du Prof. M. Matsumoto.⁶⁰ Il est plus simple que le mécanisme précédent et ne fait pas intervenir un transfert d'électron en retour. L'absence de preuve expérimentale de l'existence de cette étape est justement à l'origine des polémiques quant au manque de justification du mécanisme. Il commence avec la formation d'un phénolate dont la charge est transférée vers le motif 1,2-dioxétane (Figure I.27). Ce dernier se fragmente en un motif sur lequel un des atomes d'oxygène porte la charge transférée, l'autre atome portant l'électron surnuméraire. La rupture homolytique de la liaison carbone-carbone conduit à la formation d'une cétone et du phénol qui récupère un électron et donc sa charge complète. Sous cette forme, le phénolate est dans un état singulet excité et par retour à l'état fondamental, il libère une émission lumineuse.

⁶⁰ a) M. Matsumoto, N. Watanabe, N. Hoshiya, H. K. Ijuin *Chem. Rec.* **2008**, 8, 213. b) M. Matsumoto, H. Suzuki, N. Watanabe, H. K. Ijuin, J. Tanaka, C. Tanaka *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5006.

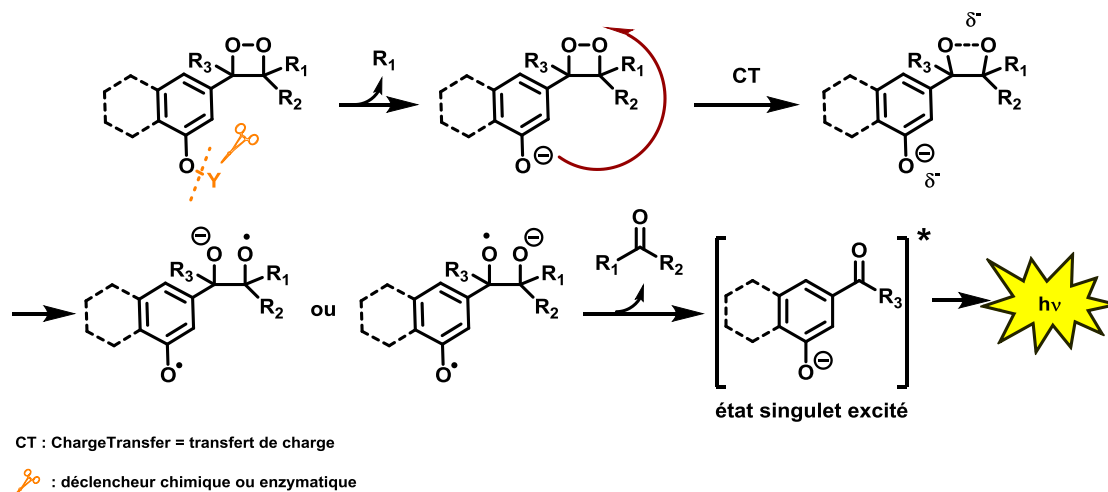


Figure I.27 : Représentation schématique du mécanisme CTID

Certaines publications, notamment celles du groupe du Prof. Matsumoto évoquent le mécanisme CTID pour expliquer l'émission des motifs 1,2-dioxétanes. Cependant, il est plus fréquent de voir le mécanisme CIEEL en raison du caractère récent des propositions concernant l'autre mécanisme, du manque de preuves de celui-ci et de l'utilisation exclusive du mécanisme CIEEL pendant plus de 20 ans.

Il est important de noter que, dans les deux mécanismes, le déclenchement de chimiluminescence est amorcé par la formation de l'anion phénolate. Pour ainsi dire, en absence de l'anion, le transfert d'électron et la chimiluminescence sont beaucoup moins efficaces. Idéalement, si le motif 1,2-dioxétane est destiné à être utilisé en conditions physiologiques, le pKa du déclencheur (*i.e.* ici le phénol, mais nous allons voir d'autres motifs dans la suite de notre discussion) doit être au minima proche du pH physiologique pour conserver une bonne efficacité de chimiluminescence.

3.3 Relation structure-stabilité : influence des substituants sur la stabilisation thermique du motif 1,2-dioxétane

Le motif 1,2-dioxétane, la source principale d'énergie, est généralement porté par un chromophore et possède des groupements R_1 , R_2 et R_3 qui interviennent dans les stabilités chimique (*i.e.* le temps de demi-vie noté $t_{1/2}$) et thermique (*i.e.* que nous appelons de manière instinctive $t'_{1/2}$)⁶¹ de la molécule (Figure I.28). Les groupes R_1 et R_2 sont en général des groupes alkyles, le groupe R_3 est en général un groupe O-Alkyle. Le cycle aromatique contient le déclencheur de chimiluminescence (*i.e.* le groupement Y) et sa nature peut varier d'un phénol à une structure polycyclique hétéroaromatique. Nous allons voir dans la suite de notre discussion, qu'en fonction de la nature des groupements stabilisants et du déclencheur, les propriétés photophysiques diffèrent.

⁶¹ Le paramètre de stabilité thermique est issu d'un calcul théorique selon la loi d'Arrhenius et n'est pas le paramètre préférentiellement donné dans les publications, notamment dans les publications récentes. De ce fait, cette grandeur n'apparaîtra dans le manuscrit qu'à de très rares occasions.

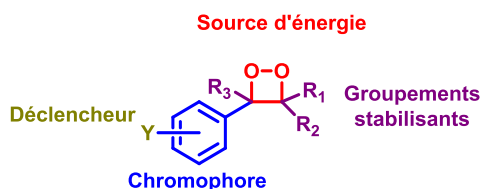


Figure I.28 : Représentation schématique des motifs 1,2-dioxétane chimiluminescents

3.3.1 Sélection des groupements stabilisants

Le nature du groupement stabilisant influe fortement sur la stabilité thermique du motif 1,2-dioxétane. Plus il est encombrant et électro-donneur, plus la stabilité augmente. Différents groupements ont été décrits dans la littérature et parmi eux, le groupement adamantyl qui est le stabilisant historique (Figure I.29). Il est à la base de sondes chimiluminescentes commercialisées, aujourd'hui, sous forme de kits.⁶²

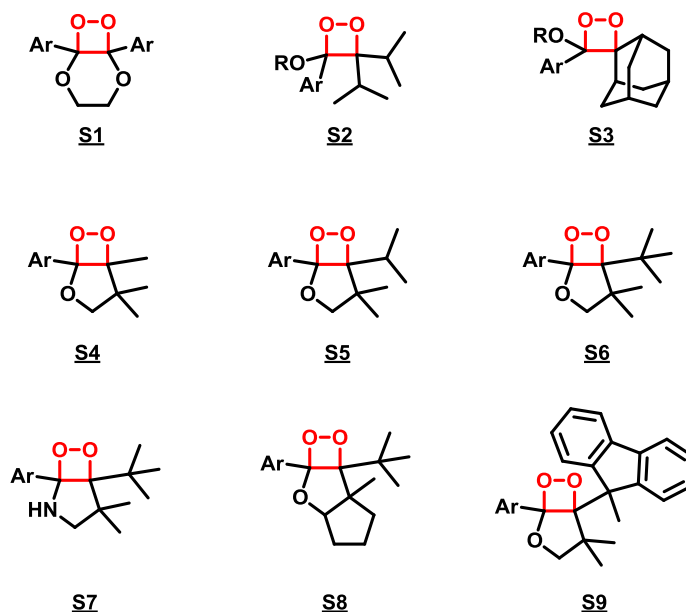


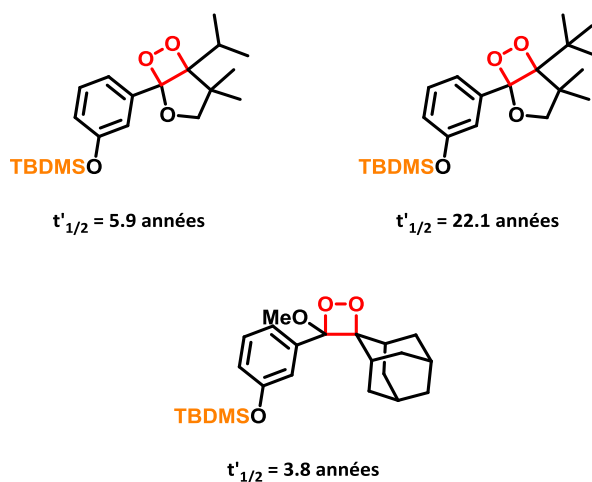
Figure I.29 : Représentation de quelques groupements stabilisant du motif 1,2-dioxétane reportés dans la littérature⁶³

Depuis une vingtaine d'années, le groupe du Prof. Matsumoto a développé une nouvelle classe de groupements stabilisant fondés sur un motif dihydrofurane (*i.e.* les molécules **S4** à **S9** sur la Figure I.29). Le dioxétane, alors sous une forme bicyclique, est fortement stabilisé par la jonction de cycle et enrichi en électron par l'effet électro-donneur de l'atome d'oxygène et des groupements alkyl (*e.g.* méthyl, iso-propyl ou tert-butyl). Comme représenté en Figure I.29, il a démontré une meilleure stabilité thermique $t'_{1/2}$ du motif 1,2-dioxétane pour les composé **S5** et **S6** greffés sur un cœur phénol

⁶² Ces kits sont disponibles chez de nombreux fournisseurs tels que Sigma-Aldrich ou Thermo-Fisher et peuvent être employés pour la détection de protéines par des techniques de Western Blot ou dans les dosages immuno-enzymatiques, par exemple.

⁶³ Les molécules représentées sur cette figure sont numérotées de façon arbitraire tels que **S** pour stabilisants.

et ayant un éther silylé comme déclencheur (*i.e.* $t'_{1/2} = 5.9$ années et $t'_{1/2} = 22.1$ années, respectivement) par rapport au groupement adamantyl (*i.e.* $t'_{1/2} = 3.8$ années).



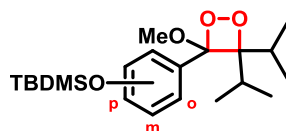
Lors de travaux antérieurs au laboratoire, nous avons déjà exploré les groupements adamantyl pour stabiliser le motif 1,2-dioxétane, qui étaient fonctionnels, mais ceux-ci manquaient de stabilité. Nous avons donc choisi de travailler avec le motif dihydrofurane pour développer nos sondes chimiluminescentes.

3.3.2 Sélection du chromophore et du déclencheur

Comme montré dans les mécanismes de chimiluminescence en Figure I.26 et Figure I.27, le déclencheur doit être un bon donneur d'électron pour fragiliser et fragmenter le motif 1,2-dioxétane. Les déclencheurs décrits dans la littérature sont de nature hydroxyle, thiol et amine. Quelques cas plus rares de carbanions sont également reportés. Nous allons voir dans ce paragraphe que la nature du chromophore et du déclencheur permet de moduler la longueur d'onde d'émission, l'intensité et le type de chimiluminescence (*i.e.* de type « flash » ou « glow », notion que nous allons aborder plus en détails dans le chapitre III).

Notons que dans la suite de ce manuscrit, nous allons présenter des motifs chimiluminescents pour lesquels le déclencheur est situé en position *meta* vis-à-vis du cycle 1,2-dioxétane. Les études menées par le Prof. Prof. Matsumoto, sur un dioxétane stabilisé par le groupement *gem*-di-isopropyl ont montré une influence de la position du déclencheur (*i.e.* l'anion phénolate dans cette étude) sur la longueur d'onde d'émission, l'efficacité de chimiluminescence et le temps de demi-vie du motif 1,2-dioxétane.⁴³ Ainsi, lorsque le déclencheur est placé en position *méta* (*i.e.* position utilisée dans la majorité des exemples de la littérature), le chimiluminophore émet à 463 nm et présente une efficacité de chimiluminescence de 21%. Le déplacement du déclencheur en position *para* n'influe pas sur la longueur d'onde (*i.e.* longueur identique), en revanche le rendement quantique de chimiluminescence chute drastiquement avec une valeur de 0.05%. Par ailleurs, son émission est très rapide avec un temps

de demi-vie inférieure à la seconde contre les 6.3 secondes observées pour l'analogue en position méta. Le déplacement déclencheur en position *ortho* induit un effet hypsochrome (*i.e.* $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 422 \text{ nm}$) avec une efficacité de chimiluminescence amoindrie, de l'ordre de 0.08%. Le temps de demi-vie est également affecté avec une valeur de 1.5 secondes. D'après ces résultats, l'analogue possédant le déclencheur en position méta est le candidat idéal pour obtenir un déclenchement de chimiluminescence optimal.



Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	ϕ^{CL} (%)	$t_{1/2}$ (s)
Ortho (o)	422	0.08	1.5
Meta (m)	463	21	6.3
Para (p)	463	0.05	> 1

Tableau I.2 : Propriétés photophysiques de la décomposition du motif 1,2-dioxétane en fonction de la position du déclencheur [mesures effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, à 25 °C]

Nous verrons dans le chapitre III que des études similaires ont été réalisées sur un cœur naphtyle et montrent l'importance de la position du déclencheur vis-à-vis du cycle dioxétane.

Le cœur phénol est le modèle historique utilisé pour les déclenchements de chimiluminescence. Les travaux pionnier du Prof. Schaap sont fondés sur les 1,2-dioxétanes à cœur phénol (Figure I.31) qui ont, quelques années plus tard, initié la commercialisation de kits pour la détection d'activités enzymatiques (cf chapitre II).

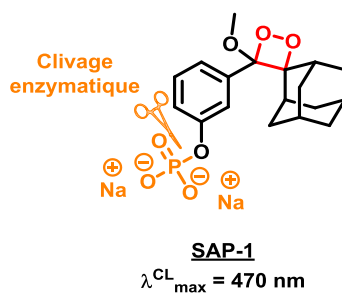


Figure I.31 : Représentation schématique d'un 1,2-dioxétane à cœur phénol proposé par le Prof. Schaap

Le 1,2-dioxétane à phénol présente généralement une émission dans le bleu (*i.e.* $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$), mais nous allons voir, dans les chapitres II et III, notamment avec les travaux des Prof. Matsumoto et Shabat, que son émission peut tendre vers l'orange voire le proche IR.

Le groupe du Prof. Matsumoto a montré la possibilité de réaliser un déclenchement de chimiluminescence à partir d'un cœur aniline (Figure I.32).⁶⁴ L'utilisation d'un tel motif permet de déplacer la longueur d'onde d'émission vers la rouge (*i.e.* $\lambda_{\text{max}} = 642 \text{ nm}$). En revanche, le rendement quantique de chimiluminescence chute drastiquement avec une valeur de l'ordre de 0.00048%, contre les 20% observés pour le 1,2-dioxétane à phénol.

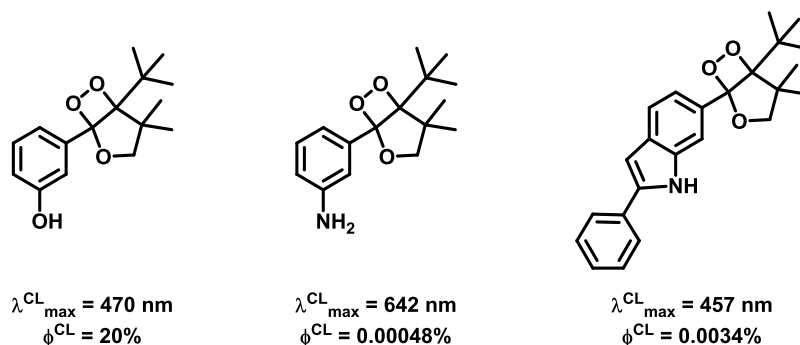


Figure I.32 : Représentation schématique des cœurs aniline proposés par le Prof. Matsumoto

Cette différence est due au pK_a de l'aniline qui, contrairement au phénol, est trop élevé en milieu organique (*i.e.* 30.6 dans le DMSO) pour que sa forme anionique prédomine et favorise le transfert d'électron vers le motif 1,2-dioxétane. Notons qu'en conditions physiologiques (*i.e.* pH 7.4), nous rencontrons le même problème (*i.e.* $\text{pK}_a = 18$), l'aniline libre sera donc majoritairement sous sa forme protonée (*i.e.* contre un pK_a de 9-10 pour le phénol) (Figure I.33).

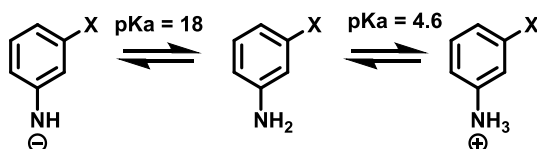


Figure I.33 : Représentation schématique des équilibres acido-basiques de l'aniline en conditions aqueuses

Le groupe de Matsumoto a tenté d'abaisser le pK_a (*i.e.* en milieu organique) en utilisant un indole, dont le pK_a est de 20.95, en lieu et place de l'aniline. Il a alors observé une luminescence dans le bleu (*i.e.* $\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ nm}$), avec un rendement quantique de chimiluminescence augmenté par rapport à l'aniline correspondante mais toujours faible (*i.e.* $\phi^{\text{CL}} = 0.0034\%$). En raison des faibles efficacités de chimiluminescence et des difficultés de déprotonation, le cœur aniline n'est apparemment pas le candidat idéal pour un déclenchement de chimiluminescence optimal, notamment pour des applications *in vivo*.

Nous pouvons également citer les travaux du Prof. P.-Y. Renard, effectués dans l'équipe du Dr. C. Mioskowski au CEA de Saclay, concernant la détection d'activité enzymatique de type

⁶⁴ N. Watanabe, M. Ichikawa, A. Ono, H. Murakami, M. Matsumoto *Chem. Lett.* **2005**, 34, 718.

acétylcholinestérase.⁶⁵ Le chromophore était, ici, de nature thiophénol, la chimiluminescence est donc déclenchée par rupture d'un pont disulfure par la thiocholine, formée en amont par hydrolyse de l'acétylcholine par son enzyme. Les deux groupements nitro présents sur le second thiohénol permettent d'orienter l'addition de la thiocholine, et conduisent, en milieu physiologique, au thiophénolate 1,2-dioxétane, qui se décompose comme déjà décrit.

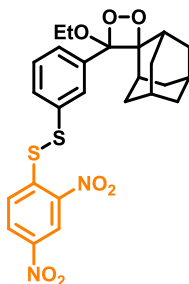
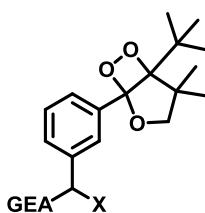


Figure I.34 : Représentation schématique de la sonde chimiluminescente visant une détection de l'acétylcholinestérase⁶⁵

Des espèces carboanioniques ont également montré des aptitudes intéressantes pour le déclenchement de la chimiluminescence (Figure I.35).⁶⁶ Ce concept est basé sur la présence d'un groupement électroattracteur lié à l'atome de carbone déclencheur. L'addition d'une base dans le milieu conduit à la formation d'un carbanion et permet donc de déclencher le mécanisme de chimiluminescence. Plus le carbanion est entouré de groupements électroattracteurs, plus l'efficacité de chimiluminescence est augmentée. La présence de tels groupements permet également de déplacer les longueurs d'onde vers le proche IR, avec une émission maximale du dioxétane observée à 758 nm. Néanmoins, ces études ont été menées exclusivement en milieux organiques et ne permettent pas de se projeter, pour le moment, vers une application *in vivo*.



GEA = CN, X = H :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 702 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.0033\%$; $t_{1/2} < 0.02 \text{ s}$
GEA = CN, X = Me :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 758 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.0002\%$; $t_{1/2} < 0.05 \text{ s}$
GEA =CO ₂ Me X = H :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 666 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.004\%$; $t_{1/2} = 0.42 \text{ s}$
GEA = COPh, X = H :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 622 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.04\%$; $t_{1/2} = 0.42 \text{ s}$
GEA = CN, X = CO ₂ Me :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 530 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.57\%$; $t_{1/2} = 40 \text{ min}$

Figure I.35 : Représentation schématique des motifs 1,2-dioxétane à déclencheur carbanion⁶⁶

⁶⁵ S. Sabelle, P.-Y. Renard, K. Pecorella, S. de Suzzoni-Dézard, C. Créminon, J. Grassi, C. Mioskowski *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4874.

⁶⁶ N. Watanabe, T. Mizuno, M. Matsumoto *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9569.

D'autres méthodologies ont été réalisées pour augmenter la longueur d'onde d'émission du motif 1,2-dioxétane, par l'utilisation d'aromatiques polycycliques ou d'hétéroaromatiques. Nous pouvons citer les travaux du Prof. Matsumoto sur les 1,2-dioxétane à naphтол, qui nous ont mené à élaborer des sondes pour la détection d'activités enzymatiques (cf Chapitre III.II). Il a également étendue la conjugaison par synthèse d'un dioxétane à anthracène qui présente une longueur d'onde d'émission de 709 nm.⁶⁷ Cependant, celui-ci possède un faible rendement quantique de l'ordre 0.004 %.

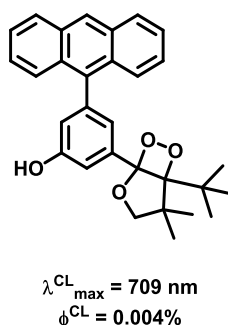


Figure I.36 : Représentation schématique du 1,2-dioxétane à anthracène⁶⁷

Une autre alternative pour déplacer les longueurs d'onde d'émission vers le proche IR est l'utilisation d'un fluorophore relais. Le déclenchement reste identique, cependant l'émission lumineuse observée ne correspond pas à celle du motif 1,2-dioxétane mais à celle du fluorophore. Ce mécanisme se produit grâce à un transfert d'énergie du phénolate à l'état excité vers le fluorophore. Nous allons voir qu'il existe deux types de transfert d'énergie : un transfert d'énergie à travers l'espace et un transfert d'énergie à travers les liaisons.

4. Conjugaison aux fluorophores organiques

4.1 Transfert d'énergie à travers l'espace de type *Chemiluminescence Resonance Energy Transfer* (CRET)

Nous avons abordé, dans la partie Chapitre I.IV.1.1, le transfert d'énergie de type BRET entre un bioluminophore donneur et un fluorophore accepteur, à l'image du transfert de type FRET. Dans le cas de la chimiluminescence, il s'agit d'un transfert de type CRET pour *Chemiluminescence Resonance Energy Transfer*. La cassette est composée d'un chimiluminophore donneur et d'un fluorophore accepteur émettant, généralement, à des longueurs d'onde plus élevées. Comme le FRET, ce processus nécessite un recouvrement optimal des spectres d'émission du chimiluminophore et d'absorption du fluorophore relais. Parmi les nombreux exemples décrits dans la littérature, nous pouvons citer les

⁶⁷ M. Matsumoto, D. Kasai, K. Yamada, N. Fukuda, N. Watanabe, H. K. Ijuin *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8079.

travaux du Dr. K. Teranishi visant une détection de l'anion superoxyde.⁶⁸ Le dispositif est constitué d'un chimiluminophore dérivé de la cœlentérazine et de la sulforhodamine 101, tous deux greffés sur une cyclodextrine. Grâce à ce transfert d'énergie intramoléculaire, une émission dans le rouge à 610 nm (*i.e.* qui correspond à longueur d'émission de la sulforhodamine 101) est observée.

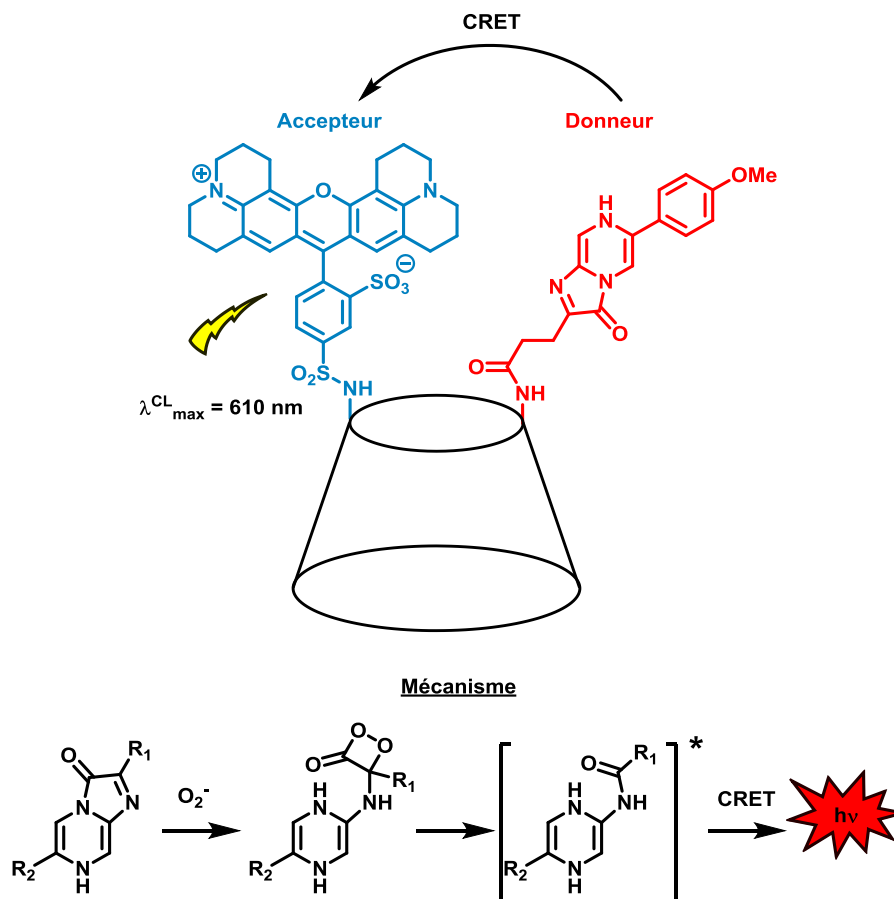


Figure I.37 : Représentation schématique du dispositif proposé par le Dr. Teranishi⁶⁸

Et, plus récemment, une cassette constituée du luminol et d'un BODIPY a été décrite. Les deux partenaires sont reliés par un motif triazole.⁶⁹ Pour cette cassette, le déclenchement de chimiluminescence opère après traitement de la sonde avec du peroxyde d'hydrogène, en présence d'ions Fe(II). Ce dispositif pourrait, par exemple, être utilisé en criminologie. L'émission observée correspond alors à la longueur d'onde d'émission du BODIPY (*i.e.* $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$).

⁶⁸ K. Teranishi *Luminescence* **2007**, 22, 147.

⁶⁹ A. Degirmenci, F. Algi *Dyes and Pigments* **2017**, 140, 92.

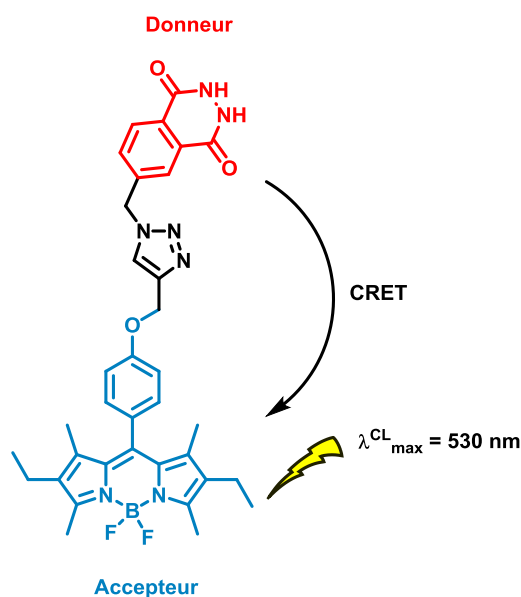


Figure I.38 : Représentation schématique de la cassette chimiluminescente proposée par le groupe du Dr. Algi⁶⁹

Dans ces deux exemples, les partenaires sont liés de façon covalente, le transfert d'énergie est donc intramoléculaire. Nous verrons dans le chapitre II d'autres exemples de transfert de type CRET qui s'effectuent, cette fois-ci, de façon intermoléculaire.

Malgré les avantages de ce processus (*e.g.* absence d'une source excitatrice externe, déplacement des longueurs d'ondes vers le proche IR, augmentation de l'efficacité de chimiluminescence), notamment pour des applications en conditions aqueuses, il représente un défi de point de vue synthétique puisqu'un point d'accroche pour le fluorophore est nécessaire. De plus, un bon recouvrement des spectres d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur, respectivement, est primordial pour un transfert d'énergie optimal.

4.2 Transfert d'énergie à travers les liaisons de type *Through Bond Energy Transfer* (TBET)

Le transfert à travers les liaisons, également appelé *Through Bond Energy Transfer* (TBET), est une alternative au transfert de type CRET, car contrairement à ce dernier, il ne nécessite pas un bon recouvrement spectral des donneur et accepteur. Le choix du fluorophore relais est de ce fait beaucoup plus vaste. Les travaux du Prof. Burgess ont notamment initié le développement de cassettes TBET aussi bien fluorescentes que chimiluminescentes. La Figure I.39 représente un exemple de cassette élaborée par le groupe du Prof. K. Burgess. De façon similaire à la cassette CRET proposé par le Dr. Algi, le Prof. Burgess utilise le luminol comme chimiluminophore, qui émet normalement à 460 nm, et une benzophénoxazine (*i.e.* le Nile red) comme fluorophore. Les partenaires sont reliés par une triple liaison afin d'augmenter l'efficacité du transfert à travers les liaisons.

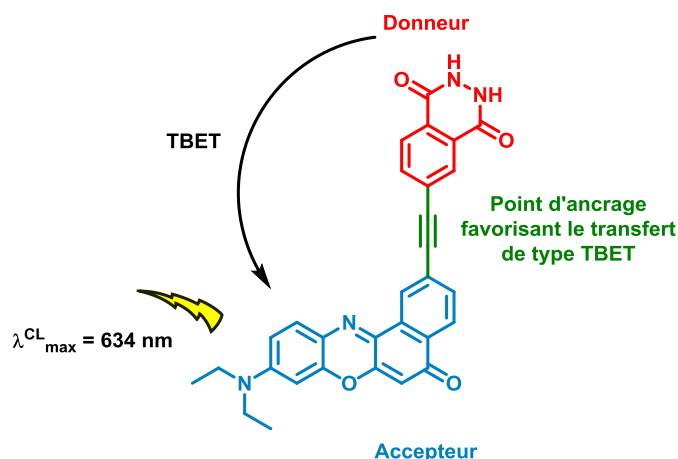


Figure I.39 : Représentation schématique d'une cassette de type TBET proposées par le Prof. Burgess.

Ce type de transfert sera abordé en détails dans le chapitre III, nous n'insisterons donc pas d'avantage sur les travaux fondés sur le transfert de type TBET.⁷⁰

V. Introduction au projet de thèse

Comme nous avons pu le voir dans ce chapitre, les techniques d'imagerie optique sont en plein essor. Notamment, la pro-fluorescence qui est d'autant plus attractive qu'elle permet d'observer un signal lumineux d'un fluorophore « masqué » uniquement après interaction avec l'analyte ciblé. Néanmoins, l'utilisation de sondes pro-fluorescentes n'est pas sans imperfections. Effectivement, le signal « OFF », plus particulièrement pour les sondes de type « OFF-ON », n'est pas total : les différents mécanismes de *quenching* ne permettent pas d'éteindre complètement la fluorescence du fluorophore, un bruit de fond est toujours observé avant réaction avec l'analyte d'intérêt.³⁴ La chimiluminescence reprend le même principe de la pro-fluorescence mais contourne son manque d'efficacité : nous nous affranchissons du bruit de fond et de toute source excitatrice externe.

Ainsi, le but de ce projet de thèse est la synthèse et l'étude de sondes chimiluminescentes capables de détecter une ou plusieurs activités enzymatiques *in vivo*. La stratégie envisagée passe par la préparation d'une plateforme chimiluminescente comportant un motif 1,2-dioxétane thermiquement stable, sur laquelle il est possible de faire varier le déclencheur (possibilité d'adapter cette plateforme à l'analyte ou événement que l'on veut détecter) et d'accrocher un fluorophore ayant une émission dans le proche-IR. S'il serait théoriquement possible d'utiliser un fluorophore à phénol émettant directement dans le proche IR sur lequel le motif 1,2-dioxétane est greffé, à l'image des travaux réalisés au laboratoire sur un modèle de coumarine (*i.e.* que nous allons décrire dans le chapitre suivant), les efforts de synthèse nécessaires semblent être disproportionnés par rapport à l'objectif. La conception des sondes envisagées est, du coup, fondée sur un transfert d'énergie entre le motif 1,2-dioxétane et

⁷⁰ Pour des exemples de cassettes de types TBET, voir : a) A. Loudet, C. Thivierge, K. Burgess *Dojin News* **2011**, 137, 1. b) J. Fan, M. Hu, P. Zhan, X. Peng *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 29.

un fluorophore. Il s'inscrit dans la continuité des travaux antérieurs au laboratoire et amorcés par d'anciens doctorants, le Dr. Jean-Alexandre Richard (thèse soutenue le 20 Octobre 2008) et le Dr. Virgile Grandclaude (thèse soutenue le 23 Septembre 2011) dans le cadre d'une collaboration avec la société Quidd (Quantitative Imaging in Drug Development), aujourd'hui disparue.

Nous verrons ainsi, au cours du deuxième chapitre, une première stratégie novatrice qui consiste à concevoir une sonde chimiluminescente à motif 1,2-dioxétane et cœur phénolique sur laquelle un complexe de lanthanide, ayant des propriétés de luminescence dans le proche IR, est greffé et à travers lequel un transfert d'énergie à travers l'espace (*i.e.* de type CRET) est envisageable. Nous observerons alors un phénomène d'antenne. Cette stratégie est développée en collaboration avec le Dr. Philippe DURAND de l'Institut de Chimie et des Substances Naturelles UPR 2301, à Gif-sur-Yvette.

La dernière partie du projet repose, elle, sur l'élaboration d'une cassette chimiluminescente hydrosoluble à plateforme naphtholique, greffée à un fluorophore organique dont l'émission est dans le proche IR, et fondée sur un transfert d'énergie à travers les liaisons, à l'instar des travaux du Prof. Burgess que nous venons d'évoquer. Le défi de cette cassette TBET réside dans l'efficacité du transfert d'énergie du motif 1,2-dioxétane vers le fluorophore. En effet si elle est proche de 100%, en supposant qu'il n'y a peu ou pas de *quenching* liée aux molécules d'eau, l'émission de chimiluminescence observée correspondra uniquement à la longueur d'onde d'émission du fluorophore.

Et bien que ces plateformes ne soient pas stricto sensu spécifiques d'une enzyme particulière, nous avons pour objectif initial de nous centrer sur la détection de la phosphatase alcaline, complexe enzymatique impliqué dans diverses pathologies telles que le scorbut, l'hypothyroïdie et l'insuffisance hépatique sévère. Ces premiers modèles présentent l'avantage d'avoir un substrat chargé (*i.e.* le groupement phosphate), ce qui devrait participer à l'hydrosolubilisation des sondes, facilitant ainsi les purifications de petites quantités de sondes par RP-HPLC et les tests de validation *in vitro* en tampon aqueux. La phosphatase alcaline présente aussi l'avantage de pouvoir être détectée à un pH légèrement basique (*i.e.* pH 9.0), ce qui devrait, dans un premier temps, permettre de minimiser les problèmes de déprotonation du phénol ou du naphtol.

**Chapitre II. Développement de sondes
chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour
une détection dans le proche IR**

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

I. Etat de l'art

Ce premier chapitre est consacré à la mise au point de nouveaux systèmes chimiluminescents à cœur phénolique pour la détection d'activités enzymatiques d'intérêt dans le proche-IR. En amont d'une présentation des résultats obtenus, nous nous attacherons à exposer les différents exemples de la bibliographie et nous insisterons sur l'importance d'utiliser un motif dihydrofurane en lieu et place d'un motif adamantyl comme groupement stabilisant du motif 1,2-dioxétane.

1. Présentation des avancées sur le motif 1,2-dioxétane à phénol : de la détection UV au proche IR

Cette partie 1 est destinée à rappeler l'un des principaux sujets de ce projet de thèse, à savoir l'intérêt d'une utilisation du motif 1,2-dioxétane. Ici, sont donc soulignés les travaux fondamentaux basés sur le développement de sondes phénoliques chimiluminescentes innovantes à motif 1,2-dioxétane. Ainsi, et ce de façon sommaire, nous présentons ci-après les avancées notoires sur le motif 1,2-dioxétane réalisées par les groupes des professeurs Schaap, Matsumoto et Shabat.

1.1 Travaux du Prof. A.P. Schaap : commercialisation des premières plateformes chimiluminescentes et amélioration de leur efficacité

Les 1,2-dioxétanes à cœur phénolique sont depuis un certain nombre d'années le sujet de nombreuses investigations. Avant l'essor de sondes chimiluminescentes proche IR, diverses tentatives ont été réalisées pour pallier le problème d'efficacité de chimiluminescence dans les conditions aqueuses (*i.e.* quenching de l'eau évoqué dans le Chapitre I)⁷¹. La solution la plus encourageante à ce jour semble être le transfert d'énergie du produit excité (résultant de l'ouverture du cycle dioxétane) vers un accepteur spatialement proche. Ainsi, les premiers essais se sont tournés vers la mise en place d'une cage hydrophobe, aujourd'hui appelée « enhancer » de luminescence, qui est composée de molécules de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), elles-mêmes organisées sous la forme de micelles, et à l'intérieur de laquelle le dioxétane est protégé de toute interaction avec l'eau (Figure II.1).⁷² Le « quenching » de l'eau est, de cette façon, limité. En complément, des molécules de 5-(stéaroylamino)fluorescéine (*i.e.* notées F sur le schéma de gauche) sont additionnées au milieu et, grâce à leur longue chaîne hydrophobe, elles participent à l'encapsulation micellaire. Le déclenchement de chimiluminescence de ce premier modèle **SAP-1**⁷³ a pu être par la suite vérifié par une activation enzymatique de type phosphatase alcaline.

⁷¹ M. Matsumoto *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem.* **2004**, 5, 27.

⁷² A. P. Schaap *EP352713A1*, **1990**, 37 pp.

⁷³ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre II.I.1.1 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **SAP** pour Schaap Arthur Paul.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

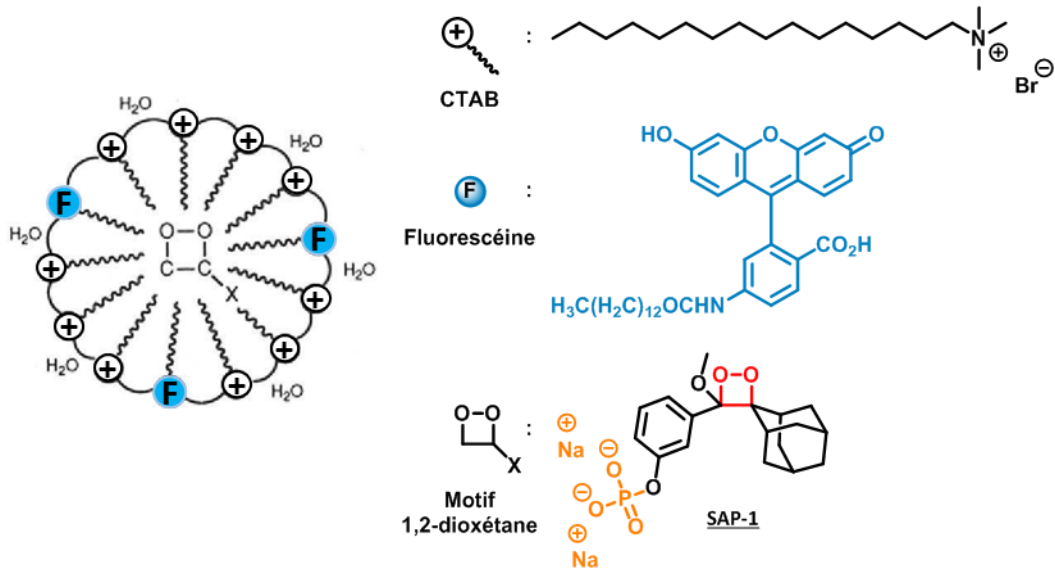
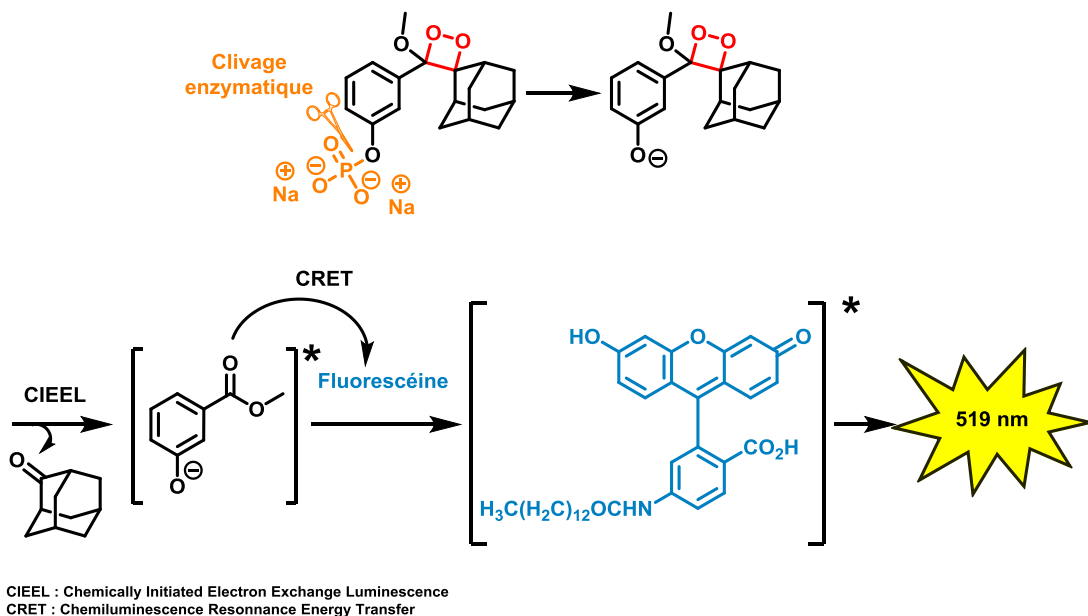


Figure II.1 : Schéma représentatif du kit vendu par la société Lumigen, Inc.⁷⁴

Après reconnaissance enzymatique, le mécanisme de décomposition du dioxétane (voir chap I) peut donc opérer et l'énergie ainsi produite est directement transférée vers le fluorophore de façon intermoléculaire, on parle alors d'un transfert de type CRET intermoléculaire (Figure II.2). Comme dans tout phénomène de transfert d'énergie de luminescence à la résonance (FRET, BRET, donc CRET), ceci nécessite un recouvrement du spectre d'absorption de la fluorescéine avec le spectre d'émission par chimiluminescence du composé **SAP-1**.



CIEEL : Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence
CRET : Chemiluminescence Resonance Energy Transfer

Figure II.2 : Représentation schématique du mécanisme CIEEL appliquée à la sonde **SAP-1**

⁷⁴ <http://www.lumigen.com/>

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Nous pouvons observer sur le spectre de chimiluminescence représenté en Figure II.2 (spectre B), que le transfert d'énergie a effectivement opéré et que l'utilisation de ce système micellaire augmente fortement l'efficacité de chimiluminescence par rapport à la sonde seule (spectre A). Par ailleurs, il a été observé que l'intensité de chimiluminescence dépendait également de la concentration en fluorophore. En effet, le temps de demi-vie de l'espèce électroniquement excitée étant très court, le transfert est d'autant plus efficace que la concentration en fluorescéine est saturante dans le milieu d'étude.

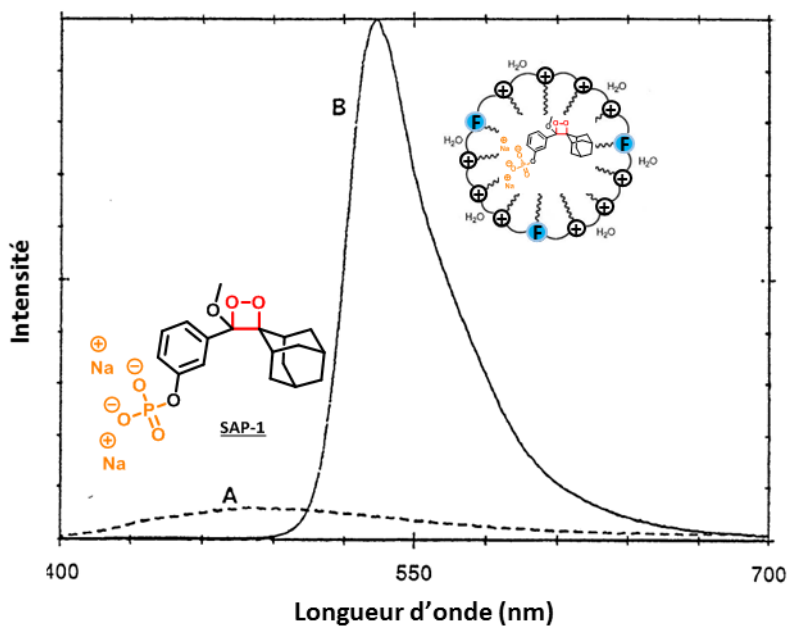


Figure II.3 : Spectre de chimiluminescence de la sonde **SAP-1** [43 μM] en absence (A) et en présence (B) de la cage hydrophobe fluorescente [déclenchement réalisé en tampon phosphate (0.75 M), pH = 9.1, 37 °C, en présence de phosphatase alcaline bovine (12 pg/mL), de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ (0.8 mM), de CTAB (1.13 mM) et de 5-(stéaroylamino) fluorescéine (0.056 mM)]⁷²

Ce dispositif, qui est depuis commercialement disponible sous la forme de kits⁷⁴, permet sensiblement d'amplifier l'émission du 1,2-dioxétane. Il a notamment été largement exploité dans la détection *in vivo* d'activités enzymatiques telle que celles de la phosphatase alcaline.⁷⁵ Le groupe du Pr. R. P. Mason a également montré la possibilité de détecter la β -galactosidase par utilisation du kit Galacton-Light PlusTM. Celui-ci contient différentes substances dont le motif 1,2-dioxétane Galacto-Plus (Figure II.4) ainsi qu'un « enhanceur » similaire à celui présenté ci-dessus, et a montré des résultats prometteurs suite aux essais *in vivo* réalisés sur des souris portant une tumeur transgénique exprimant la beta-galactosidase (porteuse du gène LacZ).⁷⁶

⁷⁵ a) A. P. Schaap, R. S. Handley, B. P. Giri *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 935. b) A. P. Schaap, T.-S. Chen, R. S. Handley, R. DeSilva, B. P. Giri *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1155. c) A. P. Schaap, M. D. Sandison, R. S. Handley *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1159. d) A. P. Schaap, H. Akhavan, L. J. Romano *Clin. Chem.* **1989**, 35, 1863. e) J.-C. Tseng, A. L. Kung *J. Biomed. Sci.* **2015**, 22, 45.

⁷⁶ a) L. Liu, R. P. Mason *PLOS ONE* **2010**, 5, e12024. b) J. Y. Park, J. Gunpat, L. Liu, B. Edwards, A. Christie, X.-J. Xie, L. J. Kricka, R. P. Mason *Luminescence* **2014**, 29, 553.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

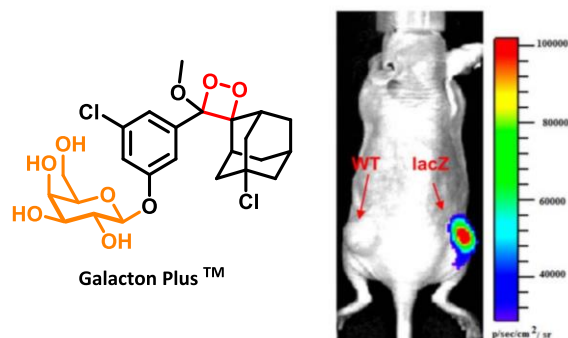


Figure II.4 : Représentation schématique de la structure du Galacto-Plus™ et imagerie d'une souris 10 secondes après injection intratumorale [50 μ L du kit Galacton-Light Plus™ injectés dans les tumeurs à lignée MCF7 (WT) et par MCF7-lacZ (lacZ)]^{76a}

D'autres exemple, présentés dans les travaux du Dr. A. R. Lippert, mettent en avant la possibilité de détecter d'autres analytes d'intérêt grâce à l'utilisation d'un « enhanceur ». Par synthèse de diverses sondes chimiluminescentes spécifiques au sulfure d'hydrogène (H_2S) intracellulaire (Figure II.5) ou qui permettent de déterminer le phénomène d'hypoxie (*i.e.* un manque accrue de dioxygène chez un organisme vivant ; phénomène que nous décrivons dans la partie II de ce chapitre) (Figure II.6), il a pu observer une chimiluminescence sur cellules et chez le petit animal.⁷⁷

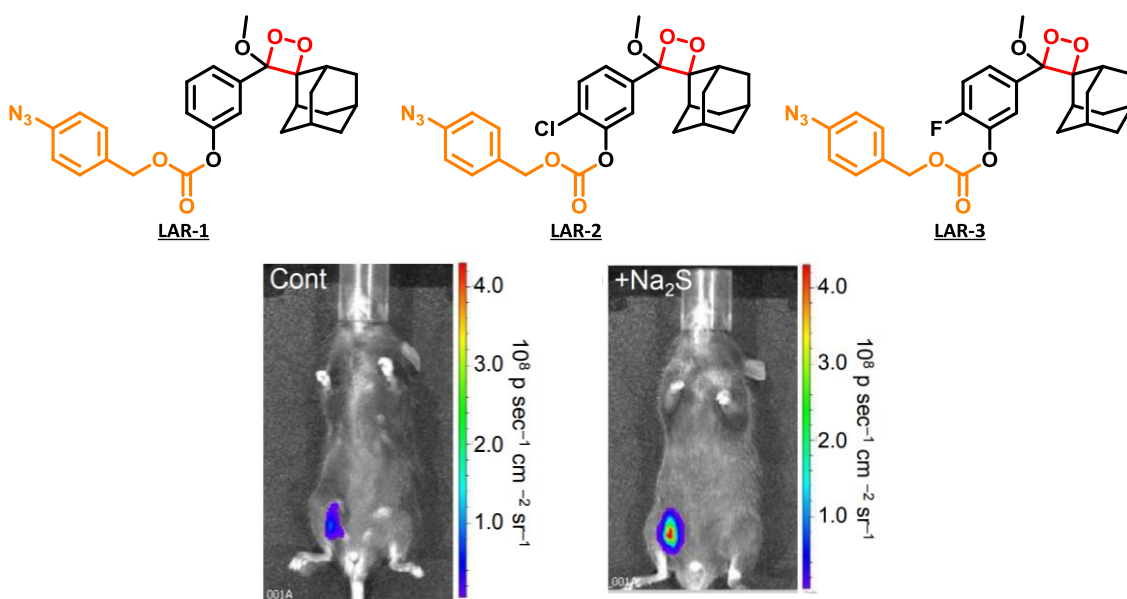


Figure II.5 : Représentation schématique des sondes chimiluminescente proposées par le Dr. Lippert et imageries de souris 30 secondes après injection de LAR-2 [0.08 μ M en absence (à gauche) et en présence (à droite) d'une solution de Na_2S (4 mM) dans 100 μ L de tampon HEPES (20 mM, pH = 7.4) contenant 20 % de Emerald II Enhancer]⁷⁷

⁷⁷ a) J. Cao, R. Lopez, J. M. Thacker, J. Y. Moon, C. Jiang, S. N. S. Morris, J. H. Bauer, P. Tao, R. P. Mason, A. R. Lippert *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1979. b) J. Cao, J. Campbell, L. Liu, R. P. Mason, A. R. Lippert *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4995.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Notons que sur chacune de ces sondes, le déclencheur (*i.e.* le groupement *para*-azidobenzyle pour les sondes **LAR-1** à **LAR-3**⁷⁸ et le groupement *para*-nitrobenzyle pour les sondes **LAR-4** et **LAR-5**) est introduit sous la forme d'un bras réactif auto-immolable. En effet, après activation par l'analyte d'intérêt correspondant (Na_2S ou la nitroréductase), le groupement *para*-azidobenzyle, comme le groupement *para*-nitrobenzyle, est réduit en aniline. Le bras réactif de type alcool *para*-aminobenzyle (*i.e.* PABA) résultant suit alors un mécanisme d'élimination qui libère le phénolate initiateur de la chimiluminescence. Nous verrons un peu plus en détails, dans la partie Chapitre II.1.3 de ce chapitre, les différents bras réactifs auto-immolables ainsi que les principaux mécanismes d'auto-immolation qui les accompagnent.

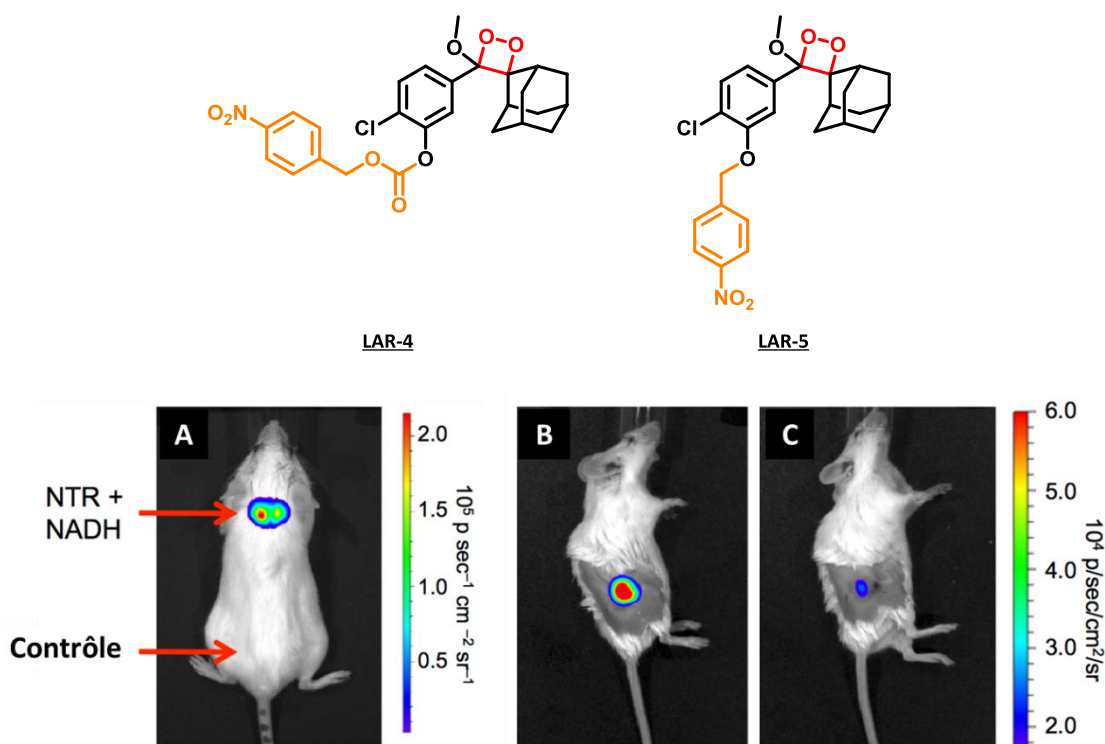


Figure II.6 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes **LAR-4** et **LAR-5** proposée par le Prof. Lippert pour une détection *in vivo* de la nitroréductase (en haut) et imageries de souris (en bas) [pour le groupe A : mesures pour des souris SCID/BALB-C réalisées 30 secondes après injections sous-cutanées de la sonde **LAR-5** (30 μL , 40 μM dans PBS (10 mM), pH = 7.4, en présence de NTR (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$), NADH (0.4 mM) et de Emerald II Enhancer (10%). Pour le test contrôle, la NTR et le NADH ont été remplacés par H_2O et NaOH 0.01M) ; pour les groupes B et C : mesures pour des souris SCID/BALB-C transfectée avec le gène tumoral H1299 et réalisée 90 secondes après injection intratumorale de la sonde **LAR-5** (100 μL , 40 μM dans PBS (10 mM), pH = 7.4, en présence de Emerald II Enhancer (10%), pour des souris respirant de l'air (en B) ou 100% O_2 (en C)]

Cependant, l'inconvénient majeur de ce dispositif réside dans l'utilisation d'une concentration relativement élevée en surfactant présent dans l'enhancer, proche de la limite autorisée *in vivo*.⁷⁹ De

⁷⁸ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre II.1.1 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **LAR** pour Lippert Alexander Ryan.

⁷⁹ A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

plus, la structure micellaire est difficilement maintenue après injection chez l'animal, cette approche nécessite donc quelques améliorations pour une détection *in vivo* ou pour l'imagerie d'activité biologique générée par des enzymes ou des analytes chimiques. De plus, comme indiqué ci-dessus, la nécessité d'une concentration élevée en fluorophore présente, certes, l'avantage d'accentuer l'intensité lumineuse mais peut également conduire à des problèmes « d'auto-quenching » tels que l'homo-FRET (*i.e.* phénomène observé lorsque deux ou plusieurs fluorophores identiques sont suffisamment proches spatialement)⁸⁰, la formation d'excimères ou d'exciplexes (voir chapitre I). L'une des alternatives proposées par la suite réside dans la préparation de nouvelles plateformes chimiluminescentes, où le motif 1,2-dioxétane est lié à un fluorophore de façon covalente (Figure II.7).

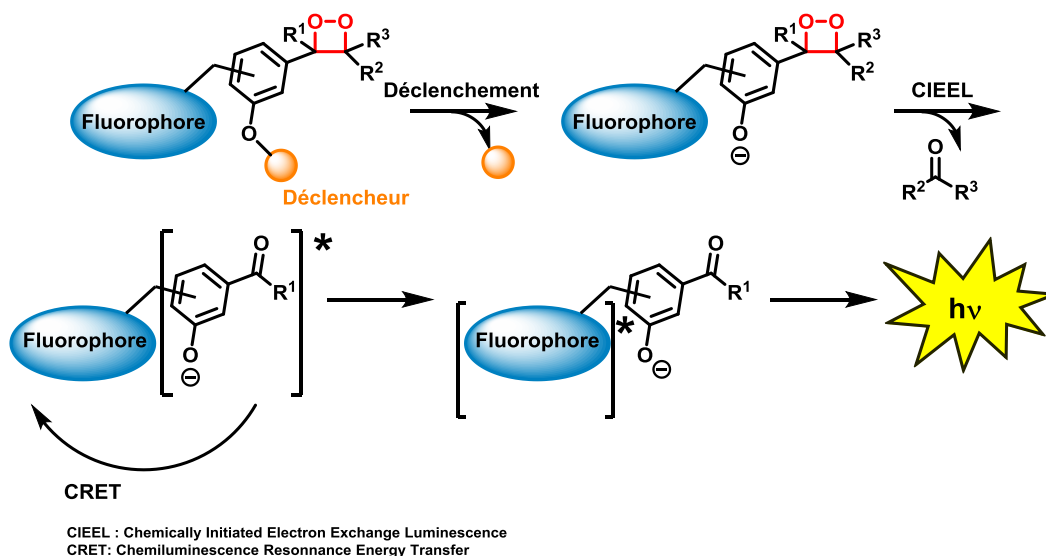


Figure II.7 : Représentation schématique du mécanisme d'activation de chimiluminescence d'un dioxétane conjugué à un fluorophore⁸¹

Le Prof. Schaap a, par exemple, breveté un système similaire à ses premières sondes (*i.e.* adamantylidenedioxetane) et capable, cette fois-ci, de réaliser un transfert énergétique intramoléculaire après déclenchement de chimiluminescence par reconnaissance enzymatique.⁸² La conception de ces nouvelles sondes repose sur la même stratégie synthétique employée pour la synthèse de la plateforme modèle **SAP-1** (Figure II.8). Deux fluorophores ont été sélectionnés pour cette étude : la fluorescéine, déjà utilisée pour le complexe micellaire servant de preuve de concept, et le benzothiazole, structure plus petite et ayant une émission proche de celle de la fluorescéine (*i.e.* $\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 519 \text{ nm}$). L'accroche de ces derniers n'a pas été réalisée directement sur le phénol mais au voisinage du motif 1,2-dioxétane soit par formation d'un lien amide (*i.e.* pour les sondes **SAP-4**, **SAP-6** et **SAP-7**) soit par formation d'un lien éther (*i.e.* pour les sondes **SAP-3** et **SAP-8**). Effectivement, ces études visaient également à élargir le panel de motifs 1,2-dioxétane par variation de ses substituants.

⁸⁰ Pour un exemple de phénomène d'homo-FRET voir : M. E. Roth, O. Green, S. Gnaïm, D. Shabat *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1309.

⁸¹ Le code couleur employé pour ce schéma (*i.e.* bleu pour l'entité fluorescente, orange pour le substrat réactif vis-à-vis d'un analyte d'intérêt et rouge pour le motif 1,2-dioxétane) sera également utilisé et respecté dans la suite de ce manuscrit.

⁸² A. P. Schaap, H. Akhavan-Tafti *WO9007511A1*, **1990**, 81 pp.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

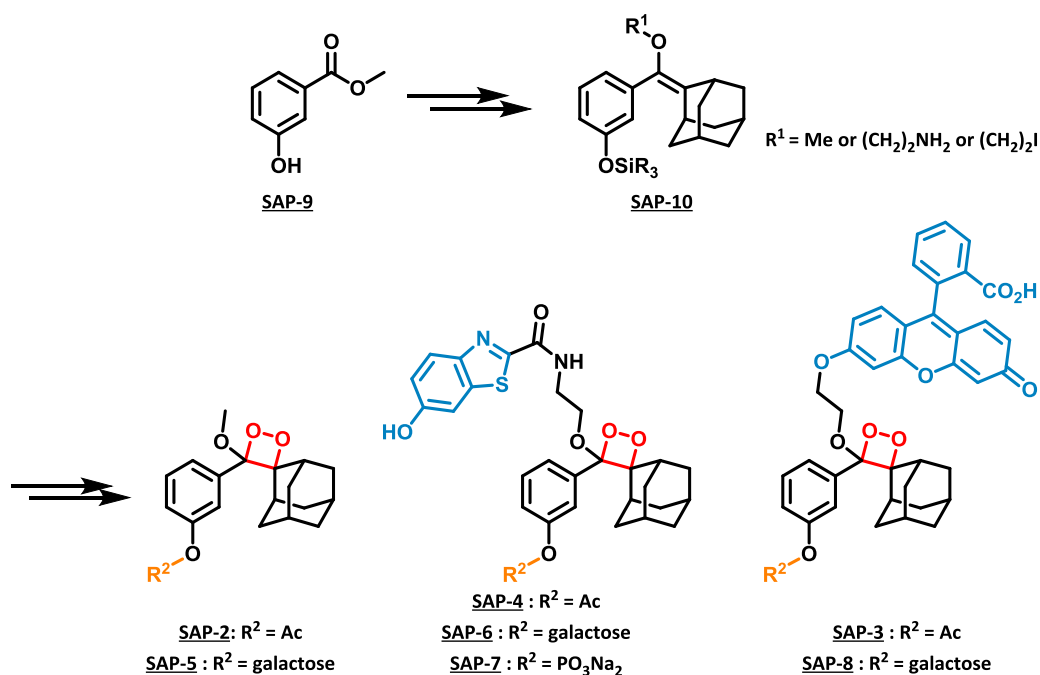


Figure II.8 : Représentation schématique de la voie synthétique adoptée par le groupe du Prof. Shaap et exemples de sondes développées par cette voie

Les expériences de déclenchement ont été menées *via* l'activation des sondes par trois enzymes : une estérase, une galactosidase et la phosphatase alcaline. Ainsi, sept sondes ont été développées et évaluées. A travers les résultats présentés dans ce brevet, le Prof. Schaap a pu montrer que l'attache d'un fluorophore sur la plateforme 1,2-dioxétane permet d'augmenter considérablement le rendement quantique de chimiluminescence ϕ^{CL} en milieu aqueux (Figure II.9). En effet, les composés **SAP-3** et **SAP-4** présentent respectivement des efficacités de chimiluminescence 240 et 325 fois plus élevées (*i.e.* $\phi^{\text{CL}}_{\text{SAP-3}} = 0.29\%$ et $\phi^{\text{CL}}_{\text{SAP-4}} = 0.39\%$) que celle de leur précurseur **SAP-2** (*i.e.* $\phi^{\text{CL}}_{\text{SAP-2}} = 0.0012\%$) dans les mêmes conditions. De plus, pour ces mêmes sondes, les spectres de déclenchement de chimiluminescence enregistrés lors de ces expériences indiquent une longueur d'onde maximale de chimiluminescence correspondante à la longueur d'onde maximale d'émission des fluorophores associés. On peut en conclure que le transfert énergétique intramoléculaire souhaité a pu opérer. L'avantage de cette méthode réside principalement dans l'absence totale d'un outil d'encapsulation et dans l'utilisation d'une concentration finale en fluorophore réduite.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

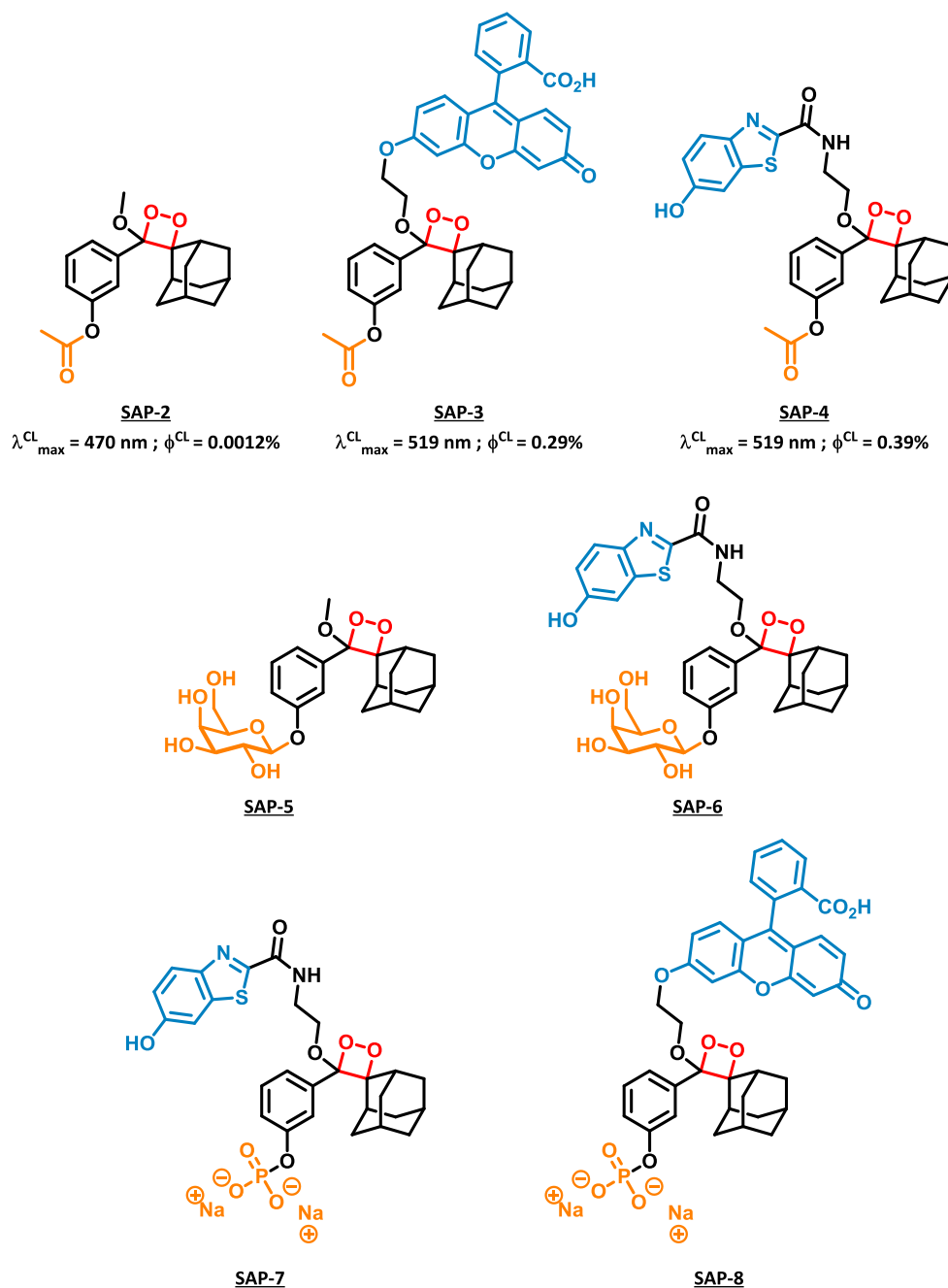


Figure II.9 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes du Prof. Schaap [déclenchements réalisés en présence de carboxyle estérase de foie de porc (150 unités/mg en suspension dans 3.2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en tampon phosphate, pH=9.2, à 37 °C pour les composés **SAP-2**, **SAP-3** et **SAP-4** ; pour les composés **SAP-5**, **SAP-6**, **SAP-7** et **SAP-8**, les résultats obtenus sont similaires aux précédents pour des détections respectives d'activités glycosidase et de phosphatase]

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

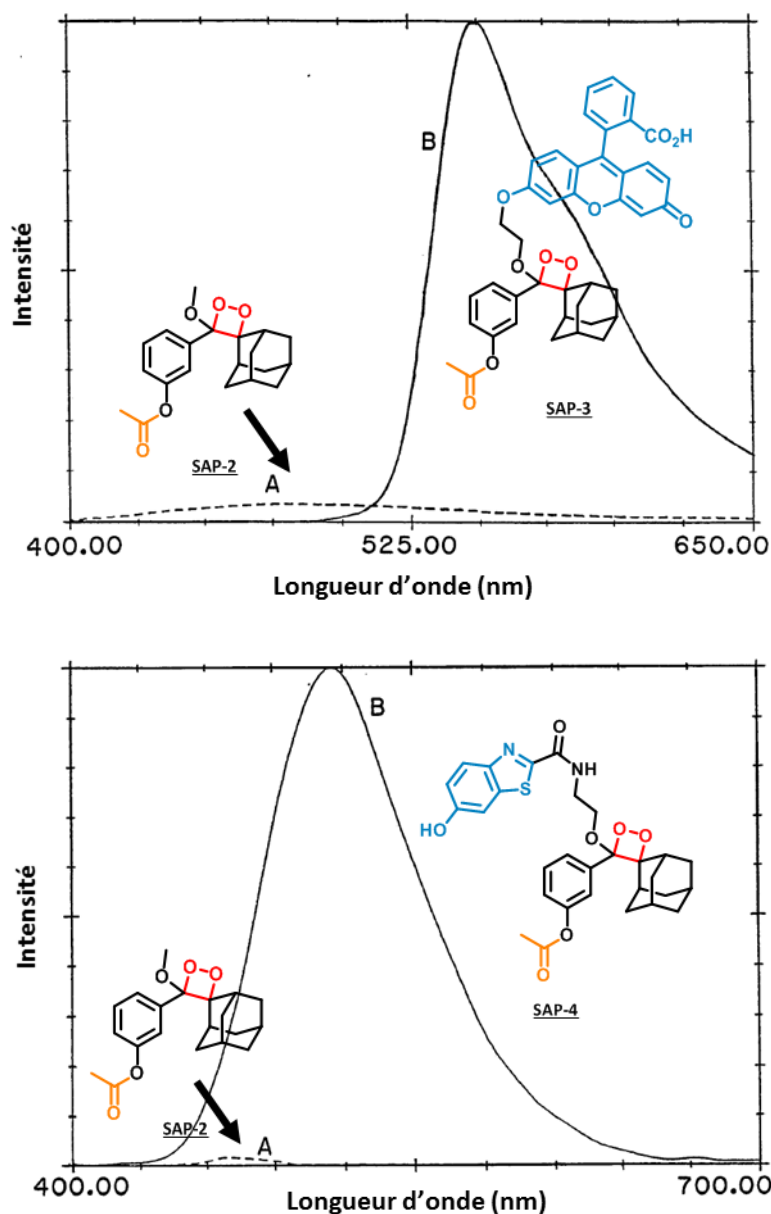


Figure II.10 : Spectre de chimiluminescence des sondes **SAP-2** (A) et **SAP-3** (B) (en haut) [mesures réalisées en solution de NaOH aqueux] et spectre de chimiluminescence de **SAP-2** (A) et **SAP-4** (B) (en bas) [43 μ M, en tampon phosphate (0.75 M), pH = 9.2, 37 °C, en présence de carboxyle estérase de foie de porc (150 unités/mg en suspension dans 3.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)]⁸²

Le Prof. Schaap a ainsi créé une nouvelle classe de sondes chimiluminescentes et ces résultats prometteurs ont ouvert la voie au développement de sondes plus efficaces en milieux aqueux grâce à un transfert énergétique intramoléculaire.

1.2 Travaux du Prof. M. Matsumoto : synthèse et développement d'un nouveau motif dioxétane

Le groupe du Prof. Matsumoto a développé une autre famille de sondes à la suite des travaux du Prof. Schaap. Celles-ci se composent d'un dioxétane bicyclique lié de manière covalente à une espèce

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

fluorescente (*i.e.* fluorescéine dans un cas, hydroxybenzothiazole dans l'autre) par le biais d'un bras amide. La différence majeure apportée par le Prof. Matsumoto, par rapport aux molécules proposées par le Prof. Schaap, est le remplacement du motif adamantyl par un motif dihydrofurane. Nous avons vu précédemment que le Prof. Matsumoto a réalisé quelques études de décomposition du motif 1,2-dioxétane *via* une variation des groupements stabilisants (*e.g.* adamantyl, diisopropyl, benzofurane, ...). Il a ainsi pu montrer que le groupement de type dihydrofurane est le candidat idéal pour une stabilisation optimale de l'entité 1,2-dioxétane (*e.g.* $t_{1/2} = 49.8$ années pour la dégradation thermique spontanée du motif dihydrofurane *tert*-butylique contre $t_{1/2} = 3.8$ année pour le motif adamantyl). Le développement de nos sondes chimiluminescentes est justement basé sur l'incorporation de ce motif. Nous allons en discuter plus en détails dans la partie II de ce chapitre.

Ainsi, comme l'indique la Figure II.11, la synthèse des sondes du Prof. Matsumoto démarre avec le chlorure de 3-méthoxybenzyle **MM-1** commercial. Un alcool, préalablement obtenu à partir du diéthyl 3-oxoglutarate, est introduit sur le composé **MM-1** *via* une liaison éther pour obtenir le composé **MM-2**. Par la suite, trois étapes, dont une étape d'oxydation, conduisent à la cétone **MM-3**. Celle-ci permet d'accéder en 4 étapes au composé **MM-4** contenant le cycle dihydrofurane précurseur du motif 1,2-dioxétane. L'introduction du fluorophore par le biais d'un bras amide se fait en 4 étapes supplémentaires pour conduire au composé **MM-5**. La plateforme chimiluminescente **MM-6** est alors obtenue selon une réaction de cycloaddition [2+2] du dihydrofurane **MM-5** avec l'oxygène singulet.

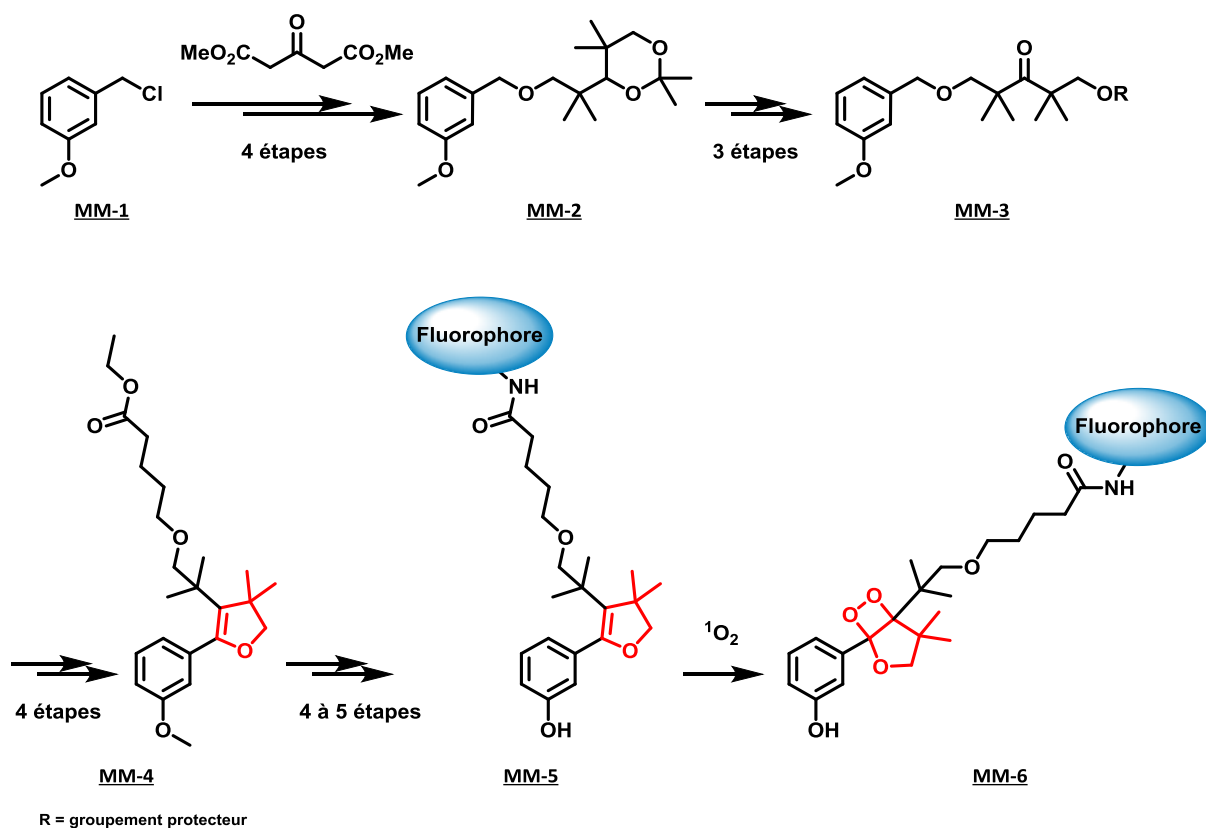


Figure II.11 : Représentation schématique de la voie synthétique proposée par le Prof. Matsumoto

Les sondes désirées sont ensuite obtenues par cycloaddition [2+2] en présence d'oxygène singulet. Elles sont composées d'un squelette de type **MM-6** sur lesquels le fluorophore est légèrement éloigné

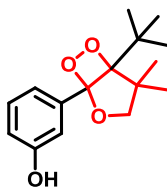
Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

(*i.e.* une chaîne C5 sépare le fluorophore du dihydrofurane) par rapport aux modèles de Schaap.⁸³ Cette distance permet de conserver un transfert d'énergie entre le chimiluminophore et le fluorophore comme nous le montrent les Figure II.12 et Figure II.13. L'équipe du Prof. Matsumoto a pu ainsi réaliser des déclenchements de chimiluminescence en milieux organique (*i.e.* TBAF/ACN) et aqueux (*i.e.* 0.1 M NaOH/H₂O). En milieu organique, la présence des chromophores permet d'observer des longueurs d'onde maximales de chimiluminescence de $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 535 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 469 \text{ nm}$ pour **MM-8** et **MM-9** respectivement, correspondant aux longueurs d'onde d'émission des fluorophores respectifs.⁸⁴

⁸³ Pour plus d'information sur la synthèse du motif dihydrofurane voir : a) M. Matsumoto, N. Watanabe, A. Ishikawa, H. Murakami *Chem. Commun.* **1997**, 2395. b) M. Matsumoto, N. Watanabe, M. Yamada *EP1238976A1*, **2002**, 22 pp.

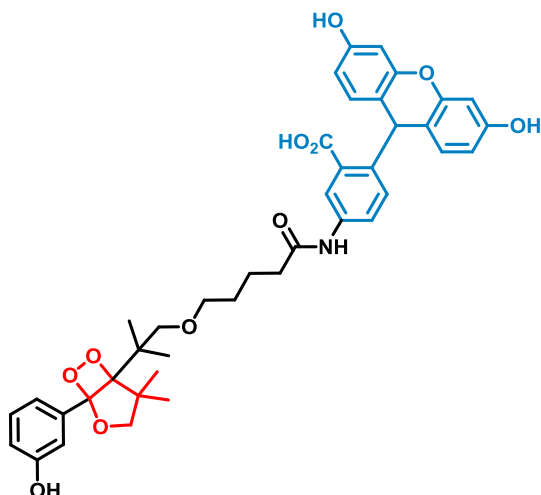
⁸⁴ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre II.I.1.2 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur telles que MM pour Mastumoto Masakatsu.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR



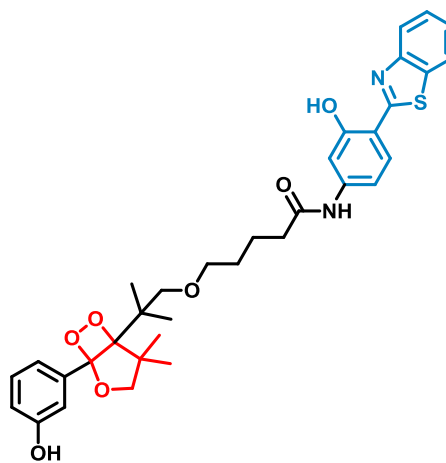
MM-7

Système A: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 467 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 11\%$
 Système B: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 467 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.0011\%$



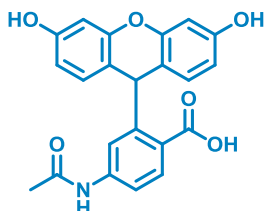
MM-8

Système A: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 535 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 19\%$
 Système B: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 525 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.6\%$



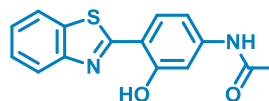
MM-9

Système A: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 469 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 21\%$
 Système B: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 468 \text{ nm}$; $\phi^{\text{CL}} = 0.037\%$



MM-10

Système A: $\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 535 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 52\%$
 Système B: $\phi^{\text{FL}} = 73\%$



MM-11

Système A: $\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 469 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 48\%$
 Système B: $\phi^{\text{FL}} = 36\%$

Figure II.12 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes employées par le groupe du Prof. Matsumoto (Système A : TBAF/ACN ; Système B : 0.1 M NaOH/H₂O ; mesures faites à 25 °C)⁸⁵

De même que pour les résultats préliminaires du Prof. Schaap, les spectres d'émission par chimiluminescence des dioxétanes **MM-8** et **MM-9** concordent exactement avec les spectres d'émission par fluorescence des composés **MM-10** et **MM-11** respectivement. Le concept d'un transfert énergétique intramolécule du dioxétane vers le fluorophore associé de façon covalente est confortée. Par ailleurs, une amélioration des rendements quantiques de chimiluminescence a été constatée en milieu aqueux : les valeurs sont 550 et 30 fois (*i.e.* $\phi_{\text{MM-8}}^{\text{CL}} = 0.6\%$ et $\phi_{\text{MM-9}}^{\text{CL}} = 0.037\%$) supérieures à celle de la sonde modèle **MM-6** (*i.e.* $\phi_{\text{MM-7}}^{\text{CL}} = 0.0011\%$).⁸⁵

⁸⁵ N. Watanabe, H. Kino, S. Watanabe, H. K. Ijuin, M. Yamada, M. Matsumoto *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6079.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

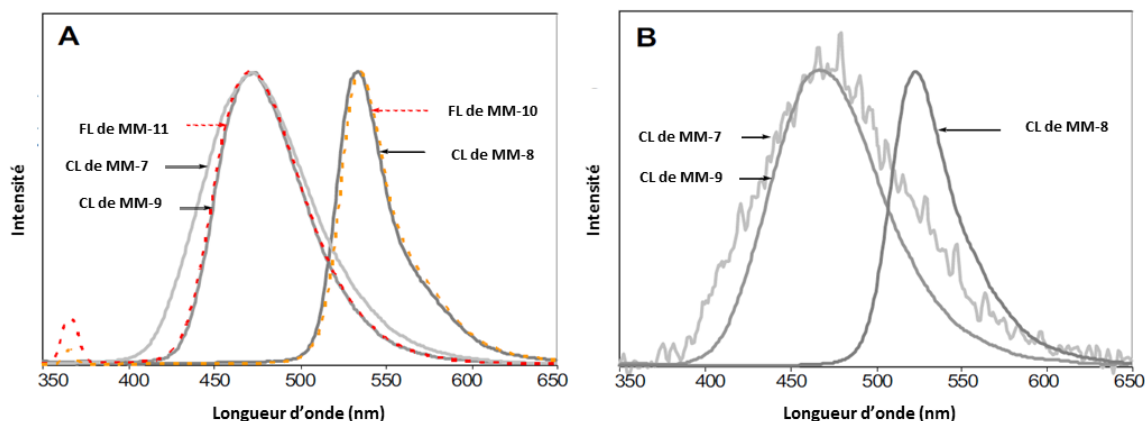


Figure II.13 : Illustrations issues de la publication Mastmuto *et al.*⁸⁵

A : Spectres de chimiluminescence des dioxétanes **MM-7**, **MM-8** et **MM-9**, et d'émission des composés **MM-10** et **MM-11** dans TBAF/NaOH

B : Spectres de chimiluminescence des dioxétanes **MM-7**, **MM-8** et **MM-9** dans 0.1 M NaOH/H₂O

Cependant, s'ils sont nettement plus élevés en milieu aqueux par rapport au chimiluminophore dépourvu de fluorophore, les rendements quantiques de chimiluminescence restent faibles, en particulier pour la sonde **MM-9**. Ces résultats bien qu'encourageants ne permettent malheureusement pas de répondre aux besoins des études *in vivo* en raison d'une émission en dehors de la « fenêtre d'imagerie » *in vivo* (cf Chapitre I.1.2.2.2).

1.3 Travaux du Prof. D. Shabat : optimisation des dioxétanes du Prof. Schaap et extension de la chimiluminescence vers le proche IR pour des applications *in vivo*

Une nouvelle approche a été développée, durant ma thèse, par le groupe du Prof. Shabat.⁸⁶ Elle propose l'introduction du fluorophore sur la plateforme chimiluminescente, cette fois-ci, après la formation du cycle 1,2-dioxétane, à la différence des travaux du Prof. Matsumoto qui formait ce cycle en ultime étape (Figure II.14).

⁸⁶ N. Hananya, A. Eldar Boock, C. R. Bauer, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13438.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

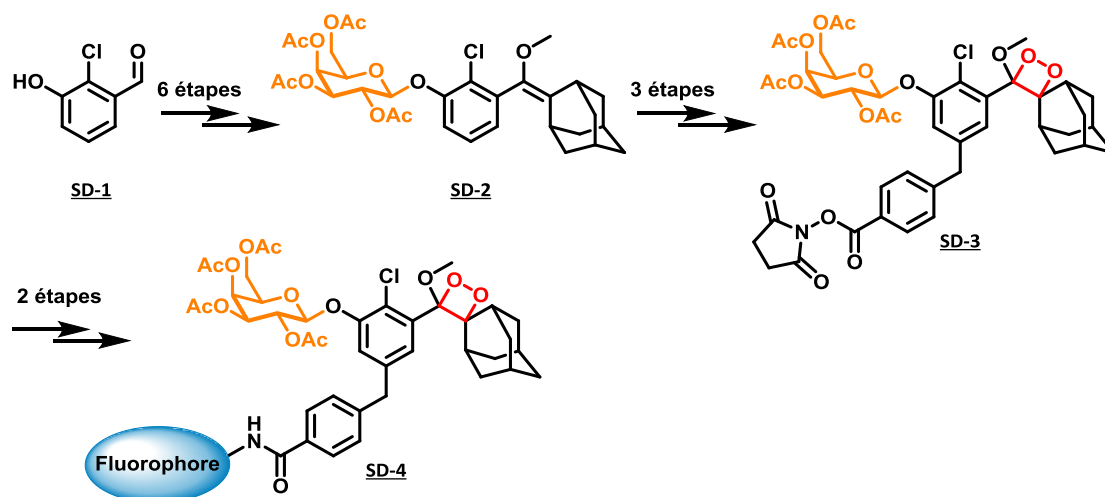


Figure II.14 : Représentation schématique de la voie synthétique adoptée par le groupe du Prof. Shabat.

De plus, ce groupe a choisi de suivre les exemples du Prof. Schaap qui repose sur le motif adamantyl. La synthèse démarre donc avec un dérivé de l'hydroxybenzaldéhyde **SD-1**.⁸⁷ Rappelons que la formation du phénolate après libération du déclencheur est essentielle au déclenchement de chimiluminescence. Or, à pH physiologique, celui-ci ne se forme que peu ou pas. Afin d'abaisser le pK_a de l'anion phénolate (*i.e.* $pK_a = 9.5$)⁸⁸, un atome de chlore a été ajouté sur le noyau aromatique, augmentant la proportion de phénolate en conditions physiologiques (*i.e.* $pK_a = 7.82$)⁸⁸. L'adamentyldiene et le déclencheur, dont le choix s'est porté sur un substrat réactif vis-à-vis de la β -galactosidase, sont rapidement introduits sur le phénol **SD-1**. Le composé **SD-2** résultant est engagé dans la réaction de formation du cycle 1,2-dioxétane pour conduire au composé **SD-3**. L'entité fluorogénique y est ensuite introduite par le biais d'un bras espaceur de type amide. Deux fluorophores ont été employés dans cette étude : la fluorescéine pour la sonde **SD-6** et une cyanine phénolique (**Q-Cy**) pour la sonde **SD-7** (Figure II.15). L'utilisation de la **Q-Cy**, chromophore développé au sein de ce groupe⁸⁹, permet de déplacer l'émission dans le proche IR (*i.e.* $\lambda^{FL}_{max} = 700$ nm). La sonde **SD-7** est donc plus appropriée pour un travail dans la « fenêtre d'imagerie » *in vivo* que la sonde **SD-6**.

⁸⁷ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre II.I.1.3 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur telles que **SD** pour Shabat Doron.

⁸⁸ Valeurs de pK_a des phénols déprotégés portant le motif 1,2-dioxétane-adamantyl avec et sans l'atome de chlore, calculées sur le site <https://chemicalize.com>

⁸⁹ N. Karton-Lifshin, L. Albertazzi, M. Bendikov, P. S. Baran, D. Shabat *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20412.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

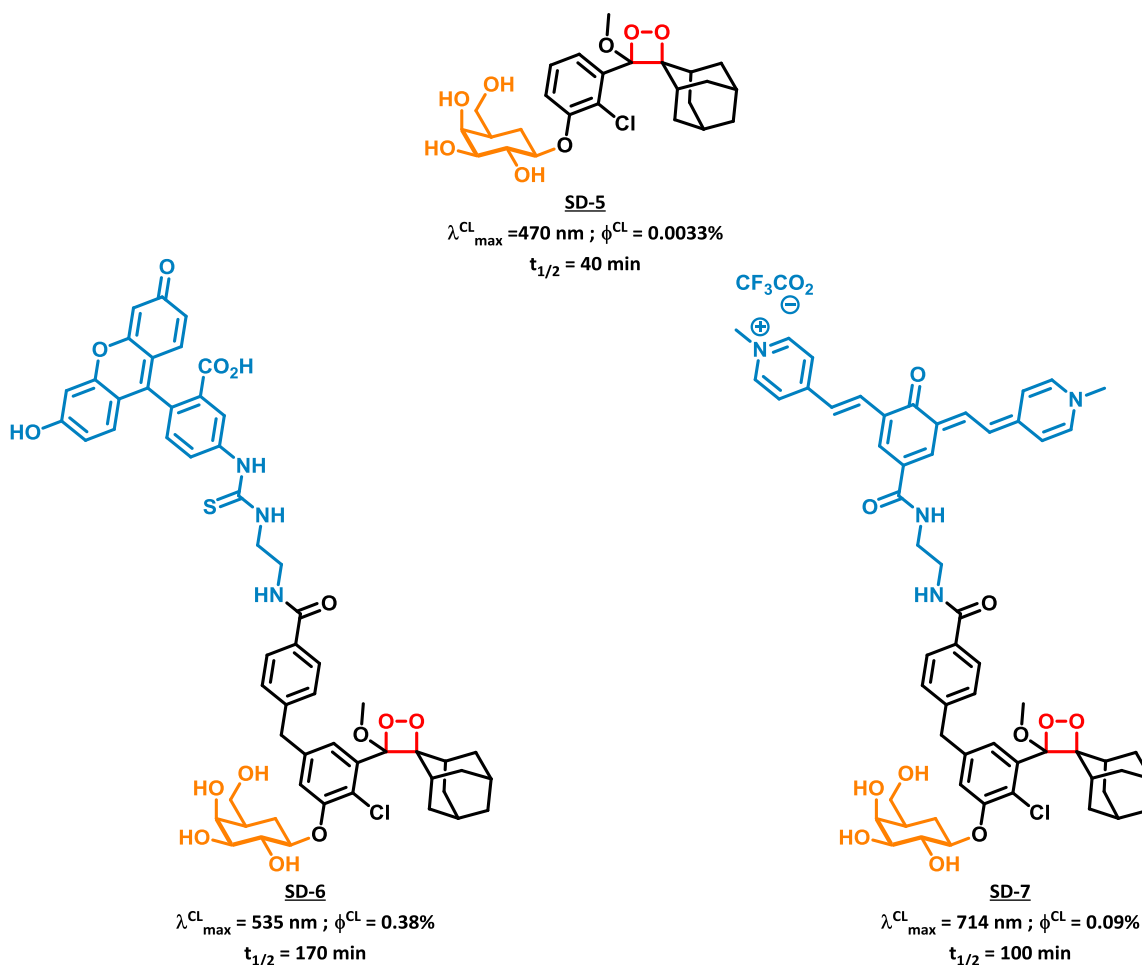


Figure II.15 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes employées par le groupe du Prof. Shabat

Ces sondes ont été activées par déclenchements en présence de β -galactosidase et la chimiluminescence résultante a été observée après injection sous-cutanée ou intrapéritonéale chez la souris et par imagerie de luminescence. Comme attendu, la sonde **SD-7**, malgré un rendement quantique quatre fois moins élevé, présente une forte intensité de chimiluminescence par rapport à **SD-6** (Figure II.16), ce qui dénote clairement l'avantage de la chimiluminescence proche IR pour de l'imagerie *in vivo*.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

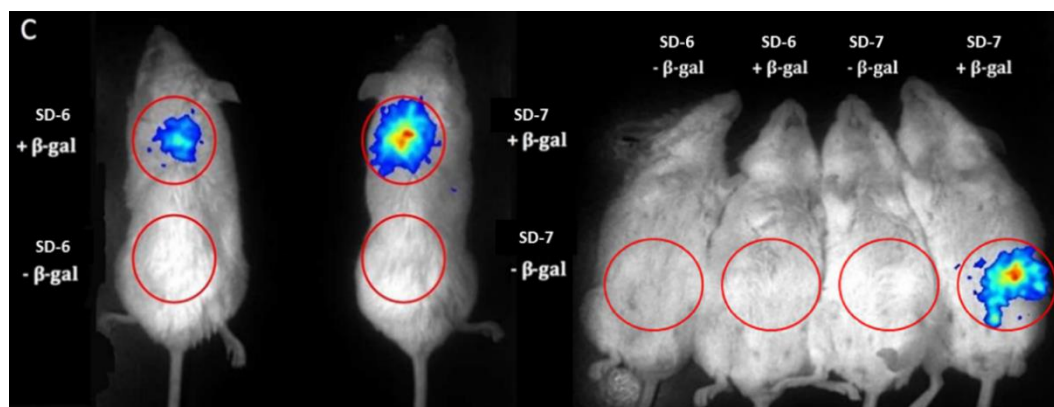


Figure II.16 : Imageries de souris obtenues 15 min. après injections sous-cutanée (à gauche) et intrapéritonéale (à droite) des sondes **SD-6** et **SD-7** [50 μ L, 1 μ M dans PBS (100 mM), pH 7.4, après 30 min. de pré-incubation avec ou sans 1.5 unités/mL de β -galactosidase]⁸⁶

Des images de cellules basées sur l'activité endogène de la β -galactosidase ont également été obtenues et encouragent fortement le développement de nouvelles sondes chimiluminescentes pour une application *in vivo*. Notons que l'approche synthétique proposée par le Prof. Shabat est d'autant plus confortée par l'observation, dans cette étude, d'une décomposition rapide (*i.e.* formation instantanée du produit d'ouverture) des sondes **SD-6** et **SD-7** (Figure II.17).

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

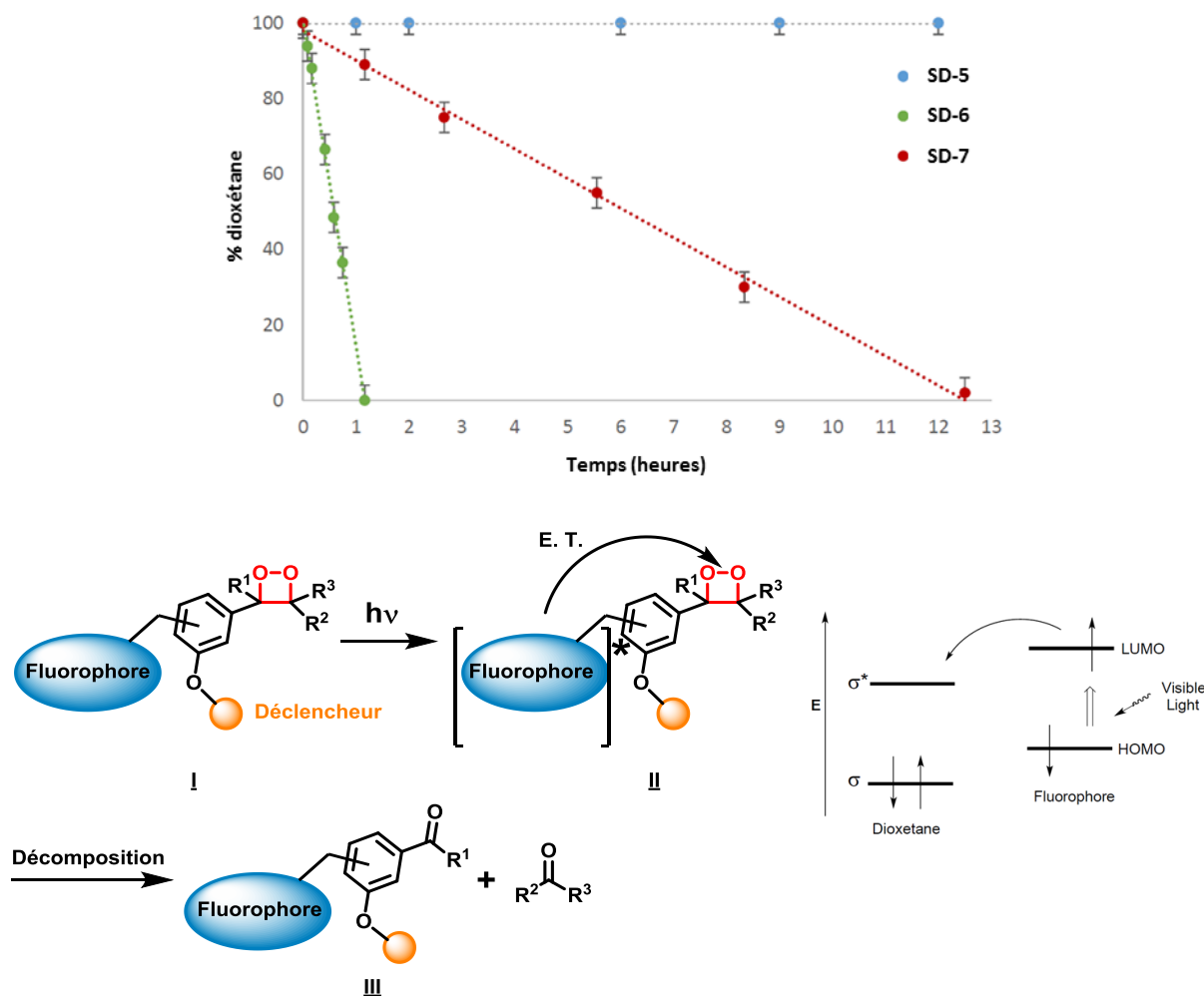


Figure II.17 : Suivi de la photostabilité des sondes **SD-5**, **SD-6** et **SD-7** vis-à-vis d'une exposition à lumière naturelle (en haut) [300 μM , en tampon PBS (100 mM), pH 7.4, température ambiante, suivi réalisé par RP-HPLC]⁸⁶ et représentation schématique de la décomposition d'un dioxétane conjugué à un fluorophore (en bas)

Des mesures de photostabilité des sondes **SD-5**, **SD-6** et **SD-7** ont été réalisées par simple exposition à la lumière naturelle pendant quelques heures. Nous pouvons voir sur le graphe représenté en Figure II.17, que la sonde **SD-5**, dépourvue de fluorophore, n'est pas affectée par la lumière. En revanche, la sonde **SD-6**, comportant une fluorescéine, est, elle, fortement instable et est totalement convertie en son produit d'ouverture en une heure (*i.e.* $t_{1/2}(\text{SD-6}) = 45 \text{ min}$). En ce qui concerne la sonde **SD-7**, porteuse de la **Q-Cy**, son temps de demi-vie, lors d'une exposition à la lumière naturelle, a été estimé à six heures. Ces mêmes expériences ont été réalisées à l'abris d'une source lumineuse et aucune dégradation des sondes n'a été observée. Ce phénomène serait donc causé par un transfert d'électron du fluorophore vers la liaison peroxyde du motif 1,2-dioxétane. Le Prof. Shabat a proposé un mécanisme selon lequel le fluorophore présent sur la plateforme **I** serait excité par la lumière naturelle pour conduire à l'espèce excitée **II**. Un électron de l'orbitale LUMO du fluorophore excité est ensuite transféré vers l'orbitale antiliante σ^* de la liaison peroxyde O-O. Ceci induit la rupture de la liaison O-O puis la décomposition spontanée du motif 1,2-dioxétane en un benzoate **III** et libération de l'adamantanone. Depuis ces résultats préliminaires, une autre méthodologie a été élaborée par le Prof.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Shabate.⁹⁰ Elle propose une stratégie simplifiée selon laquelle un fluorophore additionnel n'est pas nécessaire si le benzoate lui-même (*i.e.* formé après déclenchement de chimiluminescence) est un « bon » fluorophore qui présente une émission plus importante. Il s'agit alors de transformer le phénol en un système donneur-accepteur après addition d'un groupement électroattracteur (*i.e.* accepteur) sur une position conjuguée au phénol donneur. Comme l'indique la Figure II.18, plusieurs composés ont été synthétisés par l'équipe du Prof Shabat en se fondant sur ce principe.

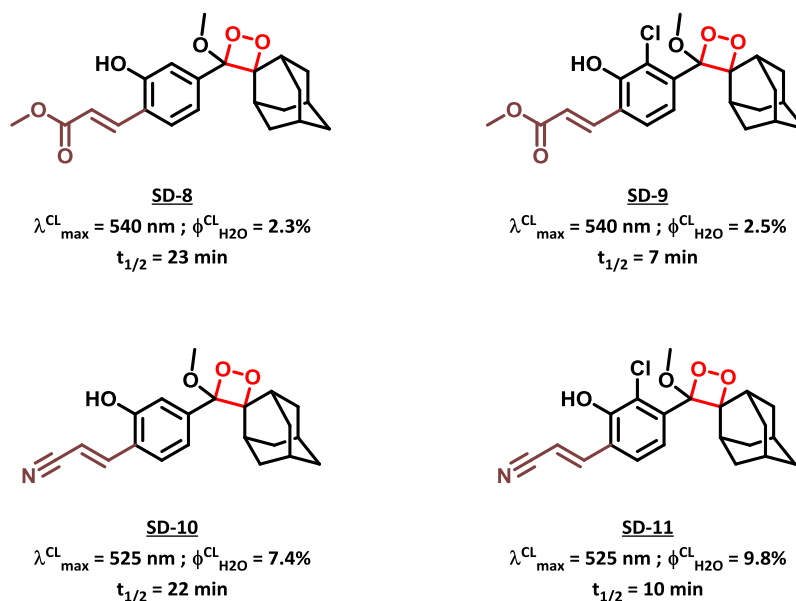


Figure II.18 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes employées par le groupe du Prof. Shabat (mesures effectuées en tampon PBS [100 mM], pH 7.4, 5% DMSO, 37°C, pour des concentrations en sondes de l'ordre de 1 μM)⁹⁰

De même que dans l'étude précédente, un atome de chlore a été ajouté afin d'abaisser le pK_a du phénol. De plus, grâce à leur caractère électroattracteur, les groupements acrylate et acrylonitrile participent aussi à la diminution du pK_a du phénol. Les mesures de déclenchement de chimiluminescence ont été ensuite réalisées dans le tampon PBS. Le pH de ce tampon (*i.e.* 7.4) suffit à lui seul à déprotoner les phénols **SD-8** à **SD-11**. Dans le cas de ces sondes, l'absence de fluorophore additionnel ne permet pas d'observer des émissions de chimiluminescence dans le proche IR mais plutôt dans le vert : $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 540 \text{ nm}$ pour les composés **SD-8** et **SD-10**, $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 525 \text{ nm}$ pour **SD-9** et **SD-11**, mais les rendements quantiques de chimiluminescence en milieu aqueux sont suffisants pour observer un rapport signal/bruit correct. Comme attendu, ces longueurs d'onde d'émission par chimiluminescence concordent avec celles d'émission par fluorescence des benzoates correspondants. De plus, le temps de demi-vie de ces entités se retrouve abaissé (*i.e.* de l'ordre d'une vingtaine de minutes pour les sondes **SD-8** et **SD-10**, et d'une trentaine de minutes pour les sonde **SD-9** et **SD-11**) par rapport au composé modèle **SD-5** (*i.e.* $t_{1/2}(\text{SD-5}) = 40 \text{ min}$). Néanmoins, les rendements quantiques de chimiluminescence sont considérablement augmentés (*i.e.* de l'ordre de 10^3) par rapport au composé **SD-5** (*i.e.* $\phi_{\text{SD-5}}^{\text{CL}} = 0.0033\%$). Par la suite, les phénols des motifs 1,2-dioxétane **SD-8** à **SD-11**

⁹⁰ O. Green, T. Eilon, N. Hananya, S. Gutkin, C. R. Bauer, D. Shabat *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 349.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

ont été fonctionnalisés pour une reconnaissance par la β -galactosidase (Figure II.19). Le motif réactif vis-à-vis de cette enzyme a été introduit sur la plateforme phénolique par le biais d'un bras réactif auto-immolable pour des raisons de gêne stérique. Nous reviendrons sur le concept des bras réactifs auto-immolables dans la partie I.3 de ce chapitre. Ainsi, comme nous le montre le graphe représenté en Figure II.19, les sondes chimiluminescentes **SD-12** à **SD-15**, en présence de la β -galactosidase, présentent chacune un profil cinétique typique de chimiluminescence : une augmentation du signal initial jusqu'à un maximum atteint, pour les concentrations testées, après 30 à 90 minutes, suivi d'une diminution lente de l'émission de luminescence.

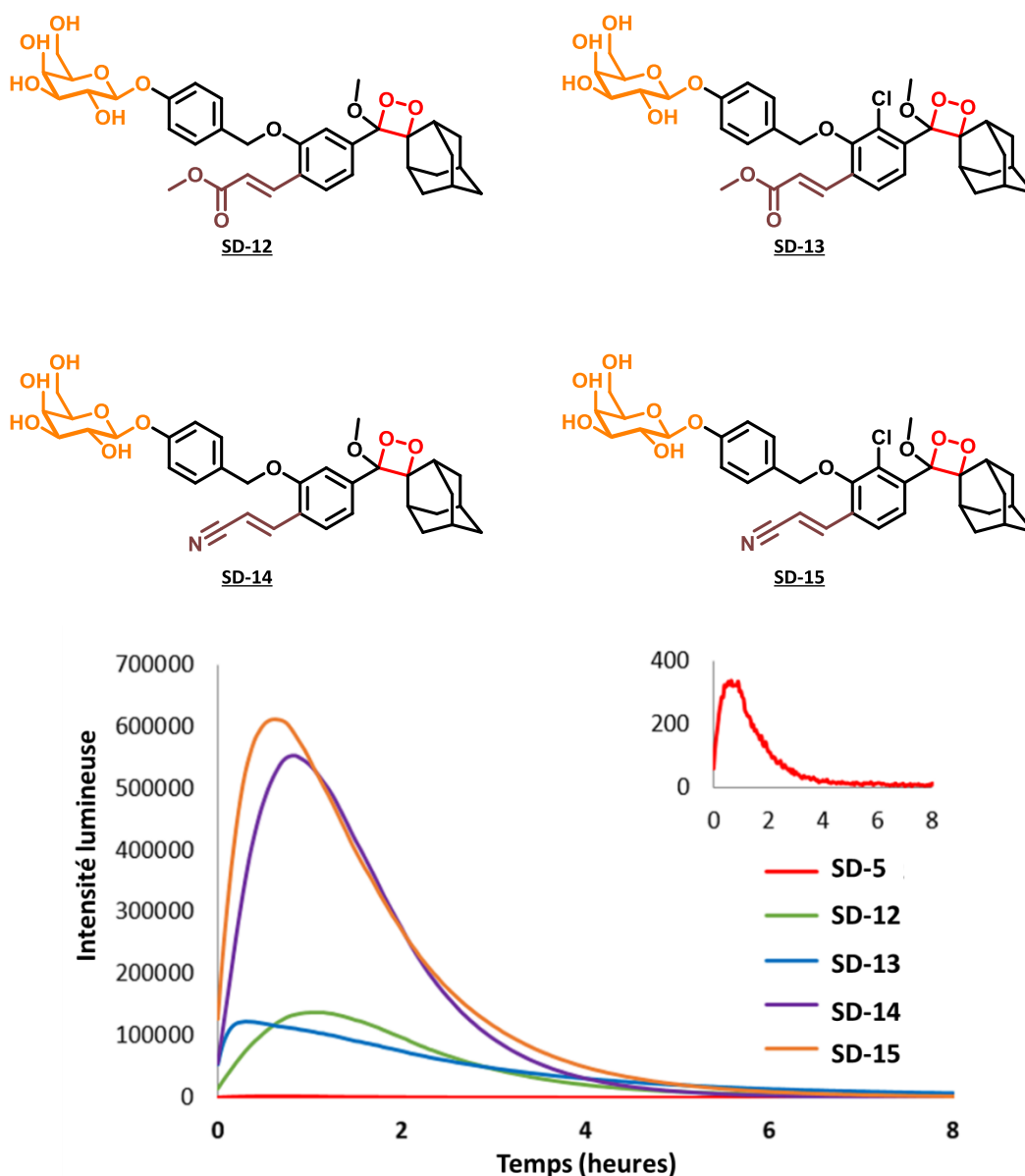


Figure II.19 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes à β -galactosidase du Prof. Shabat (en haut) et profils cinétiques des sondes **SD-5**, **SD-8**, **SD-9**, **SD-10** et **SD-11** (mesures effectuées en tampon PBS [100 mM], pH 7.4, 10% DMSO, en présence de β -galactosidase [1.5 unités/ mL] pour une concentration en sonde de l'ordre de 1 μ M) (en bas)⁹⁰

Ces plateformes ont par la suite permis de détecter d'autres bioanalytes d'intérêt tels que la phosphatase alcaline, le glutathion et les ROS, par émission dans le vert initialement,⁹⁰ mais également

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

dans le proche IR.⁹¹ En effet, par conjugaison du phénol, en position *para*, à un fluorophore dérivé d'une chromone (*i.e.* la dicyanométhylchromone) le Prof. Shabat a développé une sonde chimiluminescente **SD-17** émettant intrinsèquement dans le proche IR (Figure II.20). Ce système est basé sur un phénomène de « push-pull » dans lequel la chromone joue le rôle d'un accepteur et le chimiluminophore est le donneur.

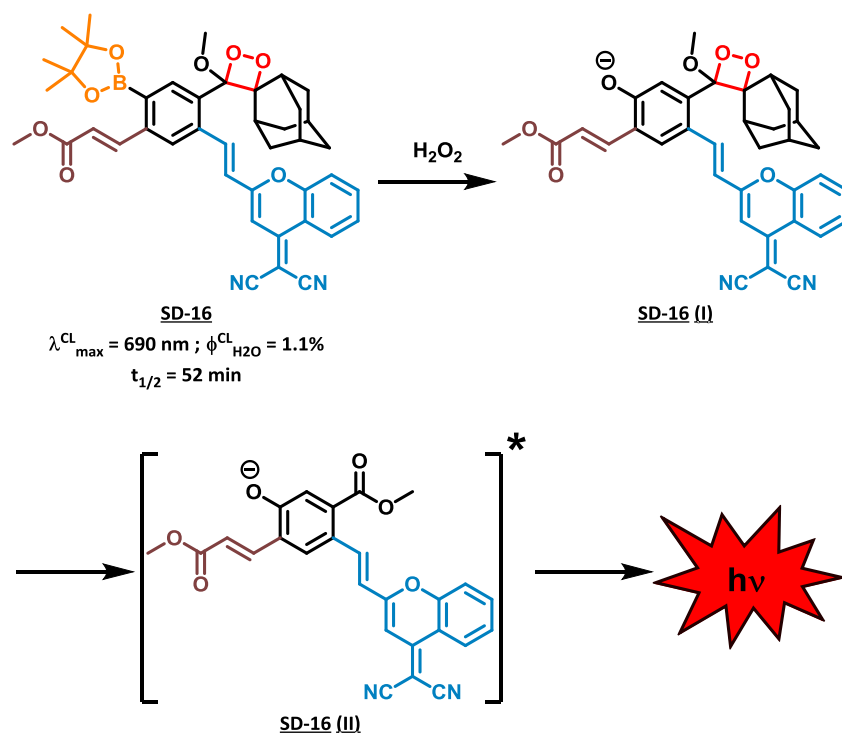


Figure II.20 : Représentation schématique de la sonde SD-16 et de son mécanisme d'activation avec H₂O₂

De même que la série de sondes **SD-12** et **SD-13**, cette plateforme contient un groupement acrylate électroattracteur participant à la diminution du pKa du phénol. L'activation de la sonde se réalise grâce à l'ester boronique qui après réaction avec le peroxyde d'hydrogène, analyte impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires,⁹² conduit à la formation du phénolate **SD-16(I)**. Le benzoate **SD-16(II)** est ensuite obtenu suivant le mécanisme de chimiluminescence CIEEL, et libère la luminescence dans le proche IR ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 690 \text{ nm}$). Le profil cinétique de la sonde **SD-16** indique une forte chimiluminescence en présence de peroxyde d'hydrogène (Figure II.21), et a permis de poursuivre l'étude par un déclenchement *in vivo* en temps réel chez la souris. L'imagerie représentée en Figure II.21 montre qu'une souris transfectée avec le lipopolysaccharide (*i.e.* LPS, un inducteur d'H₂O₂)⁹³ et la sonde **SD-16** (en A) fournit une réponse positive (*i.e.* une forte chimiluminescence dans le proche IR) par rapport à une souris transfectée avec la sonde **SD-16** seule (en C). Un test « contrôle » (en B) a été

⁹¹ a) O. Green, S. Gnaïm, R. Blau, A. Eldar-Boock, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13243.

b) N. Hananya, O. Green, R. Blau, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11793.

⁹² C. Wittmann, P. Chockley, S. K. Singh, L. Pase, G. J. Lieschke, C. Grabher *Advances in Hematology* **2012**, *2012*, 6.

⁹³ D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, N. Murthy *Nature Materials* **2007**, *6*, 765.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

également mené après injection du LPS et de la sonde **SD16-OMe** (*i.e.* porteuse d'un groupement méthoxy en lieu et place de l'ester boronique) et n'a montré aucune émission lumineuse.

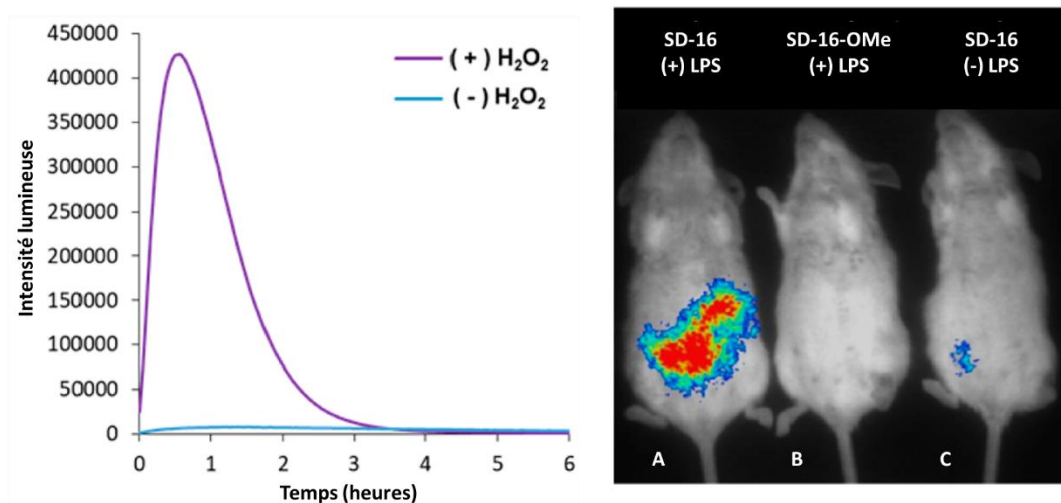


Figure II.21 : Profil cinétique de la sonde **SD-16** (à gauche) [$50 \mu\text{M}$ en tampon PBS, $\text{pH} = 7.4$, 37°C , 5% DMSO, 10% sérum de veau fœtal (FBS), avec et sans H_2O_2 ($250 \mu\text{M}$)] et imageries de souris (à droite) [mesures effectuées après injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS) (1 mL d'une solution à 0.1 mg/mL dans PBS, $\text{pH} = 7.4$) et de la sonde **SD-16** ou de la sonde **SD-16-OMe** ($100 \mu\text{L}$ d'une solution à $100 \mu\text{M}$ dans PBS, $\text{pH} = 7.4$)]^{91a}

Dans un autre exemple récent décrit par le Prof. Shabat, les squelettes de type **SD-9** ont été utilisés pour une détection d'activité enzymatique de type protéase (Figure II.22). Le groupe a synthétisé quatre sondes, chacune équipée du peptide Val-Cit visant une détection de la Cathepsine B, enzyme impliquée dans divers cancers.⁹⁴ Ce dipeptide est, comme pour les analogues **SD-12** à **SD-15**, introduit sur le chimiluminophore par le biais d'un bras réactif auto-immolable de type alcool para-aminobenzyle. Il est également lié à un groupement R_1 qui joue le rôle d'un groupement protecteur (*i.e.* le groupement *N*-carboxybenzaldéhyde pour les sondes **SD-18** et **SD-19**) ou qui intervient dans l'hydrosolubilité de la sonde finale par introduction d'une chaîne polyéthylène glycol (*i.e.* PEG-17 pour la sonde **SD-20**) ou du tétrapeptide Lys-Arg-Lys-Cys qui possède à la fois une propriété de pénétration cellulaire, et un ciblage des tumeurs, *via* un bras succinimide (*i.e.* pour la sonde **SD-21**).

⁹⁴ M. E. Roth-Konforti, C. R. Bauer, D. Shabat *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15633.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

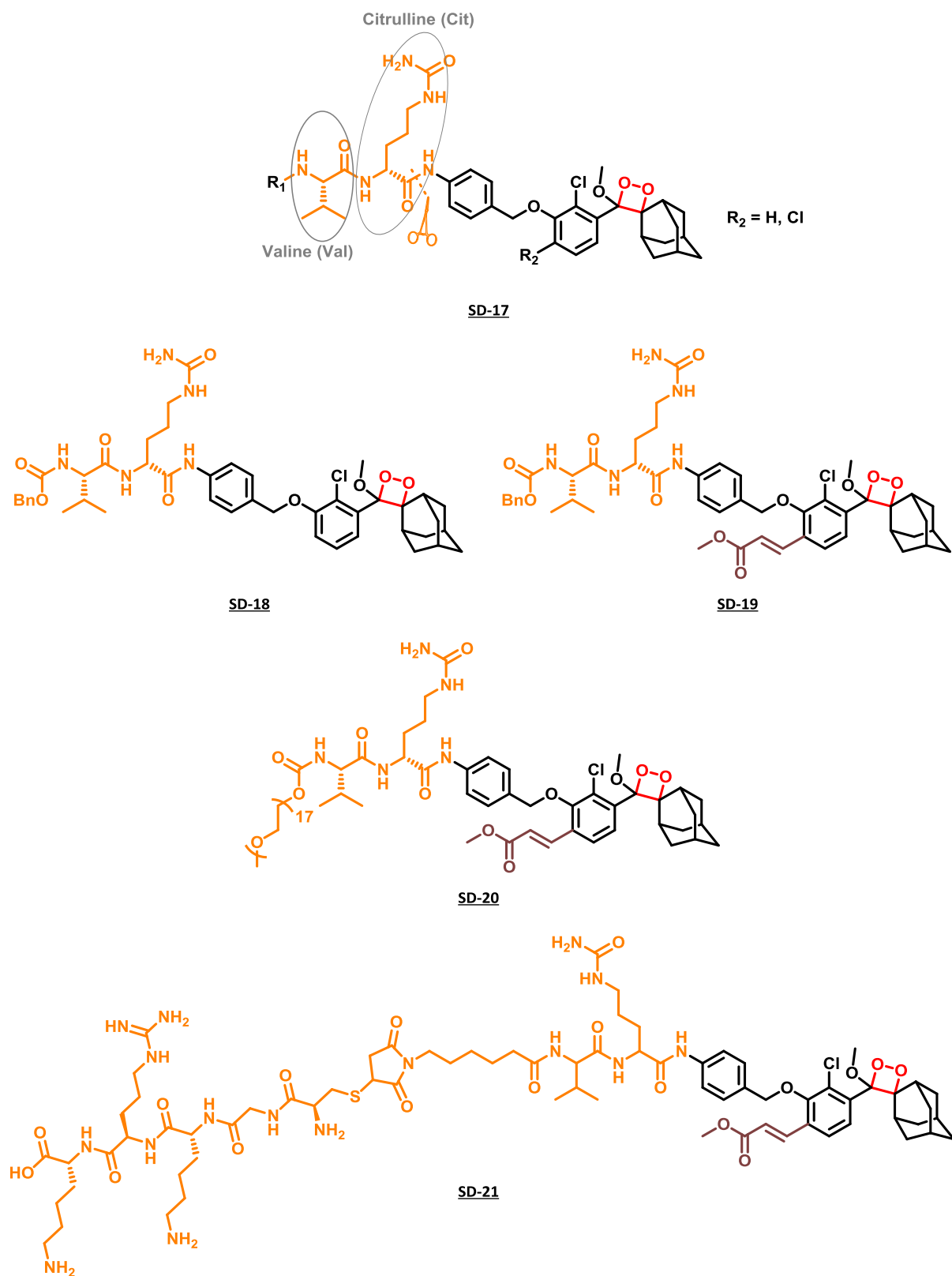


Figure II.22 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes proposées par le Prof. Shabat, visant une détection de la Cathepsine B

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Et, toujours dans l'optique d'abaisser le pK_a du phénol, un atome de chlore a également été ajouté en position *ortho*. L'efficacité de chimiluminescence de ces sondes a été évaluée en présence et en absence de la protéase dans les mêmes conditions que précédemment (Figure II.23). En absence d'enzyme, l'émission lumineuse des sondes est quasiment nulle. En présence de la Cathepsine B, la sonde **SD-18** (*i.e.* analogue de la sonde **SD-5**) présente, comme attendu, une très faible chimiluminescence voire quasi inexistante au cours du temps. En revanche, avec la sonde **SD-19**, le Prof. Shabat démontre à nouveau l'influence positive du groupement acrylate sur l'intensité lumineuse. Concernant la sonde **SD-20** porteuse d'une chaîne PEG, la chimiluminescence est légèrement améliorée par rapport à la sonde **SD-19**, et s'effectue de façon plus persistante dans le temps. Le caractère hydrophile de la chaîne PEG, augmentant l'hydrosolubilité de la sonde, serait responsable de l'augmentation du signal de chimiluminescence. De façon plus remarquable, la sonde **SD-21** possède le plus fort signal d'émission lumineuse (*i.e.* 200 fois supérieur par rapport à la sonde **SD-17** fondée sur le squelette initialement proposé par le Prof. Schaap). Cette amélioration est liée à l'addition du peptide Lys-Arg-Lys-Cys qui, en conditions aqueuse, possède trois résidus chargés positivement et contribue donc à augmenter l'hydrosolubilité. Ce térapeptide permet également d'améliorer la perméabilité membranaire, critère non négligeable pour réaliser des études *in cellulo* ou *in vivo*, et différencier les cellules cancéreuses des cellules saines.⁹⁵

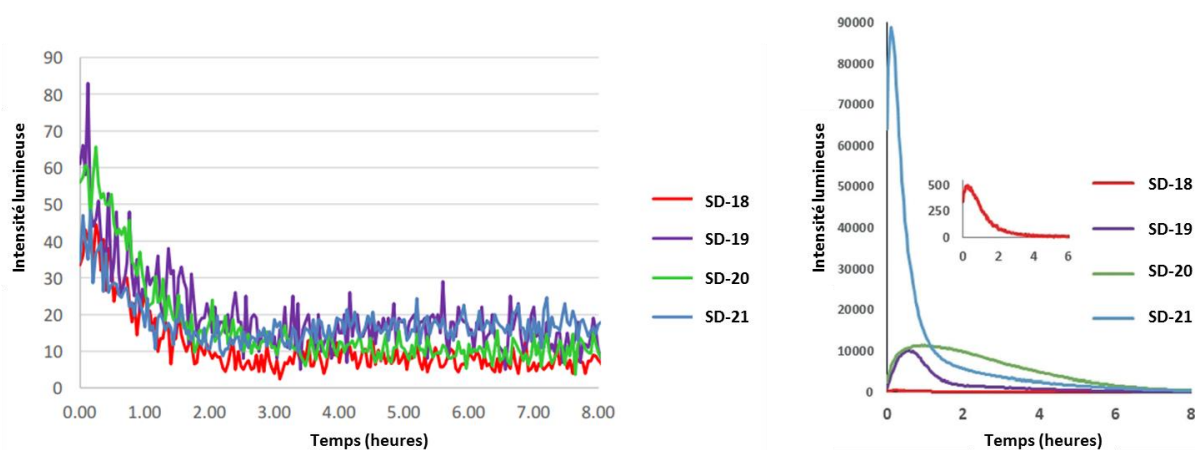


Figure II.23 : Profils cinétiques des sondes SD-17 à SD-20 en absence (à gauche) et en présence (à droite) de la Cathepsine B [mesures effectuées en « tampon d'activité de la Cathepsine B » (0.1 M tampon phosphate, 55 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Gluthathion), pH = 7.4, 10% DMSO, température ambiante, 2.5 unités/mL Cathepsine B, pour une concentration en sonde de l'ordre de 1 μ M]⁹⁴

Des études *in cellulo* ont été menées en employant les sondes **SD-20** et **SD-21** sur des cellules saines (*i.e.* 3T3) et cancéreuses (*i.e.* RAW 264.7 et CT26) (Figure II.24). Les résultats observés ont confirmé le fort pouvoir chimiluminescent en milieu aqueux de la sonde **SD-21** et ont démontré l'aptitude de cette sonde à différencier les cellules saines des cellules cancéreuses. Les tests sont négatifs pour la sonde **SD-20** en raison d'une hydrosolubilité insuffisante qui traduirait une faible perméabilité vis-à-vis de la membrane cellulaire.

⁹⁵ U. Langel *Handbook of Cell-Penetrating Peptides, Second Edition*, CRC Press, 2006.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

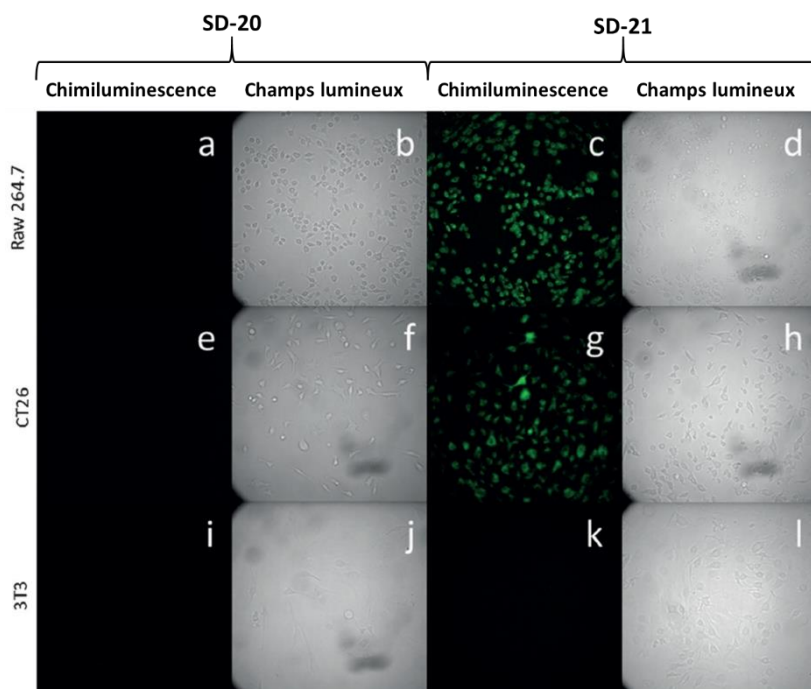


Figure II.24 : Imageries de cellules cancéreuses (*i.e.* RAW 264.7 et CT26) et de cellules saines (*i.e.* 3T3) après incubation avec les sondes **SD-20** et **SD-21** [images obtenues 20 minutes après incubation d'une culture cellulaire avec les sondes **SD-20** ou **SD-21** (5 μ M), via chimiluminescence pour a, e, i, c, g, k, et via un champ lumineux pour b, f, j, d, h, l]⁹⁴

Ainsi, grâce à cette nouvelle méthodologie, des molécules chimiluminescentes innovantes ont été développées et ont montré une efficacité de chimiluminescente améliorée, dans des conditions physiologiques, par rapport aux premiers essais du Prof. Shaap. Ceci ouvre sans aucun doute la voie vers la conception de nouveaux squelettes de petite taille fonctionnant comme sondes chimiluminescentes.

Il est important de noter que la stratégie proposée depuis 2016 par l'équipe du Prof. Shabat, concernant l'introduction d'un atome de chlore pour diminuer la pK_a du phénol et l'utilisation d'un fluorophore comme plateforme chimiluminescente (*e.g.* utilisation d'une coumarine, *vide infra*) avait déjà été envisagée par notre laboratoire et a été l'objet d'une ANR blanche en 2013. Les résultats obtenus par le Prof. Shabat ne font que confirmer la validité des hypothèses émises par notre laboratoire. Nous avons, cependant, souhaité concentrer nos efforts sur le motif dihydrofurane pour une stabilisation de l'entité 1,2-dioxétane. De plus, nous avons élaboré une stratégie novatrice selon laquelle l'entité fluorescente jouerait à la fois le rôle d'accepteur d'énergie et de groupement favorisant un abaissement du pK_a du phénol. Notre choix s'est porté sur un complexe de lanthanide, de type DOTA. Cette stratégie sera présentée dans la partie II de ce chapitre.

2. Utilisation des lanthanides pour la chimiluminescence

Dans le premier chapitre (cf partie Chapitre I.1.2), nous avons évoqué les lanthanides et leurs complexes comme des entités pouvant être utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'IRM ou en radiothérapie. Leurs propriétés physico-chimiques leur permettent d'être exploités sous un autre angle. En effet, les cations lanthanides Ln(III), dont la configuration électronique est de type $[Xe]4f^n$ (avec $n = 0$ à 14), à l'exception du La(III) et Lu(III), possèdent une couche f incomplète rendant le nombre de combinaisons électroniques important.⁹⁶ Les lanthanides sont alors caractérisés par un très grand nombre de niveaux d'énergie et peuvent subir trois types de transitions électroniques (*i.e.* entre les différents niveaux d'énergie) : une transition intraconfigurationnelle de type 4f-4f, la promotion d'un électron de la couche 4f vers la couche 5d, et les transitions de transfert de charge (*i.e.* du métal vers le ligand (MLCT) ou l'inverse (LMCT)).⁹⁷ Ces transitions électroniques confèrent des propriétés singulières de luminescence. Néanmoins, les deux dernières se réalisent à des énergies beaucoup trop élevées pour des applications *in vivo*⁹⁸ donc seules celles de type 4f-4f sont à mettre à profit dans l'imagerie cellulaire et la biomédicale, surtout lorsque le lanthanide est sous forme complexé (Figure II.25).⁹⁹

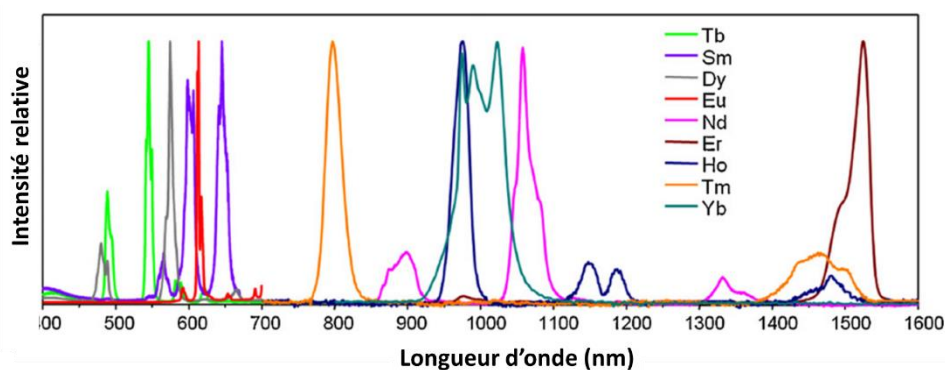


Figure II.25 : Spectre d'émission normalisé des différents complexes de lanthanide Ln(III) luminescents en solution¹⁰⁰

Les orbitales 4f ont un caractère covalent faible induisant une perturbation minimale de l'architecture moléculaire à la suite d'une absorption lumineuse. De ce fait, le nombre de sous-niveaux électroniques des ions lanthanides est bien moins important que celui des chromophores organiques, et le réarrangement électronique de la transition f-f qui s'en suit libère une énergie lumineuse semblable à l'énergie d'absorption. Effectivement, la dissipation énergétique par vibration et rotation des liaisons, généralement observée dans le cas des chromophores organiques, n'a pas lieu dans le cas des ions lanthanides. Ceci se traduit par la formation de bandes d'absorption fines et par un déplacement de Stokes négligeable (Figure II.26). De plus, il est très peu probable qu'un électron de valence soit promu

⁹⁶ C. Huang, Z. Bian in *Rare Earth Coordination Chemistry*, **2010**, pp. 1-39.

⁹⁷ J.-C. G. Bünzli, S. V. Eliseeva in *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects* (Eds.: P. Hänninen, H. Härmä), **2011**, pp. 1-45.

⁹⁸ J.-C. G. Bünzli *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729.

⁹⁹ E. Soini, T. Lövgren, C. B. Reimer *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1987**, *18*, 105.

¹⁰⁰ H. Uh, S. Petoud *Comptes Rendus Chimie* **2010**, *13*, 668.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

dans une orbitale appartenant à la même sous-couche, c'est pourquoi le coefficient d'absorption molaire des transitions 4f-4f est de l'ordre de l'unité (avec un maximum d'environ $12 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour le Nd^{3+}) alors que les chromophores organiques possèdent communément des coefficients de l'ordre de 10^4 à $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'excitation directe des ions lanthanides s'avère donc inefficace. Par ailleurs, la désexcitation radiative de ces transitions électroniques s'avère extrêmement longue (*i.e.* jusqu'à 10 ms pour certains lanthanides).⁹⁷ Cette caractéristique permet de réaliser des mesures de luminescence *in vitro* et *in vivo* en temps résolu (*i.e.* l'acquisition ne débute qu'après un certain délai) et donc de s'affranchir du bruit de fond lié à l'auto-fluorescence des milieux biologique dont le temps de désexcitation radiative n'excède généralement pas quelques dizaines de ns. C'est la raison principale de l'utilisation des complexes de lanthanides pour des application en bio-imagerie.

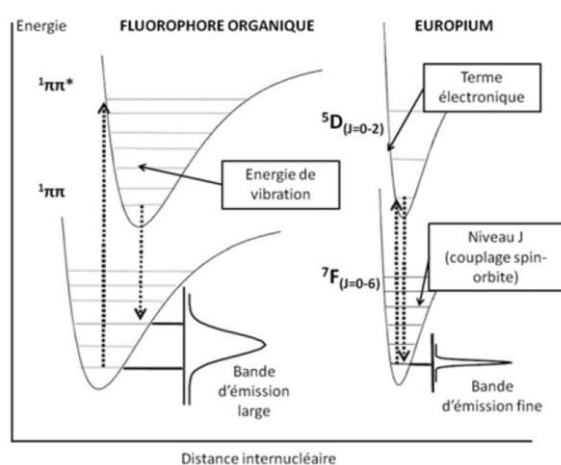


Figure II.26 : Représentation schématique des diagrammes d'énergie potentielle de l'émission radiative d'un fluorophore organique et de l'europlum.¹⁰¹

En raison du faible coefficient d'absorption des ions lanthanides, il est plus commun de faire appel à des ligands dits « sensibilisateurs » également appelés « antennes ».¹⁰² Ces ligands sont des chromophores, souvent composés d'atomes intervenant dans la complexation du lanthanide, qui permettent d'exalter la longueur d'onde d'excitation de l'ion métallique par absorption de l'énergie lumineuse suivie d'un transfert d'énergie vers le lanthanide. Le coefficient d'absorption molaire ne dépend alors plus du cation métallique mais du chromophore. Néanmoins, l'intensité d'émission du complexe sera gouvernée par l'efficacité de transfert d'énergie entre l'antenne et le métal. Dans le but d'une meilleure compréhension de ce processus, celui-ci est illustré dans la Figure II.27 qui reprend le diagramme de Jablonski vu dans le Chapitre I.III.1. Ainsi, suite à l'absorption de lumière, le fluorophore atteint un état singulet excité S1, puis un état triplet excité T1 par croisement intersystème. Dans le cas de chromophores classiques, cette étape d'inversion de spin de l'électron promu n'est pas favorable mais la proximité d'un atome lourd paramagnétique rend cette conversion compétitive.¹⁰³

¹⁰¹ J.-C. G. Bünzli and S. V. Eliseeva, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Härnä (eds.), Springer-Verlag : Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 1-45.

¹⁰² S. I. Weissman *The Journal of Chemical Physics* **1942**, 10, 214.

¹⁰³ S. Tobita, M. Arakawa, I. Tanaka *The Journal of Physical Chemistry* **1985**, 89, 5649.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Le centre métallique reçoit ensuite l'énergie via ce niveau T1. Ce transfert est efficace si la différence d'énergie entre les niveaux S1 et T1 du ligand est d'au moins $5\,000\text{ cm}^{-1}$ et si l'état T1 du ligand est plus énergétique d'au moins $2\,500$ à $3\,000\text{ cm}^{-1}$ par rapport aux niveaux d'émission de l'ion lanthanide (*i.e.* valeurs valables pour Eu(III) et Tb(III) mais le principe reste le même pour l'ensemble des lanthanides).¹⁰⁴ Cependant, la luminescence donnant suite à ce transfert peut être inhibée par une désactivation non-radiative.

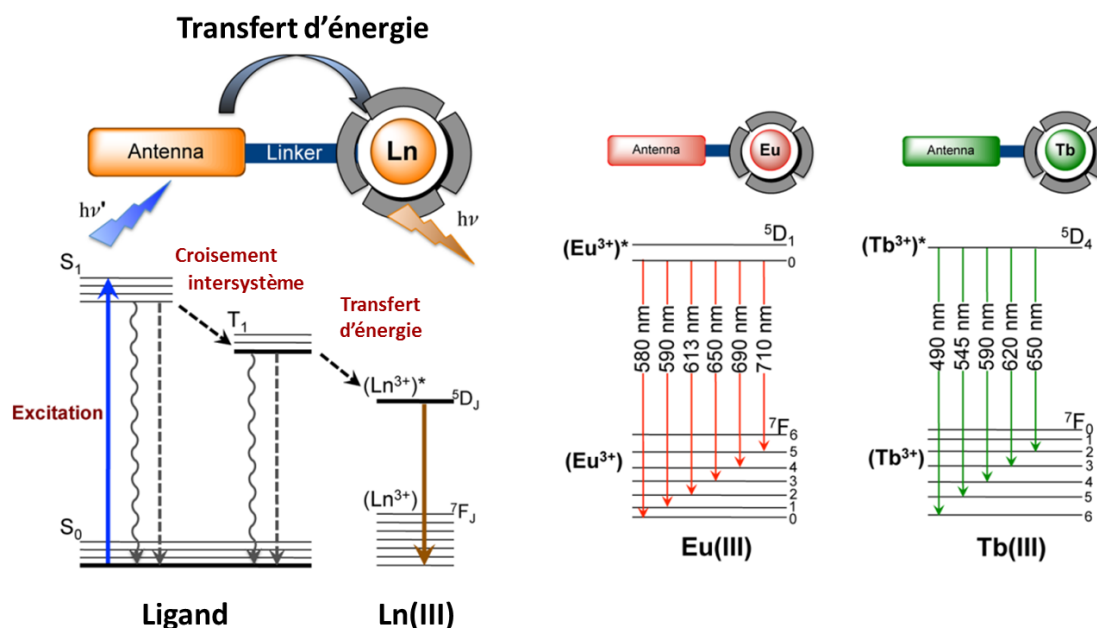


Figure II.27 : Représentation schématique du transfert d'énergie d'un fluorophore vers un ion lanthanide (le Eu^{3+} ici)¹⁰⁵

En effet, par interaction dipolaire avec des liaisons appartenant au ligand et/ou à des molécules coordonnées ou situées proches dans l'environnement, l'énergie peut rapidement se dissiper par vibration.¹⁰⁶ L'intensité de cette désactivation non-radiative est dépendante de la température, de la distance entre le lanthanide et l'oscillateur (*i.e.* la nature de la liaison) et du nombre de quanta (*i.e.* phonons, qui sont l'équivalent des photons en mécanique quantique) nécessaires pour combler la différence d'énergie entre le niveau d'émission et le niveau le plus proche d'énergie inférieure. Plus ce nombre de quanta est faible et plus cette désactivation est efficace. C'est pourquoi les oscillateurs vibrationnels de haute énergie sont les plus aptes à inhiber la luminescence et à diminuer le temps d'émission. Par ordre croissant on trouve les liaisons suivantes : C-F ($\nu = 1\,200\text{ cm}^{-1}$) < C-C, C-O ($\nu \approx 1\,600\text{ cm}^{-1}$) < O-D, C-D, CN ($\nu \approx 2\,200\text{ cm}^{-1}$) < C-H ($\nu = 3\,000\text{ cm}^{-1}$) < N-H ($\nu = 3\,300\text{ cm}^{-1}$) < O-H ($\nu = 3\,600\text{ cm}^{-1}$). L'eau est par conséquent un très bon vecteur d'extinction de luminescence des lanthanides (Figure II.28). Pour les applications en conditions aqueuses ou *in vivo*, il est donc nécessaire de concevoir une architecture moléculaire protégeant au mieux le cation métallique des molécules d'eau

¹⁰⁴ F. J. Steemers, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, E. B. van der Tol, J. W. Verhoeven *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9408.

¹⁰⁵ M. C. Heffern, L. M. Matosziuk, T. J. Meade *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496.

¹⁰⁶ A. de Bettencourt-Dias *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 1460.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

environnantes. Ainsi, ce principe a permis le développement de diverses sondes luminescentes composées de complexes de lanthanides, et plus particulièrement de complexes de Eu(III) et de Tb(III), possédant des antennes de type aromatiques azotés.

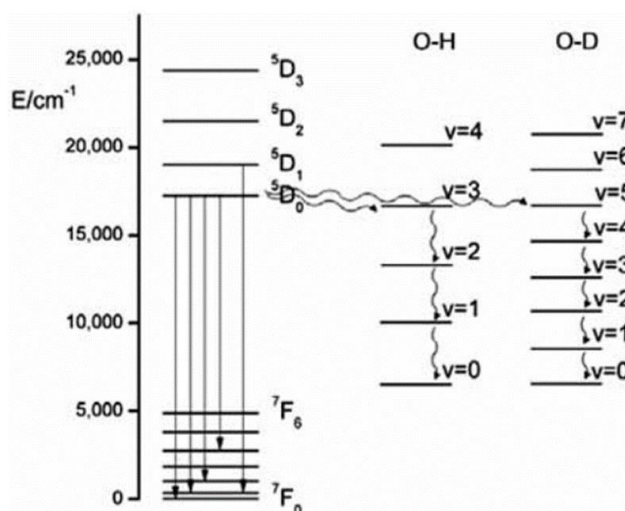


Figure II.28 : Représentation schématique de la désactivation vibrationnelle de luminescence au-travers de liaisons O-H et O-D coordonnées à l'Eu(III)¹⁰⁶

Il est possible de classer ces ligands par la nature de leur architecture complexante : les polyaminocarboxylates, les macrocycles, les phosphonates, les β -dicétones ou les cryptands. L'addition de tels ligands de complexation a permis le développement de sondes visant une activité enzymatique ou un analyte d'intérêt.¹⁰⁷ Notre laboratoire a notamment élaboré des sondes luminescentes lanthanidiques, dont la sonde **PS-1**¹⁰⁸ schématisée en Figure II.30, fondées sur le principe de FRET, pour une détection de la Caspase-3, enzyme impliquée dans divers cancers.¹⁰⁹ Les sondes sont composées d'un complexe de Eu(III) à motif polyaminocarboxylates (*i.e.* terpyridine) jouant le rôle de donneur d'énergie, d'un motif spécifique de la caspase-3 (*i.e.* Asp-Glu-Val-Asp (ou DEVD)) et d'un fluorophore relais (*i.e.* accepteur), la cyanine Cy5.0. Comme l'indique la Figure II.29, la distance entre les deux partenaires est suffisamment courte pour que l'émission du complexe de lanthanide soit quenchée par le fluorophore accepteur et uniquement l'émission du fluorophore est observée. Après activation enzymatique, la distance séparant le donneur de l'accepteur augmente et lève le FRET. Ceci se traduit par l'extinction progressive de la luminescence de l'accepteur en parallèle avec une augmentation de l'émission du chélate de lanthanide.

¹⁰⁷ a) B. K. McMahon, T. Gunnlaugsson *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5406. b) Y. Wang, H. Wang, M. Yang, J. Yuan, J. Wu *Opt. Mater.* **2018**, *75*, 243.

¹⁰⁸ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre II.1.2 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **PS** pour Poupart Séverine.

¹⁰⁹ a) S. Poupart, C. Boudou, P. Peixoto, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4165. Pour d'autres exemples de ligands synthétisés par notre laboratoire, voir : b) N. Maindron, S. Poupart, M. Hamon, J.-B. Langlois, N. Ple, L. Jean, A. Romieu, P.-Y. Renard *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2357. c) G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P.-Y. Renard, A. Romieu *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

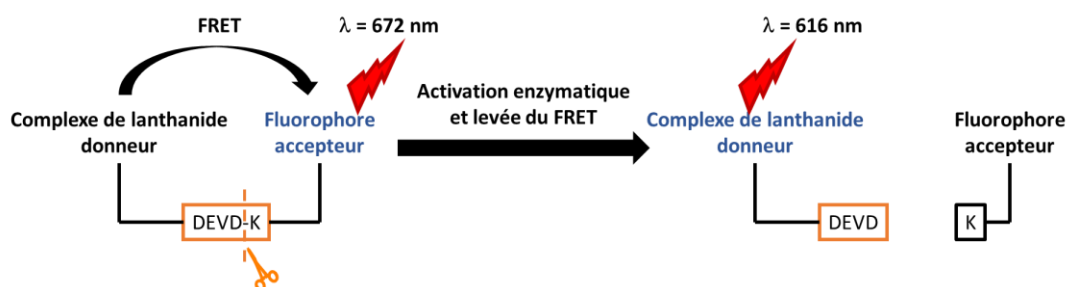


Figure II.29 : Représentation schématique du principe de Fret appliquées à la sondes PS-1

Les mesures de fluorescence, représentées en Figure II.30, ont été réalisées dans un tampon spécifique à la caspase-3, après excitation de la sonde à la longueur d'onde d'excitation du chélate de Eu(III) (*i.e.* $\lambda_{exc} = 298 \text{ nm}$). Seule une émission à 672 nm, correspondant à la longueur d'onde d'émission de la Cy5.0, a été observée, confirmant le transfert d'énergie non-radiatif du donneur vers l'accepteur selon un principe de type FRET.

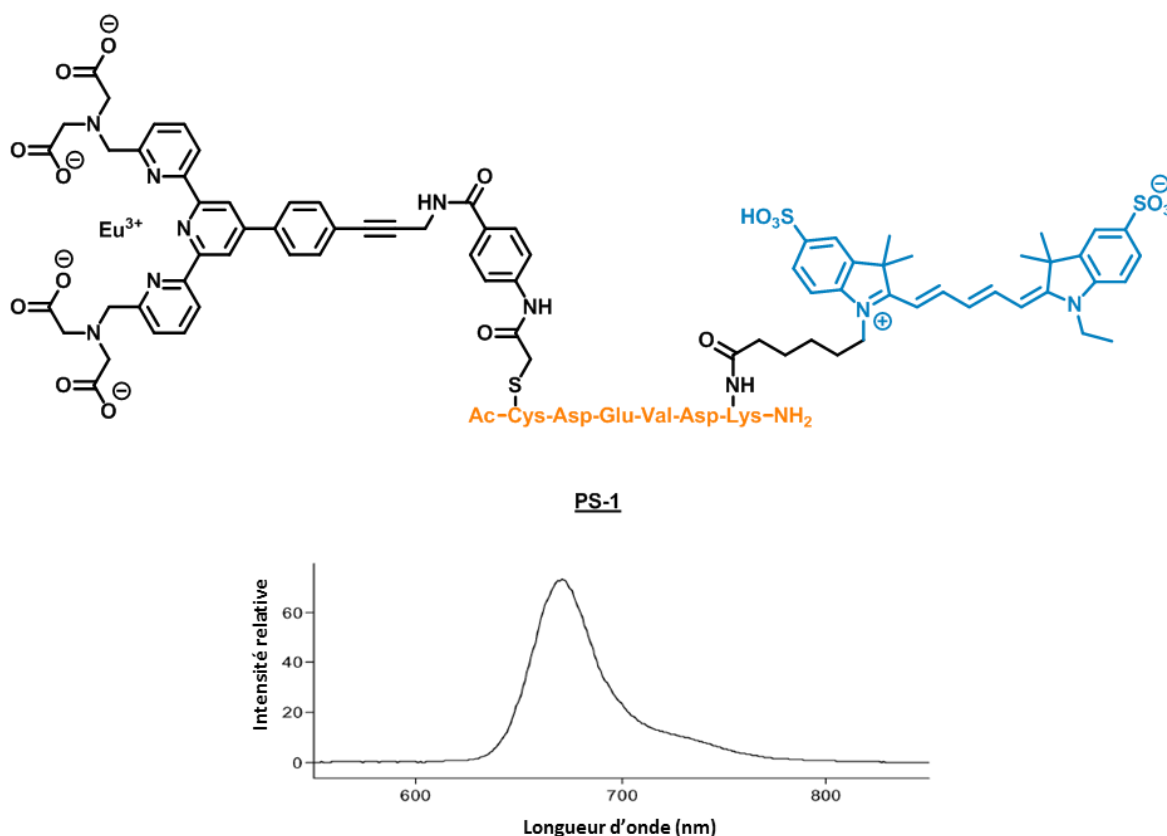


Figure II.30 : Représentation schématique (en haut) et spectre d'émission de fluorescence (en bas) de la sonde PS-1 [mesures éalisées pour 1 μM de sonde PS-1 dans un tampon spécifique de la caspase-3, à 37 °C, après excitation à 298 nm]^{109a}

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

L'utilisation de complexes de lanthanides a également été associée à la chimiluminescence, et les reste de cette partie bibliographique, se limitera aux exemples associant lanthanides et phénomènes de chimiluminescence. Plusieurs exemples de la littérature reportent l'utilisation de ligand de type β -dicétone comme déclencheur de chimiluminescence. L'échantillon à tester contient alors un chimiluminophore et un complexe $[\text{Ln}(\text{L})_3]^{3+}$ et l'émission observée correspond à celle de l'ion lanthanide à la suite d'un transfert d'énergie du chimiluminophore vers le lanthanide. Comme l'indique la Figure II.31, des tests ont été réalisés en présence de chimiluminophores tels que le motif adamantylidenadamantane 1,2-dioxétane (AAD), dont la décomposition a lieu par thermolyse.¹¹⁰

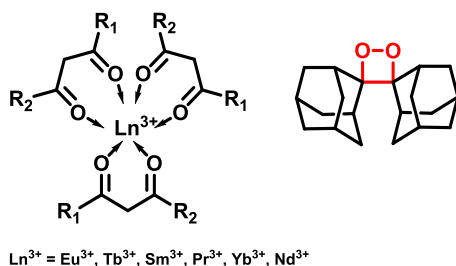


Figure II.31 : Représentation schématique des structures d'un complexe de lanthanide à base de β -dicétones et d'un motif 1,2-dioxétane de type bisadamantyle¹¹¹

Le mécanisme du transfert d'énergie n'est pas établi de façon claire, plusieurs hypothèses ont été proposées :¹¹¹

- Un transfert de type intermoléculaire de l'état triplet excité T1 du 1,2-dioxétane vers l'état triplet excité T1 du ligand, suivi d'un transfert vers le niveau ⁵D du lanthanide
- Un transfert de type « intracomplexe » (*i.e.* le complexe considéré est $[\text{AAD.Ln}(\text{L})_3]$) de l'état singulet excité S1 du 1,2-dioxétane vers l'état singulet excité S1 du ligand, suivi d'un croisement intersystème vers l'état triplet excité T1 de ce même ligand puis un transfert vers le niveau ⁵D du lanthanide.

Dans un autre exemple, l'endoperoxyde de 1,4-diméthynaphtalène (DMNE) est utilisé comme chimiluminophore (Figure II.32).¹¹² Ici, le transfert se déroule de la façon suivante : après thermolyse du DMNE, l'oxygène singulet généré permet une oxydation des β -dicétones constituant le ligand. L'énergie d'oxydation est transférée vers l'ion lanthanide qui, après retour à l'état fondamental, émet de la luminescence à sa longueur d'onde d'émission.

¹¹⁰ G. B. Schuster, N. J. Turro, H. C. Steinmetzer, A. P. Schaap, G. Faler, W. Adam, J. C. Liu *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7110.

¹¹¹ a) A. I. Voloshin, N. M. Shavaleev, V. P. Kazakov *J. Lumin.* **2000**, *91*, 49. b) A. I. Voloshin, N. M. Shavaleev, V. P. Kazakov *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2000**, *136*, 203.

¹¹² D. V. Kazakov, F. E. Safarov *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1646.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

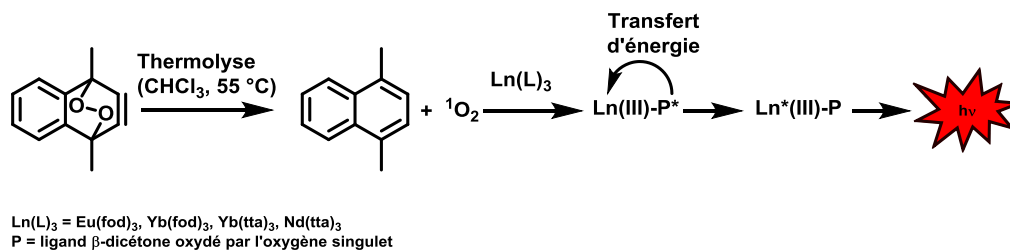


Figure II.32 : Représentation schématique du mécanisme de chimiluminescence proposé par le groupe du Prof. V. Kazakov¹¹²

Parmi les différents chélatants existants, notre attention se porte plus particulièrement sur les motifs macrocycliques de type cyclène qui sont les plus couramment exploités en raison de la forte stabilité de complexation qu'ils apportent par leur structure polydentée anionique. Cette stabilisation est d'autant plus renforcée lorsque les atomes d'azotes sont substitués par des fonctions acides (*e.g.* DOTA) qui, en conditions physiologique, génèrent des bases dures de types carboxylate entrant dans la sphère de coordination du cation lanthanidique. Les atomes d'azotes peuvent également être substitués par d'autres fonctions les reliant à des chromophores tels que la fluorescéine,¹¹³ la rhodamine¹¹⁴, le BODIPY¹¹⁵, ou encore à des complexes organométalliques tels que ceux à base d'iridium.¹¹⁶ Cette facilité à moduler la fonctionnalisation de ce type de ligands les rend d'autant plus attractifs. La chélation avec les cyclènes, en particulier le DOTA et ses dérivés, a notamment montré ses preuves dans l'imagerie IRM par amélioration de la qualité du contraste.¹¹⁷ Nous pouvons citer un exemple d'agent de contraste, décrit par les groupes du Dr. E. Tóth et du Dr. P. Durand, qui est un constitué d'un bras réactif auto-immolable ayant une fonction spécifique à une enzyme.

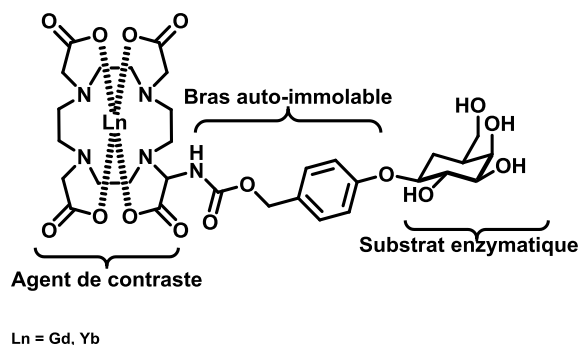


Figure II.33 : Représentation schématique de l'agent de contraste proposé par les groupes de du Dr. Tóth et du Dr. Durand¹¹⁸

¹¹³ K. Aita, T. Temma, Y. Shimizu, Y. Kuge, K.-I. Seki, H. Saji *Synthesis of a New NIR Fluorescent Nd Complex Labeling Agent*, Vol. 20, **2009**.

¹¹⁴ W. Huang, D. Wu, D. Guo, X. Zhu, C. He, Q. Meng, C. Duan *Dalton Trans.* **2009**, 2081.

¹¹⁵ J. H. Ryu, Y. K. Eom, J.-C. G. Bunzli, H. K. Kim *New J. Chem.* **2012**, 36, 723.

¹¹⁶ A. Jana, B. J. Crowston, J. R. Shewring, L. K. McKenzie, H. E. Bryant, S. W. Botchway, A. D. Ward, A. J. Amoroso, E. Baggaley, M. D. Ward *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 5623.

¹¹⁷ a) L. Tei, Z. Baranyai, L. Gaino, A. Forgacs, A. Vagner, M. Botta *Dalton Trans.* **2015**, 44, 5467. b) C. S. Bonnet, É. Tóth in *Adv. Inorg. Chem.*, Vol. 68 (Eds.: R. van Eldik, C. D. Hubbard), **2016**, pp. 43-96. c) A. R. Baek, H.-K. Kim, S. Park, G. H. Lee, H. J. Kang, J.-C. Jung, J.-S. Park, H.-K. Ryeom, T.-J. Kim, Y. Chang *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 4861.

La présence du bras auto-immolable induit un changement de la sphère de coordination du lanthanide ce qui donne une différence de signal RMN soit par effet PARACEST soit par simple diminution du nombre de molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide.¹¹⁸ Nous reviendrons sur le chélate de type DOTA dans la partie II de ce chapitre

3. Les bras réactifs auto-immolables

Les bras réactifs auto-immolables (ou « self immolative linker » en anglais) ont été introduits dans la conception de prodrogues.¹¹⁹ Le transport des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible ainsi que le déclenchement de leur activité, uniquement au niveau de ces cibles (*i.e.* pour une meilleure spécificité et une limitation des effets secondaires), reposent sur la possibilité de masquer l'activité biologique de ces molécules jusqu'à l'action d'un analyte (*i.e.* spécifique de la cible) démasquant cette activité biologique. Une des stratégies classiques consiste à greffer, sur une partie de la molécule responsable de l'activité biologique, un dérivé qui sera spécifiquement clivé au niveau de la cible. Il s'agit typiquement d'un pont disulfure pouvant être clivé de façon intracellulaire par le glutathion, ou d'une fonction ester par des estérases intracellulaires, voire d'une fonction pH-sensible qui ne se clive qu'à une valeur de pH désirée. Ce dérivé peut également servir pour le ciblage ou le transport de la molécule active. Cependant, cette stratégie a longtemps été problématique notamment en raison de ruptures précoces des liaisons reliant le principe actif à son transporteur (*e.g.* liaisons ester). Quelques méthodes, telles que l'incorporation d'un simple espaceur (ou « linker » en anglais) entre ces deux entités, ont été développées mais se sont heurtées au même problème.¹²⁰ Ainsi, une alternative a consisté en l'insertion de groupements ayant la particularité de s'éliminer rapidement et, ce, de manière irréversible après une reconnaissance enzymatique. Le terme bras auto-immolable s'applique ainsi pour une entité lorsque le lien entre celle-ci et le principe actif – de même que pour le lien entre l'entité et le déclencheur – est suffisamment stable quelques soient les conditions chimiques. Seules les réactions chimiques impliquées dans la reconnaissance enzymatique ou la présence d'un analyte spécifique de la cible doivent fragiliser cette liaison (Figure II.34).¹²¹

¹¹⁸ T. Chauvin, S. Torres, R. Rosseto, J. Kotek, B. Badet, P. Durand, E. Toth *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 1408.

¹¹⁹ a) D. Shabat *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1569. b) F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20.

¹²⁰ A. Warnecke in *Drug Delivery in Oncology*, **2011**, pp. 553-589.

¹²¹ S. Papot, I. Tranoy, F. Tillequin, J. Florent, J. Gesson *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* **2002**, *2*, 155.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

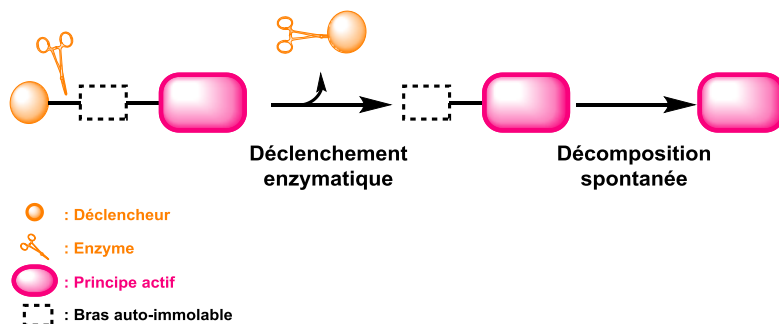


Figure II.34 : Représentation schématique du principe du bras réactif auto-immolable appliqué aux prodrogues et déclenchée par une activité enzymatique

En effet, le déclencheur (fréquemment un substrat réactif vis-à-vis d'une enzyme d'intérêt) engendre, une fois clivé, une réaction en cascade qui permet la libération du principe actif.¹²² La fragmentation de cette liaison chimique peut se réaliser selon deux principaux mécanismes :

- Un mécanisme de type cyclisation selon lequel le groupe nucléophile Y (groupement, de type amino, hydroxyl ou thiol), libéré par activation du déclencheur, attaque la fonction carbonyle du bras espaceur lié au le principe actif, ce qui conduit à la formation d'un cycle à cinq ou six chaînons. Celui-ci génère instantanément la libération du principe actif (Figure II.35).
- Un mécanisme de type élimination (1,4, 1,6 ou 1,8) dont la force motrice peut être la libération de gaz (*i.e.* CO₂) ou d'une entité de type quinone (Figure II.35).¹²³ Celle-ci est fortement électrophile et réagit rapidement avec les molécules d'eau présentes en abondance au sein de l'organisme pour former un adduit cliniquement toléré.¹²⁴

¹²² Pour des revues récentes sur les bras réactifs auto-immolables, voir : a) A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492. b) S. Huvelle, A. Alouane, T. Le Saux, L. Jullien, F. Schmidt *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3435.

¹²³ a) P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479. b) A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien *Chemistry – An Asian Journal* **2014**, *9*, 1334.

¹²⁴ Les dérivés quinones ont potentiellement des propriétés alkylantes et pourraient donc former des adduits avec les bases nucléiques de l'ADN ou encore avec des complexes enzymatiques. Cependant, pour des prodrogues n'utilisant qu'un seul bras réactif auto-immolable suivant un mécanisme de type élimination, cette toxicité est négligeable. Voir les références 120 et 123b pour plus d'informations.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

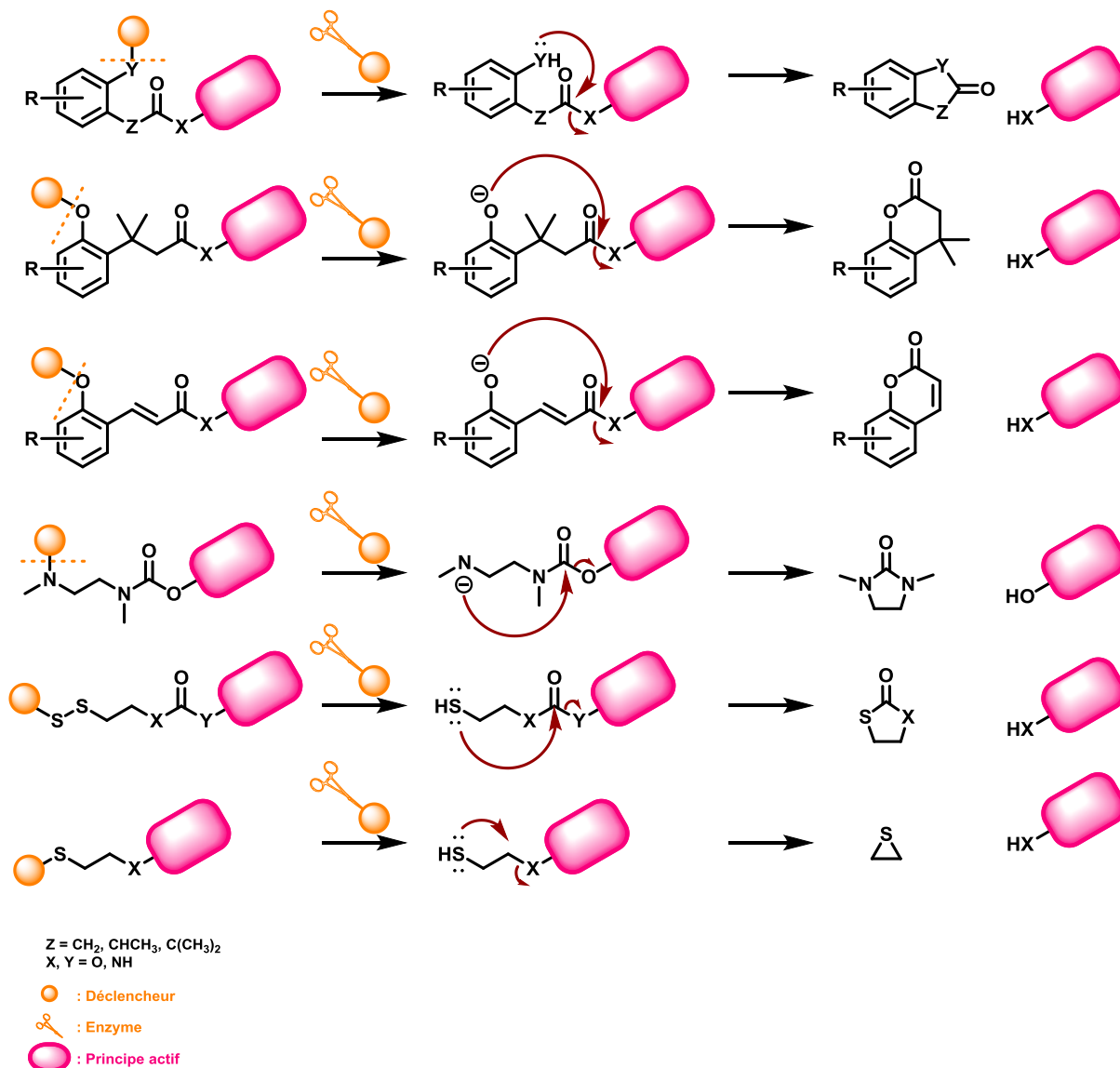


Figure II.35 : Représentation schématique des principaux bras réactifs auto-immolable basés sur un mécanisme de cyclisation

Un des avantages de ce type de groupements, outre la possibilité d'avoir des liaisons plus stables entre le déclencheur et le principe actif, réside dans une diminution non négligeable de l'encombrement stérique souvent présent autour des fonctions impliquées dans le mécanisme de reconnaissance d'un substrat réactif vis-à-vis d'un complexe enzymatique.¹²⁵

¹²⁵ G. M. Dubowchik, R. A. Firestone *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3341.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

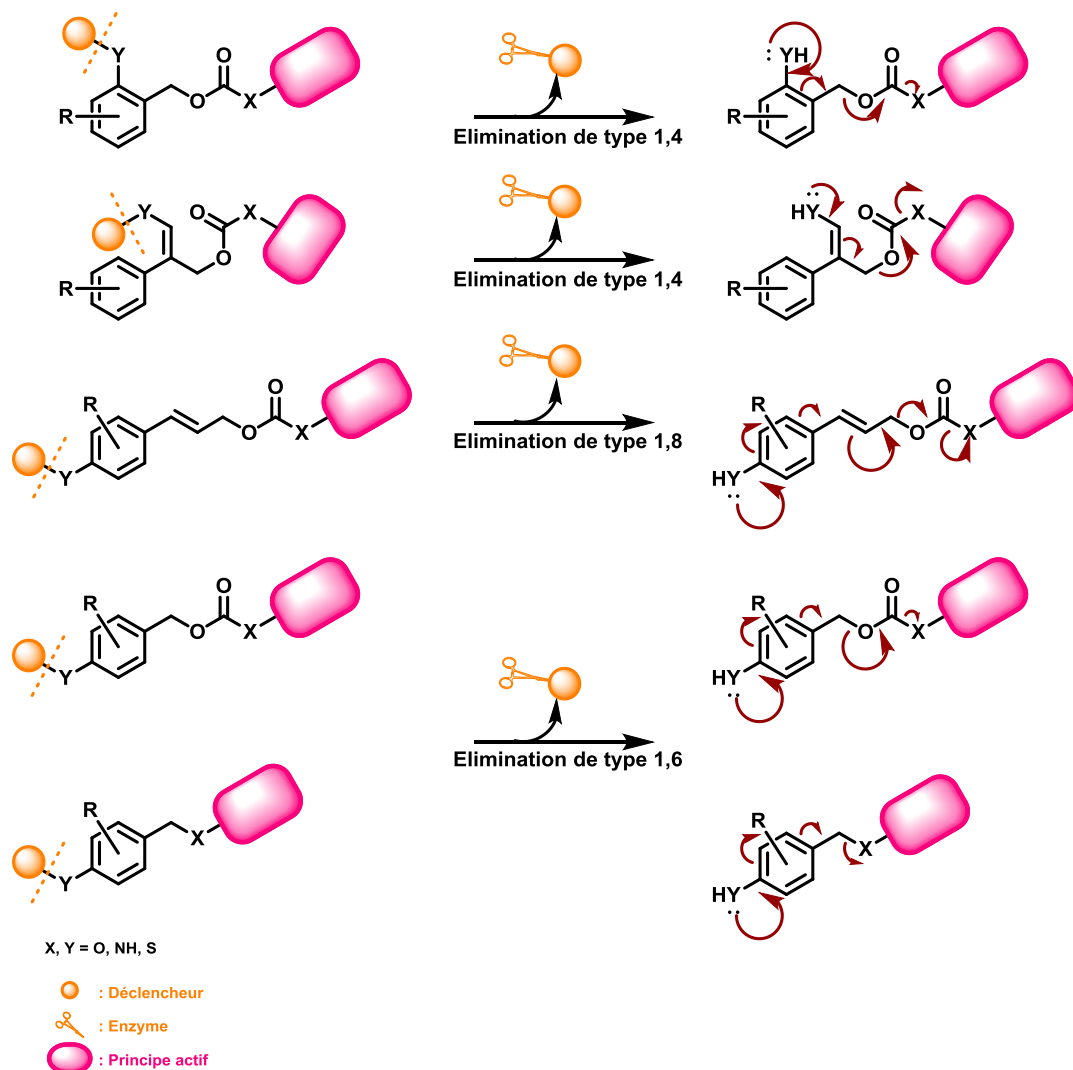


Figure II.36 : Représentation schématique des principaux bras réactifs auto-immolable basés sur un mécanisme d'élimination

Ainsi, de nombreux bras réactifs auto-immolables tels que l'alcool *para*-aminobenzyle (PABA) ou l'oxycarbonyl *para*-aminobenzyle (PABC) ont été développés.¹²⁶ Notre laboratoire a également conçu un modèle fondé sur le greffage d'alcools sur phase solide : l'hémithioaminal qui, après activation enzymatique (*i.e.* par l'amidase de pénicilline G (PGA)), suit un mécanisme de fragmentation suivi d'une cyclisation (Figure II.37).

¹²⁶ Pour une revue sur le développement des bras réactifs auto-immolables voir : C. Gil, S. Bräse *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 230.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

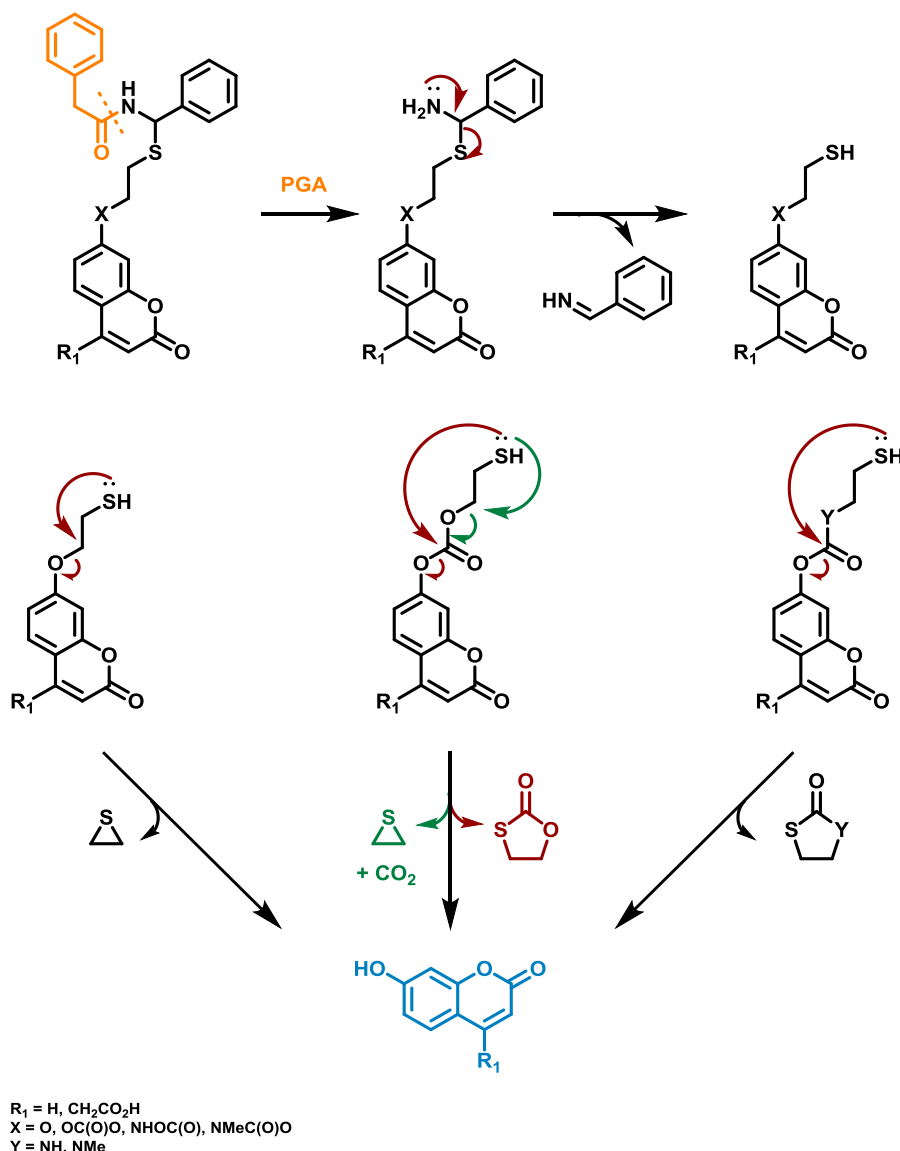


Figure II.37 : Représentation schématique des mécanismes de réarrangement possibles du bras réactif auto-immolable de type hémithioaminal après activation enzymatique de la PGA, appliqué à une sonde pro-fluorescente à motif coumarine

Les bras auto-immolables ont par ailleurs contribué à la conception de prodrogues novatrices utilisés dans diverses thérapies, dont les thérapies anticancéreuses.¹²⁷ Leurs applications se sont par la suite étendues dans plusieurs domaines¹²⁸, notamment dans le développement de pro-fluorophores (le fluorophore est alors utilisé en lieu et place du principe actif).¹²⁹ Nous venons juste d'en voir un

¹²⁷ Pour des revues sur l'utilisation des bras réactifs auto-immolables dans la conception de pro-drogues, voir : a) D. Sriram, P. Yogeewari, R. Thirumurugan, T. Ratan Bal *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 393. b) T. Doura, K. Takahashi, Y. Ogra, N. Suzuki *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 211.

¹²⁸ M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim, D. Shabat *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1309.

¹²⁹ Pour plus d'information sur l'utilisation des bras auto-immolables dans la conception de sondes pro-fluorescentes, voir : a) J.-A. Richard, Y. Meyer, V. Jolivel, M. Massonneau, R. Dumeunier, D. Vaudry, H. Vaudry, P.-Y. Renard, A. Romieu *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1707. b) Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard, A. Romieu *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1777. c) R. Labruère, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9344. d) A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, I. Aujard, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 11717. d) J. Park, Y. Kim

exemple avec le motif hémithioaminal.¹³⁰ Et, dans ce cas, la fluorescence de la sonde résultante est atténuée voire annulée (i.e. via l'effet électroattracteur du carbonate qui annihile l'effet push-pull responsable de la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine) et seule une cascade de réactions, suivant un clivage enzymatique spécifique ou la présence d'un analyte réactif, permet de restaurer le marqueur fluorescent original. Ce système a justement été employé lors de travaux antérieurs au laboratoire, qui vont être présentés ci-après. Il est aujourd'hui devenu un outil récurrent dans la conception de molécules à visées diagnostique et thérapeutique. Nous avons justement vu quelques exemples d'application pour une détection d'activité enzymatique par chimiluminescence avec les travaux du Prof. Lippert (Figure II.6 et Figure II.7) et du Prof. Shabat (Figure II.19).

4. Présentation des travaux antérieurs au laboratoire

Dans le but d'une meilleure compréhension de ce projet de thèse, il est nécessaire de le replacer dans son contexte grâce, notamment, grâce aux travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire concernant la mise en place des premiers systèmes chimiluminescents.

4.1 Synthèse et évaluation d'une sonde chimiluminescente pour la détection de la Caspase-3

Une première sonde chimiluminescente modèle, à cœur phénol, a pu être mise au point au sein de notre équipe par le Dr. Jean-Alexandre Richard durant sa thèse (dirigée par le Prof. Pierre-Yves Renard et financée la société QUIDD entre 2005 et 2008).¹³¹ Cette sonde est fondée sur un déclenchement de chimiluminescence *in vitro* par détection de la caspase-3, acteur clé du processus apoptotique. Ainsi, elle est composée d'un motif adamantylidenedioxetane à phénol sur lequel est greffé un bras auto-immolable de type PABA reliant la plateforme au térapeptide DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), substrat de la caspase-3 (Figure II.38).

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2013**, 23, 2332. e) S. Gnaim, D. Shabat *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 2970.d) pour des revues récentes voir la référence 122

¹³⁰ a) Meyer, Y. *Conception et développement de bras réactifs auto-immolables pour la synthèse de sondes pro-fluorescentes : application à la détection de peptidases dans un contexte in vivo*. Université de Rouen – Quidd, thèse de doctorat soutenue en 2010. b) Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard, A. Romieu *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1777.

¹³¹a) J.-A. Richard, L. Jean, A. Romieu, M. Massonneau, P. Noack-Fraissignes, P.-Y. Renard *Org. Lett.* **2007**, 9, 4853. b) J.-A. Richard, L. Jean, C. Schenkels, M. Massonneau, A. Romieu, P.-Y. Renard *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2941.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

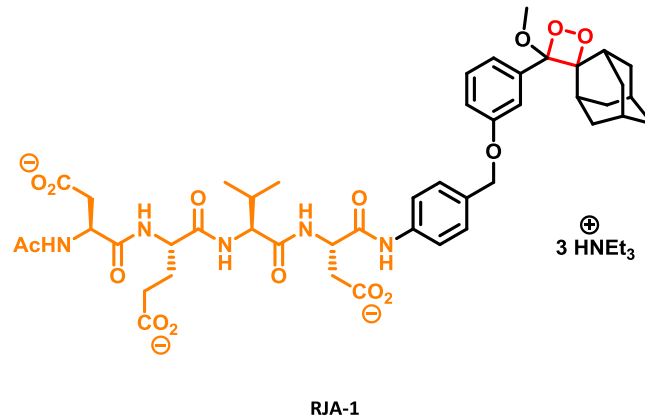
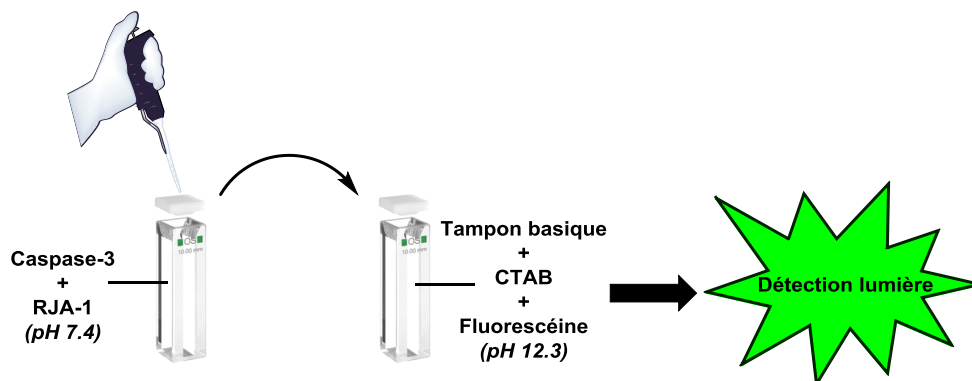


Figure II.38 : Représentation schématique de la sonde chimiluminescente réalisée par le Dr. J.-A. Richard

Les conditions employées, pour observer l'émission de cette sonde en milieu aqueux, ont été adaptées des procédures décrites par le Prof. Schaap (voir partie 1.1 de ce chapitre). La détection a été réalisée en temps final :

- 1) la sonde et la caspase-3 recombinante humaine ont été dissoutes dans un tampon spécifique de l'enzyme (200 μ L, 10% sucrose (m/v), HEPES [50 mM], NaCl [100 mM], DTT [10 mM], EDTA [1 mM], 0.1% CHAPS (m/v), pH 7.4);
- 2) une solution basique contenant les additifs (CTAB [100mM], 5-(stéarylamo)fluorescéine [0.18 mM], pH 12.3) est utilisée pour la détection de la chimiluminescence;
- 3) une partie du milieu réactionnel est prélevée toutes les 15 min puis ajoutée à la solution basique contenant l'« enhanceur », l'émission de chimiluminescence a été enregistrée pendant 10 minutes (Figure II.39).



Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

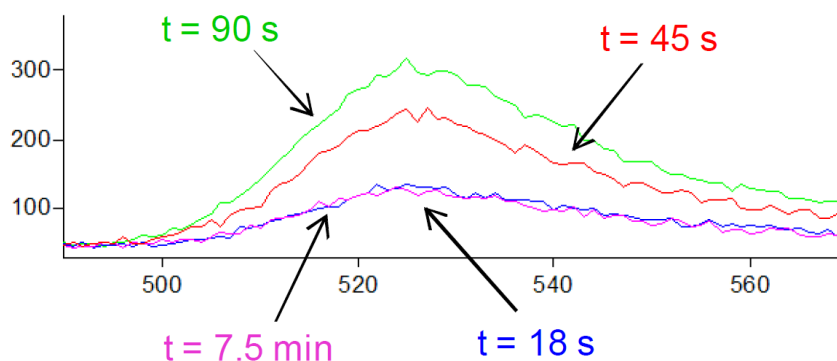


Figure II.39 : Représentation schématique de la procédure de déclenchement adoptée (en haut) ; Spectre de chimiluminescence (en bas) ¹³²

Une émission a donc pu être enregistrée à 530 nm (Figure II.39), ce qui correspond à la longueur d'onde d'émission de la fluorescéine. Ce même protocole a, par ailleurs, été réalisé en absence du fluorophore et aucune émission notable (en tout cas, avec les appareillages utilisés) n'a été observée, montrant ainsi l'utilité de celui-ci et l'efficacité du transfert énergétique. Il est à noter que pour chaque mesure effectuée, l'émission dure plusieurs minutes, la chimiluminescence est alors dite de type « glow »¹³³ (Figure II.40).

Bien que ce dispositif soit efficace pour une détection enzymatique *in vitro*, et malgré la présence d'une chaîne hydrosoluble, il ne remplit malheureusement pas le cahier des charges de l'imagerie *in vivo*. En effet, basée sur les premières expériences du Prof. Shaap, cette étude reprend les mêmes inconvénients cités dans la partie Chapitre II.1.1.1 de ce chapitre.

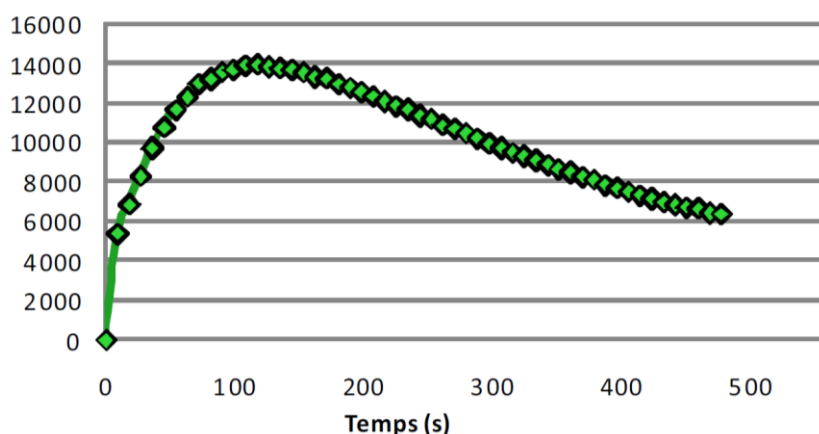


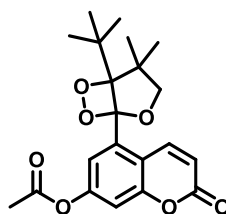
Figure II.40 : Spectre de chimiluminescence représentatif de la quantité de lumière émise en fonction du temps (mesure effectuée pour l'échantillon à $t = 1\text{ h }45\text{ min}$ de la cinétique enzymatique) ¹³²

¹³² Richard, J.-A. *Synthèse de sondes luminescentes utilisant un bras réactif auto-immolable : application à la détection de peptidases*. Université de Rouen – Quidd, Thèse de doctorat soutenue en 2008

¹³³ N. Watanabe, H. Kobayashi, M. Azami, M. Matsumoto *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6831.

4.2 Synthèse et évaluation d'un hybride dioxétane-coumarine

Une seconde approche, fondée sur l'utilisation d'un fluorophore comme espèce excitée lors du déclenchement de chimiluminescence, à l'image de ce qui a été ensuite exploité par le Prof. Shabat (*i.e.* « motifs phénols de types push-pull »), a été explorée au sein de notre laboratoire.¹³⁴ En guise de sonde chimiluminescente, le Dr. Jan Koci a directement greffé le 1,2-dioxétane sur un fluorophore à phénol (Figure II.41). La 7-hydroxycoumarine présente l'avantage d'avoir un bon rendement quantique en milieu aqueux ($\phi^{FL} = 76\%$ à pH 7.5 en tampon PBS)¹³⁵, et un pKa bas pour un phénol (7.8)¹³⁶, ce qui permet un déclenchement en milieu neutre ou dans un tampon légèrement basique. La possibilité de placer le dioxétane en position *mé*ta du phénol rend d'autant plus intéressante l'utilisation de cette coumarine. De plus, par la présence de ce fluorophore, la sonde chimiluminescence possède un caractère pro-fluorescent marqué, comme nous l'indique la Figure II.42 (courbe bleue), et après clivage enzymatique, une émission dans le bleu est observée autour de 460 nm (courbe verte).



GV-1

Figure II.41 : Représentation schématique de la sonde hybride dioxétane-coumarine

Cependant, aucune émission par chimiluminescence n'a été observée en milieu aqueux, que ce soit en présence ou non de l'enzyme. Ceci peut s'expliquer par le quenching de l'eau, problème déjà décrit dans la littérature. Devant les échecs rencontrés avec le déclenchement de chimiluminescence en milieu aqueux, les propriétés optiques ont tout de même été étudiées en milieu organique.

¹³⁴ J. Koci, V. Grandclaude, M. Massonneau, J.-A. Richard, A. Romieu, P.-Y. Renard *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6713.

¹³⁵ K.-i. Setsukinai, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, T. Nagano *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 2453.

¹³⁶ M. Adamczyk, M. Cornwell, J. Huff, S. Rege, T. V. S. Rao *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1985.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

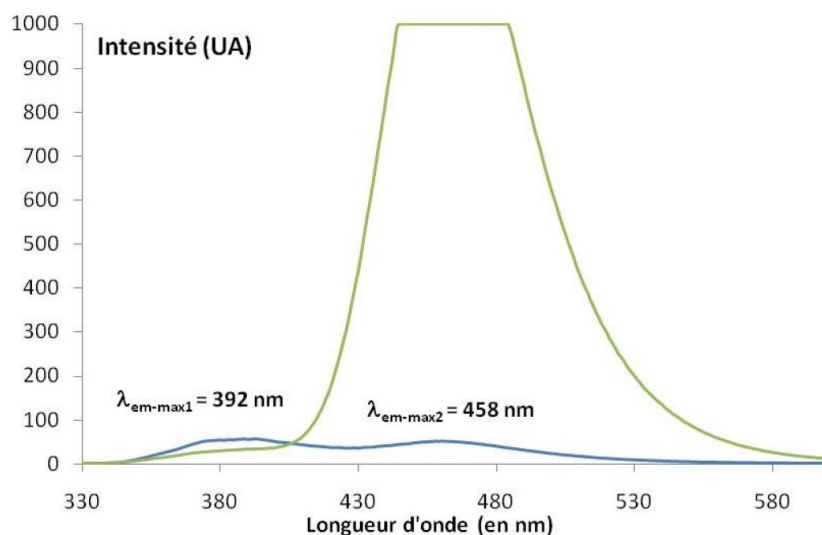


Figure II.42 : Spectres d'émission par fluorescence de la sonde **GV-1** avant (courbe bleue) et après (courbe verte) clivage par la lipase de *Mucor miehei* (mesures effectuées pour **GV-1** [30 μM] en tampon phosphate [100mM] + 0.3% de DMSO, pH 7.5, 37 °C, lipase de *Mucor miehei* [0.72 U])

Ainsi, une émission par chimiluminescence est observée à 470 nm (Figure II.43), ce qui concorde avec le spectre d'émission de fluorescence de la coumarine dans le DMSO. Ceci traduit un transfert énergétique, du motif 1,2-dioxétane vers la coumarine, effectif.

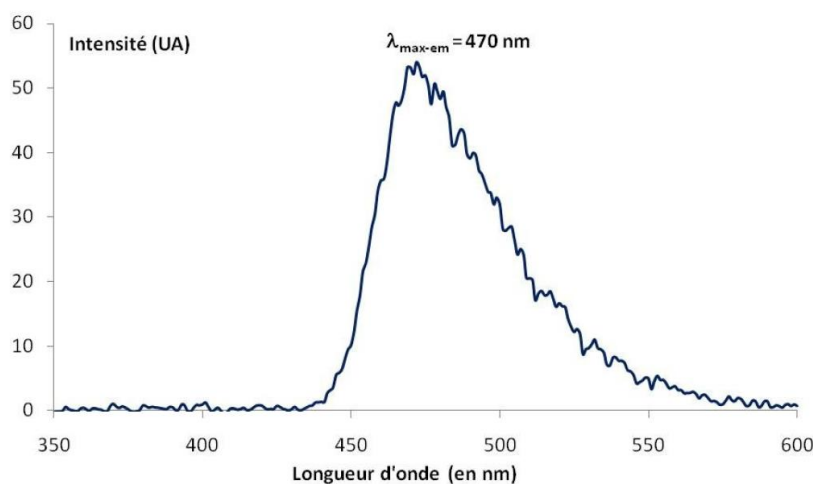


Figure II.43 : Spectre d'émission par chimiluminescence de **GV-1** (mesures effectuées pour **GV-1** [170 μM] dans DMSO, 25 °C après addition de TBAF en solution dans THF [1 M])

L'objectif initialement visé a été respecté et montre la possibilité de développer de nouveaux chimiluminophores utilisant comme plateforme des fluorophores à phénol. Le défi réside alors dans l'utilisation de composés fluorogéniques ayant des longueurs d'ondes d'émission plus élevées pour une adaptation en imagerie *in vivo*. Cependant, le défi synthétique que représente la synthèse de la coumarine, présentant un motif 1,2-dioxétane en position méta du phénol, est très important (*i.e.* 17 étapes, 3% de rendement final), et si la preuve de principe a bien été obtenue avec cette sonde, une

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

utilisation de ces coumarines pour une grande variété de déclenchement enzymatiques semble difficile à atteindre.

4.3 Extension de la chimiluminescence vers le proche-IR : formation d'une première cassette « TBET » phénolique¹³²

La troisième approche élaborée visait à mettre en place une première cassette de type « TBET » à cœur phénolique, à l'image des travaux réalisés avec le luminol par le Prof. Burgess (cf Chapitre I et Chapitre III.1.1.2). La synthèse a été réalisée en incorporant un autre groupement stabilisant du motif 1,2-dioxétane : le dihydrofurane. La conception du composé **RJA-4** est donc inspirée des travaux du Prof. Matsumoto présentés dans la partie 1.2 de ce chapitre. Le défi reposait sur l'introduction d'une triple liaison servant d'accroche à un fluorophore pour former la sonde **RJA-5** (Figure II.44).

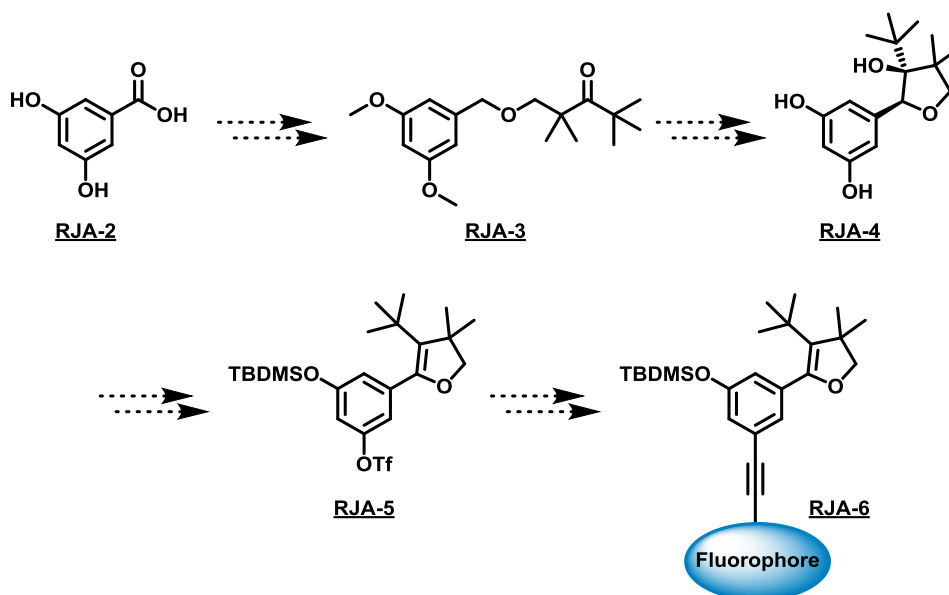


Figure II.44 : Représentation schématique de la voie de synthèse du composé **RJA-5**

Différentes conditions de couplage de Sonogashira, rassemblées dans le Tableau II.1, ont été testées. La première approche évaluée, voie A sur la Figure II.45, consiste à réaliser le couplage pallado-catalysé sur le dérivé silylé **RJA-5**. Malheureusement, aucun couplage n'a été obtenu et seul le réactif de départ **RJA-5** a été observé.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

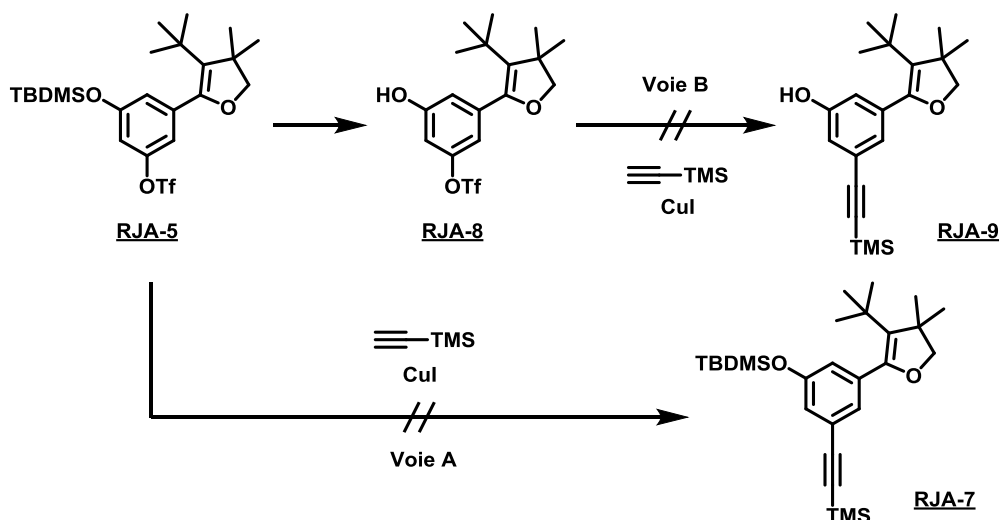


Figure II.45 : Représentation schématique des composés RJA-7 et RJA-9

Il a été supposé que l'insertion oxydante ne s'opérait pas en raison de l'encombrement stérique lié au groupement TBDMS en méta du triflate. Une seconde approche, la voie B sur la Figure II.45, a donc été réalisée sur le composé RJA-8 obtenu après déprotection du groupement silyl. Cependant et ce malgré une variation de la nature de la base, du solvant et même de l'espèce catalytique, dans la voie A comme dans la voie B, aucune conversion du réactif de départ n'a été observée.

Voie	Source catalytique	Ligand	Base	Solvant
A	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	-	TEA	THF
	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	-	TEA	DMF
	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	-	DIEA	DMF
	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	-	DIPA	-
B	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	-	DIEA	DMF
	Pd(OAc) ₂	PPh ₃	TEA	DMF
	Pd(OAc) ₂	P(<i>o</i> -Tol) ₃	Pipéridine	-
	Pd(OAc) ₂	⁺ HP(<i>t</i> -Bu) ₃ /BF ₄ ⁻	TEA	DMF

Tableau II.1 : Conditions de couplage de Sonogashira employées dans les voies A et B

Ainsi, les deux premières stratégies soulèvent une problématique majeure : la difficulté d'adapter ces sondes en imagerie *in vivo*. La troisième stratégie pourrait être une solution si l'entité fluorescente choisie présente une émission dans le proche IR et augmente l'hydrosolubilité de la sonde finale.

Ces résultats nous ont donc amené à construire une nouvelle stratégie synthétique du motif 1,2-dioxétane à cœur phénol que nous allons présenter ci-après.

II. Résultats et discussion

Cette partie sera consacrée à la mise au point de nouveaux systèmes chimiluminescents à cœur phénolique permettant la visualisation d'une activité enzymatique dans le proche-IR (*i.e.* 650 – 800 nm). Nous aborderons alors en détail les différentes stratégies de synthèse envisagée permettant l'obtention des plateformes chimiluminescentes que nous avons retenues. Au vu des travaux/résultats antérieurs du laboratoire, que nous venons d'évoquer, le motif retenu permettant d'obtenir une réponse de chimiluminescence sera le motif dihydrofurane. L'objectif étant d'induire, ici, un transfert, de type CRET (cf Chapitre I.IV.4.1), de la plateforme phénolique vers un complexe de lanthanide. Ce dernier devrait également participer à l'abaissement du pKa du phénol, après libération de celui-ci (*i.e.* à la suite de l'activation enzymatique), par le biais d'une liaison entre le phénol et le lanthanide (Figure II.46).

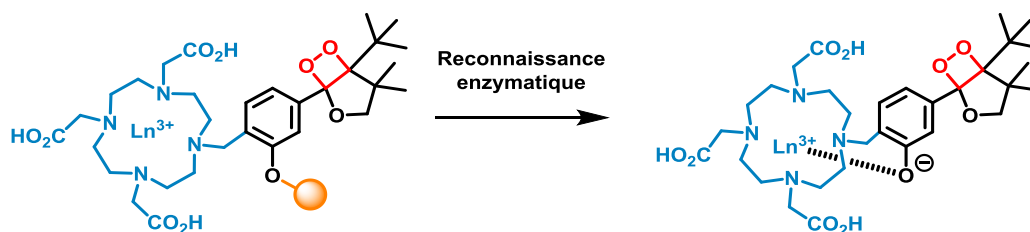


Figure II.46 : Représentation schématique de la liaison formée entre le phénolate et le lanthanide après reconnaissance enzymatique

1. Présentation de la voie de synthèse de nouvelles plateformes chimiluminescentes à cœur phénolique

Comme indiqué dans le chapitre précédent, ce motif riche en énergie peut être substitué par divers groupements (*e.g.* adamantyl, dihydrofurane, diisopropyl, ...), chacun apportant une stabilité plus ou moins étendue dans le temps.⁷¹ Bien que les sondes chimiluminescentes du Prof. Schaap basées sur le motif adamantylidenedioxétane soient considérées par les « spécialistes » de la chimiluminescence comme les sondes à motif 1,2-dioxétane les plus stables et efficaces, les efforts apportés sur ce projet consistaient à la mise au point de sondes à dioxétane bicyclique. En effet, d'après les travaux du Prof. Matsumoto, il est difficile d'apporter plus de stabilité thermique à l'espèce adamantylidenedioxétane. De ce fait, l'utilisation d'espèces bicycliques telles que le 1-phényl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptane rend une modulation de l'architecture plus facile à mettre en œuvre. Par ailleurs, les études faites par Matsumoto et son groupe ont démontré que ces dernières espèces amélioreraient de façon non négligeable le temps de demi-vie de l'entité 1,2-dioxétane (*e.g.* 49.8 années pour le motif dihydrofurane *tert*-butylique contre 3.8 années pour le motif adamantyl)¹³⁷ (Figure II.47). Ainsi, l'ensemble du projet de thèse se repose sur l'utilisation de ce dioxétane bicyclique.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

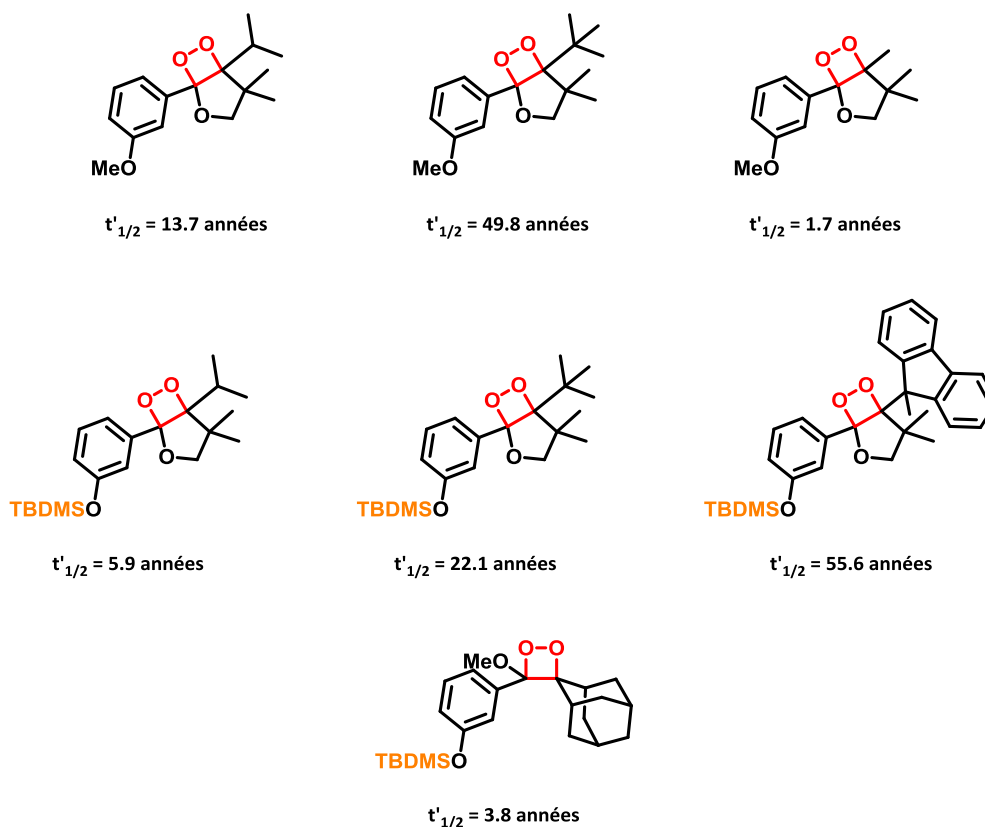


Figure II.47 : Schéma représentatif de la stabilité des différents 1,2-dioxétanes (mesures faites à 25 °C)¹³⁷

1.1 Synthèse de chimiluminophores : synthèse modèle d'une plateforme phénolique

Comme l'indique la Figure II.48, nous avons choisi de construire notre plateforme de la manière suivante : une entité fluorescente (représentée en bleu) située en *ortho* d'un groupement phénolique portant le motif réactif vis-à-vis d'un bio-analyte d'intérêt, que nous appellerons « déclencheur » dans la suite de ce manuscrit (*e.g.* phosphatase alcaline, nitroréductase, ...), lié au phénol, *via*, ou non, un bras réactif auto-immolable, et représenté en orange. Cette position en *ortho* d'un point de vue synthétique rend plus accessible l'insertion de grosses structures telles que des fluorophores organiques ou des complexes de lanthanides. En effet, le déclencheur et le DHF sont encombrants et peuvent potentiellement empêcher toute substitution sur la position *ortho* entre le DHF et le phénol. Ainsi, l'idée novatrice de ce projet sera donc de concevoir une architecture permettant de moduler aussi bien le déclencheur que la partie fluorescente.

¹³⁷ M. Matsumoto, N. Watanabe, N. C. Kasuga, F. Hamada, K. Tadokoro *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2863.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

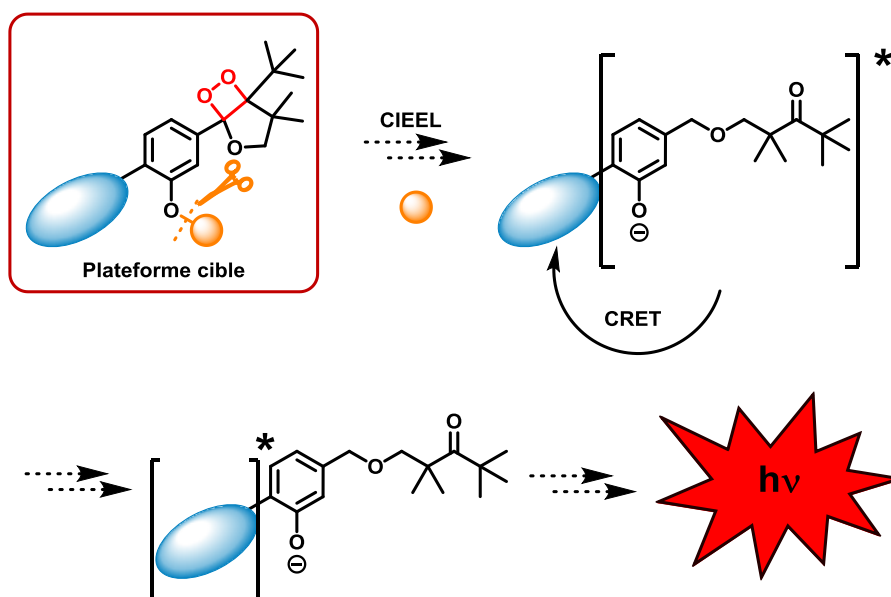
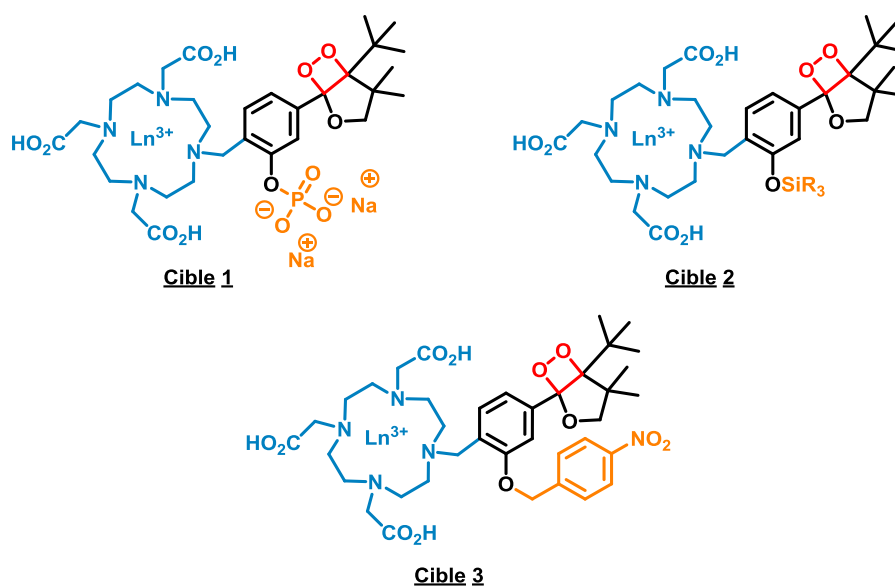


Figure II.48 : Représentation schématique de sonde phénolique visée

A partir de ce modèle, nous avons prévu la synthèse de trois cibles ayant chacune une réactivité spécifique vis-à-vis d'une enzyme ou d'un analyte d'intérêt : la **cible 1** permettant une reconnaissance de la phosphatase alcaline, la **cible 2** pouvant être déclenchée en présence d'ions fluorures et la **cible 3** comportant un substrat de la nitroréductase (Figure II.49). Nous avons vu précédemment la possibilité de réaliser un transfert d'énergie entre un chimiluminophore et un complexe de lanthanide. Nous avons donc décidé d'utiliser un complexe de lanthanide de type DO3AtBu comme structure fluorescentes, pour ces trois cibles.



R = groupement stabilisant

Figure II.49 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes à cœur phénol visées

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Au cours de ce projet, plusieurs stratégies ont été envisagées (Figure II.50 et Figure II.52), toutes reposant sur une étape clé : la mise en place d'un bras permettant l'insertion d'un fluorophore et éventuellement celle d'un groupement électro-attracteur visant à diminuer la valeur du pKa du phénol. Dans chacune des voies proposées ci-dessous, le 3-hydroxybenzoate de méthyle commercial est utilisé comme substrat de départ de la synthèse.

1.1.1 Première stratégie : insertion d'un groupement fonctionnel *via* une réaction d'*ortho*-métallation

Dans cette première stratégie, nous avons envisagé d'introduire un halogène (brome ou chlore) en position benzylique en *para* de l'ester méthylique afin d'introduire une cage de type DOTA complexant le lanthanide (Figure II.50).

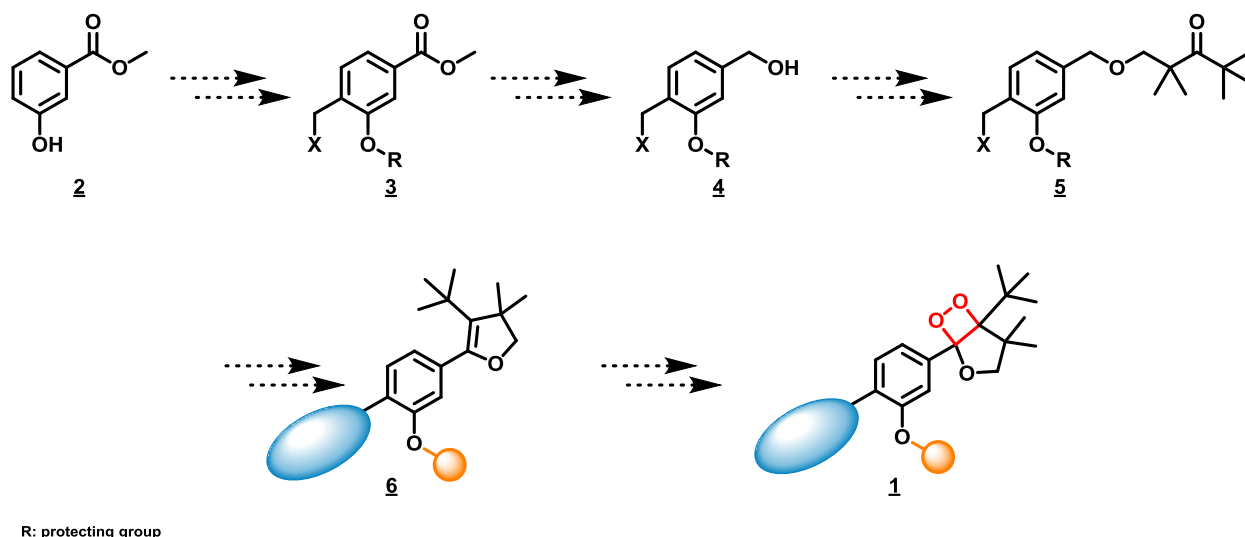


Figure II.50 : Représentation schématique de la première stratégie envisagée

Nous nous sommes alors inspirés des travaux du Prof. J. Mortier sur les substitutions électrophiles aromatiques régiosélectives par *ortho*-métallation.¹³⁸ Afin de réaliser cette substitution, nous devons en premier lieu protéger le phénol. Notre choix s'est porté sur le groupement méthoxyméthyl (MOM) à la fois pour nous rapprocher au mieux de la littérature (le phénol est protégé sous la forme d'un groupement méthoxy dans les travaux du Prof. Mortier) mais également pour rendre notre synthèse la plus orthogonale possible. En effet, le groupement protecteur doit être compatible avec l'ensemble des conditions employées, notamment en milieux acide, basique et oxydant. Sa déprotection doit aussi être simple à mettre en œuvre. Bien que le groupement MOM soit sensible en conditions acides, il constituait le groupement protecteur compatible vis-à-vis des conditions utilisées pour notre système,

¹³⁸ T.-H. Nguyen, N. T. T. Chau, A.-S. Castanet, K. P. P. Nguyen, J. Mortier *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3419. Pour des revues sur ces conditions d'*ortho*-métallation voir : a) M. Schlosser *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001, 3975. b) L. Lochmann *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2000, 1115.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

et en tout cas nettement plus facile à déprotéger qu'un groupement de type méthoxy. Ainsi, le composé **7** a pu être obtenu au moyen du MOMCl et de la diisopropyléthylamine dans le dichlorométhane avec un bon rendement de 94%.

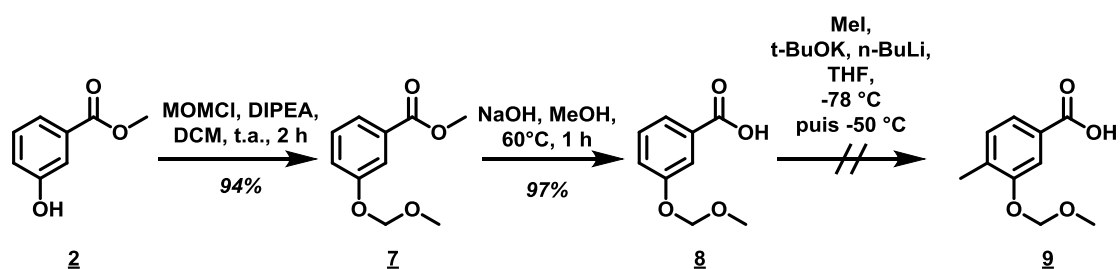


Figure II.51 : Synthèse du composé **9**

La fonction ester est par la suite saponifiée selon des conditions classiques de saponification pour fournir l'acide **8**. Nous avons alors adapté les conditions d'*ortho*-métallation décrites dans la littérature : le composé **8** est mis en réaction avec l'iodure de méthyle en présence d'une super base obtenue par combinaison du *tert*-butanolate de potassium et du *n*-butyllithium. Malheureusement, cette réaction a uniquement abouti à un mélange de produits non exploitables. Ceci peut s'expliquer par la présence du groupement MOM, éventuellement clivé après traitement du produit brut de réaction. Nous avons donc envisagé de reprendre la synthèse à partir de l'acide 3-hydroxy-4-méthylbenzoïque commercial, cependant en raison du coût important de ce produit, cette stratégie a vite été abandonnée. Par ailleurs, l'utilisation du groupement protecteur MOM étant fortement toxique (*i.e.* par la synthèse et l'emploi de son agent actif, le MOMCl), notre idée de refonte de cette stratégie initiale est confortée.

1.1.2 Deuxième stratégie : insertion d'un groupement fonctionnel *via ortho*-formylation

Nous avons tenté, en deuxième approche, d'insérer un alcool benzylique en *ortho* du phénol. L'introduction a été effectuée en début de synthèse *via* une réaction d'*ortho*-formylation (Figure II.52). La fonction aldéhyde nous semble être la plus appropriée car après réduction et protection de celle-ci, la synthèse élaborée par Matsumoto *et al* pourrait alors être envisagée.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

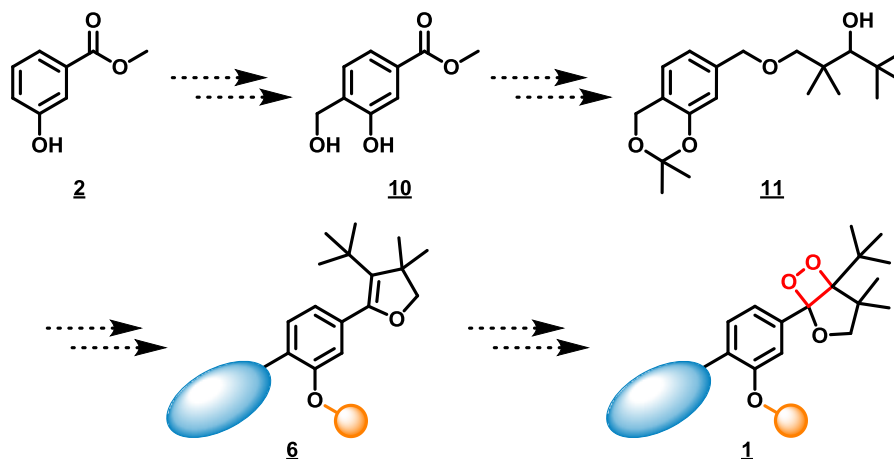


Figure II.52 : Représentation schématique de la deuxième stratégie envisagée

Une première réaction d'hydroxyméthylation directe du phénol **2**, basée sur des travaux antérieurs au laboratoire sur l'hydroformylation des coumarines (*i.e.* formaldéhyde en présence de K_2CO_3), pour obtenir le diol **10** a été tentée mais s'est avérée infructueuse (Figure II.53). Nous nous sommes donc tournés vers une réaction de formylation suivie d'une étape de réduction. Les premiers efforts ont été centrés sur la réaction de Vilsmeier-Haack (*i.e.* $POCl_3$, DMF), mais aucun résultat concluant n'a pu être observé, seul le composé de départ (le phénol **2**) a été récupéré. Une première alternative choisie a été l'utilisation des conditions de la réaction de Duff (*i.e.* hexaméthylènetétramine (HMTA) en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) suivi d'une hydrolyse acide).

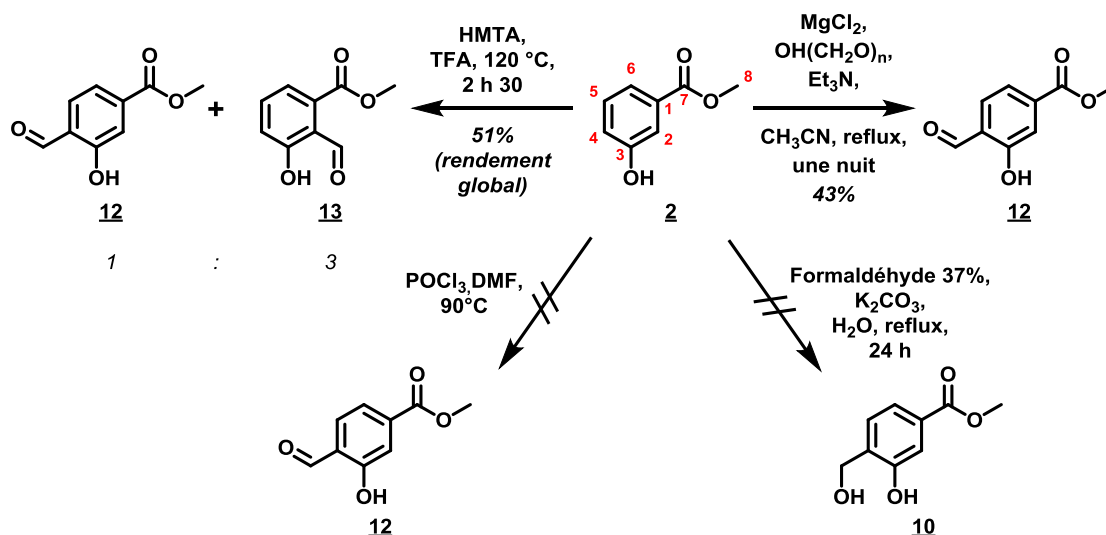


Figure II.53 : Représentation schématique des tentatives de formylation

Le produit **12** désiré est bien formé mais est, hélas, présent de façon minoritaire (1 : 3) par rapport à son régioisomère **13** (aldéhyde en position *ortho* du phénol et de l'ester). Seule l'utilisation du paraformaldéhyde en présence du chlorure de magnésium et de triéthylamine nous a permis d'obtenir

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

exclusivement l'aldéhyde dans la position attendue, avec, certes, un taux de conversion modéré (43%). Cependant, après réflexion, cette stratégie a été également abandonnée pour des raisons de point de vue synthétique. En effet, la fonction acétal, utilisées dans la protection simultanée de l'alcool primaire et du phénol, risque d'être trop fragile, ce qui perturberait le cours de la synthèse. Il est donc plus avantageux de réaliser la formylation en fin de synthèse, plutôt qu'en début de synthèse, afin de minimiser les étapes de protection/déprotection. En revanche, cette étude nous a permis d'étudier et d'optimiser les conditions de formylation de la position 3 désirée. Ces conditions ont d'ailleurs pu être utilisées lors de la troisième stratégie.

1.1.3 Troisième stratégie

Dans cette voie synthétique, le groupement protecteur R est introduit en début de synthèse uniquement sur le phénol. Cette stratégie a été choisie selon sa compatibilité avec l'ensemble de notre synthèse multi-étapes nécessaire à l'introduction du motif dihydrofurane. Ainsi, parmi les nombreuses possibilités et au regard des travaux antérieurs effectués par le Dr. Virgile Grandclaude (cf Chapitre III.1.2), notre choix s'est porté sur le groupement benzyl (Bn). Ce groupement présente l'avantage d'être résistant aussi bien aux conditions basiques et acides faibles qu'aux conditions oxydantes. De plus, il pourra être éliminé par une hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon ou via l'utilisation d'un acide de Lewis tel que le trichlorure de bore (BCl_3). Après addition d'une chaîne éther suivie d'une étape cyclisation, le précurseur aldéhydique **17** pourrait être obtenu (Figure II.54).

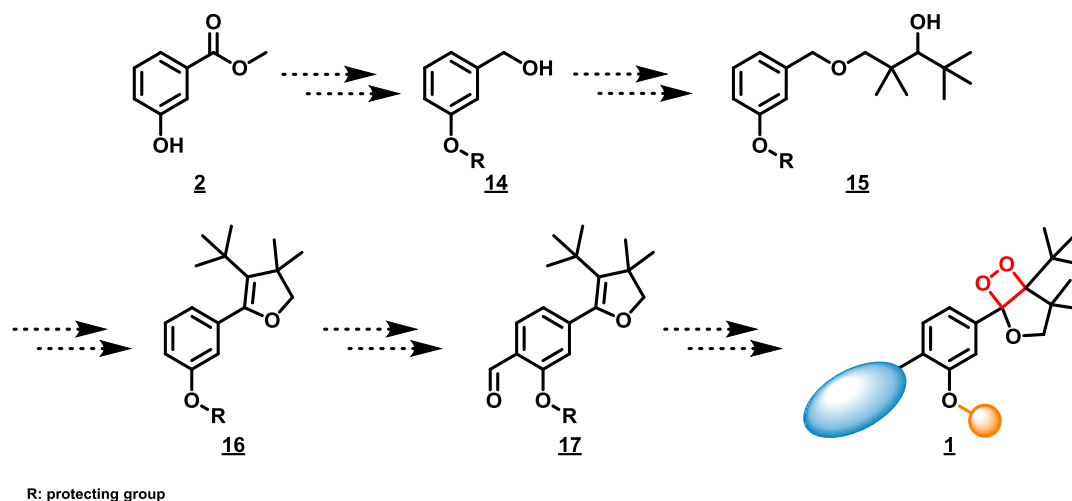


Figure II.54 : Représentation schématique de la troisième stratégie envisagée

Ainsi, le 3-hydroxybenzoate de méthyle **2** a été directement engagé dans une réaction d'alkylation du phénol par le bromure de benzyle (bien moins toxique que le chlorure de benzyle) et en présence de carbonate de potassium dans l'acétone au reflux (Figure II.55).

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

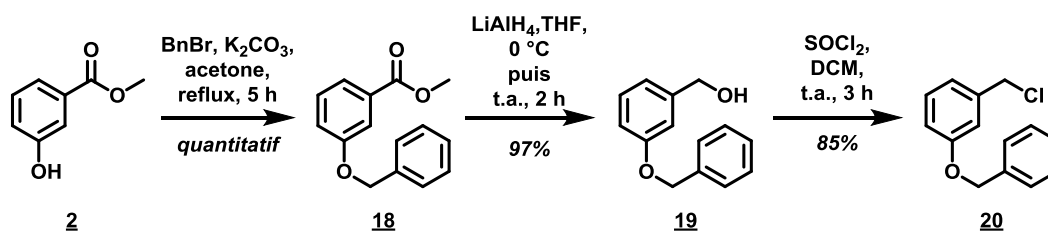


Figure II.55 : Synthèse du dérivé chloré **20**

Le phénol protégé **18** est obtenu avec un rendement quantitatif. Sa fonction ester méthylique est par la suite réduite par LiAlH_4 dans le THF anhydre pour former l'alcool **19** avec un bon rendement (97%). La formation du dérivé chloré **20** a pu être effectuée par traitement de la molécule **19** au chlorure de thionyle, avec un rendement correct (i.e. 85%). Nous disposons ainsi de l'intermédiaire halogéné nécessaire pour l'introduction de la chaîne alcoolique **22**. Celle-ci a été préparée via la séquence réactionnelle en trois étapes, présentée en Figure II.56, qui reprend les travaux effectués au laboratoire ainsi que ceux du Prof. Matsumoto.



Figure II.56 : Synthèse du diol **22**

L'alkylation de l'alcool primaire du diol **22** par le composé **20** a été réalisée en utilisant l'hydrure de sodium dans le DMF (Figure II.57). L'éther **24** est ainsi obtenu avec un rendement de 93%. L'alcool secondaire présent sur la molécule **21** est ensuite oxydé en cétone en présence de sels de chrome (PCC) conduisant à la molécule **25** avec un bon rendement (i.e. 87%), qui peut être engagée dans une réaction de cyclisation.

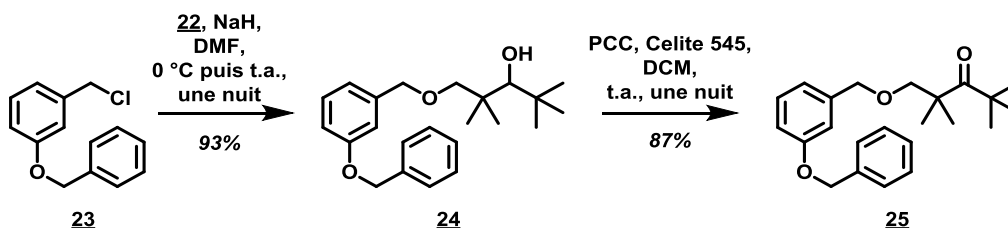


Figure II.57 : Synthèse de la cétone **25**

Cette réaction de cyclisation intramoléculaire est induite par la formation d'un carbanion benzylique au moyen d'une base forte (Figure II.58). Les essais menés à l'aide de diisopropylamide de lithium

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

(LDA), formé *in situ*, et de *tert*-butyllithium n'ont pas conduit au produit cyclisé attendu. Seuls le composé de départ **25** et des produits de dégradation sont observés. Le composé **26** a, cependant, pu être obtenu (avec un bon rendement de 79%) selon d'autres conditions mettant en jeu le dismyl de potassium, formé *in situ* à partir du *tert*-butanolate de potassium dissout dans le DMSO anhydre. Le Prof. Matsumoto a montré que l'utilisation de cette base permettait d'obtenir de meilleurs rendements et que, par ailleurs, seul le diastéréoisomère thermodynamique est observé.¹³⁹ Ceci est favorisé par l'encombrement entre le cycle phénolique et le groupement *tert*-butyle. Ces deux groupements sont donc en position *trans* l'un par rapport à l'autre. Il est à noter que les études structurales visant à clairement identifier le diastéréoisomère **26** n'ont pas été menées. En effet, la stéréochimie relative de ces deux centres pourrait paraître accessoire, car nous recherchons à obtenir l'éther d'énol achiral formé *via* une réaction d'élimination. Cependant, cette étape d'élimination peut se produire soit suivant un mécanisme de type E1 (et la stéréochimie relative n'importe pas), soit de type E2, qui demande des conditions réactionnelles un peu plus douces, mais qui nécessite que le groupement partant et l'atome d'hydrogène présents sur le furane sont en position *trans* l'un par rapport à l'autre. De plus, les études RMN effectués sur des composés similaires obtenus au laboratoire (i.e. composé naphthyle, cf chapitre 2, thèse du Dr. Virgile Grandclaude) ont confirmé cette stéréochimie relative. Ceci conforte notre choix quant à l'utilisation du dismyl de potassium pour la réaction de cyclisation.

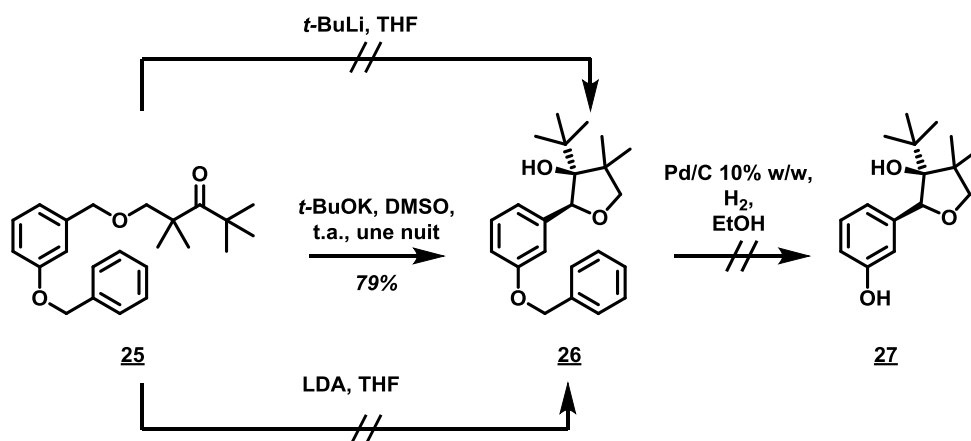


Figure II.58 : Essais de cyclisation et de débenzylation

À cette étape, nous avons souhaité déprotéger le phénol, afin de pouvoir utiliser l'hydrogénolyse, réaction classique pour la déprotection des groupements benzyle, et donc éviter une réduction du cycle dihydrofurane (i.e. précurseur du dioxétane, et formé par élimination de l'alcool). Ce phénol libre est également nécessaire pour l'étape d'*ortho*-formylation possible. La déprotection du composé **26** a donc été tentée suivant les conditions classiques de déprotection des groupements benzyle, c'est-à-dire en employant du palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. Cependant, seul le composé initial **26** est observé. De ce fait, nous avons tout de même poursuivi la synthèse en conservant le motif benzylique et réalisé une étape de déshydratation de l'alcool **26** en utilisant un

¹³⁹ M. Matsumoto, N. Watanabe, A. Ishikawa, H. Murakami *Chem. Commun.* **1997**, 2395.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

large excès de SOCl_2 et de pyridine dans le dichlorométhane pour former le dihydrofurane **28** (Figure II.59).

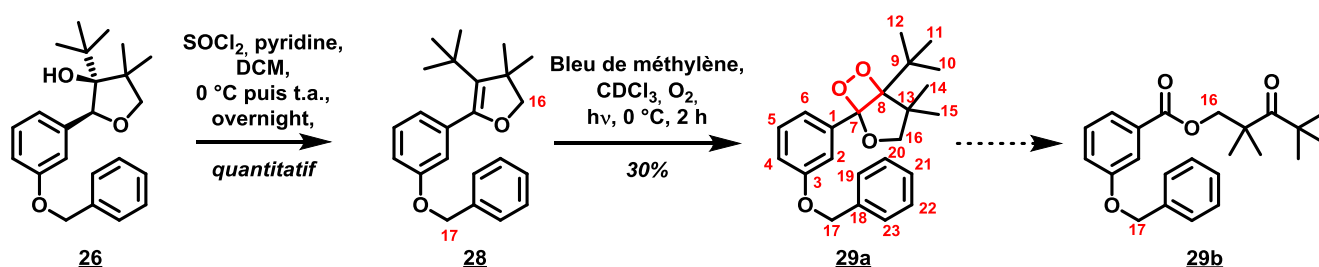


Figure II.59 : Synthèse du 1,2-dioxétane **29a**

Souhaitant valoriser notre plateforme à cœur phénolique et vérifier la possibilité d'accéder au 1,2-dioxétane, nous avons parallèlement réalisé la réaction de cycloaddition de type [2+2] entre l'oxygène singulet et le composé **28** pour obtenir le composé **29a**. Celle-ci s'opère de la manière suivante : un photosensibilisateur (le bleu de méthylène) est mis en solution, dans la chloroforme, sous atmosphère après bullage d'oxygène. Il génère, après irradiation lumineuse, l'oxygène singulet. Dans notre cas, cette irradiation est réalisée à l'aide d'une lampe halogène d'une puissance de 300 W ou d'une lampe de type « lampe de bureau » d'une puissance de 60 W et s'effectue à $0\text{ }^\circ\text{C}$ afin d'éviter toute formation instantanée du produit d'ouverture **29b**. De plus, l'oxygène singulet ayant une durée de vie plus importante dans les solvants non constitués d'atomes d'hydrogènes, nous avons utilisé le chloroforme deutéré comme solvant de réaction. Ceci facilite d'autant plus le suivi de réaction que nous avons choisi de réaliser par RMN du ^1H (Figure II.60). En effet, la formation du cycle 1,2-dioxétane génère deux centres stéréogènes (en position 7 et 8), les atomes d'hydrogène du CH_2 en position 16 sont donc diastéréotopiques. Par conséquent, en RMN du ^1H , chacun aura un signal caractéristique se présentant sous la forme d'un doublet (i.e. en l'occurrence 3.80 ppm et 4.57 ppm). Lorsque le motif 1,2-dioxétane se décompose en produit d'ouverture **29b**, un seul signal sous la forme d'un singulet est observé (4.40 ppm). Ainsi, nous avons noté la formation simultanée des composés **29a** et **29b** lorsque l'oxygène singulet est généré *in situ* par irradiation d'une lampe d'une puissance de 300 W. En diminuant la puissance de la lampe à 60 W, seul le produit **29a** désiré est observé. Cependant, après purification sur colonne de silice native ou désactivée par ajout de triéthylamine, nous avons également observé, pour chaque irradiation effectuée, le produit de dégradation **29b**. Ceci traduit une instabilité de la molécule **29a** lors de la purification ou à température ambiante et explique le rendement moyen de 30%. Ayant pris en considération ces inconvénients, des précautions de manipulation ont été employées pour la suite de notre étude.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

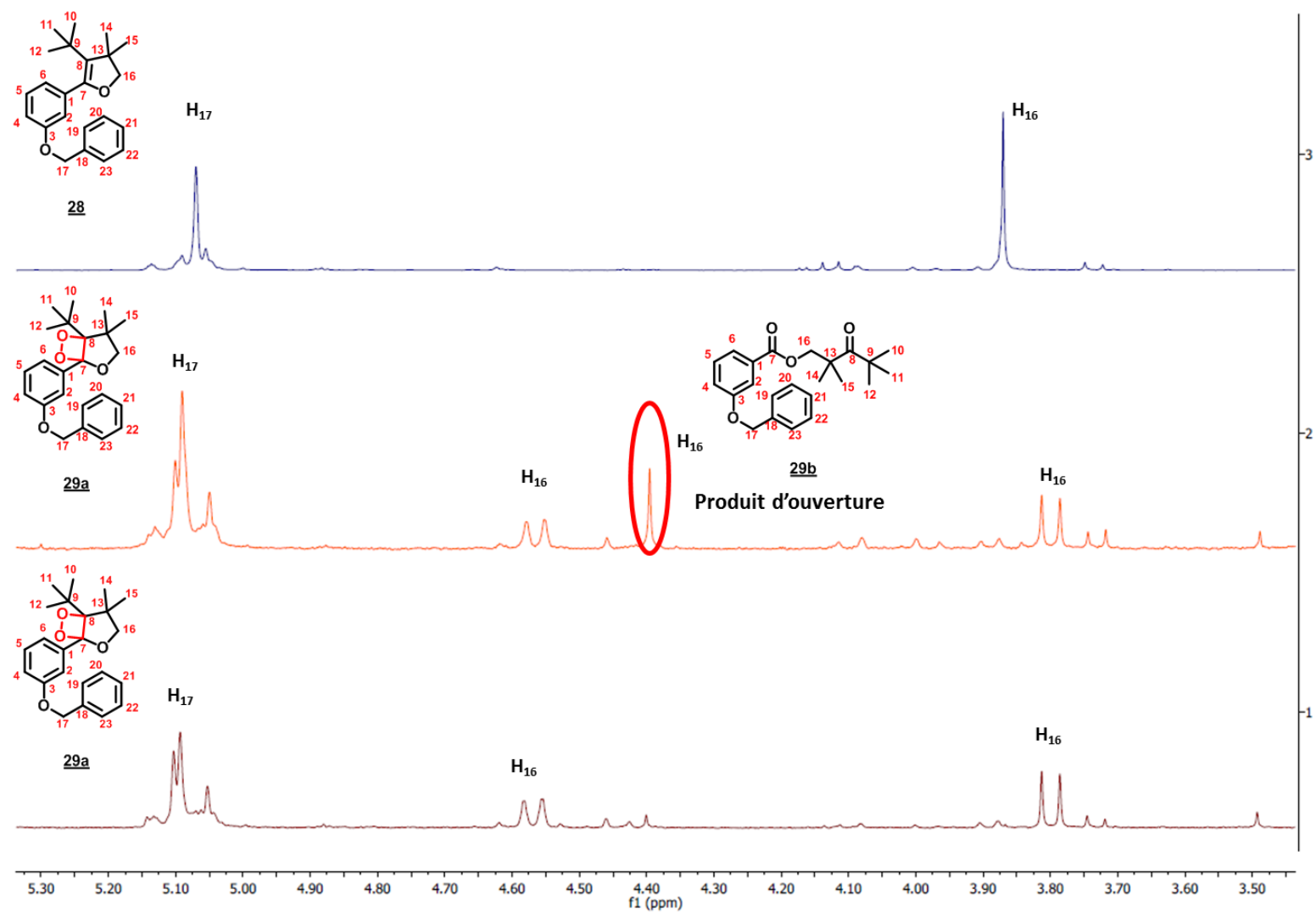


Figure II.60 : Représentation des spectres RMN ^1H (300 Mhz, dans le CDCl_3) respectifs des composés **28** (en bleu) et **29** (en orange : utilisation d'une lampe de 300 W ; en marron : utilisation d'une lampe de 60 W ; spectre enregistré après 2 h de réaction)

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

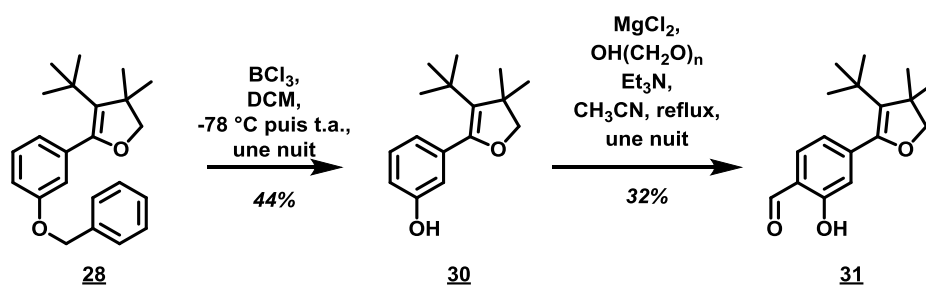


Figure II.61 : Synthèse du dérivé aldéhyde **31**

La synthèse de notre cœur phénol s'est poursuivie avec une déprotection du groupement benzyl sur le composé **28**. Afin d'éviter une réduction du cycle dihydrofurane, nous avons opté pour une autre méthode de débenzylation qui met en jeu le trichlorure de bore dans le dichlorométhane. Le phénol **30** est alors obtenu avec un rendement modéré de 44 %. Le bras permettant l'accroche au fluorophore relais peut alors être introduit. Nous avons donc suivi la méthode de formylation précédemment optimisée (*vide supra*) et le dérivé aldéhydique **31** est obtenu avec un rendement moyen de 32%.

A ce niveau, deux options se sont présentées : soit nous procédons à l'introduction directe du substrat réactif vis-à-vis d'un analyte d'intérêt, soit cette introduction est réalisée après mise en place du motif réactif vis-à-vis de l'insertion du fluorophore (*i.e.* insertion d'un halogène (atome de chlore ou de brome) en lieu et place de l'aldéhyde). Cette seconde approche permet de fonctionnaliser le phénol en toute dernière étape, et permet donc d'avoir des synthèses plus convergentes quelques soient les groupes déclencheurs et les cibles biologiques choisis. Nous avons donc tenté, en premier lieu, la deuxième approche. Ainsi, le molécule non protégé **31** est engagé dans une étape de réduction en présence de borohydrure de sodium (NaBH_4) dans le méthanol pour fournir le diol **32**. Ce dernier est par la suite mis en réaction avec du chlorure de thionyle dans le dichlorométhane pour fournir le dérivé chloré **33**. Cependant, ces conditions ne nous ont pas permis d'obtenir le composé **33** souhaité, seul un mélange de composés inexploitable est observé. Ceci a remis en doute la viabilité d'une réaction permettant la formation d'un dérivé chloré en position benzylique sur un phénol non protégé. N'ayant pas abouti au composé désiré nous donc avons décidé d'opter pour la première approche.

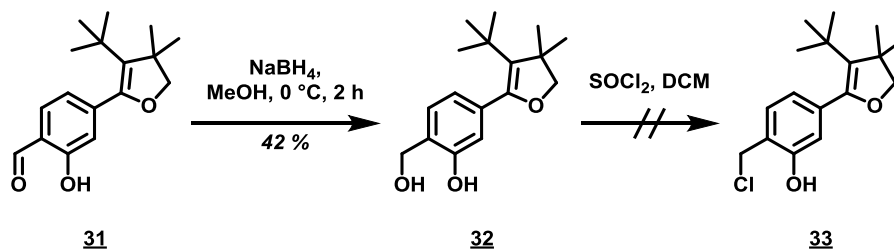


Figure II.62 : Essai de synthèse du composé **33**

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

1.2 Choix et introduction d'un déclencheur de chimiluminescence

Comme indiqué en début de chapitre, nos sondes ont pour objectif d'être applicables à différents types de détection d'activité enzymatique (phosphatase, nitroréductase, protéase ...). La stratégie présentée ci-dessus vise justement à faire varier facilement le motif réactif vis-à-vis de l'enzyme cible. En effet, l'absence de groupement protecteur sur le phénol **31** nous permet à ce stade d'introduire un groupement fonctionnel autorisant le déclenchement de chimiluminescence. Nous avons alors sélectionné trois types de déclencheurs : un groupement phosphate en vue de détecter une activité de type phosphatase, un dérivé silylé comme motif réactif des ions fluorures et un groupement nitrobenzyl pour la détection de nitro-réductase. Pour chacun de ces substrats, l'incorporation a été réalisée soit directement sur le phénol, soit à l'aide d'un bras réactif auto-immolable. En effet, il peut être préférable d'insérer un bras espaceur afin de minimiser l'encombrement stérique en vue d'optimiser la reconnaissance enzymatique et d'augmenter la stabilité de la sonde.^{129b, 132}

1.2.1 Introduction de groupement phosphates pour une détection de la phosphatase alcaline

L'objectif initial de ce projet reposait sur l'introduction d'un groupement phosphate permettant la détection de la phosphatase alcaline, enzyme modèle impliquée dans diverses pathologies telles que le scorbut et l'insuffisance hépatique sévère,¹⁴⁰ et enzyme reporthrice utilisée dans de nombreux tests enzymoimmunologiques.⁷⁴ Pour cela, nous avons envisagé tout d'abord une stratégie simple impliquant une réaction de phosphorylation de notre phénol **31** mettant en jeu des groupements phosphates protégés, avant d'introduire le fluorophore via la réduction et activation de la fonction aldéhyde (Figure II.63). L'alcool **35** obtenu sera alors engagé dans une étape de substitution nucléophile de type SN2 permettant l'introduction d'un atome de chlore. La déprotection du groupement phosphate sera par la suite envisagée pour conduire à l'intermédiaire **37**. Après insertion du fluorophore sur cet intermédiaire, suivi de la réaction de cyclisation [2+2], la sonde à motif 1,2-dioxétane **38** désirée peut être obtenue. Cette stratégie permet également d'avoir un minimum de flexibilité quant à l'étape de déprotection du phosphate. Dans l'idéal, et dans le cas de l'introduction d'un motif de type DOTA chélatant des lanthanides, l'étape de déprotection des phosphates pourrait être concomitante à celle de la déprotection des acides carboxyliques de la cage DOTA (i.e. par utilisation du TFA).

¹⁴⁰ Z. Lu, J. Wu, W. Liu, G. Zhang, P. Wang *RSC Advances* **2016**, *6*, 32046.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

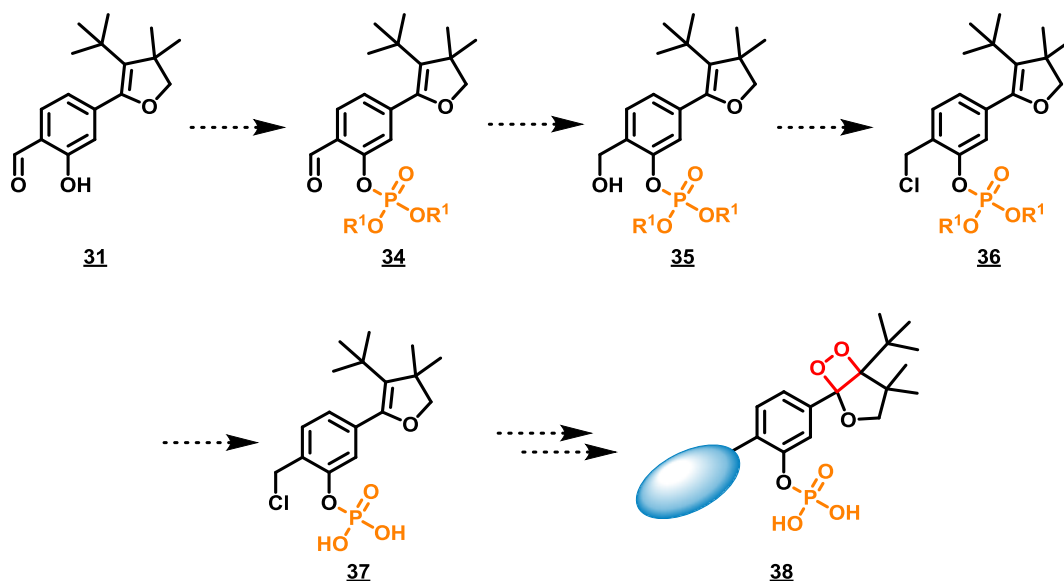


Figure II.63 : Représentation schématique de la synthèse de la sonde à phosphatase alcaline

Ce premier modèle **38** présente l'avantage d'avoir un substrat chargé (phosphate), ce qui devrait participer à améliorer l'hydrosolubilité de la sonde. De plus, la phosphatase alcaline présente l'avantage de pouvoir être détectée à un pH légèrement basique (9.0), ce qui devrait, dans un premier temps, permettre de minimiser les problèmes de déprotonation du phénol, avant de travailler dans un second temps sur les modifications structurales du phénol pour diminuer son pKa. Notons que le choix du groupement protecteur R^1 du phosphate est un facteur déterminant sur la viabilité de la sonde **38**. Effectivement, nous avons pu observer durant notre étude que ce groupement a une forte influence sur la stabilité du squelette **34**, ce qui sera expliqué ci-après. Ainsi, différents dérivés phosphates ont été synthétisés. Toutefois, le phénol **31** étant un composé à haute valeur ajoutée, nous avons en premier lieu procédé à des essais de phosphorylation sur une molécule modèle, le salicyaldéhyde. Celle-ci comporte des fonctions similaires à notre plateforme, à savoir un aldéhyde en position *ortho* d'un phénol. Ceci nous a particulièrement aidé à anticiper les problèmes pouvant survenir lors des réactions de phosphorylations qui emploient souvent des conditions drastiques, notamment lors des étapes de déprotection des groupements phosphates choisis, et qui peuvent poser des problèmes d'orthogonalité vis-à-vis de notre synthèse. Comme représenté en Figure II.64, notre attention s'est portée sur les groupements de type diéthylphosphate et di-*tert*-butyle phosphate.

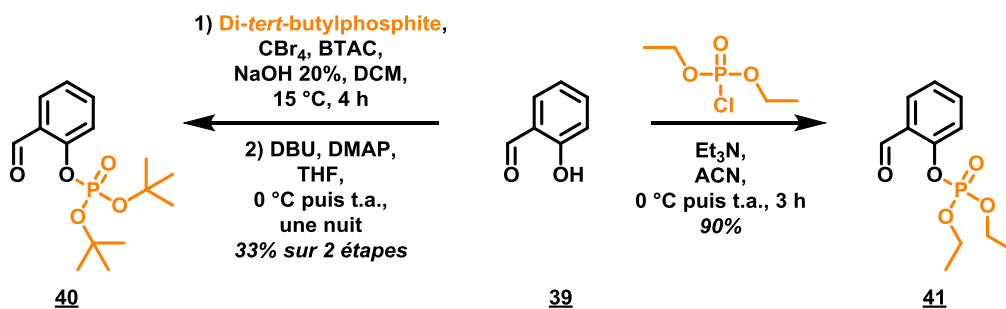


Figure II.64 : Synthèse de phénols phosphorylés modèles

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Ainsi, le dérivé tert-butyle phosphate **40** a pu être obtenu avec un rendement de 33% sur deux étapes. En effet, le bromure de di-tert-butyle phosphate est préparé en amont, par réaction du di-tert-butylphosphite avec de la soude et du tétrabromométhane dans le dichlorométhane et en présence d'un agent de transfert de phase, le chlorure de benzyltriéthylammonium (BTAC).¹⁴¹ Il est par la suite engagé (i.e. sans purification) dans la réaction de phosphorylation du phénol sur le composé **39** en présence de DBU et de diméthylaminopyridine (DMAP) dans le THF.¹⁴¹ Le dérivé diéthylphosphate **41** est, lui, obtenu en une étape en mettant en réaction le chlorure de di-éthyl chlorophosphate avec le salicyaldéhyde en présence de triéthylamine dans l'acétonitrile.¹⁴² Ayant obtenu des résultats satisfaisants sur ces deux exemples de phosphorylations, nous avons poursuivi les essais de phosphorylations directement sur le phénol **31** (Figure II.65).

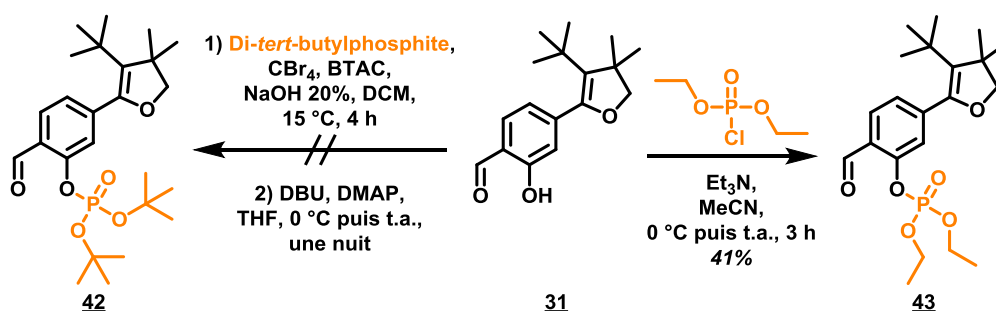


Figure II.65 : Synthèses des phosphates **42** et **43**

Les conditions permettant d'insérer le phosphate di-tertbutylique n'ont malheureusement pas permis d'obtenir le composé **42** souhaité en raison des problèmes de reproductibilité de la formation du bromophosphate correspondant. Cet échec peut également s'expliquer par l'instabilité (i.e. à la suite d'une hydrolyse spontanée, puis dégradation) du dérivé phosphate. En effet, durant cette étude nous avons observé la dégradation d'un composé similaire portant une fonction aldéhyde en position *para* du phénol (voir ci-après). Nous nous sommes alors orientés vers la phosphorylation en présence du chlorure de diéthylphosphate, conditions utilisées pour le composé **41**. Le phosphate **43** a ainsi pu être obtenu avec un rendement moyen de 41%. Ce faible rendement s'explique par la difficulté de purification des différents produits formés au cours de la réaction de phosphorylation. L'incorporation de ces phosphates a été réalisée en parallèle sur un bras réactif auto-immolable afin de vérifier la stabilité et l'influence de cette modification sur l'efficacité de notre sonde finale. Comme bras espaceur, nous avons choisi un dérivé de l'alcool *para*-hydroxybenzylique (PHBA). Après reconnaissance et hydrolyse du motif phosphate par l'enzyme, celui-ci suit un mécanisme d'élimination de type 1,6 et libère le phénolate nécessaire à la chimiluminescence (Figure II.66).

¹⁴¹ W. R. Baker, M. Stasiak *WO2005063777A1*, **2005**, 82 pp.

¹⁴² X. Lin, T. W. Doyle, I. King *US20040254103A1*, **2004**, 33 pp.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

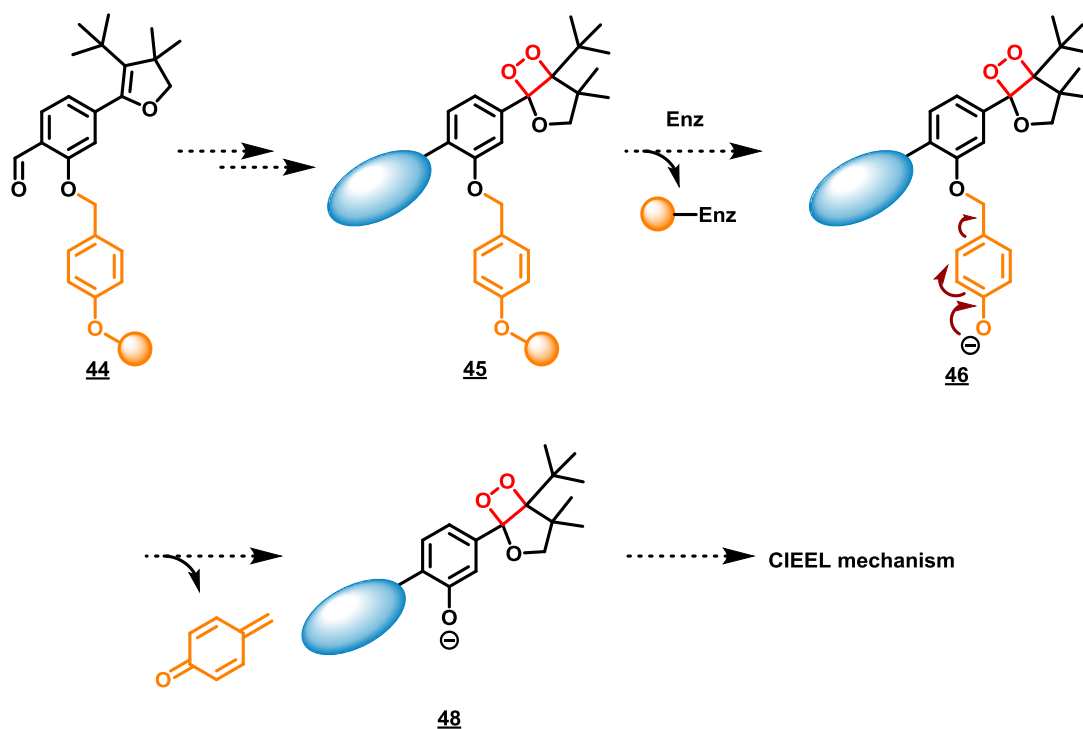


Figure II.66 : Représentation schématique du mécanisme d'élimination du bras réactif auto-immolable suite à une activation enzymatique

Par ailleurs, le bras PHBA rend la variation du déclencheur plus flexible, notamment *via* une liaison de type éther et présente l'avantage d'être disponible commercialement. Dans notre cas, l'utilisation directe du bras PHBA pour une incorporation du déclencheur n'était pas envisageable. Effectivement, la présence de deux alcools sur la molécule nous empêche de contrôler la régiosélectivité de la phosphorylation. Nous avons donc débuté la synthèse de ces bras réactifs avec le *para*-hydroxybenzaldéhyde **48** commercial (Figure II.67). Nous avons commencé avec une insertion du di-*tert*-butylphosphate selon les conditions appliquées pour les phosphates **40** et **41**, cependant le composé **49** n'a pas pu être isolé en raison d'une instabilité possiblement identique à celle que nous venons d'évoquer. Nous avons donc abandonné cette voie au profit d'autres conditions de phosphorylation. Ainsi, les mêmes conditions de phosphorylation que pour les phosphates **41** et **43** ont été appliquées sur l'alcool **48** et nous ont permis d'accéder au diéthylphosphate **49** avec un rendement modeste de 45%.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

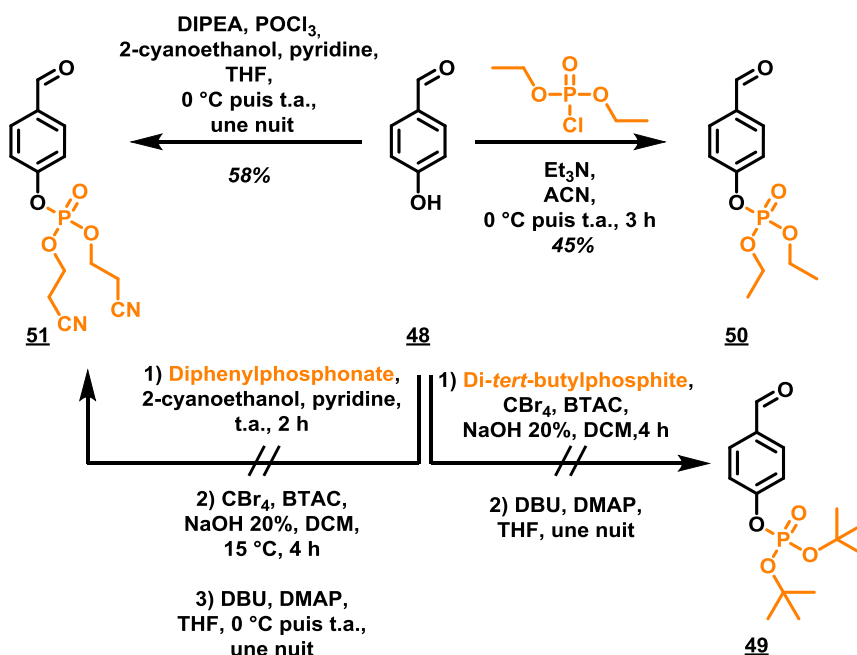


Figure II.67 : Réactions de phosphorylation sur l'aldéhyde **48**

Un autre type de phosphorylation a également été essayé. Il consiste à introduire un bis(2-cyanoéthyl)phosphate facilement clivable en milieu basique. Nous avons alors exploré deux méthodes de phosphorylation. La première, réalisée en trois étapes, commence par une transestérification du diphenyl *H*-phosphonate par réaction avec le 2-cyanoéthanol en présence de pyridine pour fournir le bis(2-cyanoéthyl) *H*-phosphonate.¹⁴³ Afin de faciliter la réaction de phosphorylation du phénol **48**, nous avons souhaité convertir ce dialcyl *H*-phosphonate en un bromophosphate, à l'image des conditions de formation du dérivé *tert*-butylbromophosphate **40**. Cependant, au cours de cette réaction, aucune formation du composé désiré n'a été observé. Nous avons vu par ailleurs que la formation d'halogénophosphates à partir de phosphites correspondants peut s'avérer difficile. Toutefois, comme l'indique la Figure II.67 et ce de façon intéressante, la deuxième méthode nous a permis de rebondir sur cet échec. En effet, cette voie, qui est une synthèse de type « one pot », fait intervenir l'oxychlorure de phosphore (POCl₃) qui permet de phosphoryler le phénol **48** en présence de DIPEA.¹⁴⁴ Le phosphate intermédiaire réagit ensuite avec le 2-cyanoéthanol, ajouté en large excès en présence de pyridine, formant ainsi le phosphate **51** avec un rendement de 58%.

Ces phosphates seront introduits sur le phénol **31** *via* une liaison éther selon un mécanisme de type SN2. Dans le cas du phosphate **50**, nous avons, pour cela, réduit la fonction aldéhyde par du tétraborohydrure de sodium (NaBH₄) pour former l'alcool benzylique **52** avec un bon rendement de 73% (Figure II.68). Par la suite, celui-ci est converti en un meilleur groupe partant soit sous la forme de bromure de benzyle soit sous la forme d'un dérivé mésylate. Ainsi les composés **53** et **54** sont obtenus avec des rendements respectifs de 38% et 58%. Le dérivé bromé **53** est directement engagé dans une

¹⁴³ A. Kers, I. Kers, J. Stawiski, M. Sobkowski, A. Kraszewski *Synthesis* **1995**, 1995, 427.

¹⁴⁴ H. Akhavan-Tafti *US5772926A*, **1998**, 32 pp.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

étape d'alkylation avec le phénol **31** en présence de carbonate de potassium dans l'acétone pour former le composé **55** avec un rendement de 72%.

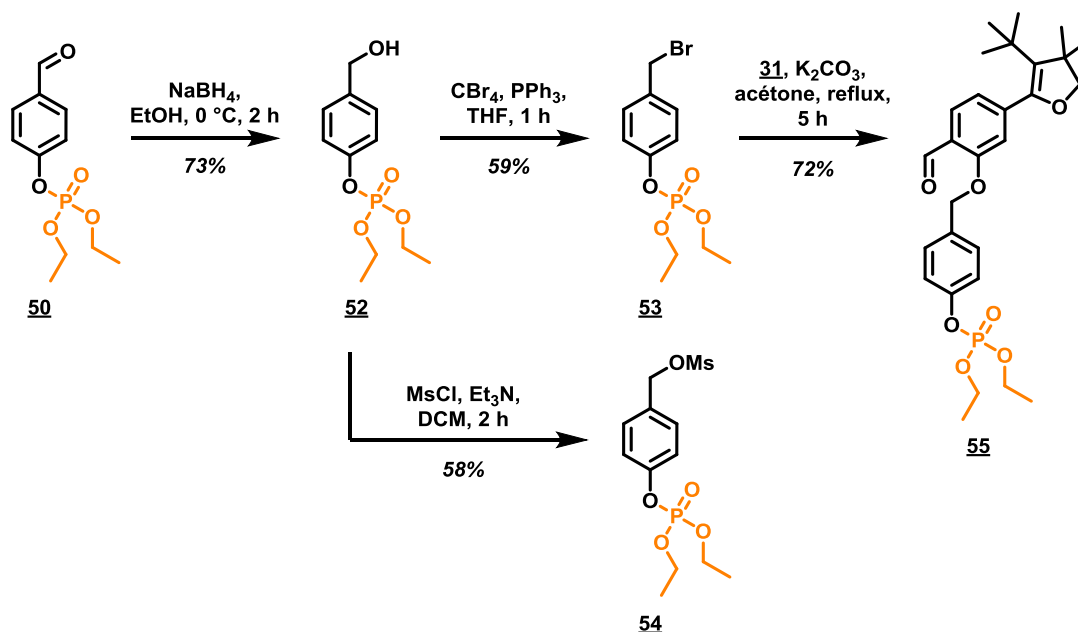


Figure II.68 : Synthèse des composés **54** et **55**

Par manque de temps, cette séquence réactionnelle n'a malheureusement pas pu être terminée aussi bien sur le composé **55** que sur le composé **51**. En parallèle, devant les difficultés rencontrées lors des étapes de phosphorylation, nous avons aussi étudié la possibilité d'introduire un groupement silylé pour la détection d'ion fluorures.

1.2.2 Introduction de dérivés silylés pour une détection d'ions fluorures

Quelques exemples de la littérature décrivent le phénomène de chimiluminescence sur le motif 1,2-dioxétane pour la détection d'ions fluorures.¹⁴⁵ Nous avons donc poursuivi notre étude par insertion de dérivés silylés sur notre plateforme à cœur phénolique. Nous avons en premier lieu tenté d'introduire un silane directement sur le phénol (Figure II.69).

¹⁴⁵ Pour des publications récentes sur la détection d'ions fluorures par chimiluminescence voir : a) I. S. Turan, E. U. Akkaya *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1680. b) I. S. Turan, O. Seven, S. Ayan, E. U. Akkaya *ACS Omega* **2017**, *2*, 3291.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

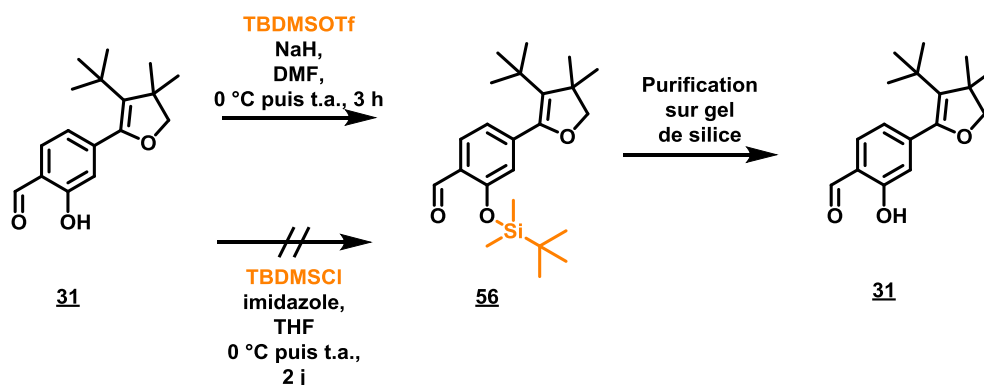


Figure II.69 : Synthèse du composé **56**

Les conditions impliquant le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle et l'imidazole dans le THF anhydre ne nous ont, cependant, pas permis d'obtenir le composé **56** souhaité. Néanmoins, lorsque l'aldéhyde **31** réagit avec le triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence d'hydrure de sodium dans le DMF anhydre, le phénol silylé **56** se forme. Malheureusement, lors de la purification de ce dernier sur silice, le phénol est spontanément déprotégé. Pour pallier ce problème, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'un bras réactif auto-immolable de type PHBA précédemment utilisé (*vide supra*). Ainsi, le phénol **48** est protégé sous forme d'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle via le TBDMSOTf en présence de triéthylamine dans le THF. Le composé **57**, alors obtenu avec un rendement de 53%, est directement engagé dans une étape de réduction dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour fournir l'alcool **59** correspondant. Le phénol **48** a également été protégé par un *tert*-butyldiphénylsilyle au moyen du TBDPSCI en présence d'imidazole dans le dichlorométhane pour fournir le composé **58** avec un rendement quantitatif.

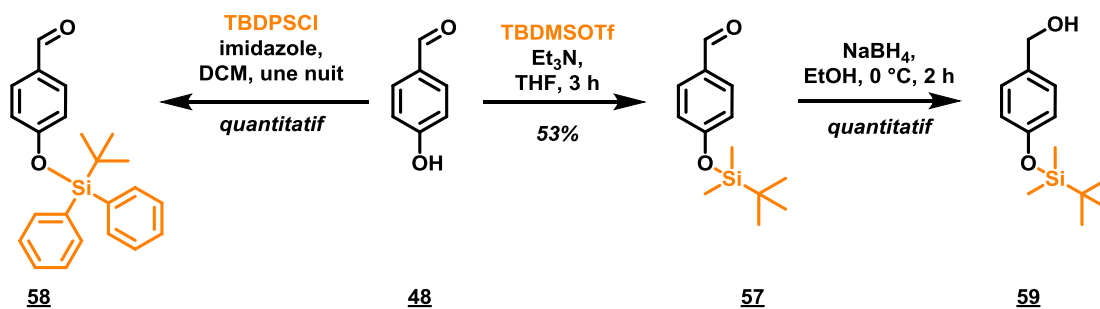


Figure II.70 : Synthèse des dérivés silylés **58** et **59**

Il ne reste qu'à réaliser une étape de bromation sur le composé **59** avant de l'introduire sur l'aldéhyde **31** via une réaction de substitution nucléophile de type S_N2 (Figure II.71). De même, pour obtenir le composé équivalent portant le groupement *tert*-butyldiphénylsilyl, l'aldéhyde **58** doit être engagé dans la même suite réactionnelle que son homologue **57**. Cette stratégie est actuellement en cours d'exploration.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

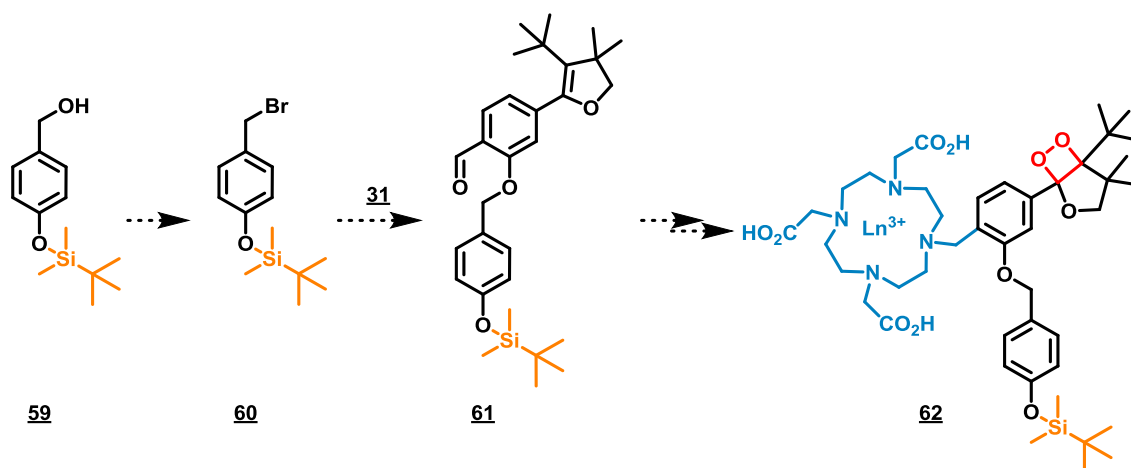


Figure II.71 : Représentation schématique de la synthèse de la sonde 62 visée

1.2.3 Introduction d'un groupement nitro *via* un bras auto-immolable pour une détection de la nitro-réductase

Au cours de ce projet et en vue des difficultés synthétiques rencontrées, nous avons cherché à insérer un substrat enzymatique simple et pour lequel peu d'exemples de chimiluminescence sont décrits. Nous nous sommes alors dirigés vers la détection de nitroréductases qui présentent diverses applications dont la détection d'hypoxie cellulaire, application qui nous a semblé être la plus intéressante. En effet, l'hypoxie traduit une pression anormalement basse en dioxygène en raison d'anomalies vasculaires et d'une prolifération anarchique des cellules tumorales (Figure II.72).¹⁴⁶ Elle s'accompagne généralement d'une surexpression en enzymes réductrices intracellulaires, telles que les nitroréductases (NTR), DT-diaphorases ou encore azoréductases, qui participent à l'activation sélective de molécules fonctionnelles qui leur sont spécifiques.¹⁴⁷ L'hypoxie correspond donc un marqueur pathogène pour de nombreux cancers, en particulier les cancers à tumeurs solides.

¹⁴⁶ a) S. Luo, R. Zou, J. Wu, M. P. Landry *ACS Sens.* **2017**, 2, 1139. b) X. Sun, G. Niu, N. Chan, B. Shen, X. Chen *Mol. Imag. Biol.* **2011**, 13, 399.

¹⁴⁷ a) S. Danson, T. H. Ward, J. Butler, M. Ranson *Canc. Treat. Rev.* **2004**, 30, 437. b) Y. Li, Y. Sun, J. Li, Q. Su, W. Yuan, Y. Dai, C. Han, Q. Wang, W. Feng, F. Li *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 6407.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

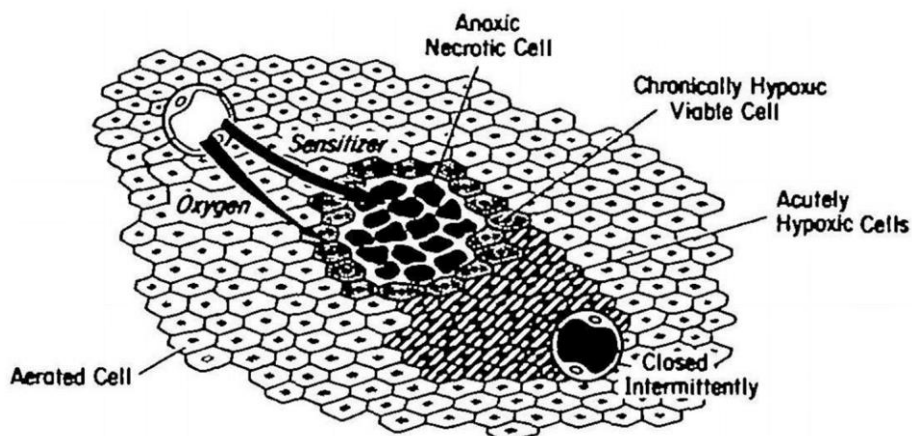


Figure II.72 : Schéma représentatif d'hypoxie cellulaire¹⁴⁸

Ainsi, depuis une vingtaine d'années, différentes techniques d'imagerie comme la TEP ou la TEMP ont été employées afin de mesurer la teneur en dioxygène au sein des tumeurs solides^{146b,149} et récemment les efforts se sont particulièrement concentrés sur l'utilisation de techniques d'imagerie non invasives telles que la fluorescence. En effet, nous avons vu dans le Chapitre I.I que cette technique est plus intéressante de point de vue sécurité (*i.e.* utilisation de molécules non radioactives) ainsi que dans sa mise en place. Ceci a contribué au développement de nombreuses sondes fluorogéniques pour la détection de tumeurs hypoxiques *via* activation enzymatique.¹⁵⁰ Par ailleurs, la concentration en NTR est directement reliée au degré d'hypoxie dans les tumeurs solides.¹⁵¹ Ainsi, mesurer la concentration en NTR peut être une solution pour évaluer le degré d'hypoxie d'une tumeur. Les motifs nitroaromatiques (*e.g.* nitroimidazole, nitrobenzyl, ...) ont donc suscité un grand intérêt en raison de leur forte affinité électronique et de leur réactivité vis-à-vis de la NTR. Ils sont à la base du développement de sondes visant la détection d'hypoxie cellulaire par activation de la NTR en condition *in vivo*.¹⁵² La Figure II.73 illustre le métabolisme des composés à motif nitro en présence (normoxie) et en absence (hypoxie) de dioxygène. Ainsi, nous pouvons voir qu'en normoxie, les réductases convertissent le groupement nitro en son anion radical, en présence d'un donneur d'électron (*i.e.* NADPH ou NADH issu de la chaîne respiratoire). Cet anion radical est oxydé en retour par l'oxygène moléculaire présent dans les cellules qui, lui, est réduit en anion superoxyde puis en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD).^{152d} En revanche, si une hypoxie a lieu, la forme anion radical du groupement nitro est produite de façon surabondante et est spontanément réduite par la

¹⁴⁸ C. N. Coleman *J. Natl. Cancer Inst.* **1988**, *80*, 310.

¹⁴⁹ J. Pacheco-Torres, P. López-Larrubia, P. Ballesteros, S. Cerdán *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 1.

¹⁵⁰ a) K. Tanabe, N. Hirata, H. Harada, M. Hiraoka, S. i. Nishimoto *ChemBioChem* **2008**, *9*, 426. b) W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano, K. Hanaoka *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13028.

¹⁵¹ K. Okuda, Y. Okabe, T. Kadonosono, T. Ueno, B. G. M. Youssif, S. Kizaka-Kondoh, H. Nagasawa *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 324.

¹⁵² Pour quelques exemples de sondes fluorogéniques utilisées pour la détection de nitroréductase, voir : a) E. Nakata, Y. Yukimachi, H. Kariyazono, S. Im, C. Abe, Y. Uto, H. Maezawa, T. Hashimoto, Y. Okamoto, H. Hori *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6952. b) K. Kiyose, K. Hanaoka, D. Oushiki, T. Nakamura, M. Kajimura, M. Suematsu, H. Nishimatsu, T. Yamane, T. Terai, Y. Hirata, T. Nagano *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15846. c) Z. Li, X. Li, X. Gao, Y. Zhang, W. Shi, H. Ma *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3926. d) R. B. P. Elmes *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8935.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

NTR pour former des produits hautement réactifs pouvant se lier de façon irréversible à des nucléophiles cellulaires (*i.e.* les molécules d'eau, les protéines et l'ADN).

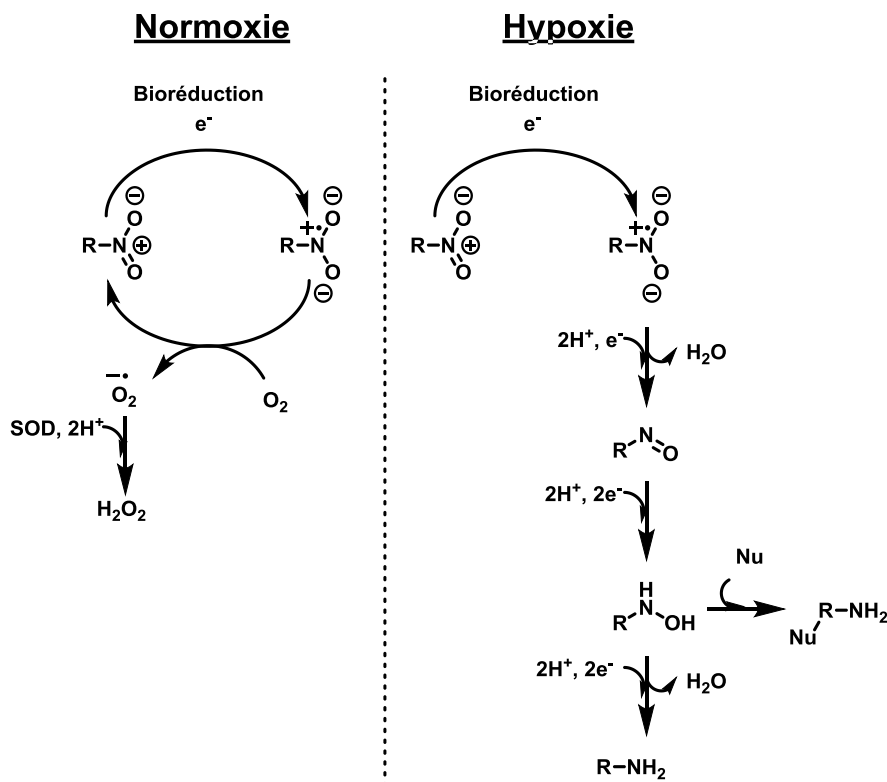


Figure II.73 : Représentation schématique proposant le métabolisme de bioréduction des molécules à groupement nitro

Nous nous sommes donc intéressés à cette enzyme modèle. La méthode de choix, qui a fait ses preuves dans ce domaine, est l'alkylation du motif phénolique par un motif de type nitro-aryl comme le groupement *para*-nitrobenzyl par exemple. Son utilisation pour la conception de sondes fluorogéniques a d'ailleurs été largement étudiée au laboratoire.¹⁵³ Son dérivé bromé était donc disponible et ce en quantité suffisante pour notre étude. Une activité de type nitroréductase sur ce dérivé nitrobenzyle conduirait donc à l'obtention d'une aniline correspondante (Figure II.74). Puis, via un mécanisme d'élimination de type 1,6 semblable à celui observé lors de l'auto-immolation des motifs PABA et PHBA, notre plateforme phénolique s'en retrouverait libérée.

¹⁵³ Chevalier, A. Développement de nouveaux outils chimiques pour la synthèse de sondes optiques fluorogéniques pour la détection d'activité enzymatiques en milieu biologique. Université de Rouen, Thèse de doctorat soutenue en 2014

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

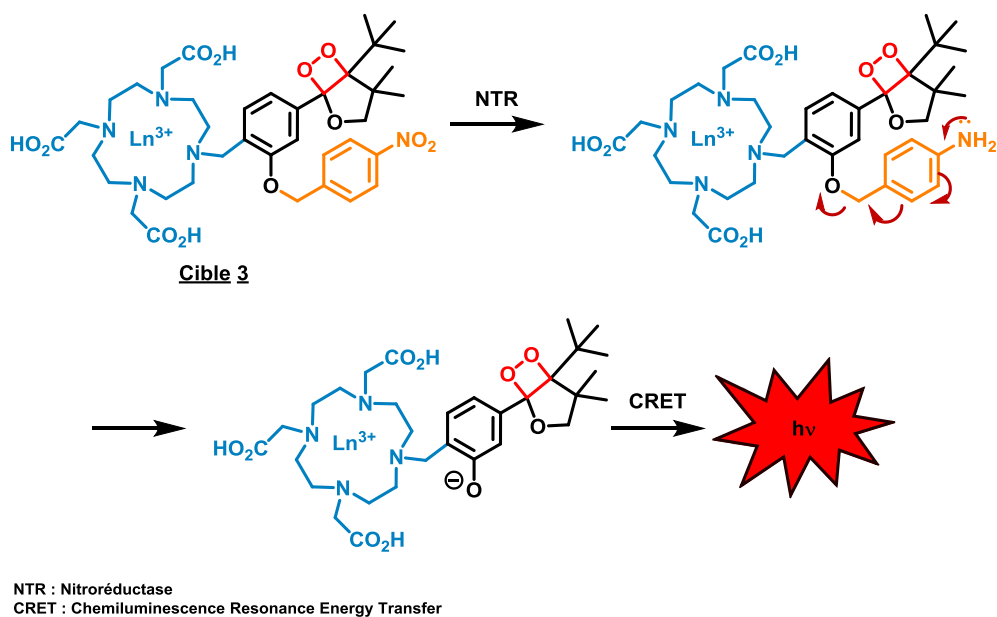


Figure II.74 : Représentation schématique de l'activation de la NTR par la cible 3

Ainsi, le phénol **31** est alkylé par le bromure de nitrobenzyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile à reflux (Figure II.75). Le dérivé benzylique **63** résultant est par la suite engagé dans une réaction de réduction par le NaBH₄ dans un mélange 6 : 1 de MeOH/DCM pour fournir l'alcool benzylique **64**. Cette position benzylique est ensuite activée sous forme de bromure au moyen du tétrabromométhane en présence de triphénylphosphine dans le dichlorométhane. Le dérivé bromé **65** est alors obtenu avec un rendement de 63%.

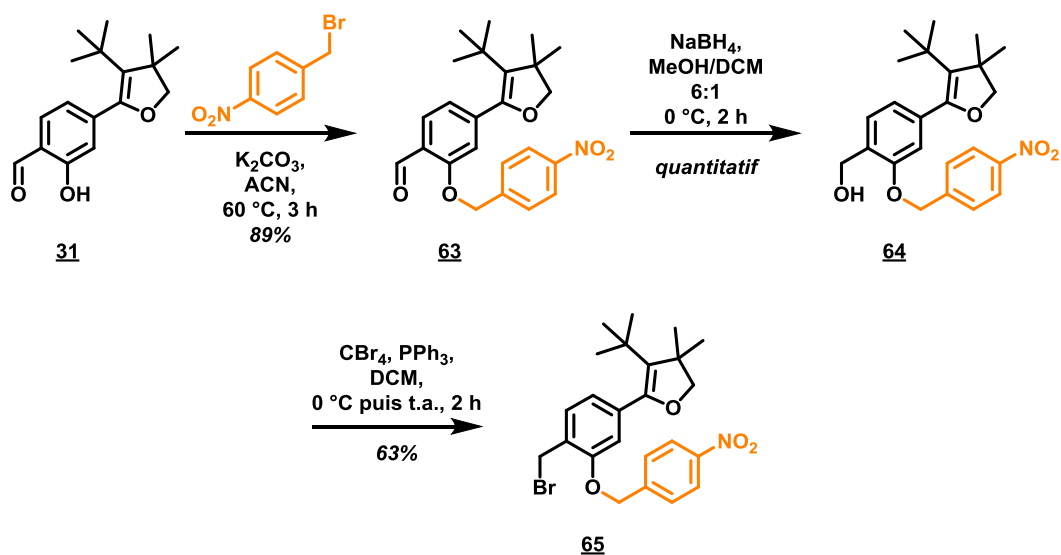


Figure II.75 : Synthèse du dérivé bromé **65**¹⁵⁴

¹⁵⁴ L'ensemble de cette stratégie a été réalisée dans le cadre du stage post-doctoral du Dr. A. Chevalier.

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Il est donc possible à ce stade d'introduire un fluorophore relais sur notre plateforme phénolique.

1.3 Extension de la chimiluminescence vers le proche infra-rouge : utilisation du cœur phénolique comme antenne par introduction d'un complexe de lanthanide

Rappelons que le but de notre étude est de déclencher de la chimiluminescence *in vivo*, il est donc nécessaire de rendre notre plateforme à la fois hydrosoluble et luminescente dans le proche IR. Cependant, il est difficile d'apporter de l'hydrosolubilité sur le phénol **65**, cela revient à revisiter notre stratégie de départ. Le fluorophore à introduire doit donc fournir cette hydrosolubilité manquante. Comme indiqué dans la partie I.2 de ce chapitre, les complexes de lanthanide sont fortement étudiés pour leurs propriétés fluorogéniques, notamment grâce à leur capacité d'émission dans le proche IR voire le rouge lointain, notre choix s'est donc porté sur ces entités. Le cyclène que nous avons sélectionné a la particularité d'apporter de l'hydrosolubilité grâce à ses chaînes acides. De plus, l'insertion du cyclène en position *ortho* du phénol permettrait potentiellement d'abaisser le pK_a de ce dernier *via* complexation du phénolate sur le lanthanide. Effectivement, celui-ci possède 9 sites de coordination : 7 sont utilisés pour la complexation au cyclène, il en reste donc potentiellement 2, qui en général sont occupés par des molécules d'eau. Rappelons que les molécules d'eau, diminuent, généralement, le rendement quantique de fluorescence global du lanthanide (vide supra partie Chapitre II.1.2). La présence du phénol aurait alors potentiellement trois effets : servir d'antenne pour le lanthanide ; remplacer une molécule d'eau par le phénolate, et donc augmenter la luminescence intrinsèque du lanthanide et enfin diminuer le pK_a du phénol par complexation au lanthanide. Ceci pourrait donc optimiser le mécanisme de chimiluminescence. En vue des résultats présentés précédemment, nos efforts se sont concentrés sur des stratégies synthétiques n'impliquant que des composés issus de la molécule **63**, visant une détection de la nitro-réductase. L'ensemble de cette stratégie a été réalisée en étroite collaboration avec le Dr. Arnaud Chevalier durant son stage post-doctoral.

Ainsi, afin d'accéder rapidement à la sonde chimiluminescente désirée, nous avons tenté en premier lieu de réaliser l'insertion du DO3AtBu par amination réductrice sur l'aldéhyde **63** (Figure II.76). Celui-ci a donc été mis en réaction avec le DO3AtBu dont les acides carboxyliques sont protégés par des groupements *tert*-butyle et en présence de triacétoxyborohydrure de sodium ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$) dans le dichlorométhane. Cependant, aucune conversion n'a été observée et seul le composé de départ **63** a été récupéré.

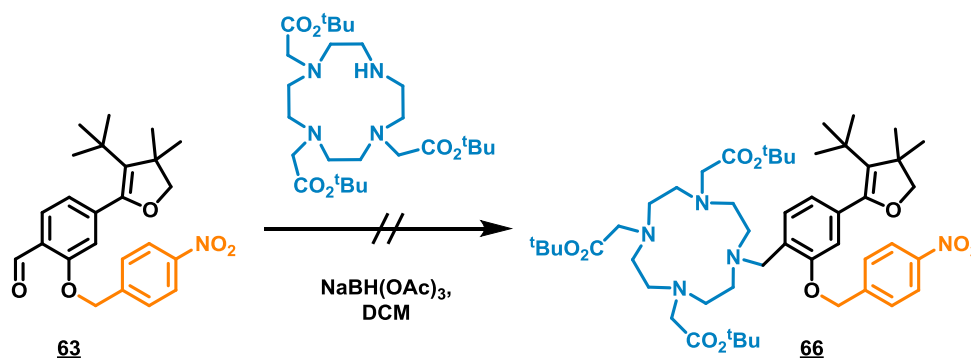


Figure II.76 : Essai de synthèse du composé **66** par amination réductrice de l'aldéhyde **63**

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Nous avons donc repris la synthèse avec le dérivé bromé **65** qui est mis en réaction avec le tert-butyl ester du DOTA en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile pour fournir le composé **66** avec un rendement moyen de 56% (Figure II.77). Les acides du DOTA sont par la suite déprotégés par l'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile, ce qui nous permet d'obtenir le triacide **67** avec un rendement de 84%.

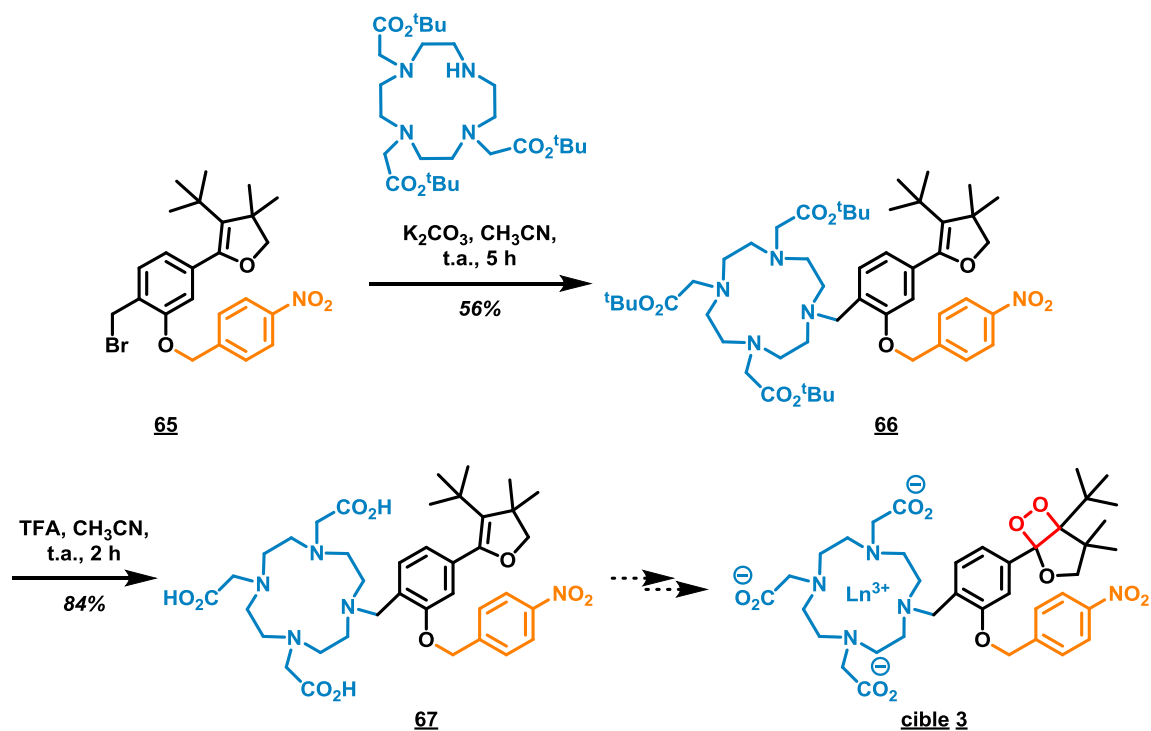


Figure II.77 : Synthèse du composé **67**

Pour atteindre notre **cible 3**, il nous reste à réaliser deux étapes : la complexation du DOTA à un lanthanide, suivie de la formation du motif 1,2-dioxétane par cycloaddition [2+2] en présence d'oxygène singulet. Ces étapes sont en cours de finalisation au laboratoire.

2. Conclusion et perspectives à ces travaux

Les travaux présentés dans ce chapitre nous ont permis de mettre en avant les défis synthétiques concernant la mise en place du chimiluminophore phénolique à 1,2-dioxétane comportant un motif dihydrofurane comme groupement stabilisant. La synthèse repose sur une méthodologie qui demande de nombreuses réflexions quant au choix du déclencheur et de l'entité fluorescente à introduire sur la plateforme, notamment en raison du nombre d'étapes conséquent (*e.g.* 19 étapes pour la **cible 3**). Néanmoins, nous avons pu amorcer la conception de sondes innovantes reposant sur un transfert d'énergie intramoléculaire. Concernant la **cible 3**, la synthèse est suffisamment avancée pour nous permettre prochainement de réaliser des mesures de chimiluminescences par activation de la nitroréductase.

Nous avons également montré la possibilité de réaliser la cycloaddition [2+2] menant à la formation du motif 1,2-dioxétane sur un motif phénol simple. Nous avons démontré à travers cet exemple que la stabilité du 1,2-dioxétane est visiblement amoindrie en présence d'un groupement benzylique comme groupement protecteur du phénol en lieu et place d'un groupement de type méthoxy, en référence aux nombreux exemples décrits par le Prof. Matsumoto.

Plusieurs perspectives à ces travaux sont envisageables, notamment sur la conception d'une plateforme facilement activable par le milieu biologique, par simple addition d'un groupement électroattracteur sur le phénol. En effet, comme évoqué dans le Chapitre I.IV.3, la formation de l'anion phénolate est nécessaire pour un déclenchement optimal de chimiluminescence. Or, à pH physiologique (pH = 7.4), la déprotonation instantanée de notre plateforme phénolique ne peut être effective. En effet, le phénol possède une valeur de pK_a de l'ordre de 9, l'équilibre phénol/phénolate est donc déplacé en faveur du phénol dans les conditions physiologiques. Néanmoins, cet équilibre peut être préférentiellement déplacé vers la formation du phénolate par addition d'un groupement électroattracteur sur le noyau aromatique, en position *ortho* du phénol, à l'image des exemples évoqués dans la première partie de ce chapitre (*i.e.* exemples des Prof. Lippert et Shabat dans lesquels un atome de chlore ou de brome ou de fluor est introduit sur le chimiluminophore). Une des perspectives de notre projet serait d'introduire, sur la plateforme **31**, un groupement fonctionnel permettant d'abaisser le pK_a du phénol (Figure II.78).

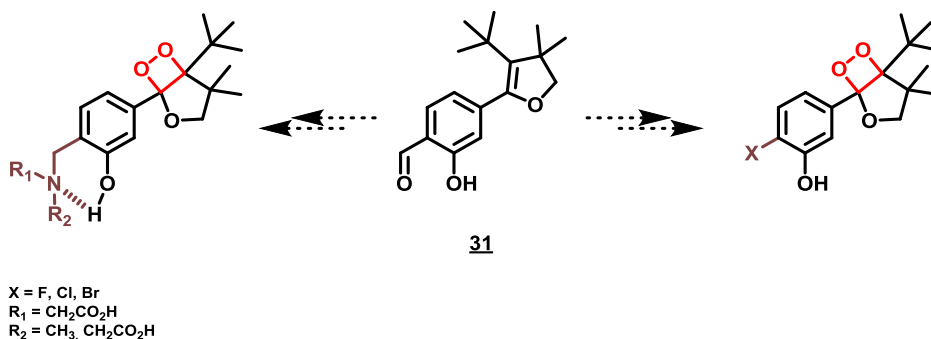


Figure II.78 : Représentation schématique de l'introduction d'un groupement électroattracteur visant une diminution du pK_a du phénol

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

Parmi les motifs ayant un pouvoir électroattracteur, les amines tertiaires (*e.g.* la sarcosine) constituent des bons compromis. En effet, par liaison hydrogène entre l'amine et l'atome d'hydrogène du phénol, le pK_a pourrait être suffisamment diminué pour un déclenchement en conditions physiologiques. De plus, dans le cas de la sarcosine et de ses dérivés ces amines pourraient, en supplément, augmenter l'hydrosolubilité de notre sonde finale. Deux stratégies synthétiques sont alors possibles : l'introduction de l'amine par une amination réductrice sur le phénol libre **31** ou le phénol protégé **63** (*e.g.* en présence de triacétoxyborohydrure de sodium ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$) et d'acide acétique). Les premiers essais préliminaires que nous avons entrepris suivant cette stratégie n'ont cependant pas donné de résultat probant. L'alternative serait de réutiliser le schéma synthétique que nous avons employé dans l'introduction du DOTA, suivant trois étapes à partir du composé **63** (Figure II.79). La synthèse de cette molécule plus simple permettrait de confirmer l'effet de cette benzylamine sur le pK_a du phénol, et, même si un fluorophore relais supplémentaire n'est pas présent, d'évaluer l'efficacité de la détection de nitroréductases, si nécessaire en présence d'enhancer.

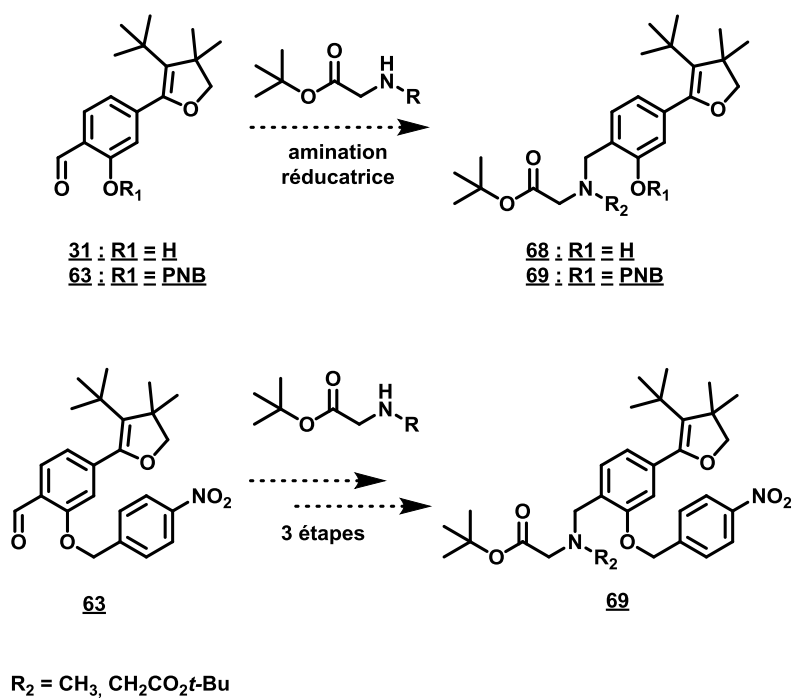


Figure II.79 : Essai de synthèse des composés **68** et **69**

Chapitre II. Développement de sondes chimiluminescentes à plateforme de type phénol pour une détection dans le proche IR

**Chapitre III. Développement de sondes
chimiluminescentes à cœur naphtholique : formation d'une
cassette « TBET » hydrosoluble**

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

I. Etat de l'art

Ce deuxième chapitre est consacré à la mise au point d'un nouveau système chimiluminescent à cœur naphtholique pour la détection d'activités enzymatiques (*e.g.* nitroréductase, phosphatase, ...). De même que présenté dans le chapitre Chapitre II.II, l'objectif de notre étude consiste à conjuguer notre plateforme chimiluminescente à une entité fluorescente. Ici, la méthode d'extension de luminescence dans le proche-IR (*i.e.* afin d'atteindre la « fenêtre d'imagerie » *in vivo*) repose sur l'introduction d'un fluorophore organique sur l'aromatique porteur du motif 1,2-dioxétane *via* une liaison de type acétylène. De cette façon, une luminescence par un transfert d'énergie à travers les liaisons de type *Through Bond Electron Transfer* (TBET, cf Chapitre I.IV.4.2 et Chapitre III.I.1.2) sera attendu. Dans cette partie, nous insisterons également sur les travaux fondés sur un squelette naphtol, et non plus phénol, qui permet déjà, à lui seul, de décaler légèrement les longueurs d'ondes d'émission du vert vers le jaune/orange. En amont d'une présentation des résultats obtenus, nous nous attacherons à décrire les quelques exemples marquants de la bibliographie notamment ceux impliquant les dioxétanes à squelette naphtol et la conception de cassettes chimiluminescentes de type TBET.

1. Présentation bibliographique

Dans cette partie 1, nous attacherons à décrire les quelques exemples de motifs 1,2-dioxétane à cœur naphtholique, benzofuranique ou benzothiophénique présentant directement des longueurs d'onde d'émission dans l'orange ou le proche infra-rouge, puis sur le principe du TBET. Et nous terminerons par une brève description de quelques modèles de benzophénoxazine hydrosolubles.

1.1 Exemples de fonctionnalisations des motifs 1,2-dioxétanes pour une extension de chimiluminescence vers le proche IR

1.1.1 Les sondes chimiluminescentes à cœur naphtholique

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, beaucoup d'études ont été réalisées sur les motifs 1,2-dioxétane à cœur phénolique. Pourtant, l'utilisation d'un chromophore à conjugaison plus étendue permet de moduler les caractéristiques photophysiques du chimiluminophore telles qu'un déplacement de l'émission par chimiluminescence vers le proche IR. Nous avons vu différentes approches à ce sujet, notamment celles impliquant la formation du motif 1,2-dioxétane sur des fluorophores aromatiques polycycliques. Si l'on se cantonne uniquement aux modèles du Prof. Schaap fondés sur le motif naphtol (Figure III.1), les rendements quantiques et les temps de demi-vie sont inférieurs à ceux des analogues de type phénol (*e.g.* **SAP-2** sur la Figure II.9) et la chimiluminescence observée atteint un maximum à 470 nm (*i.e.* valeur identique à celle des modèles fondés sur le motif phénol).¹⁵⁵ Notons tout de même que l'utilisation du naphtol comme chromophore permet

¹⁵⁵ a) A. P. Schaap *EP254051A2*, **1988**, 28 pp. b) A. P. Schaap, R. S. Handley, B. P. Giri *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 935. c) A. P. Schaap, T.-S. Chen, R. S. Handley, R. DeSilva, B. P. Giri *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1155.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

d'augmenter la stabilité thermique $t'_{1/2}$ du chimiluminophore (e.g. la sonde **SAP-11**¹⁵⁶ est thermiquement stable sur 18.5 années contre 3.8 années pour la sonde **SAP-13**), ce qui peut être un atout de point de vue synthétique.

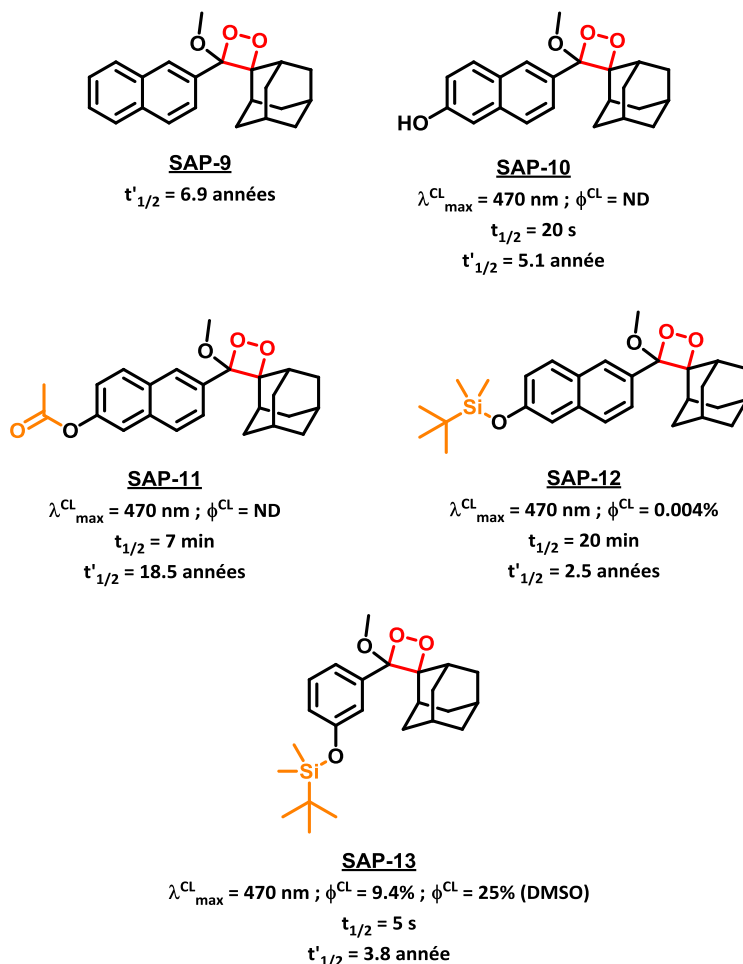


Figure III.1 : Représentation schématique des sondes à cœur naphtolique, proposées par le Prof. Schaap¹⁵⁵ [propriétés photophysiques mesurées dans l'acétonitrile sauf cas mentionnés ; dans le cas de la sonde **SAP-11** les mesures ont été réalisées en tampon phosphate (0.05 M) ou Tris (0.02 M) en présence la carboxyl estérase de foie de porc (3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pH 7.6, 25 °C]

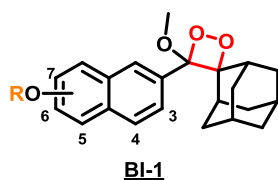
En 1990, la société TROPIX, première société qui commercialisait les substrats chimiluminescents sur la base des travaux du Pr Shaap (i.e. société depuis reprise par Lumigen), et plus particulièrement le groupe de la Dr. I. Bronstein a mis en avant la possibilité de moduler la longueur d'onde d'émission et le temps de demi-vie des chimiluminophores, par simple modification de la position du groupement hydroxyle vis-à-vis du motif 1,2-dioxétane.¹⁵⁷ Il a ainsi mené deux études à partir de sondes similaires

¹⁵⁶ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre III.1.1.1.1 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **SAP** pour Schaap Arthur Paul. La numérotation est la suite logique initiée dans le chapitre précédent

¹⁵⁷ a) B. Edwards, A. Sparks, J. C. Voyta, R. Strong, O. Murphy, I. Bronstein *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6225. b) B. Edwards, A. Sparks, J. C. Voyta, I. Bronstein *J. Biolumin. Chemilumin.* **1990**, *5*, 1.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

à celles élaborées par le Prof. Schaap et composées d'un déclencheur de type ester ou phosphate. Dans la première étude, le Dr. Bronstein choisit de déplacer le déclencheur sur les positions 6 et 7 du naphthalène pour un motif 1,2-dioxétane fixé en position 2 (Tableau III.1). Elle a ainsi observé un effet bathochrome (d'environ 50 nm) et des $t_{1/2}$ augmentés (*i.e.* de l'ordre de la demi-heure au lieu de quelques secondes) en position 7 par rapport à la position 6, pour chacun des déclencheurs. Elle introduit alors les termes « glow » et « flash » qui correspondent à des luminescences longues et courtes respectivement et que l'on associe aujourd'hui aux motifs « even » (*i.e.* pair) et « odd » (*i.e.* impair), respectivement.¹⁵⁸ Ces motifs « odd » et « even » correspondent au nombre d'atomes de carbone séparant la position du déclencheur (*i.e.* le groupement hydroxyle ou le substrat réactif vis-à-vis d'une enzyme ou d'un analyte d'intérêt) de celle du motif 1,2-dioxétane, incluant les atomes de carbone porteurs de ces groupements et de jonction de cycle. Cette notion, que nous aborderons de nouveau dans la suite de notre discussion, a son importance dans le choix du chimiluminophore en fonction de l'application visée. En effet, une luminescence de type « glow » permettrait de détecter des événements biologiques sur le long terme, à l'opposée d'une luminescence de type « flash » qui serait plus attractive pour une détection de (bio)analytes à des concentrations plus faibles.



Dioxétane	Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	$t_{1/2}$
BI-1a , R = Ac	6	459	15 s ^a
BI-1b , R = Ac	7	555	30 min ^b
BI-1c , R = PO ₃ Na ₂	6	463	9 s
BI-1d , R = PO ₃ Na ₂	7	550	23 min ^c

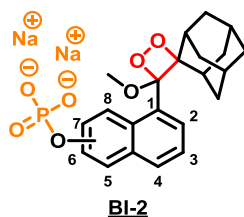
Tableau III.1 : Propriétés photophysiques des sondes de type **BI-1** [mesures réalisées dans ACN en présence de NaOCH₃ (75 mM, 450 μ L) ou dans 20% ACN dans l'eau en présence de NaOH (75 mM, 450 μ L), 25 °C, pour une concentration en sondes **BI-1a** et **BI-1b** de l'ordre de 5 mM ; mesures réalisées en tampon carbonate (0.05 M) contenant 1 mM MgCl₂, pH 9.5, 25 °C, en présence de phosphatase alcaline (2.2 μ g) pour une concentration en sondes **BI-1c** et **BI-1d** de l'ordre de 1.2 mM]^{157b}

En ce qui concerne la sonde de type **BI-2**,¹⁵⁹ les mesures ont été réalisées sur une plateforme naphtol contenant le motif 1,2-dioxétane fixé en position 1 et sur laquelle le déclencheur (*i.e.* un groupement phosphate) est placé en position 3 ou 6 (Tableau III.2). Une fois encore, le $t_{1/2}$ en est modifié et l'émission par chimiluminescence atteint son maximum (*i.e.* 560 nm) pour un déclencheur en position 6.

¹⁵⁸ N. Watanabe, H. Kobayashi, M. Azami, M. Matsumoto *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6831.

¹⁵⁹ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre II.I.1.1 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **BI** pour Bronstein Irena.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble



Dioxétane	Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	$t_{1/2}$
BI-2a	3	488	12 min
BI-2b	6	560	1 min 30

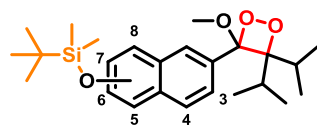
Tableau III.2 : Propriétés photophysiques des sondes **BI-2a** et **BI-2b** [mesures réalisées en tampon carbonate (0.05 M) contenant 1 mM MgCl₂, pH 9.5, 25 °C, en présence de phosphatase alcaline (0.25 pM) pour une concentration en sonde de l'ordre de 1.2 mM]^{157a}

Ces travaux ont fortement motivé le groupe du Prof. Matsumoto à mener des études approfondies sur l'influence de la position du groupement hydroxyle vis-à-vis du cycle 1,2-dioxétane.¹⁶⁰ Celui-ci est stabilisé cette fois par un groupement *gem*-di-isopropyl (*i.e.* les sondes **MM-12**¹⁶¹) ou un dihydrofurane (*i.e.* les sondes **MM-13** et **MM-14**), et le déclencheur (*i.e.* un groupement TBDMS) est déplacé sur les positions 3 à 8 (Tableau III.3). Concernant les sondes **MM-12**, les émissions par chimiluminescence varient considérablement, de 470 à 628 nm. Les rendements quantiques apparents sont également modifiés avec un maximum atteint pour un déclencheur placé en position 7 (*i.e.* $\phi^{\text{CL}} = 5.2\%$ pour le naphthalène **MM-12e**). Le Prof. Matsumoto a alors montré une relation avec l'effet « odd » / « even » : lorsque le dioxétane est en position 2, un motif impair (*i.e.* le déclencheur est positionné sur un atome de carbone du naphthalène numéroté impair) est associé à un rendement quantique et à une longueur d'onde élevés (à l'exception de la sonde **MM-12f** pour la longueur d'onde), ainsi qu'à une luminescence de type « flash », contrairement à un motif pair (Figure III.2).

¹⁶⁰ N. Hoshiya, N. Fukuda, H. Maeda, N. Watanabe, M. Matsumoto *Tetrahedron* **2006**, 62, 5808.

¹⁶¹ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre III.I.1.1.1 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **MM** pour Matsumoto Masakatsu. La numérotation est la suite logique initiée dans le chapitre précédent.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble



MM-12

Dioxétane	Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	ϕ^{CL} (%)	$t_{1/2}$ (s)	Effet « odd » / « even »
MM-12a	3	548	0.016	46	Pair
MM-12b	4	496	5.2	0.076	Impair
MM-12c	5	628	0.74	4.8	Impair
MM-12d	6	470	3.2×10^{-4}	0.15	Pair
MM-12e	7	558	5.6	250	Impair
MM-12f	8	560	0.037	0.24	Pair

Tableau III.3 : Propriétés photophysiques de la décomposition des sondes **MM-12a** à **MM-12f** [mesures effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde de l'ordre de 10 μ M pour **MM-12a**, **MM-12b**, **MM-12c**, **MM-12e** et **MM-12f**, et de 100 μ M pour **MM-12d** dans 1 mL de DMSO]^{158a, 160}

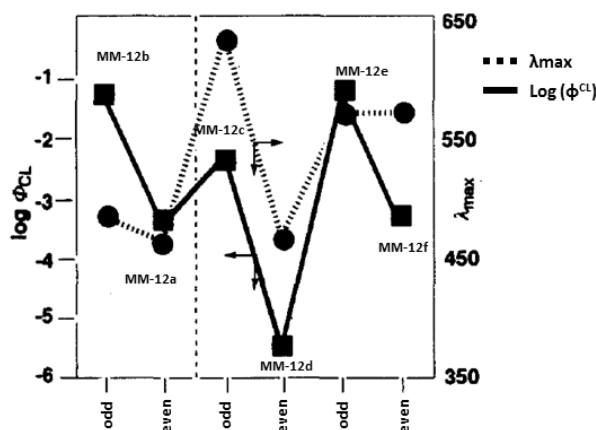
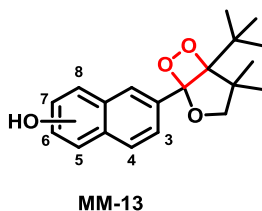


Figure III.2 : Représentation schématique de la relation entre l'effet « odd » / « even » et le rendement quantique de chimiluminescence ou la longueur d'onde d'émission appliquée aux naphthalènes **MM12**

Pour les sondes **MM-13**, le remplacement du groupement diisopropyl par un dihydrofurane ne modifie pas la longueur d'onde d'émission mais influence sur le rendement quantique et le temps de demi-vie de décomposition du motif 1,2-dioxétane (Tableau III.4). En effet, si nous comparons les sondes **MM-12a** et **MM-13a**, qui possèdent le groupement hydroxyl en position 3, nous pouvons remarquer une augmentation du rendement quantique et du $t_{1/2}$ d'un facteur 4. En revanche, pour les sondes **MM-13d** et **MM-13e** (*i.e.* analogues des naphthalènes **MM-12d** et **MM-12e**), le groupement dihydrofurane ne permet pas d'améliorer de façon significative les propriétés photophysiques. De façon étonnante, les positions 4 et 5 (*i.e.* pour les composés **MM-13c** et **MM-13d**) n'ont pas été étudiées.

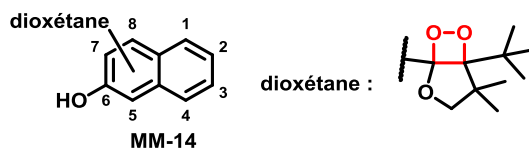
Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble



Dioxétane	Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	ϕ^{CL} (%)	$t_{1/2}$ (s)	Effet « odd » / « even »
MM-13a	3	551	0.066	170	Pair
MM-13b	4	ND	ND	ND	Impair
MM-13c	5	ND	ND	ND	Impair
MM-13d	6	470	0.0017	0.04	Pair
MM-13e	7	559	11	120	Impair

Tableau III.4 : Propriétés photophysiques de la décomposition des sondes **MM-13a** à **MM-13c** [mesures effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde de l'ordre de 10 μ M pour **MM-13a** et **MM-13c**, et de 100 μ M pour **MM-13b** dans 1 mL de DMSO]¹⁶⁰

Comme dernière expérience, le cycle 1,2-dioxétane est déplacé sur les positions 1 et 8 du 6-hydroxynaphthol (Tableau III.5). Le groupe du Prof. Matsumoto observe ainsi des rendements quantiques supérieurs à ceux des analogues **MM-13** et démontre de nouveau la relation entre l'effet « odd » / « even » et les valeurs de rendement quantiques (Figure III.3).



Dioxétane	Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	ϕ^{CL} (%)	$t_{1/2}$ (s)	Effet « odd » / « even »
MM-14a	1	582	1.7	19	Impair
MM-14b	8	516	6.8	220	Impair

Tableau III.5 : Propriétés photophysiques de la décomposition des sondes **MM-14a** et **MM-14b** [mesures effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde de l'ordre de 10 μ M dans 1 mL de DMSO]¹⁶⁰

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

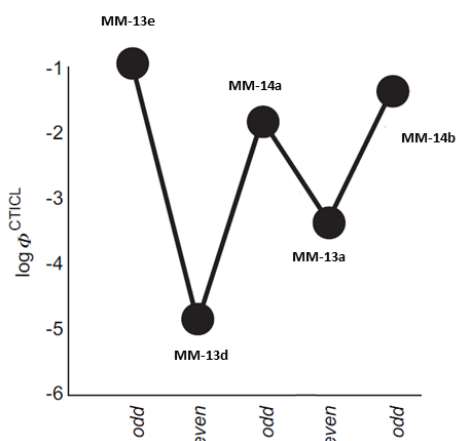


Figure III.3 : Représentation de la relation entre l'effet « odd » / « even » et le rendement quantique de chimiluminescence appliquée aux naphthalènes **MM13** et **MM-14**¹⁶⁰

Ainsi, à travers ces travaux, le groupe du Prof. Matsumoto montre la possibilité de prévoir le comportement photophysique d'un motif 1,2-dioxétane à cœur naphtolique grâce à la relation « odd » / « even » et qu'en fonction de la position du déclencheur (*i.e.* le groupement hydroxyle ou un substrat réactif vis-à-vis d'un analyte ou d'une enzyme d'intérêt) la longueur d'onde d'émission est modifiée (Figure III.4).

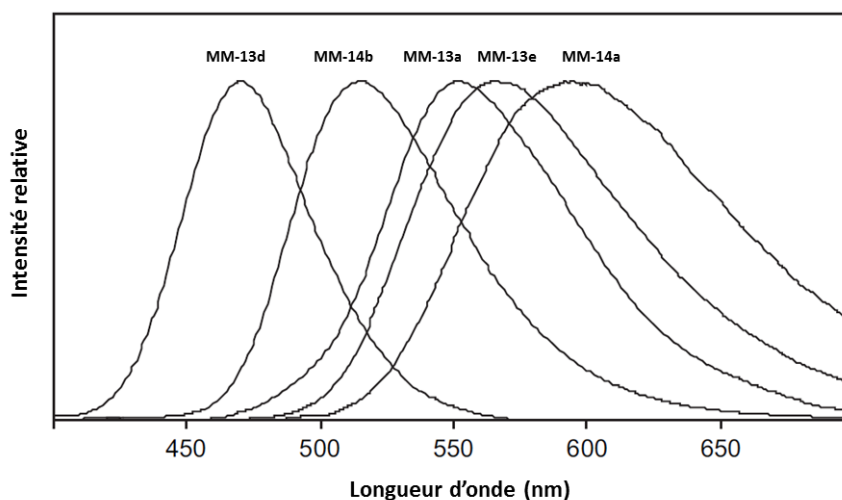


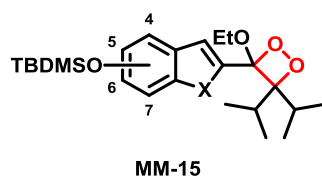
Figure III.4 : Spectre de chimiluminescence des composé **MM-13a**, **MM-13d**, **MM-13e**, **MM-14a** et **MM-14b** [mesures effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde de l'ordre de 10 à 100 μ M dans 1 mL de DMSO]¹⁶⁰

1.1.2 Autres modifications structurales

D'autres modifications structurales ont été réalisées, par le groupe du Prof. Matsumoto, pour déplacer les longueurs d'onde d'émission directes des chimiluminophores vers le proche IR. Dans un premier

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

temps, il choisit de modifier la nature du chromophore : un benzofurane ou un benzothiophène.¹⁶² Dans cette étude, le 1,2-dioxétane est stabilisé par un *gem*-di-isopropyl, et de même que dans les expériences précédentes, la position du déclencheur (*i.e.* le groupement hydroxyle protégé sous la forme d'un TBDMS) est modulée entre les positions 5, 6 et 7 de l'aromatique et les mesures ont été réalisées en milieu organique (*i.e.* dans le DMSO par déclenchement au TBAF) (Tableau III.6). Il observe ainsi, qu'en plaçant le déclencheur en position 5 ou 7, pour le benzofurane comme pour le benzothiophène, les longueurs d'onde d'émission par chimiluminescence sont dans le proche IR avec des valeurs avoisinant 620 à 630 nm (*i.e.* sondes **MM-15a**, **MM-15c**, **MM-15d**, **MM-15f**). Cependant, ces sondes possèdent des valeurs de rendements quantiques faibles, de 0.21 à 0.016%. Concernant les sondes **MM-15b** et **MM-15e**, portant le déclencheur en position 6, les émissions ne sont plus dans le rouge mais dans le bleu (*i.e.* $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 454$ nm pour **MM-15b** et $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 472$ nm pour **MM-15e**). La position 6 n'est vraisemblablement pas la position idéale, en tout cas sur ce type d'aromatique, pour observer une émission dans le proche IR.



X	Dioxétane	Position	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm)	ϕ^{CL} (%)	$t_{1/2}$ (s)
O	MM-15a	5	620	0.21	2.4
	MM-15b	6	454	0.0037	0.02
	MM-15c	7	615	0.016	280
S	MM-15d	5	628	0.14	0.27
	MM-15e	6	472	0.006	0.01
	MM-15f	7	615	0.21	22

Tableau III.6 : Propriétés photophysiques de la décomposition des sondes de type **MM-15** [mesures effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde de l'ordre de 10 μ M dans 1 mL de DMSO]¹⁶²

Le groupe a également développé des modèles fondés sur un cœur indène (*i.e.* **MM-16**) ou benzothiazole (*i.e.* **MM-17** qui est basé sur la luciférine de luciole) pouvant émettre jusqu'à 725 nm (Figure III.5). Cependant, une fois encore, les efficacités de chimiluminescence sont très faibles (*i.e.* 0.000083% pour la sonde **MM-17**). Pour les sondes **MM-16** et **MM-16**, une liaison double ou triple, respectivement, sépare le motif 1,2-dioxétane du cœur phénolique afin d'étendre la conjugaison et donc de déplacer les longueurs d'onde vers le proche IR ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 644$ nm pour **MM-18** et $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 630$ nm pour **MM-19**). Mais, de même que les sondes précédentes, celles-ci luminescent très peu.¹⁶³

¹⁶² a) M. Matsumoto, T. Hiroshima, S. Chiba, R. Isobe, N. Watanabe, H. Kobayashi *Luminescence* **1999**, 14, 345.

b) N. Watanabe, K. Nagamatsu, T. Mizuno, M. Matsumoto *Luminescence* **2005**, 20, 63.

¹⁶³ M. Matsumoto, T. Ishihara, N. Watanabe, T. Hiroshima *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4571.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

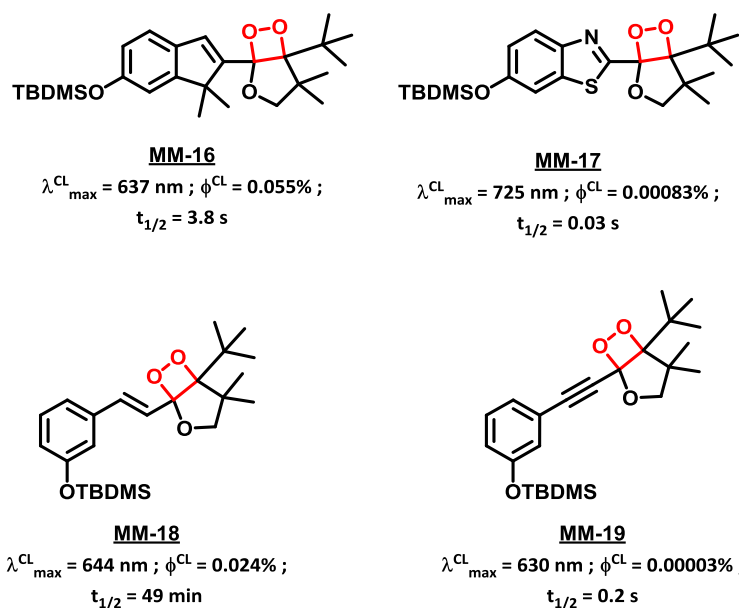


Figure III.5 : Représentation schématique des sondes chimiluminescentes émettant dans le proche IR et proposées par le Prof. Matsumoto [mesures photophysiques effectuées dans 2 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde de l'ordre de 10 μM dans 1 mL de DMSO]^{162, 163}

Bien que l'ensemble de ces résultats soient encourageants (*i.e.* le modèle **MM-12c** présente une longueur d'onde d'émission de 628 nm qui entre dans la « fenêtre d'imagerie » *in vivo*), l'ensemble des mesures photophysiques n'a été effectuée qu'en milieu purement organiques et ne permet pas de suffisamment se projeter vers une adaptation en conditions aqueuses. Pour cela, une alternative serait d'utiliser un fluorophore relais comportant des fonctions hydrosolubilisantes ou de fonctionnaliser le cœur chimiluminescent par des chaînes hydrosolubilisantes. La première option semble être à ce jour la plus adéquate de point de vue synthétique. Nos travaux sont justement fondés sur le modèle naphtol, tout juste présenté, comportant le dihydrofurane comme groupement stabilisant du motif 1,2-dioxétane et sur laquelle nous greffons un fluorophore hydrosoluble. Rappelons que notre choix s'est initialement porté sur ce groupement pour des raisons de stabilité thermique (cf Figure II.47). Notre objectif est d'introduire un fluorophore relais sur ce naphtol par le biais d'une triple liaison. Le fait d'utiliser une forme naphtol en lieu et place d'un phénol permet d'étendre la conjugaison et donc de favoriser un transfert à travers les liaisons. De plus, nous avons également vu dans le chapitre précédent, la difficulté de mise en place d'un tel système sur une plateforme phénol avec les exemples du Dr. V. Grandclaude.

1.2 Exemples de cassettes de type TBET

Au cours du chapitre II, nous avons également vu les efforts consacrés à la conception de chimiluminophores conjugués à des fluorophores organiques visant un transfert d'énergie de type CRET inter- et intramoléculaire. Le transfert de type TBET peut être une alternative au processus précédent, ne nécessitant pas un recouvrement le plus optimal possible du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur. Il repose sur la conjugaison des deux partenaires (*e.g.* le chimiluminophore et le fluorophore relais) par un système conjugué à travers lequel l'énergie

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

est transférée. Ce système à la fois rigide et conjugué empêche la coplanarité entre les fragments donneur et accepteur, car dans le cas contraire, la plateforme agit comme une seule et même entité luminescente. Il favorise ainsi en contrepartie un transfert d'énergie à travers les liaisons entre les deux fluorophores, plus rapide qu'un mécanisme de type FRET pour lequel le transfert se fait à travers l'espace, et si rapide que le retour non radiatif à l'état fondamental en est défavorisé.¹⁶⁴ Dans la majorité des exemples décrits dans la littérature, ce système conjugué est sous la forme d'une triple liaison. Néanmoins, des travaux récents montrent la possibilité d'utiliser un phényl comme linker rigide.¹⁶⁵

Cette voie a été initiée par le groupe du Prof. Burgess par le développement de « cassettes » TBET fluorescentes fondées sur le BODIPY et ses dérivés (Figure III.6).¹⁶⁶ Ces derniers sont reliés par un système double de triple liaison afin de rigidifier la structure au maximum et donc de favoriser le transfert à travers les liaisons. Dans ces travaux, il montre qu'en présence d'un tel système, l'efficacité de transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur est sensiblement améliorée et le déplacement de Stokes apparent (*i.e.* pseudo-déplacement de Stokes) est augmenté. Cette dernière caractéristique permet d'éviter des erreurs de mesures de fluorescence (*i.e.* notamment lors d'expériences de multiplexing) causées par un recouvrement des spectres d'absorption des donneur et accepteur, lors des expériences de FRET, qui peuvent conduire à décaler vers les plus basses longueurs d'onde (*i.e.* pour éviter d'exciter l'accepteur avec la longueur d'onde d'excitation du donneur) où le coefficient d'absorption, et donc la brillance finale du système, n'est pas optimale (Figure III.7).¹⁶⁷ Il a appliqué ce procédé à d'autres structures telles que la fluorescéine et un dérivé de la rhodamine, représentées en Figure III.6,¹⁶⁴ ou encore au BODIPY et aux cyanines.^{167a} Nous pouvons également citer les exemples développés par le groupe du Prof. R. Ziessel sur les motifs de type BODIPY.^{168, 169}

¹⁶⁴ G.-S. Jiao, L. H. Thoresen, K. Burgess *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14668.

¹⁶⁵ a) W. Lin, L. Yuan, Z. Cao, Y. Feng, J. Song *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 375. b) G. Liu, W. Li, Y.-M. Zhang, M. Li, S. X.-A. Zhang *Dyes and Pigments* **2017**, *147*, 529.

¹⁶⁶ A. Burghart, L. H. Thoresen, J. Chen, K. Burgess, F. Bergstrom, L. B. A. Johansson *Chem. Commun.* **2000**, 2203.

¹⁶⁷ a) Y. Ueno, J. Jose, A. Loudet, C. Pérez-Bolívar, P. Anzenbacher, K. Burgess *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 51. b) J. Han, A. Engler, J. Qi, C.-H. Tung *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 502.

¹⁶⁸ a) R. Ziessel, C. Goze, G. Ulrich, M. Césarío, P. Retailleau, A. Harriman, J. P. Rostron *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7366. b) M. A. H. Alamiry, A. Harriman, L. J. Mallon, G. Ulrich, R. Ziessel *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2774. c) A. Haefele, G. Ulrich, P. Retailleau, R. Ziessel *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3716. d) A. Harriman, L. J. Mallon, K. J. Elliot, A. Haefele, G. Ulrich, R. Ziessel *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13375.

¹⁶⁹ Pour des exemples récents de cassettes de type TBET, voir : a) X. Xue, S. Jin, Z. Li, C. Zhang, W. Guo, L. Hu, P. C. Wang, J. Zhang, X. J. Liang *Advanced Science* **2017**, *4*. b) J. X. Ong, V. Y. T. Pang, L. M. Tng, W. H. Ang *Chem. Eur. J.* **2018**.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

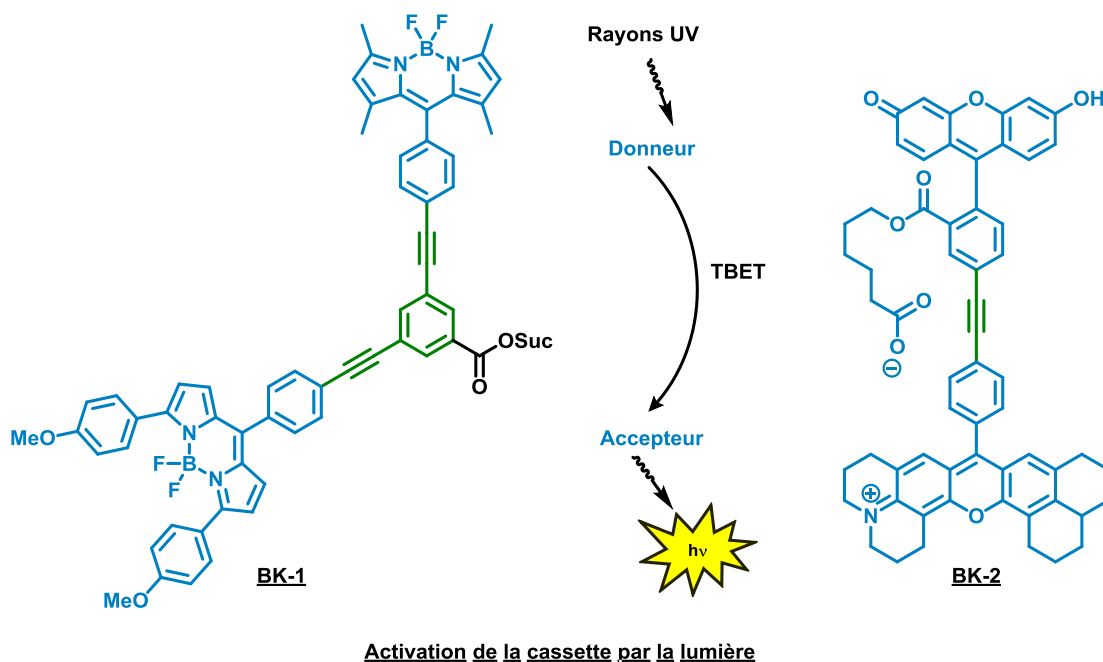


Figure III.6 : Représentation schématique des cassettes fluorescentes **BK-1** et **BK-2** proposées par le groupe du Prof. Burgess

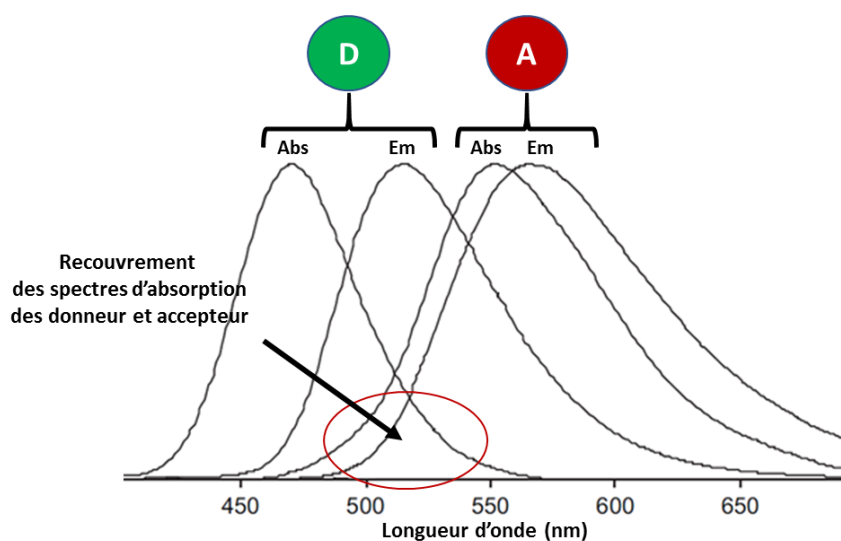


Figure III.7 : Représentation schématique d'un recouvrement des spectres d'absorption des donneur et accepteur, dans un système de type FRET

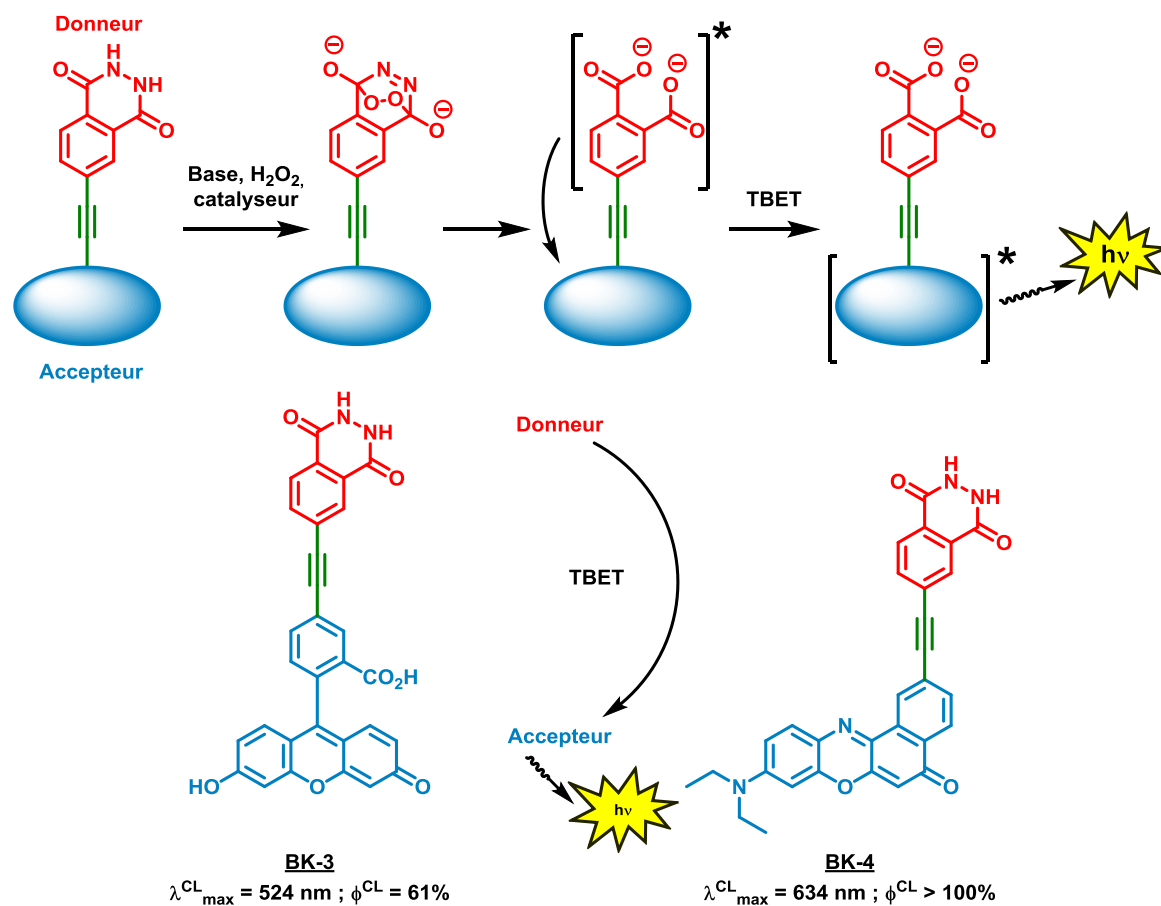
Le groupe du Prof. Burgess a adapté, par la suite, ce système donneur-accepteur à la chimiluminescence.¹⁷⁰ Pour cela, le luminol a été utilisé comme chimiluminophore donneur et la fluorescéine dans un cas, ou le Nile red dans un autre, comme fluorophore accepteur (*i.e.* les sondes **BK-3**¹⁷¹ et **BK-4** respectivement représentés en Figure III.8). Comme pour l'exemple de la cassette **BK-**

¹⁷⁰ J. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1684.

¹⁷¹ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre III.I.1.2 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **BK** pour Burgess Kevin.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

2, les deux partenaires sont reliés par une triple liaison carbone-carbone. Le transfert d'énergie opère comme suit : l'oxydation du luminol conduit à la formation d'une espèce phthalate dianionique à l'état excité. Celle-ci transfère son énergie vers le fluorophore (*i.e.* le Nile red ou la fluorescéine) *via* la triple liaison et la désexcitation du fluorophore induit une émission lumineuse à sa propre longueur d'onde (Figure III.8).



Activation de la cassette par oxydation

TBET = Through Bond Electron Transfer

Figure III.8 : Représentation schématique du mécanisme (en haut) et transfert d'énergie de type TBET appliqué aux cassettes chimiluminescentes **BK-3** et **BK-4** développées par le Prof. Burgess (en bas) [les rendements quantiques ont été établis par utilisation du luminol comme chimiluminophore de référence, ce qui peut expliquer ce rendement quantique apparent supérieur à 100 % pour **BK-4**]¹⁷⁰

Comme l'indique la Figure III.9, les spectres de chimiluminescence des sondes **BK-3** et **BK-4** affichent respectivement des longueurs d'onde d'émission de 519 et 628 nm concordant avec les longueurs d'onde d'émission de fluorescence de la fluorescéine et du Nile red, respectivement. Une émission verte est donc observée dans le cas de la sonde **BK-3** contre une émission rouge pour la sonde **BK-4**. Comme confirmation que le transfert se fait bien au travers des liaisons et pas au travers de l'espace, le Pr Burgess souligne que le transfert d'énergie est pratiquement total entre le luminol et le Nile red, alors que le spectre d'émission du luminol ne recouvre pratiquement pas celui d'excitation du Nile red.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

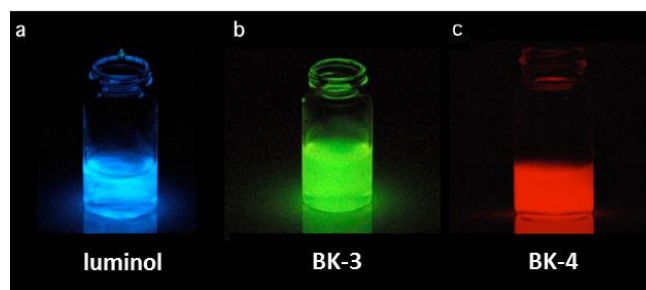
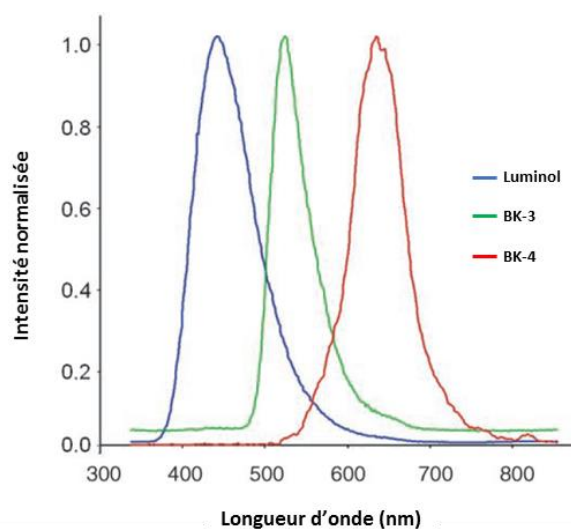


Figure III.9 : Spectres de chimiluminescence du luminol et des sondes **BK-3** et **BK-4** (en haut) [mesures réalisées en tampon carbonate, pH 10.5, 25 °C, en présence de CuSO_4 (1.5 μM) et H_2O_2 (2 μM) pour une concentration en sonde **BK-3** de l'ordre de 10 μM ; mesures réalisées dans le DMF anhydre, 25 °C, en présence de tert-butanolate de potassium dans le THF (10 μM) pour une concentration en sonde **BK-4** de l'ordre de 10 μM] et images du luminol et des sondes **BK-3** et **BK-4** en solution après activation par oxydation du luminol (en bas)¹⁷⁰

L'utilisation de cassettes donneur-accepteur de type TBET est vraisemblablement un outil important dans la conception de sondes fluorogéniques. Elles peuvent être un atout supplémentaire dans la mise en place de sondes chimiluminescentes. Effectivement, la majorité des chimiluminophores classiques émettent dans le domaine du visible mais faiblement en conditions aqueuses. Nous avons justement vu dans le chapitre II que, ces dernières années, les attentions se sont particulièrement portées sur le développement de sondes chimiluminescentes pour une détection lumineuse accentuée, en conditions aqueuses voire *in vivo*, via un fluorophore relais. La difficulté réside encore dans la possibilité d'émettre dans le proche IR. De plus, la synthèse de telles sondes peut s'avérer dense et linéaire. Or par l'intermédiaire d'un tel système, elle en devient bien plus convergente, et une augmentation de l'émission vers le proche IR ainsi qu'une amélioration de l'efficacité de chimiluminescence, notamment en conditions aqueuses, sont facilement envisageables. Ainsi, la stratégie de synthèse repose fortement sur le choix du fluorophore qui doit être en adéquation avec une détection dans la « fenêtre d'imagerie ». Notre laboratoire a par ailleurs, amorcé des travaux fondés sur une cassette TBET similaire aux cassettes du Prof. Burgess et comportent, elles aussi, une benzophénoxazine. Nous allons les présenter en détail dans la suite de notre discussion.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

1.3 Les benzo[a]phénoxazines : méthodes d'hydrosolubilisation

Nous avons évoqué dans le Chapitre I.III.1 les fluorophores les plus communément utilisés dans la recherche fondamentale et pour des applications dans l'imagerie *in vivo*. Leur architecture présente des avantages et des inconvénients vis-à-vis des propriétés optiques, de photostabilité, de solubilité et de leur accessibilité synthétique. Parmi ces fluorophores, notre attention se porte plus particulièrement sur les benzophénoxazines (BPO) (Figure III.10). Cette famille de molécules liposolubles dérive de la phénoxazine (*i.e.* structure polycyclique contenant un atome d'oxygène et un atome d'azote dans un même cycle aromatique telle que la résorufine) par élongation de la conjugaison sur l'une des trois faces *a*, *b* ou *c*. Les BPO ont principalement été utilisées comme colorants textiles ou histologiques, mais ont vu leur application étendue dans l'imagerie optique, notamment avec les benzo[a]phénoxazines (*i.e.* le Nile red et le Nile blue).¹⁷²

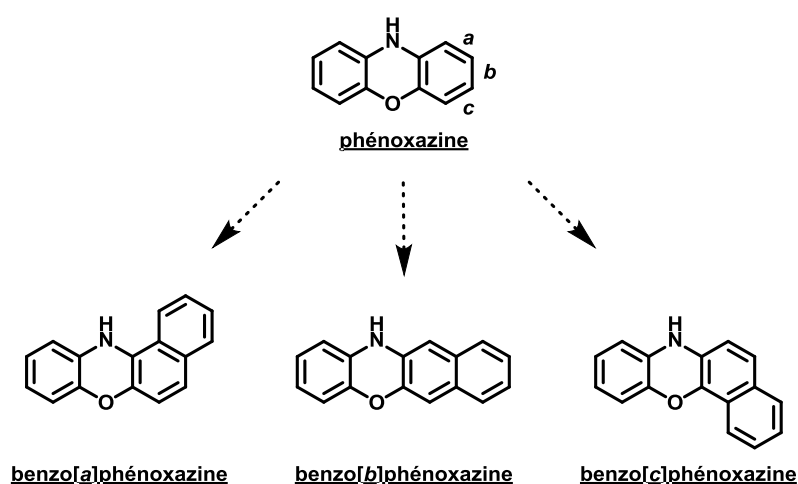


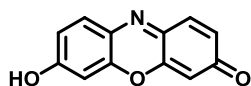
Figure III.10 : Représentation schématique des benzophénoxazines

En effet, celles-ci présentent des propriétés optiques intéressantes et potentiellement compatibles avec des applications en bio-analyse, comme nous le montre la Figure III.11, avec des émissions dans le rouge voir le proche IR (*i.e.* $\lambda_{\text{FL}_{\text{max}}}^{\text{FL}} = 638 \text{ nm}$ pour le Nile Red et $\lambda_{\text{FL}_{\text{max}}}^{\text{FL}} = 655 \text{ nm}$ pour le Nile blue, dans le méthanol) associées à des rendements quantiques convenables (*i.e.* de 30 à 40%) ainsi que de bons coefficients d'absorption molaire allant jusqu'à $88\,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La fonction amine commune au Nile red et au Nile blue étant un bon nucléophile, peut être facilement alkylé par des halogénures d'alkyle. C'est justement l'une des voies les plus empruntée pour apporter de l'hydrosolubilité à ces molécules.

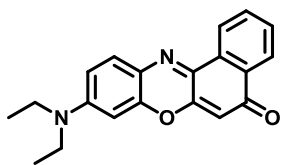
¹⁷² Pour des publications récentes sur les benzophénoxazines, voir : a) V. Martinez, M. Henary *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 13764. b) M. Santra, Y. W. Jun, Y. J. Reo, S. Sarkar, K. H. Ahn *Dyes and Pigments* **2017**, 142, 161.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble



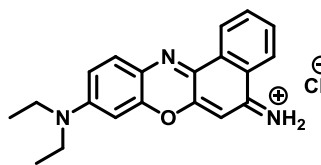
Résorufine

NaOH, pH 9.5 : $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{FL}} = 571 \text{ nm}$; $\epsilon = 62\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{ém max}}^{\text{FL}} = 585 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 74\%$



Nile red

DMSO : $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{FL}} = 552 \text{ nm}$; $\epsilon = 40\,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{ém max}}^{\text{FL}} = 633 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 42\%$
 MeOH : $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{FL}} = 554 \text{ nm}$; $\epsilon = 39\,100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{ém max}}^{\text{FL}} = 638 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 38\%$



Nile blue

DMSO : $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{FL}} = 636 \text{ nm}$; $\epsilon = 67\,100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{ém max}}^{\text{FL}} = 669 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 33\%$
 MeOH : $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{FL}} = 625 \text{ nm}$; $\epsilon = 88\,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{ém max}}^{\text{FL}} = 655 \text{ nm}$; $\phi^{\text{FL}} = 30\%$

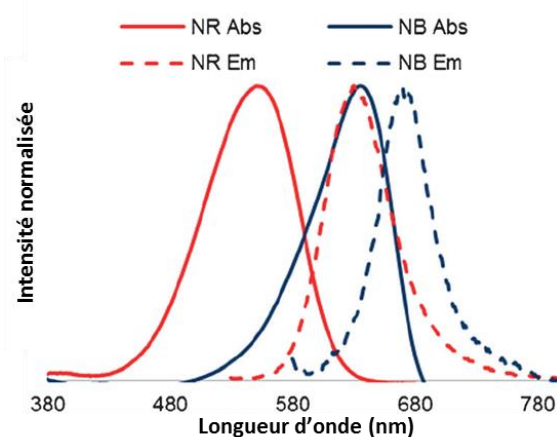


Figure III.11 : Représentation schématique et caractérisations photophysiques de la résorufine, du Nile red et du Nile blue (en haut) et spectre d'absorption et d'émission du Nile red (en rouge) et du Nile blue (en bleu)

Ainsi, la synthèse de ces molécules et de leurs analogues débute avec un aminophénol **I** qui est mis en réaction avec un dérivé halogéné afin de mono- ou bis-alkyler la fonction amine (Figure III.12). L'entité **II** résultante est ensuite engagée dans une étape de nitrosation par réaction avec le nitrite de sodium suivi d'une étape de condensation avec un dérivé naphtol pour conduire au composé **IV**.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

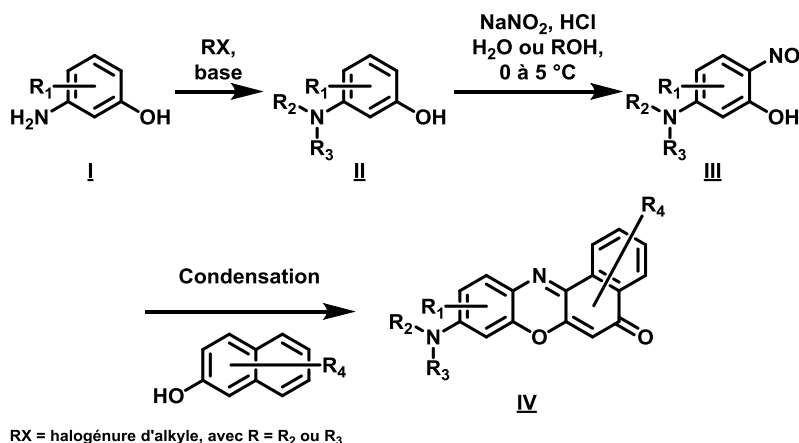


Figure III.12 : Représentation schématique de la synthèse générale d'analogues de Nile red et Nile blue

Les groupes du Prof Burgess et du Prof Weissleder ont concentré leurs efforts sur la conception de nouvelles benzo[*a*]phénoxazines comportant des fonctions participant à l'augmentation de l'hydrosolubilité telles que des chaînes de type acide carboxylique ou de type sulfonate (Figure III.13).¹⁷³ Les longueurs d'onde d'émission, mesurées cette fois en tampon phosphate pH 7.4, restent dans la même gamme que celles des BPO natives (*i.e.* $\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 658 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 652 \text{ nm}$ pour les sondes **BK-5** et **BK-6** respectivement, et $\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 675 \text{ nm}$ pour la sonde **WR-1**¹⁷⁴), et leurs efficacités de fluorescence, dans ces mêmes conditions aqueuses et dans l'éthanol, sont augmentées.

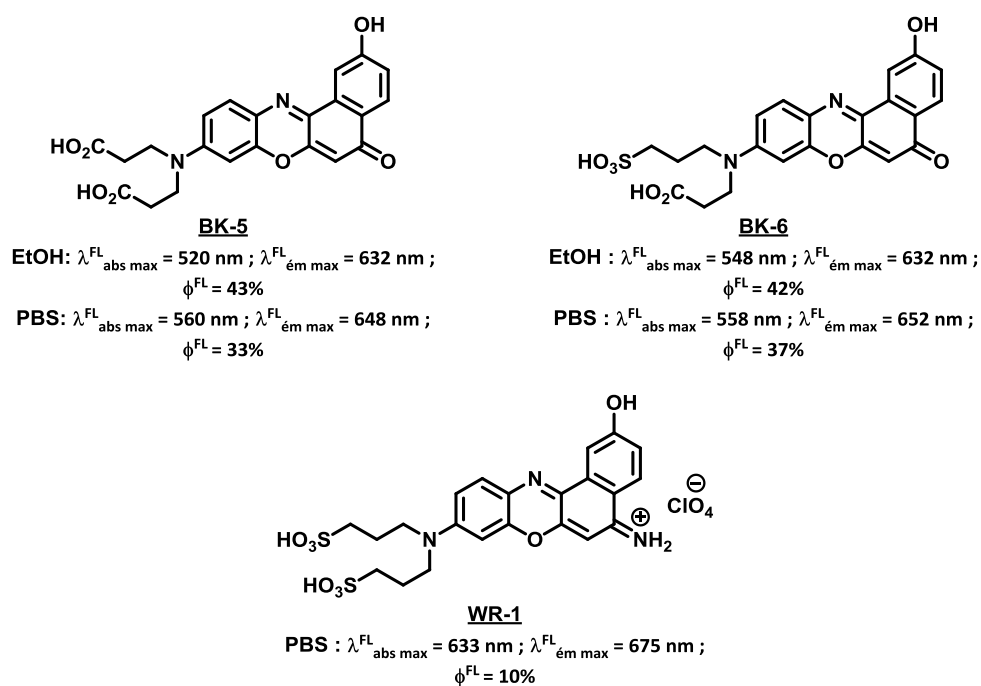


Figure III.13 : Représentation schématique de quelques BPO en version hydrosoluble¹⁷³

¹⁷³ a) J. Jose, K. Burgess *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7835. b) N.-h. Ho, R. Weissleder, C.-H. Tung *Tetrahedron* **2006**, *62*, 578.

¹⁷⁴ Les molécules extraites de la littérature et présentées dans la partie Chapitre III.1.1.3 sont numérotées de façon arbitraire et ce en fonction des initiales de l'auteur, telles que **WR** pour Weissleder Ralph.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

L'hydrosolubilité est souvent apportée par fonctionnalisation de la fonction amine, néanmoins quelques dérivés, développés par le groupe du Prof. Burgess, comportent des chaînes de type acide ou polyéthylène glycol (PEG) (*i.e.* afin de d'augmenter la perméabilité vis-à-vis de membranes cellulaires et donc de favoriser leur détection en condition physiologiques) qui sont introduites sur le groupement hydroxyle libre.¹⁷⁵ Cet alcool peut également servir de point d'ancrage à d'autres architectures, comme pour les cassettes chimiluminescentes décrites par le Prof. Burgess (*i.e.* la triple liaison est introduite sur un dérivé triflate du Nile red). Les travaux antérieurs au laboratoire ainsi que ceux impliqués dans ce projet de thèse sont fondés sur ce type d'accroche.

2. Présentation des travaux antérieurs au laboratoire

Afin de mieux saisir l'enjeu de cette partie du projet de thèse, nous allons, ci-après, rappeler les travaux antérieurs au laboratoire concernant la mise au point de cassettes chimiluminescentes de type TBET à cœur naphthol et basée sur un motif de type benzo[*a*]phénoxazine. Deux principales stratégies seront ainsi présentées.

2.1 Première stratégie : Extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR via un transfert d'énergie à travers l'espace

Nous avons vu dans le premier chapitre que le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) est à l'origine du développement de nombreuses sondes telles que celles basées sur des squelettes de type luciférine, native et modifiée, et dont l'émission avoisine des longueurs d'onde de 800 nm.¹⁷⁶ Ainsi, les travaux préliminaires à ce projet de thèse visaient à augmenter l'émission dans le rouge par construction d'un modèle chimiluminescent à l'image du phénomène de BRET (Figure III.14).¹⁷⁷ L'émission de lumière s'effectuera selon un mécanisme de type chimiluminescence, le terme CRET est donc de rigueur. Comme première stratégie, l'idée était d'utiliser un fluorophore proche IR qui serait relié de façon covalente à une plateforme chimiluminescente comportant un cœur naphthol. Nous avons également vu, ci-dessus, que la structure de type naphthalène permet de modifier la longueur d'onde d'émission du chimiluminophore suivant la position du groupement hydroxyle vis-à-vis du motif 1,2-dioxétane. Trois isomères présentent une émission maximale, par chimiluminescence, potentiellement intéressante pour notre transfert énergétique (Tableau III.3). Effectivement, par analogie avec le FRET, le transfert d'énergie est optimal lorsqu'un bon recouvrement des spectres d'émission de la plateforme à 1,2-dioxétane et d'absorption du fluorophore a lieu. L'isomère choisi a donc été celui comportant le phénol sur le deuxième cycle (*i.e.* position 4 non conjuguée avec le motif 1,2-dioxétane), le modèle **MM12-c** qui présente un maximum d'émission par chimiluminescence de 628 nm. Nous avons cependant, remplacé le groupement *gem*-di-isopropyl par un dihydrofurane pour des raisons de stabilité thermique du motif 1,2-dioxétane.

¹⁷⁵ J. Jose, A. Loudet, Y. Ueno, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, K. Burgess *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2052.

¹⁷⁶ R. Kojima, H. Takakura, T. Ozawa, Y. Tada, T. Nagano, Y. Urano *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1175.

¹⁷⁷ Richard, J.-A. *Synthèse de sondes luminescentes utilisant un bras réactif auto-immolable : application à la détection de peptidases*. Université de Rouen – Quidd, Thèse de doctorat soutenue en 2008

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

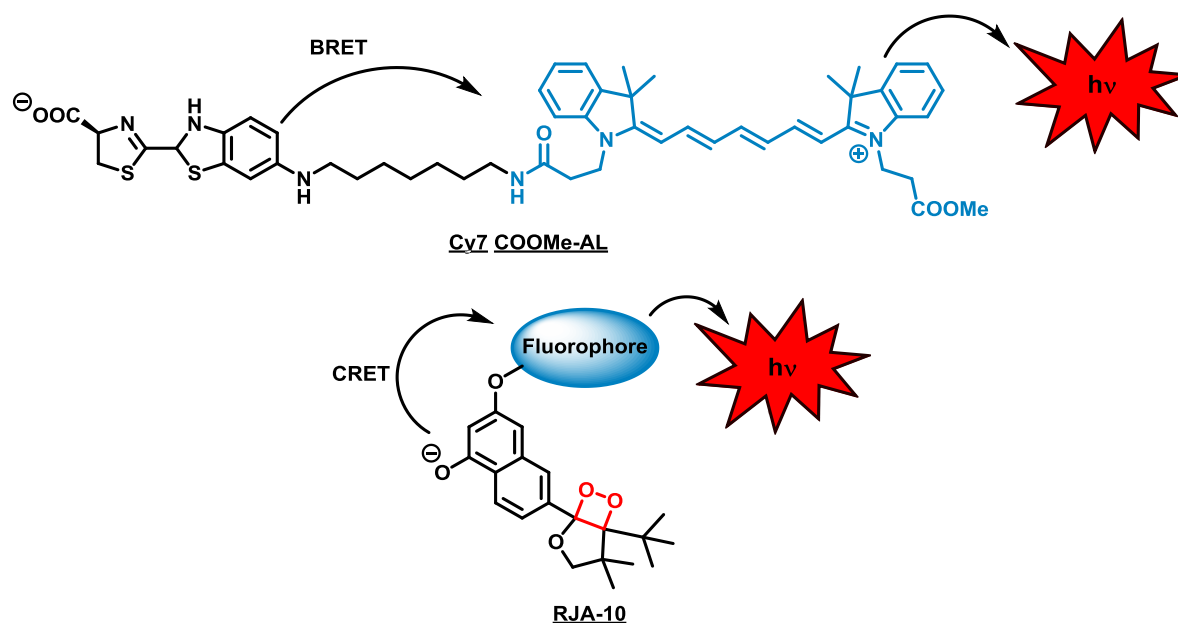


Figure III.14 : Représentation schématique d'une sonde de type BRET (en haut)¹⁷⁶ et de la sonde **RJA-10**, de type CRET intramoléculaire, visée (en bas)¹⁷⁷

La construction de ce modèle débiterait par un aménagement fonctionnel du di-hydroxybenzaldéhyde **RJA-11** pour conduire au composé **RJA-12**. Une réaction de Stobbe à partir de ce composé **RJA-12** et du succinate de diéthyle permettrait d'obtenir le composé **RJA-13** (Figure III.15). Le mécanisme de cette réaction sera expliqué en détail dans la suite de ce chapitre. Le composé **RJA-13** ainsi formé comporterait une fonction acide qui serait, par la suite, réduite en une fonction aldéhyde permettant l'obtention du composé **RJA-14**. Cette étape de réduction serait suivie d'une réaction de Friedel-Craft donnant accès au cycle naphthalène **RJA-15**. L'introduction du cycle éther d'énol, précurseur du motif 1,2-dioxétane, se réaliserait selon la méthodologie développée par le Prof. Matsumoto pour fournir le composé **RJA-16**. Le fluorophore serait alors inséré sur la plateforme via un couplage organométallique après déprotection sélective d'un des groupements hydroxyle du composé **RJA-16** suivie d'une activation sous la forme d'un dérivé triflate. Afin d'anticiper sur une possible instabilité du motif 1,2-dioxétane, celui-ci serait formé en ultime étape de synthèse.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

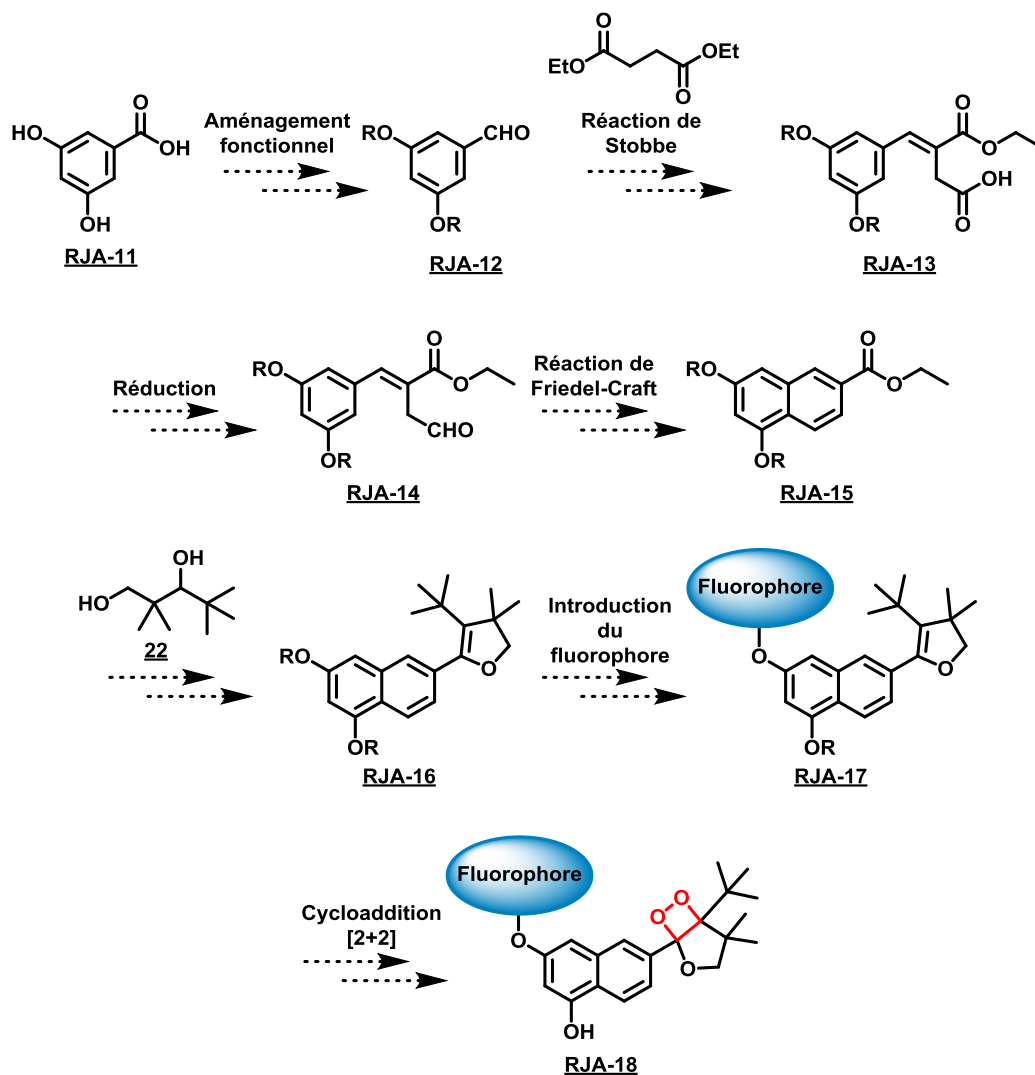


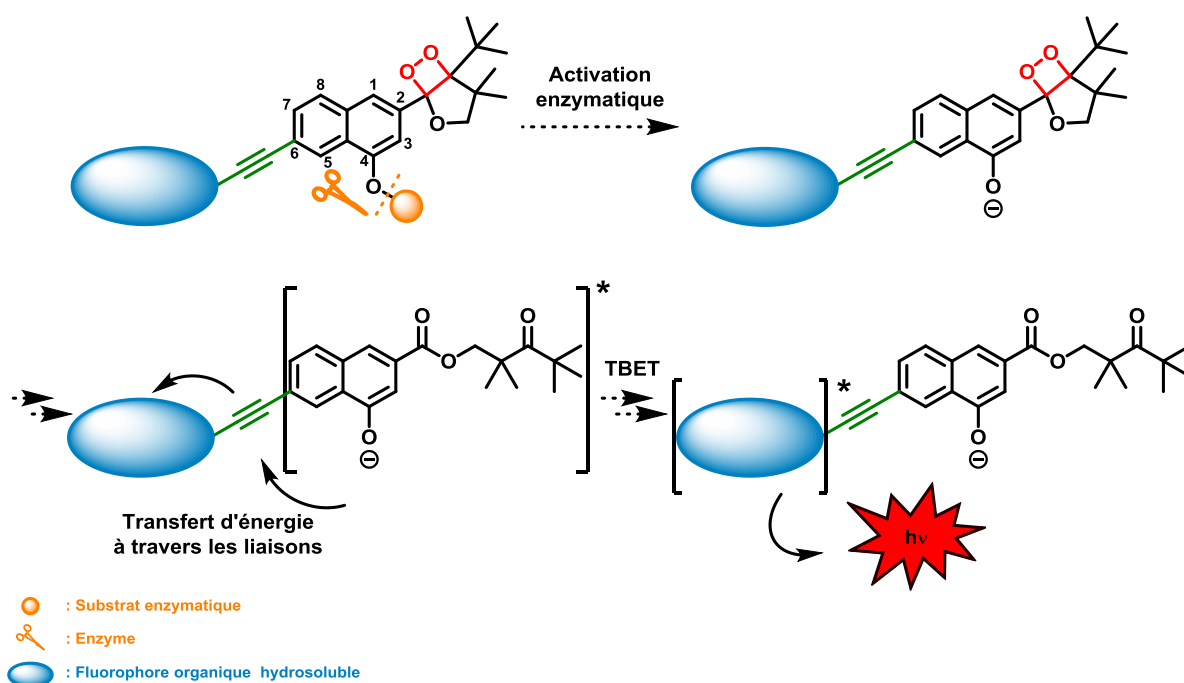
Figure III.15 : Représentation schématique de la première stratégie envisagée par le Dr. J.-A. Richard¹⁷⁷

Au cours de la synthèse, les conditions employées pour l'étape de réduction de l'acide carboxylique de la molécule **RJA-13** n'ont pas conduit, de façon surprenante, à l'aldéhyde **RJA-14** souhaité mais à différents composés. Parmi eux, le cycle naphthalène **RJA-15**, théoriquement attendu dans l'étape d'après, a été observé sous la forme de deux régioisomères avec des rendements de 5 à 10%. Afin d'exploiter au mieux cette formation inattendue du cycle naphthalène **RJA-15** désiré, des efforts d'optimisations de ces conditions ont été réalisés mais n'ont malheureusement pas abouti aux résultats escomptés. Cette stratégie a donc été abandonnée notamment au regard des travaux du Prof. K. Burgess, présentés précédemment, concernant la mise en place d'un système chimiluminescent pour lequel le transfert d'énergie se réalise à travers les liaisons.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

2.2 Deuxième stratégie : extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR via un transfert d'énergie à travers les liaisons

Le concept de transfert d'énergie à travers les liaisons a permis d'envisager une synthèse simplifiée du chimiluminophore. En effet, contrairement au CRET, ce type de transfert n'impose pas un recouvrement des spectres d'émission de la plateforme à 1,2-dioxétane et d'absorption du fluorophore. La plateforme choisie pour cette deuxième stratégie correspond à celle comportant le groupement hydroxyle en position 4 du cycle naphthalène (Figure III.16). Ce choix de position permet d'évaluer la stabilité du motif 1,2-dioxétane et de vérifier son efficacité de chimiluminescence, puisqu'elle n'a pas été évaluée par le Prof. Matsumoto lors des expériences présentées dans la partie 1.1.1 et 1.1.2 de ce chapitre. Le fluorophore y serait alors greffé *via* un bras de type acétylène, en position 7, afin de favoriser le transfert à travers les liaisons, à défaut d'un transfert dans l'espace.



Comme pour les sondes présentées dans le chapitre II, cette plateforme a pour objectif final la détection d'activités enzymatiques.

2.2.1 Conception d'un chimiluminophore à cœur naphtolique pour l'introduction d'un motif fluorescent *via* un groupement de type triflate

La stratégie de synthèse élaborée, ici, reprend quasiment le même schéma synthétique que celui présenté précédemment avec une réaction de Stobbe à partir d'un hydroxybenzaldéhyde protégé **RJA-19**, suivie d'une réaction de Friedel Craft pour conduire au cœur naphtol **RJA-21** (Figure III.17). La

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

formation du cycle dihydrofurane se ferait alors par introduction du diol **22** pour obtenir le composé **RJA-22**. Après insertion d'une triple liaison *via* une réaction de Sonogashira impliquant le triméthylsilylacétylène par exemple, le fluorophore serait greffé sur la plateforme suivant une seconde étape de couplage organométallique subséquente à une étape de déprotection du motif acétylène. La cycloaddition interviendrait alors en dernière étape de synthèse pour fournir la cassette chimiluminescente **RJA-24** désirée.

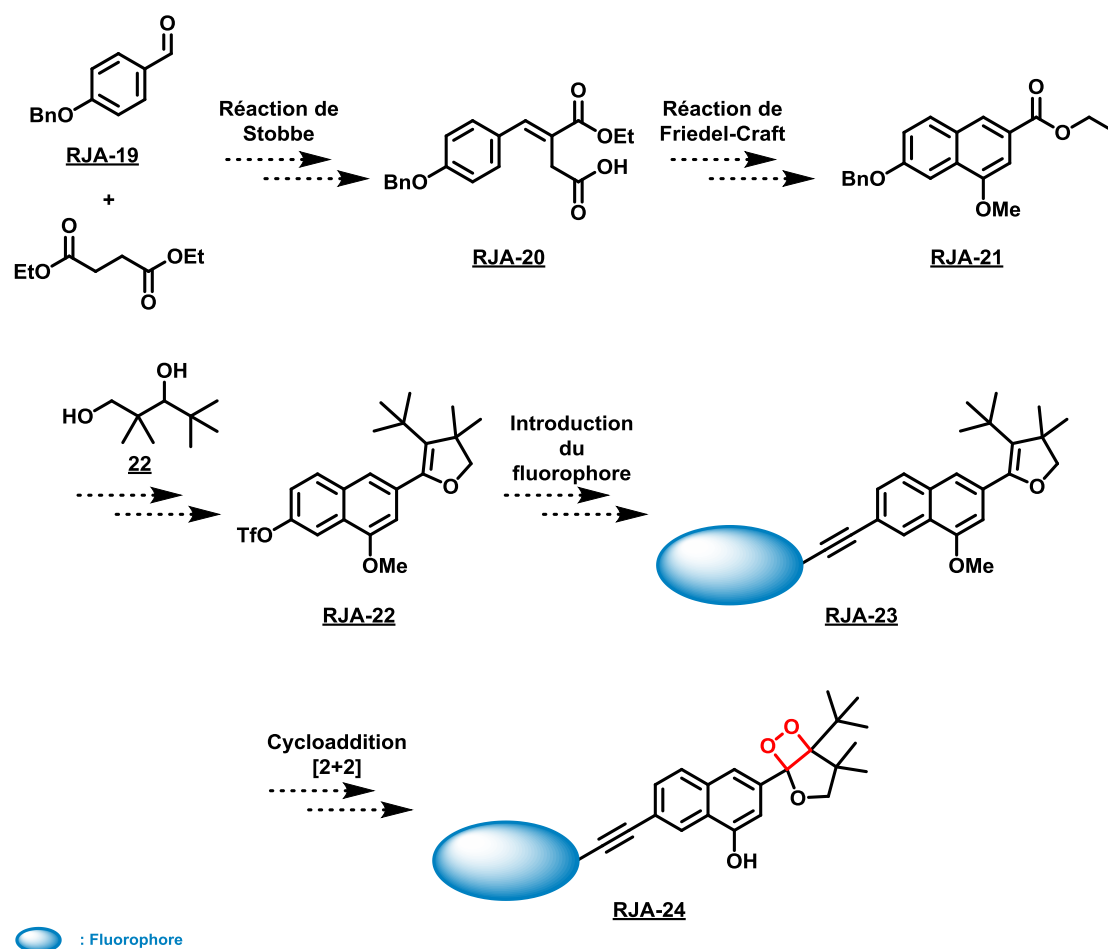


Figure III.17 : Représentation schématique de la stratégie de synthèse envisagée par le Dr. J.-A. Richard¹⁷⁷

Les premiers essais de synthèse ont mis en jeu le groupement *tert*-butyldiméthylsilane (TBDMS) comme groupement protecteur du naphtol. Cependant, en raison d'une instabilité du dérivé silylé, le choix s'est finalement porté sur le groupement méthoxy. Ceci est d'autant plus conforté par les travaux du Prof. Matsumoto que nous avons pu voir précédemment : dans ces travaux, le phénol déclencheur est systématiquement protégé par un groupement méthoxy qui est remplacé en fin de synthèse par un groupement TBDMS.

Inspirés par les travaux du Prof. Burgess dont nous avons discuté précédemment, le fluorophore sélectionné est le Nile red. Cette benzophénoxazine (BPO) présente l'avantage d'émettre dans le proche IR ($\lambda_{\text{max}}^{\text{FL}} = 630 \text{ nm}$) et a été diversifiée sous la forme d'analogues hydrosolubles. Ce dernier

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

point est, dans notre cas, intéressant puisque les sondes chimiluminescentes synthétisées au sein de notre laboratoire ont pour finalité un déclenchement *in vivo*. Ainsi, l'objectif était d'effectuer une réaction de Sonogashira entre le cœur naphtolène **RJA-22** et le Nile red **RJA-25**, puis de retirer le groupement méthoxy avant la réaction de cycloaddition [2+2]. Le fluorophore a donc été synthétisé selon une méthode décrite dans la littérature¹⁷⁰ et une fois les deux entités disponibles, différents essais de couplage de Sonogashira ont été menés (Figure III.18). Ces tests n'ont malheureusement pas conduit au produit **RJA-26** désiré et seuls les composés de départ ont été récupérés. La solution alternative a été d'introduire, cette fois-ci, la triple liaison sur le naphtolène. De plus, ceci permettrait de limiter le nombre de transformations à effectuer sur le fluorophore et d'offrir la possibilité de varier le fluorophore.

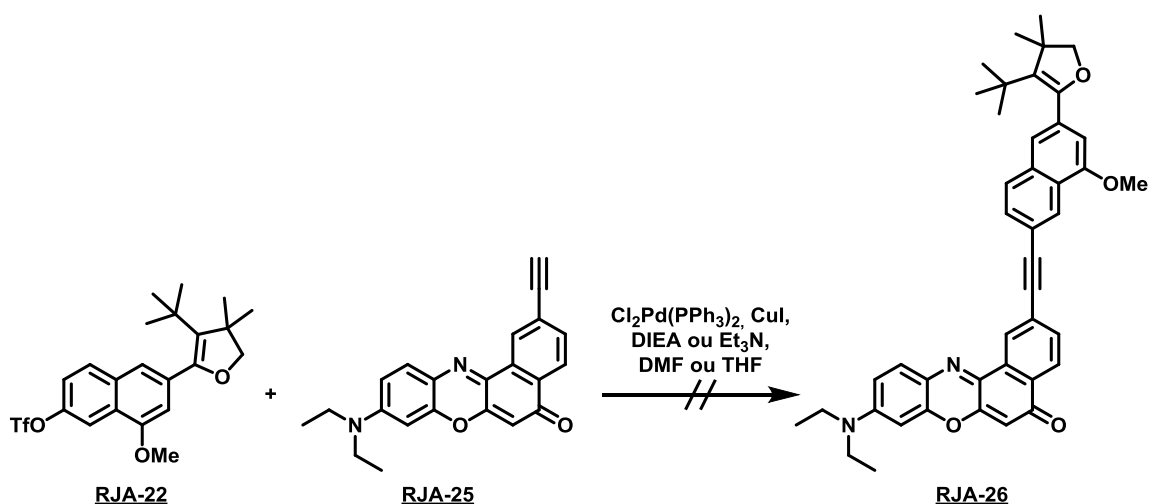


Figure III.18 : Représentation schématique de la tentative de formation du composé **RJA-26**¹⁷⁷

Le composé **RJA-27** a donc été généré sur deux étapes (Figure III.19). Des essais de déprotection du groupement méthoxy ont été ensuite effectués sur cette molécule afin d'en vérifier la viabilité (Tableau III.7). Les premiers tests ont été réalisés selon les conditions employées par le Prof. Matsumoto,¹⁶⁰ c'est-à-dire au moyen d'une fonction thiol en présence ou non d'un acide de Lewis. Le naphtol a bien été libéré avec toutefois une addition concomitante du thiol sur la triple liaison. D'autres conditions en l'absence de thiol et mettant en jeu des acides de Lewis ont été employées mais soit aucune conversion n'est observée soit l'éther d'énol se retrouve totalement détruit.

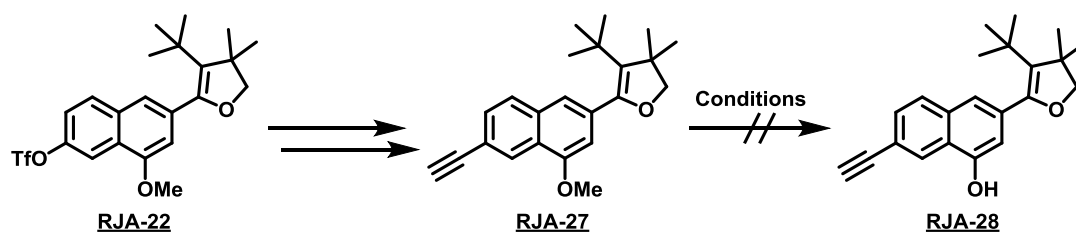


Figure III.19 : Représentation schématique des essais de synthèse du composé **RJA-28**

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

Conditions	Température	Résultats
MeSNa, DMF, reflux	160 °C	Addition sur la triple liaison
AlBr ₃ , EtSH, DCM	20 °C	Addition sur la triple liaison
AlCl ₃ , DCM	40 °C	Pas de réaction
Pyridine, HCl	180 °C – 200 °C	Pas de réaction et dégradation
LiCl, DMF	150 °C	Pas de réaction
BCl ₃ , DCM	20 °C ou 0 °C	Pas de réaction
BCl ₃ , TBAI, DCM	- 40 °C à 20 °C	Pas de réaction
BBr ₃ , DCM	- 78 °C, - 40 °C ou -20 °C à 20 °C	Pas de réaction
TMSI, ACN	20 °C	Dégradation de l'éther d'énol
SiCl ₄ , DCM/toluène	20 °C	Dégradation de l'éther d'énol
BBr ₃ /Me ₂ S	20 °C	Dégradation de l'éther d'énol

Tableau III.7 : Tableau récapitulatif des conditions employées pour la formation du composé **RJA-28**¹⁷⁷

Ces tests ont permis d'évaluer la sensibilité de la triple liaison vis-à-vis des fonctions thiol et ont montré la complexité de la réaction de déprotection du groupement méthoxy, bien que celui-ci soit utilisé dans la quasi-totalité des synthèses proposées par le Prof. Matsumoto. Afin de remédier à ce problème, il faudrait remplacer le groupement méthoxy par un groupement protecteur dont la stabilité serait intermédiaire entre celle du TBDMS et celle du méthoxy. Ceci implique de revoir la synthèse quasiment depuis le départ.

2.2.2 Modification du groupement protecteur et introduction d'un motif fluorescent *via* un atome d'halogène

2.2.2.1 Synthèse

La stratégie nouvellement élaborée par le Dr. V. Grandclaude lors de sa thèse, qui a pris la suite des travaux du Dr. J.A. Richard, reprend le même schéma synthétique que précédemment. Elle démarre, cette fois-ci, avec le 4-bromobenzaldéhyde commercial **GV-2** et propose l'utilisation du groupement benzyle comme groupement protecteur (Figure III.20).¹⁷⁸ Le naphthol serait ultérieurement protégé par un groupement silylé (le TBDMS par exemple) facilement éliminable en présence d'ions fluorures, avec l'idée d'utiliser cette déprotection finale comme déclencheur de chimiluminescence en milieu organique.

¹⁷⁸ Grandclaude, V. *Synthèse de sondes chimiluminescentes et pro-fluorescentes pour des applications en imageir in vivo*. Université de Rouen – Quidd, Thèse de doctorat soutenue en 2011

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

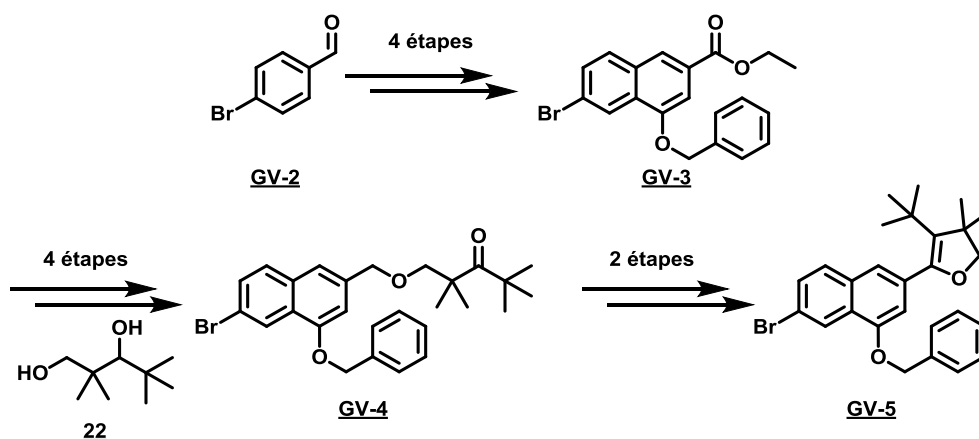


Figure III.20 : Représentation schématique de la stratégie envisagée par le Dr. V. Grandclaude

Dans la suite de la discussion, nous tenons à porter une attention particulière sur les trois dernières étapes de formation du chimiluminophore (Figure III.21). En effet, la synthèse devient un peu plus délicate dès l'insertion de la triple liaison. Les conditions employées pour ce couplage de Sonogashira ont permis d'obtenir le composé **GV-6** avec un rendement modéré de 42%. Le groupement TMS a par la suite été retiré en milieu basique pour fournir l'alcyne vrai **GV-7** avec un rendement de 64%. En raison d'une réactivité très forte du trichlorure de bore, l'étape de débenzylation a permis d'obtenir le naphthol libre **GV-8** avec un rendement modeste de 38%. Effectivement, la formation de produits secondaires a été observée suite à une complexation du bore sur l'éther d'énol qui subit alors une ouverture spontanée.

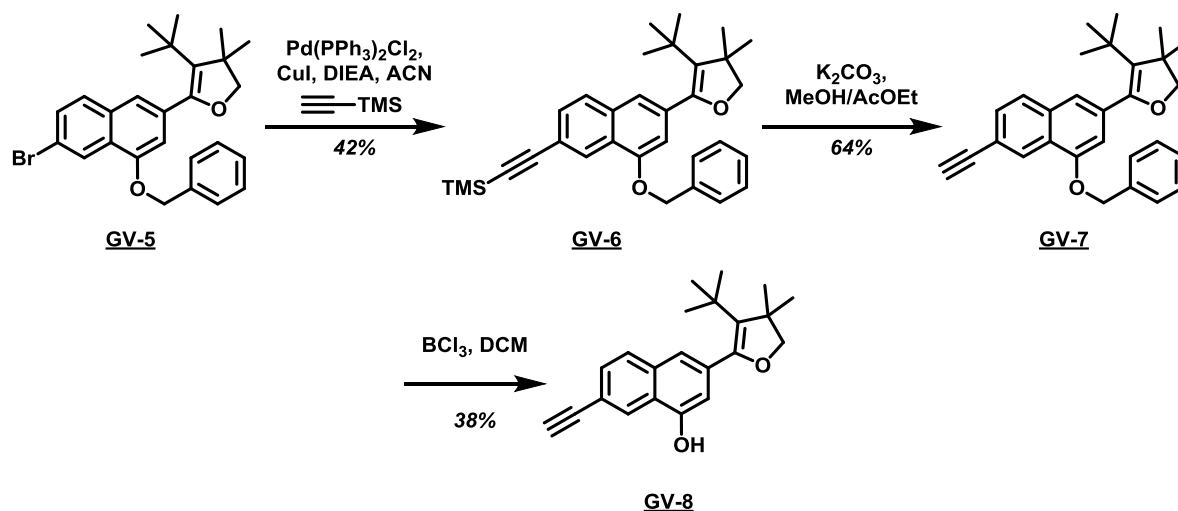


Figure III.21 : Synthèse du naphthol **GV-8**

Cette faible conversion (observée après seize étapes de synthèses cumulées) a, de nouveau, suscité quelques interrogations quant au choix du groupement protecteur. Ceci sera d'autant plus discuté dans la suite de notre exposé.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

La synthèse de la cassette chimiluminescente s'est tout de même poursuivie avec un couplage de Sonogashira entre le naphthol **GV-8** et le dérivé triflate du Nile red **GV-9**, préalablement synthétisé selon les conditions décrites dans littérature.¹⁷⁰ La fonction phénol a ensuite été protégée sous la forme d'un éther silylé permettant d'obtenir le composé **GV-10**.

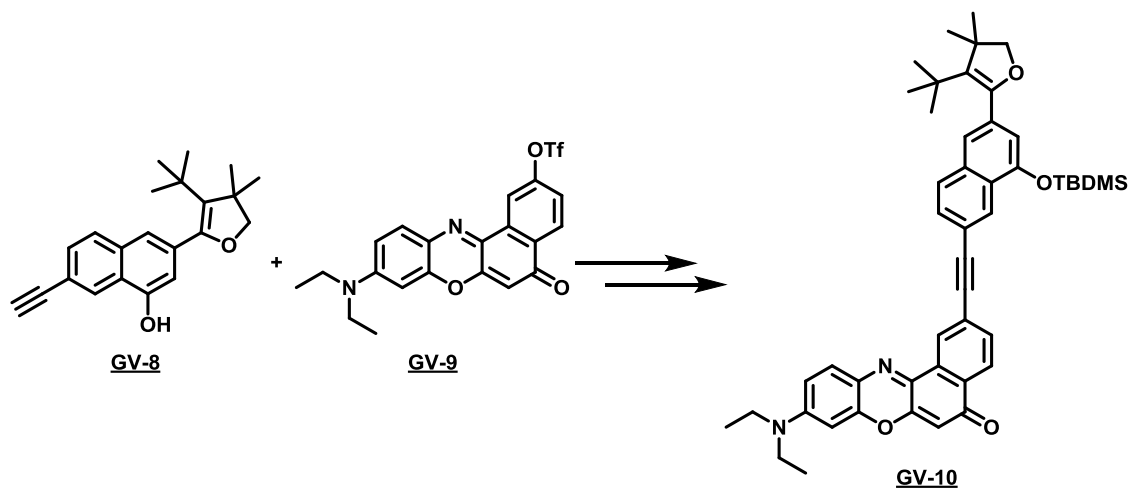


Figure III.22 : Représentation schématique de la formation du composé **GV-10**

Il ne restait donc qu'à effectuer la cycloaddition [2+2] qui donne accès au motif 1,2-dioxétane. Le produit **GV-11a** désiré a été obtenu avec, néanmoins, son analogue ouvert **GV-11b** selon un *ratio* de 55/45 (Figure III.23). Malgré des efforts de purifications et de modifications des conditions expérimentales, le produit n'a pas pu être obtenu complètement pur. Les propriétés spectrales de chimiluminescence ont donc été déterminées sur ce mélange, afin de vérifier l'efficacité du transfert d'énergie.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

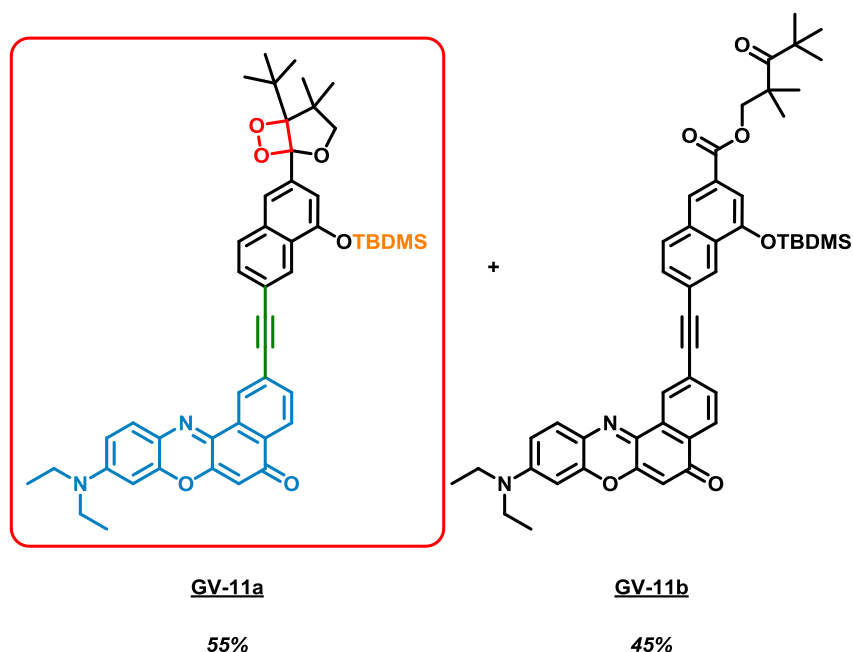


Figure III.23 : Représentation schématique des produits **GV-11a** et **GV-11a** obtenus lors de la formation du motif 1,2-dioxétane

2.2.2.2 Déclenchement de chimiluminescence par détection d'ions fluorures : preuve de concept

Une première mesure physico-chimique consistait à l'enregistrement des spectres d'absorption et d'émission par fluorescence du mélange 55/45 dans le DMSO. Ainsi, d'après la Figure III.24, le spectre d'absorption présente un maximum de 571 nm. Le spectre d'émission par fluorescence est centré autour de 645 nm pour une excitation imposée à 570 nm. Ceci concorde avec les cassettes synthétisées par le groupe du Prof. Burgess.¹⁷⁰ La partie responsable de la fluorescence de cette sonde n'étant pas structurellement modifiée, il a été supposé que la présence du composé **GV-11b**, issu de la décomposition du motif 1,2-dioxétane, n'altérerait pas les propriétés physico-chimiques de la cassette **GV-11a**.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

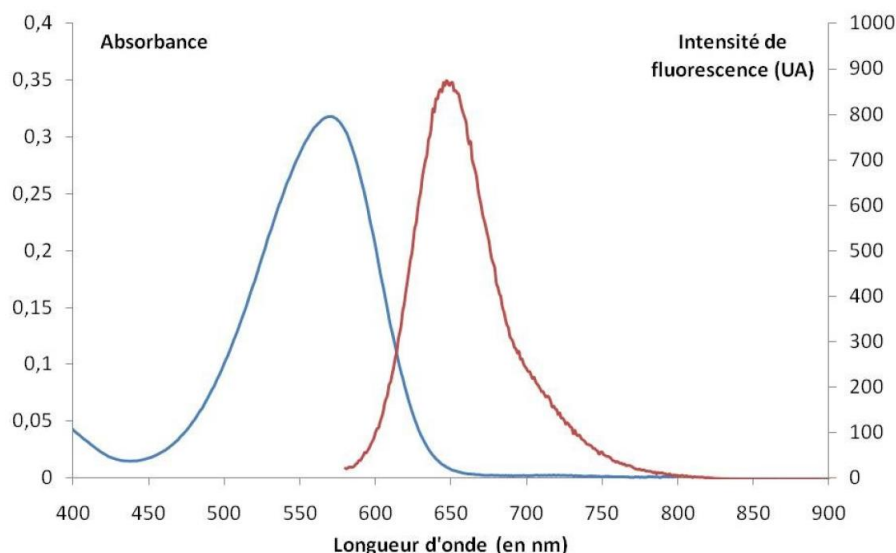


Figure III.24 : Spectres d'absorption et d'émission du mélange **GV-11a + GV-11b** (55/45) [mesures effectuées dans le DMSO, 25 °C, pour des concentrations en sonde **GV-11a + GV-11b** de 12,8 μ M pour l'absorption et de 128 nM pour l'émission, avec une excitation à 570 nm]¹⁷⁸

La chimiluminescence a par la suite été déclenchée par mise en solution du mélange de **GV-11a** et **GV-11b** avec du fluorure de *tert*-butylammonium (TBAF). Comme l'indique la Figure III.25, le spectre d'émission a été enregistré à intervalle régulier et présente un maximum à 630 nm qui correspond à la longueur d'onde maximale du Nile red. Ceci traduit donc un transfert d'énergie du motif 1,2-dioxétane vers le fluorophore. Toutefois, nous pouvons également observer un épaulement autour de 560 nm qui pourrait s'expliquer par un transfert d'énergie non total mais qui ne correspondrait pas alors à l'émission propre du chimiluminophore (*i.e.* la partie naphthalène). En effet le naphthalène **GV-12** possédant la triple liaison a été synthétisé au préalable afin et son spectre de chimiluminescence a été également enregistré dans les mêmes conditions que le mélange **GV-11a + GV-11b**. Son émission maximale est observée est à 530 nm (Figure III.26). Par manque de temps, ce second mode d'émission n'a pas été investigué plus avant, il nous reviendra de chercher à le comprendre si ces résultats sont reproductibles avec le 1,2-dioxétane purifié.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

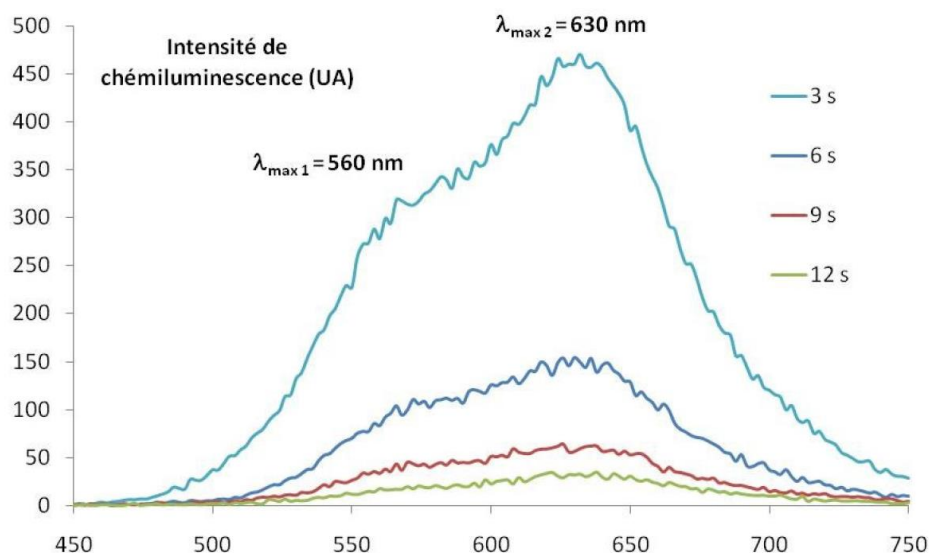


Figure III.25 : Spectre d'émission de chimiluminescence du mélange **GV-11a** + **GV-11b** (55/45) [mesures effectuées dans le DMSO, 25 °C, pour une concentration en sonde **GV-11a** + **GV-11b** de 1.28 mM (2 mL) dans 1 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO]¹⁷⁸

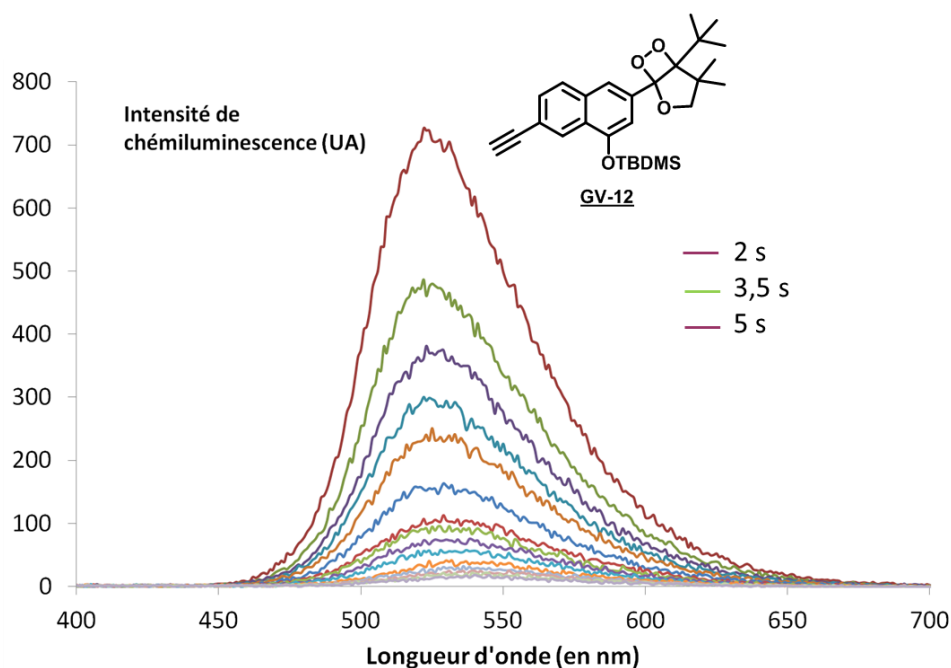


Figure III.26 : Spectre d'émission de chimiluminescence du composé **GV-12** [mesures effectuées dans le DMSO, 25 °C, pour une concentration en sonde **GV-12** de 1.28 mM (2 mL) dans 1 mL d'une solution de TBAF (10^{-2} M) dans le DMSO]¹⁷⁸

Cette étude qualitative a montré la capacité d'une cassette chimiluminescente, de type fluorophore-1,2-dioxétane, à émettre à la longueur d'onde du fluorophore, conformément à l'exemple décrit par le Prof. Burgess. Ces résultats incitent également à étendre le système pour un déclenchement de chimiluminescence dans des conditions physiologiques.

II. Résultats et discussion

Cette partie sera consacrée à la mise au point de nouveaux systèmes chimiluminescents à cœur naphtholique permettant la visualisation d'une activité enzymatique (*e.g.* phosphatase, nitroréductase) dans le proche IR. D'après les travaux/résultats antérieurs que nous venons d'évoquer, nous aborderons en détails les différentes stratégies envisagées permettant la formation de la cassette chimiluminescente hydrosoluble sélectionnée. Pour rappel, l'objectif, ici, est d'induire un transfert de type TBET de la plateforme naphtholique vers un fluorophore. Les résultats initiaux ayant montré que nous pouvions avoir une émission de luminescence dans le proche infra-rouge avec le naphthol synthétisé par le Dr. V Granclaude, nous avons dans un premier temps cherché à reproduire ses résultats, mais avec un analogue de Nile red hydrosoluble.

1. Première stratégie : modification du groupement protecteur par introduction d'un groupement de type méthoxyéther (MOM)

A l'égard des travaux évoqués ci-dessus, nous avons choisi de construire notre plateforme de la manière suivante : un cœur naphthol portant le motif 1,2-dioxétane (en rouge) lié au fluorophore (en bleu), qui, cette fois-ci, serait une version hydrosoluble du Nile red, et à un déclencheur (en orange) correspondant à un substrat réactif vis-à-vis d'une enzyme d'intérêt (Figure III.27). Deux cibles ont été envisagées : la **cible 4** comportant un groupement phosphate pour une détection d'activité enzymatique de type phosphatase et la **cible 5** pour une détection d'activité enzymatique de type nitroréductase. Compte tenu des difficultés rencontrées lors de la synthèse de dérivés phosphates sur la plateforme phénol (Chapitre II.II.1.2.1), nous avons décidé de concentrer nos efforts sur la formation d'une plateforme réactive vis-à-vis de la nitroréductase.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

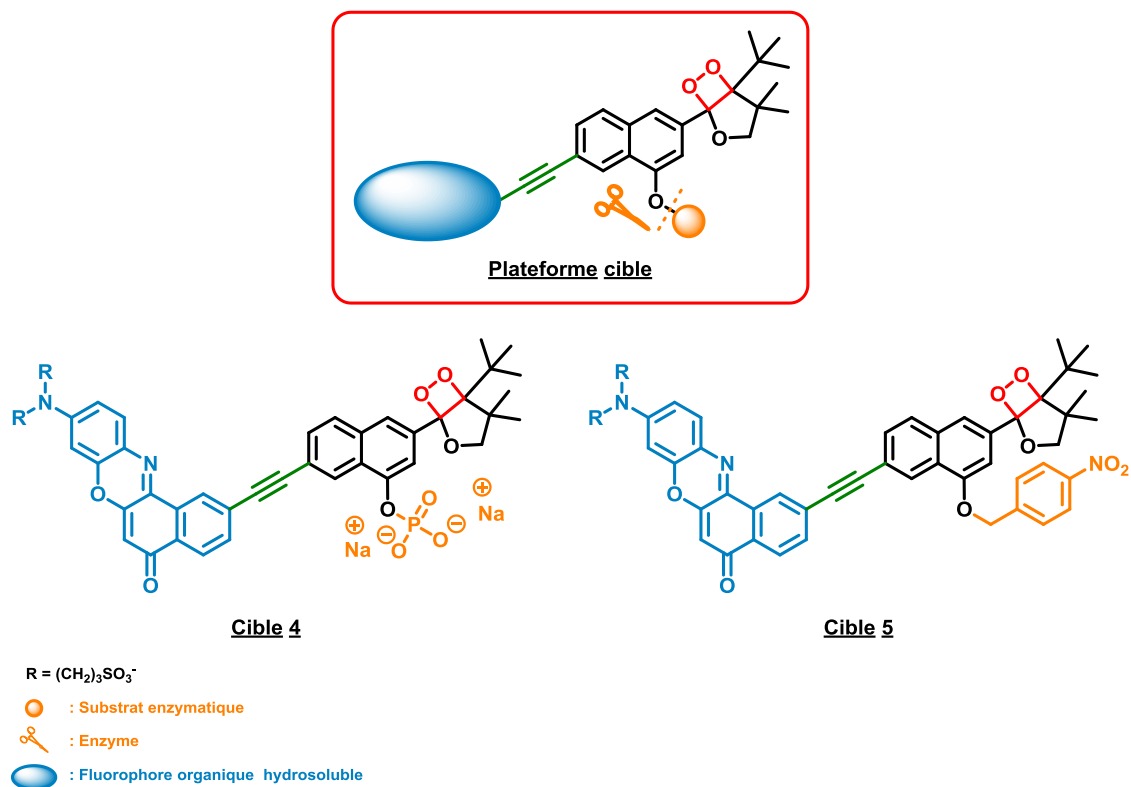


Figure III.27 : Représentation schématique de la sonde visée

Ainsi, notre première stratégie consiste à obtenir le composé **71** selon une réaction du Stobbe à partir du 4-hydroxybenaldéhyde **69** et du succinate de diéthyle **70** (Figure III.28). Ce composé **71** serait directement engagé dans l'étape de formation du cycle naphthalène et, tenant compte des difficultés rencontrées par le Dr. Grandclaude pour les dernières étapes de synthèse du cœur naphthol (Figure III.21), nous avons choisi d'introduire un groupement protecteur de type méthoxyméthyle (MOM) en lieu et place du groupement benzyle. Le motif DHF serait ensuite introduit sur le naphthalène **72** selon les mêmes conditions que celles décrites par le Prof. Matsumoto et par le Dr. V. Grandclaude pour conduire au composé **73**. Puis, le déclencheur (*i.e.* le substrat réactif vis-à-vis d'une enzyme d'intérêt) y serait additionné avant une introduction du fluorophore qui, elle, s'effectuerait par le biais d'une réaction de couplage croisé de Sonogashira *via* une triple liaison. La dernière étape demeurant la formation de la plateforme cible par une étape de cycloaddition [2+2].

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

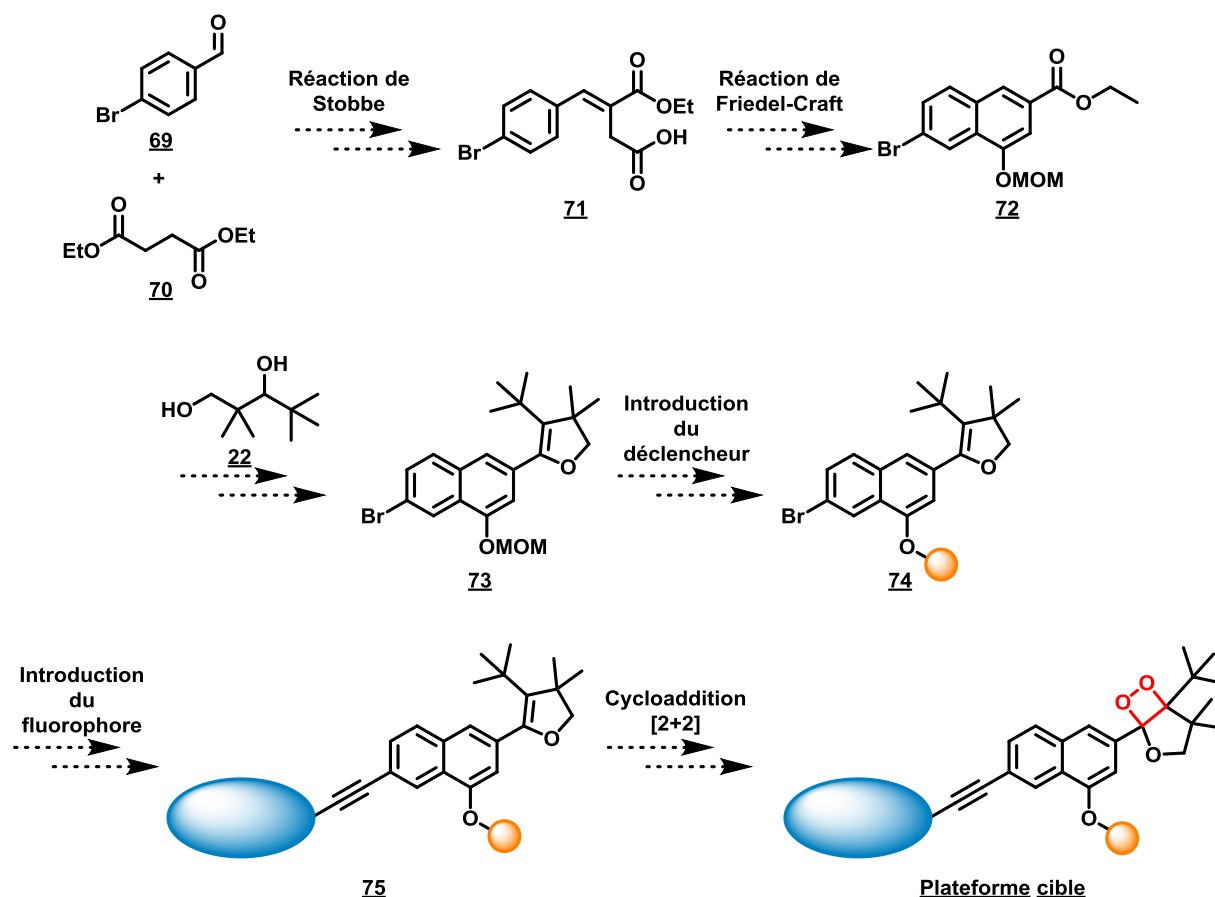


Figure III.28 : Représentation schématique de la stratégie envisagée

La synthèse commence par la formation du cycle naphthalène suivant deux étapes successives (Figure III.29). Une première étape qui permet d'obtenir l'acide **71** à partir du 4-bromobenzaldéhyde **69** commercial *via* une réaction de Stobbe. Pendant l'addition des réactifs sur la suspension d'hydruide de sodium, la température de cette réaction doit être rigoureusement contrôlée pour avoir un rendement optimal. Le composé **71** est ensuite engagé dans l'étape de cyclisation qui permet de former le naphthalène **76** avec un rendement de 81% sur deux étapes.

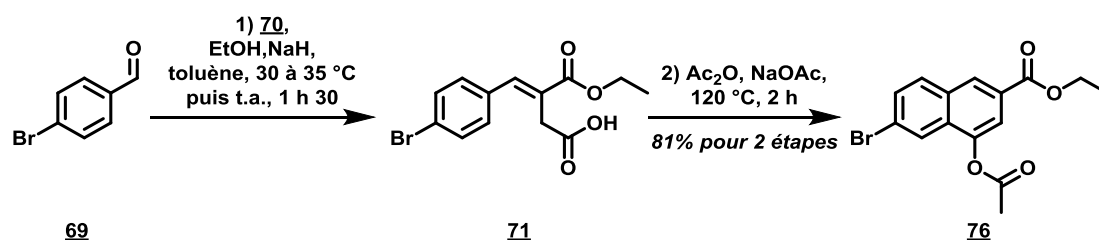


Figure III.29 : Synthèse du composé **76**

La réaction de Stobbe étant assez singulière, nous avons souhaité détailler son mécanisme dans la Figure III.30. Ainsi, une réaction d'énolisation sur le succinate de diéthyle **70** a d'abord lieu en présence

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

d'éthanolate de sodium. L'énolate **77** ainsi généré attaque la fonction carbonyle du 4-bromobenzaldéhyde **69** selon une réaction d'aldolisation pour fournir le composé **78**. La formation de celui-ci induit instantanément une lactonisation intramoléculaire par élimination d'éthanolate. Ce dernier vient ouvrir la lactone pour fournir le carboxylate **81** qui, suivant une hydrolyse en milieu acide, est converti en composé **71** dont la double liaison est de configuration (*E*).

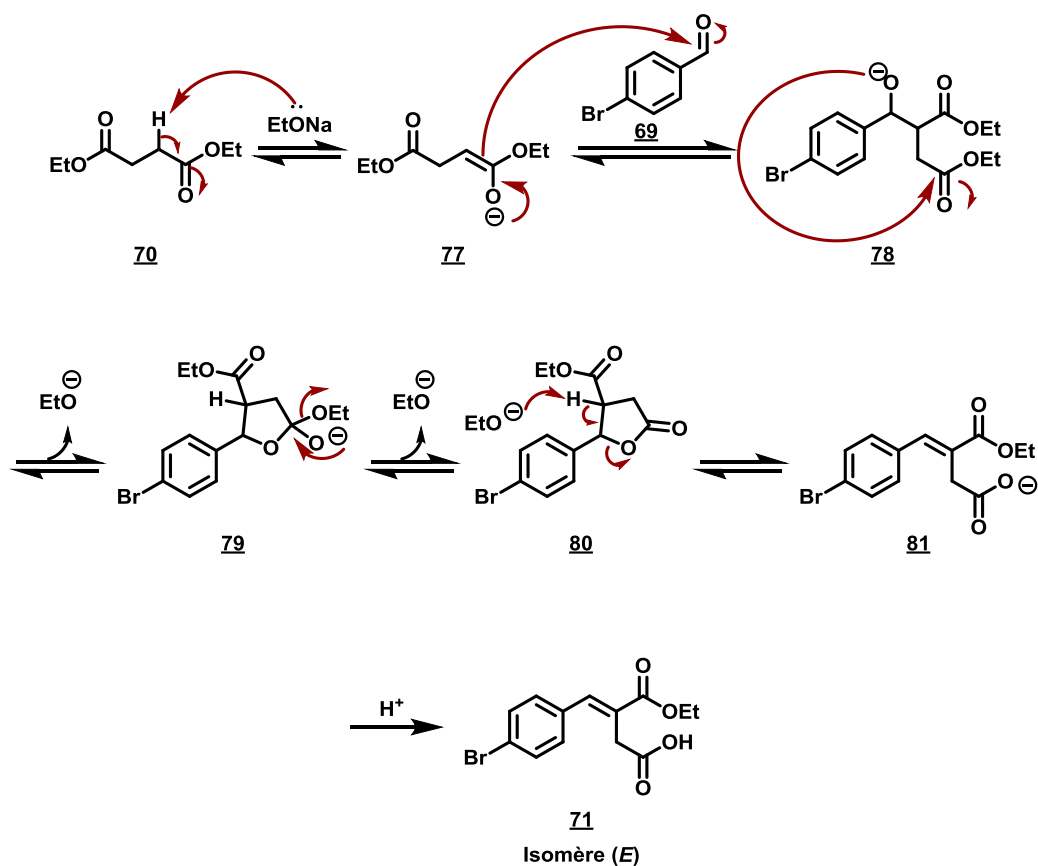


Figure III.30 : Représentation schématique du mécanisme de la réaction de Stobbe

Dans la suite de la synthèse, le groupement acétyle protégeant le naphtol obtenu lors de la réaction de cyclisation est retiré par hydrolyse acide à reflux dans l'acétone pour fournir le composé **82** avec un rendement quasi quantitatif (98%) (Figure III.31). Puis, une étape d'alkylation du naphtol **82** par le chlorure de méthoxyméthane (MOMCl) en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le dichlorométhane a permis d'obtenir la molécule **72**. La fonction ester de ce naphthalène est ensuite réduite en alcool **83** au moyen d'aluminohydrure de lithium (LiAlH_4) dans le tétrahydrofurane avec un excellent rendement de 94%.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphтолique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

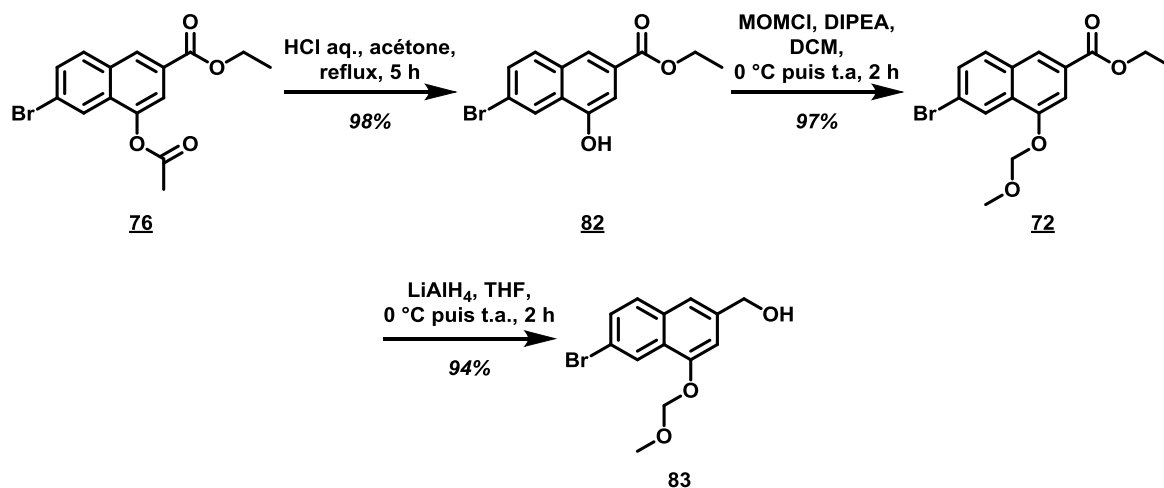


Figure III.31 : Synthèse du composé **83**

Par la suite, nous avons souhaité convertir cet alcool **83** en groupement partant selon les mêmes conditions employées pour notre plateforme phénolique c'est-à-dire en présence de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane (Figure III.32). Ces conditions ont permis la formation du dérivé chloré **84** avec un rendement modéré de 31%. Ce résultat un peu décevant nous a incité à optimiser cette étape cruciale pour la construction du dihydrofurane précurseur du motif 1,2-dioxétane. Nous avons donc opté pour d'autres méthodes. Une première alternative était la conversion de notre alcool benzylique **85** en un dérivé mésylate. Le produit formé est instable et n'a pas pu être caractérisé, nous l'avons donc directement engagé dans l'étape suivante représentée en Figure III.33. Le produit **87**, alors issu de la réaction de Williamson, a été obtenu avec un rendement de 42% sur deux étapes. Toutefois, souhaitant caractériser chaque intermédiaire de notre synthèse, nous nous sommes de nouveau orientés vers la formation d'un dérivé halogéné. Nous avons donc, au départ, souhaité convertir l'alcool en un dérivé bromé selon les conditions classiques de la réaction d'Appel : le tétrabromométhane (CBr₄) et la triphénylphosphine (PPh₃) dans le dichlorométhane. Cependant ces conditions ont fourni le composé **86** en très faible quantité (rendement de 8%). En deuxième essai, la source de brome électrophile a été remplacée par du N-bromosuccinimide (NBS), le dérivé bromé **86** a pu être obtenu avec un rendement modéré de 29%. En dernier test, nous avons changé la nature de l'atome d'halogène : un atome de chlore en lieu et place d'un atome de brome. Ainsi, par réaction du composé **83** avec le N-chlorosuccinimide (NCS) en présence de triphénylphosphine dans le dichlorométhane, nous avons pu isoler le dérivé chloré **84** avec un bon rendement de 82%.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

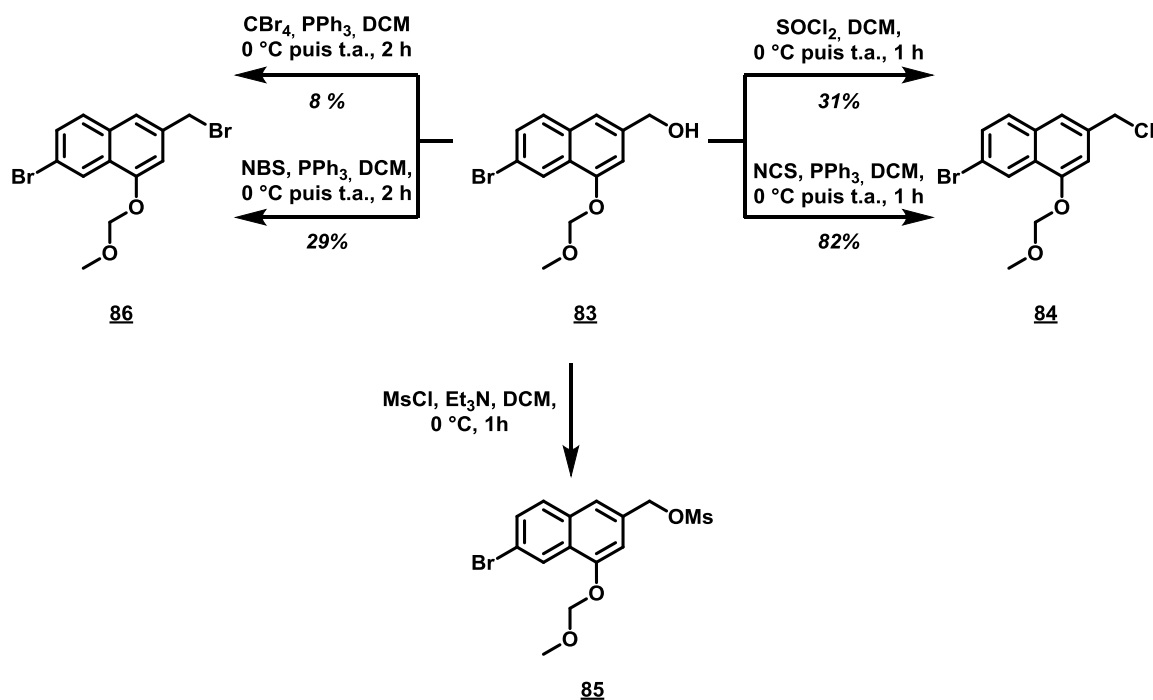


Figure III.32 : Représentation schématique des tentatives de conversion du composé **83** en un groupement partant

L'éther cyclique peut alors être formé. Le diol **22** est additionné sur le naphthalène en présence de NaH dans le diméthylformamide pour conduire à l'alcool secondaire **87** qui, ensuite, subit une oxydation par réaction avec le chlorochromate de pyridinium (PCC) pour fournir la cétone **88** de façon quantitative (Figure III.33). Comme décrit dans la synthèse de notre plateforme à cœur phénol, l'étape de cyclisation de la chaîne éther est réalisée en présence du diméthylsulfure de potassium formé *in situ* par réaction entre le *tert*-butanolate de potassium et le DMSO. Dans le cas de ce dérivé naphthalène, cette réaction a été réalisée plusieurs fois, et sur différentes échelles de synthèse. Il s'avère que le rendement n'est pas reproductible : sur une échelle de 150 mg de produit de départ **88**, nous avons obtenu un très bon rendement de 84%, mais lors de la montée en échelle, lorsque la réaction est menée sur 1 g de produit de départ **88**, le rendement chute drastiquement, et nous n'avons obtenu qu'un rendement de 34 %. Malgré cet inconvénient, nous avons poursuivi la synthèse de notre plateforme.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

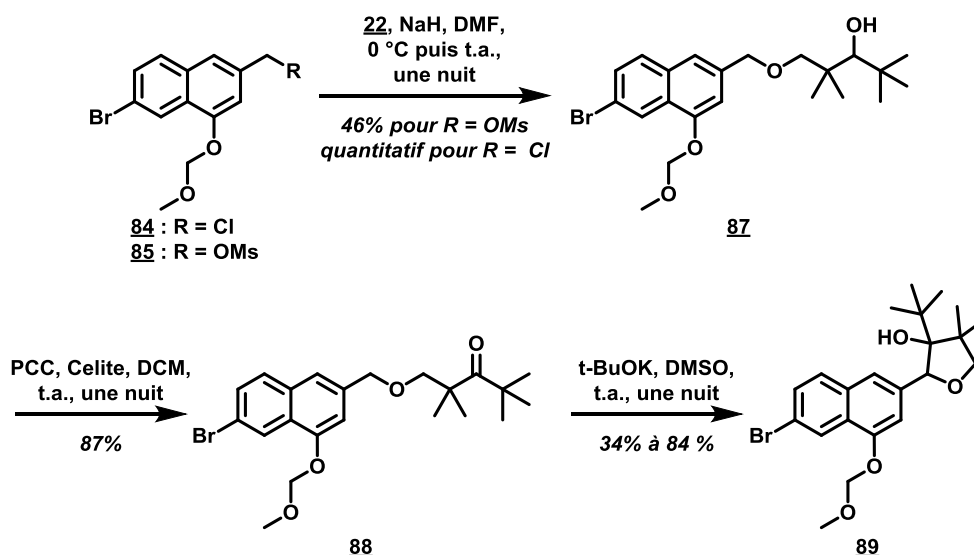


Figure III.33 : Synthèse du composé **89**

Nous avons ensuite tenté d'effectuer la réaction d'élimination donnant accès au dihydrofurane **73**. L'alcool **89** a donc été mis en réaction avec du chlorure de thionyle en présence de pyridine dans le dichlorométhane (Figure III.34). Cependant, nous avons observé la formation de produits secondaires en complément du composé **73** attendu et ce même après purification. De plus, ces conditions ont conduit à des résultats non reproductibles. Nous avons alors supposé que des traces d'acide présentes dans le chlorure de thionyle (*i.e.* et ce malgré sa distillation juste avant de l'engager dans la réaction), ou formées lors de la chloration (*i.e.* malgré la présence d'un excès de pyridine) pouvaient engendrer une hydrolyse du groupement MOM et donc mener à la formation de produits secondaires non exploitables. D'autres méthodes ont été employées : en utilisant dans le premier cas le chlorure de mésyle (plus doux que le chlorure de thionyle) en présence de triéthylamine et dans le deuxième cas nous avons choisis de reproduire les conditions décrites par le Prof. Matsumoto qui utilise l'acide *para*-toluène sulfonique monohydrate à reflux dans le toluène. Néanmoins, dans ces deux conversions, aucune conversion du composé de départ n'a été observée.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

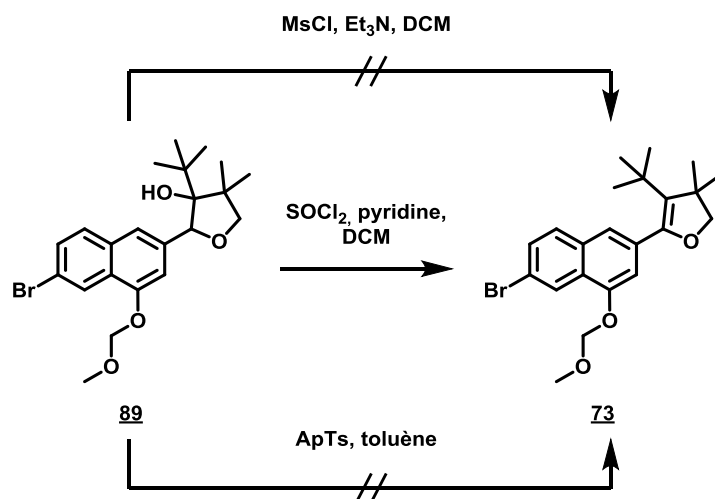


Figure III.34 : Essais de synthèse du dihydrofurane **73**

Au vu des résultats observés et difficultés rencontrées, le choix du groupement protecteur du phénol déclencheur a de nouveau été mis en question. Nous avons alors décidé de mettre entre parenthèse cette stratégie et de reprendre la synthèse développée par le Dr. Grand-Claude par introduction du groupement benzyle en lieu et place du groupement MOM.

2. Deuxième stratégie : introduction d'un groupement de type benzyle

2.1 Synthèse du chimiluminophore

Nous avons repris la synthèse du chimiluminophore à partir du naphol **82**. Celui-ci est donc protégé par un groupement benzyle par alkylation du phénol avec le bromure de benzyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétone à reflux (Figure III.35). Le dérivé **90** est obtenu avec un rendement de 66%. La fonction ester est ensuite réduite en l'alcool **91** correspondant selon des conditions classiques avec un bon rendement de 79%. Ces résultats sont similaires à ceux observés par le Dr. Grandclaude.

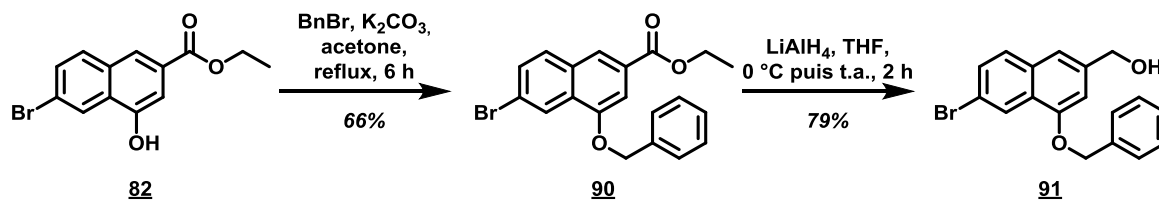


Figure III.35 : Synthèse du composé **91**

Puis, un aménagement fonctionnel permet d'obtenir le dérivé chloré **92** par réaction avec le chlorure de thionyle (Figure III.36). Le diol y est alors additionné au moyen d'hydrure de sodium dans le diméthylformamide pour conduire au composé **93** de façon quantitative. L'alcool secondaire du composé **93** est ensuite oxydé en cétone **94** par le PCC avec un bon rendement de 88%.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

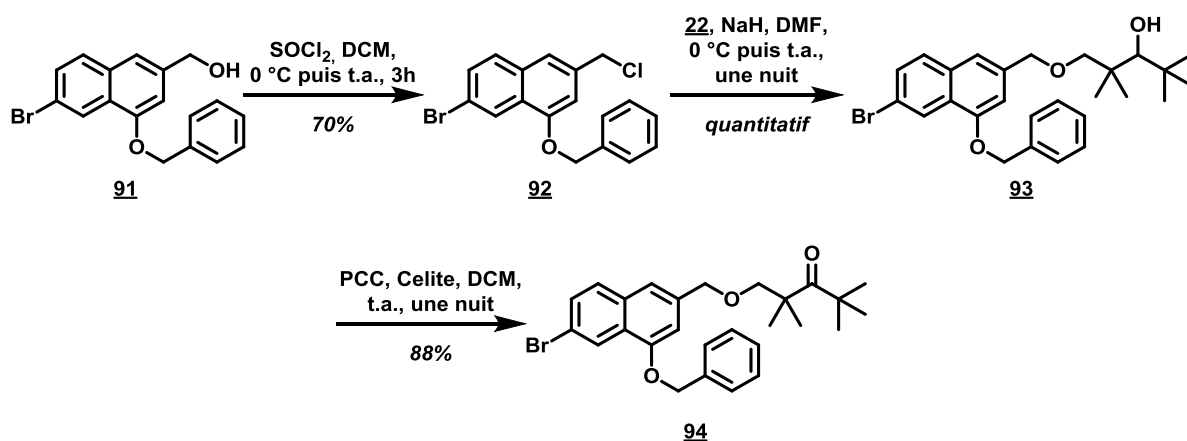


Figure III.36 : Synthèse du composé **94**

L'étape de cyclisation, par addition de la cétone **94** dans une solution de diméthyl de potassium, permet l'obtention du composé **95** avec un rendement modéré de 56% (Figure III.37). Une réaction de déshydratation conduit par la suite au dihydrofurane **96** avec un bon rendement de 91%. Pour cette voie de synthèse, seul le groupement protecteur a été modifié, nous pouvons donc affirmer que le groupement MOM était probablement la source des difficultés observées lors des essais de déshydratation effectués et présentés en Figure III.34. Il nous reste donc à introduire le déclencheur et le fluorophore sur le cœur naphtyle pour atteindre notre plateforme cible. Pour cela, nous devons déprotéger le groupement hydroxyle et additionner la triple liaison servant d'accroche au fluorophore.

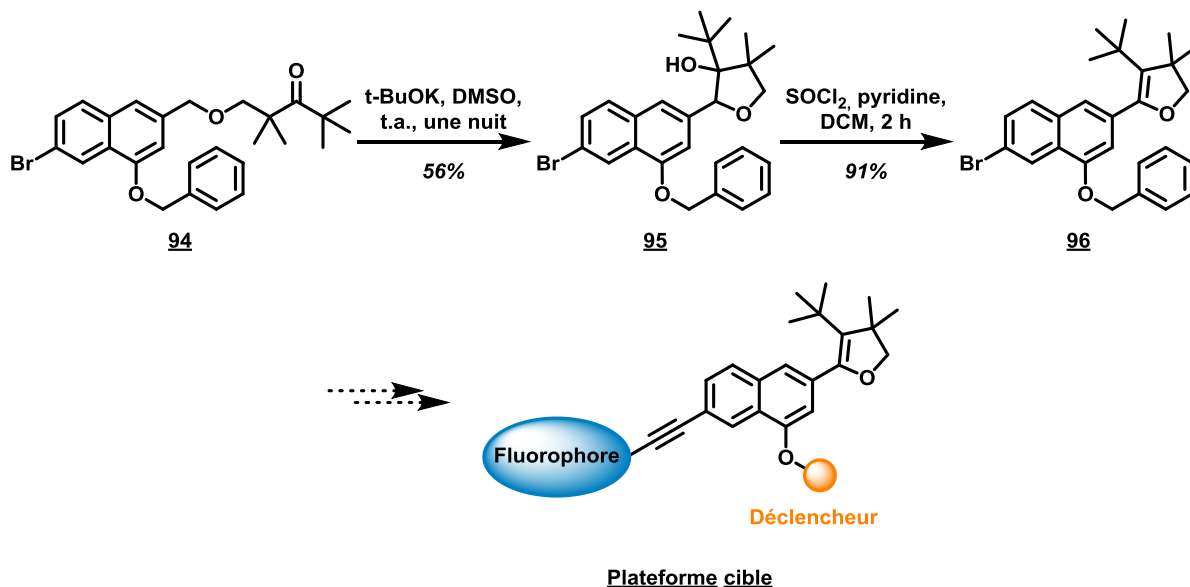


Figure III.37 : Synthèse du composé **96**

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

2.1 Choix et introduction d'un déclencheur de chimiluminescence

De même que pour nos sondes à motif phénol présentées dans le Chapitre II.II, ces sondes à cœur naphtol sont à visée diagnostique. Elles permettraient de détecter différentes activités enzymatiques (nitroréductase, phosphatase, estérase, ...) par simple modification du motif déclencheur de chimiluminescence. La stratégie que nous proposons vise justement à faire varier facilement le groupement fonctionnel autorisant le déclenchement de chimiluminescence. A l'égard des travaux effectués sur la synthèse des sondes à cœur phénol, nous avons, à ce jour, sélectionné un seul déclencheur : un groupement *para*-nitrobenzyle pour une détection de la nitroréductase. Une première approche a déjà été évoquée dans la Figure III.28: une introduction du déclencheur suivie d'une insertion de l'acétylène participant au couplage du fluorophore au naphtol. Une deuxième approche permettrait d'obtenir la plateforme **98** désirée par introduction de l'acétylène en amont du déclencheur (Figure III.38). Dans chacun des cas, le fluorophore serait par la suite couplé au cœur naphtol, et le motif 1,2-dioxétane serait formé en ultime étape de synthèse, comme initialement prévu.

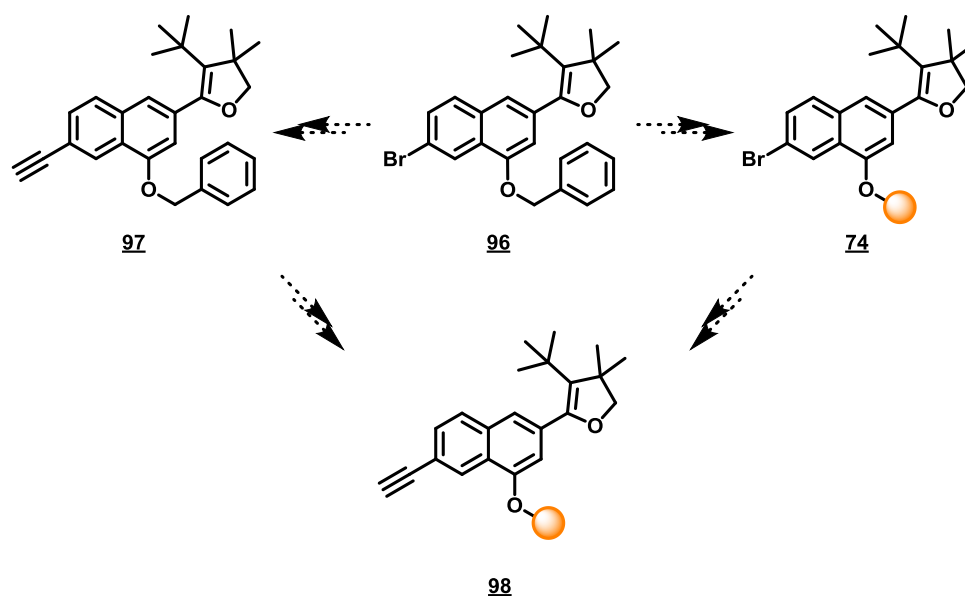


Figure III.38 : Représentation schématique des stratégies envisagées pour la synthèse du composé **98**

Nous allons donc présenter en détails ces deux approches et discuter des résultats obtenus dans chacun des cas.

2.1.1 Première stratégie : introduction de l'acétylène en amont du déclencheur

Nous avons décidé de procéder, dans un premier temps, par l'insertion de la triple liaison (Figure III.39). Le couplage est donc réalisé en présence de Pd(II) ($\text{Cl}_2\text{PdP}(\text{Ph}_3)_2$), d'iodure de cuivre, de diisopropyléthylamine, et d'acétylène de triméthylsilyl. De façon similaire aux travaux du Dr. Grand-Claude, ces conditions nous ont permis d'obtenir le composé **99** avec un rendement de 38%.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

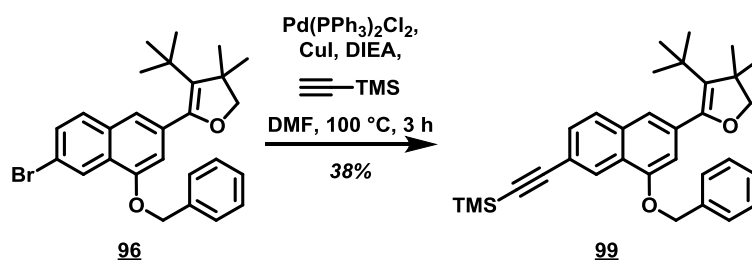


Figure III.39 : Synthèse du composé **99**

Pour obtenir le naphthol **101** comportant le groupement hydroxyle libre et un alcyne vrai, deux options se sont présentées (Figure III.40) : réaliser la réaction de débenzylation en amont de la déprotection de l'alcyne (voie A) ou l'inverse (voie B).

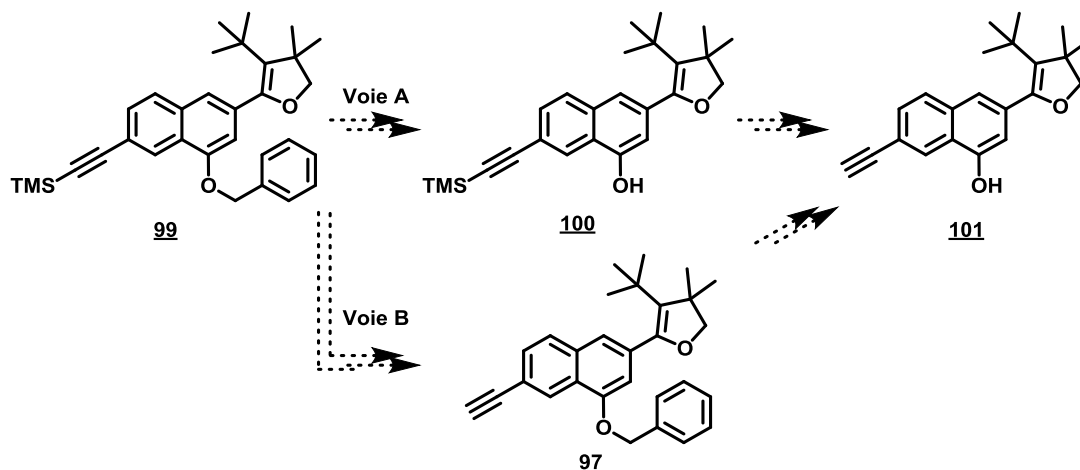


Figure III.40 : Représentation schématique des stratégies envisagée pour la synthèse du composé **101**

Nous nous sommes intéressés en premier lieu à la voie A. Afin d'éviter la réduction de la double ou de la triple liaison, l'hydrogénolyse du dérivé benzyle n'est pas envisageable en premier abord nous nous sommes tournés vers la méthode utilisée antérieurement au laboratoire et également utilisée sur notre plateforme phénolique. Le composé **99** est donc mis en réaction avec le trichlorure de bore (BCl_3) dans le dichlorométhane pour conduire au naphthol **102**, avec un rendement de 61%. L'étape suivante de désilylation en présence de carbonate de potassium dans le méthanol a permis d'obtenir l'alcyne vrai **101a** avec un rendement de 27%.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

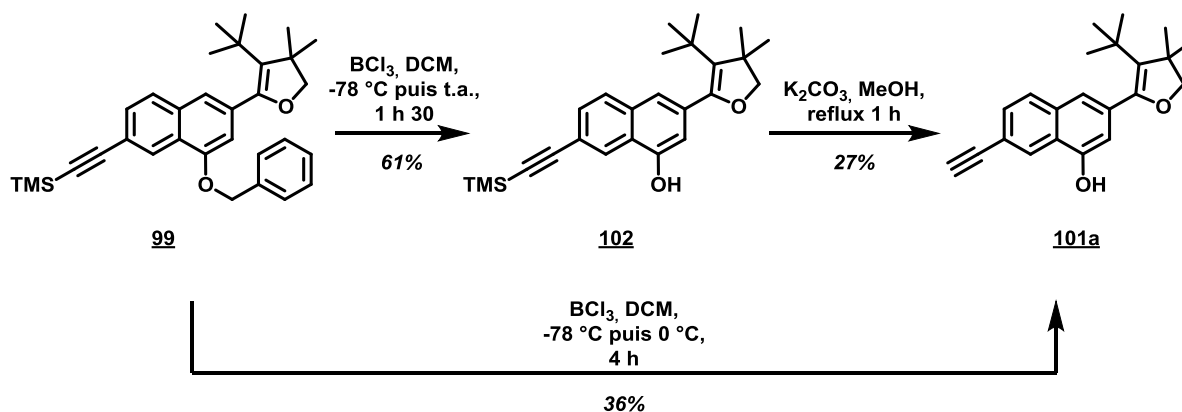


Figure III.41 : Synthèse du composé **101a** par utilisation de la voie A

De façon surprenante, nous avons noté, lors de cette réaction, l'apparition d'un autre composé Synthèse du composé **101b** qui semble être le résultat d'un homo-couplage. Ceci concorderait avec les observations du Dr. Grandclaude quant à un éventuel couplage de Glaser (Figure III.42). Cette réaction a lieu en présence d'une base, de dioxygène et de Cu(I). Le mécanisme passe par l'échange d'un proton acétylénique avec le Cu(I). Celui-ci est oxydé en Cu(II) par le dioxygène, puis la liaison carbone-cuivre subit une rupture homolytique qui conduit à la formation d'un radical acétylénique et de Cu(I). Le radical acétylénique réagit ensuite avec un autre monomère et forme le dimère. Dans notre cas, nous supposons que des traces de Cu(I) étaient encore présentes, malgré une purification sur gel de silice du composé **99** issu du couplage de Sonogashira. L'étape de formation du composé **101a** a été réalisé en présence d'une base et le solvant de réaction n'a pas été dégazé, le couplage de Glaser a pu avoir lieu.

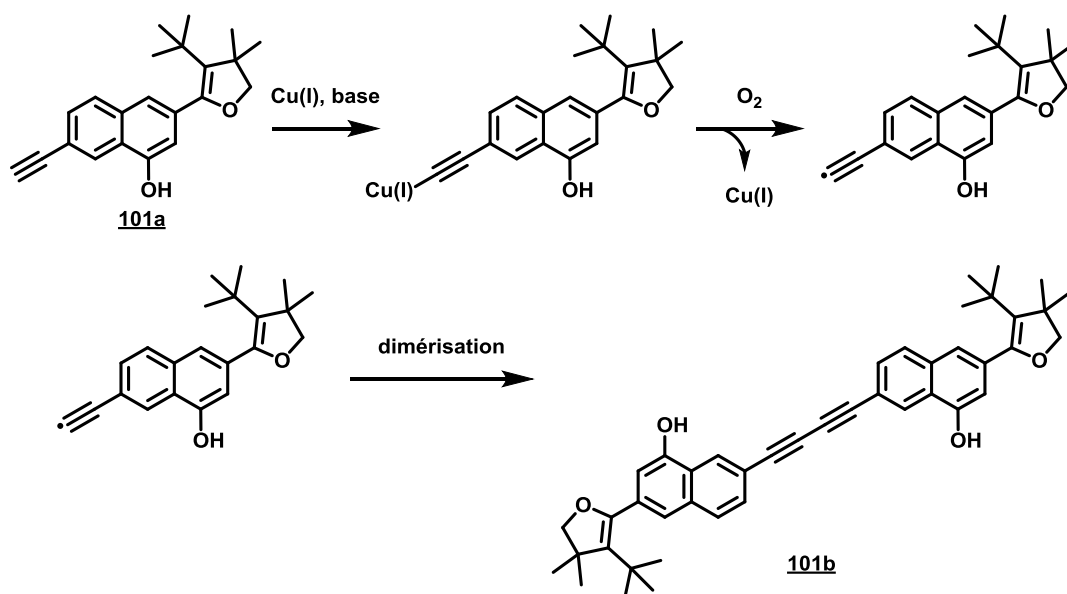


Figure III.42 : Représentation schématique du mécanisme de couplage de Glaser ayant pu avoir lieu sur le composé **101a**

Par ailleurs, lors de l'étape de débenzylation, nous avons observé la formation de traces du composé **101a**, ce qui pourrait s'expliquer soit par le caractère acide de BCl_3 soit par la nature des conditions

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

employées pour neutraliser l'excès de BCl_3 et le borane intermédiaire (*i.e.* conditions basiques). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons de nouveau engagé le composé **99** dans les conditions de débenzylation sur un temps de réaction de 4 heures. Nous avons alors pu isoler le composé **101a** en une seule étape, mais avec un rendement de 36 %. Cette valeur, bien que supérieure au rendement global de l'approche séquentielle précédente (*i.e.* débenzylation/désilylation), reste faible. Souhaitant optimiser d'avantage notre synthèse, nous nous sommes alors dirigés vers la voie B. Ainsi, la déprotection de l'alcyne **99** au moyen du fluorure de tetrabutylamonium a permis l'obtention de l'alcyne vrai **97** avec un rendement de 51% (Figure III.43). De même que dans la voie A, nous avons employé le trichlorure de bore pour libérer le naphtol et conduire au composé **101a** avec un rendement modéré de 46%. Finalement, ces deux voies ont des rendements globaux quasiment identiques et nous ont permis d'accéder au composé **101a** avec un rendement moyen d'environ 20% sur deux étapes. Cependant, la méthode de choix pour obtenir ce naphtol **101a** reste celle mettant en réaction le composé **99** avec le BCl_3 pendant 4 heures (Figure III.41).

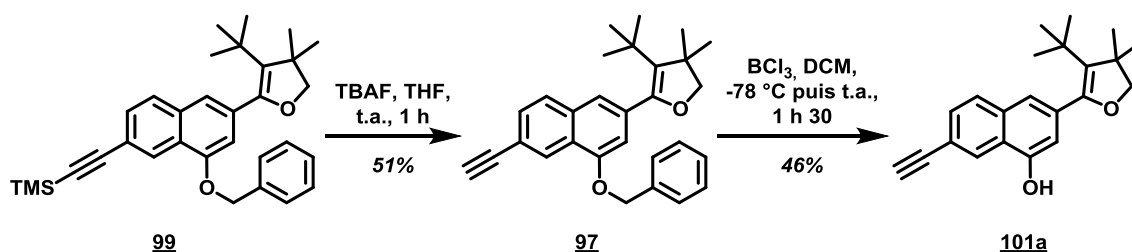


Figure III.43 : Synthèse du composé **101a** par utilisation de la voie B

La plateforme **101a** est maintenant disponible pour y introduire le déclencheur et le fluorophore. Une étape d'alkylation a donc été réalisée en présence de bromure de *para*-nitrobenzyle et de carbonate de potassium dans l'acétonitrile. Malheureusement, en raison d'une faible conversion du naphtol **101a**, le composé **103** a été obtenu avec un rendement médiocre de 2%. Cela remet en question la possibilité d'introduire le déclencheur en présence d'un alcyne vrai. Nous nous sommes alors dirigés vers la deuxième stratégie qui vise à introduire le groupement *para*-nitrobenzyle en premier.

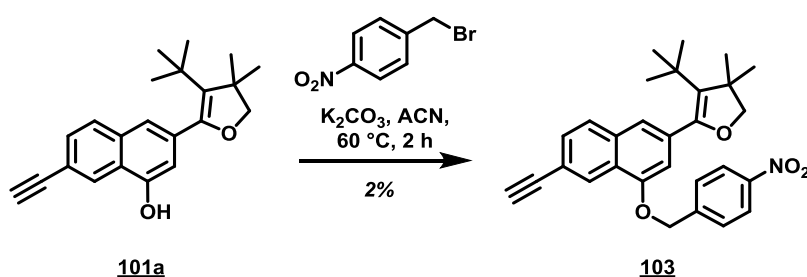


Figure III.44 : Synthèse du composé **103**

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

2.1.2 Deuxième stratégie : introduction du déclencheur en amont de l'acétylène

La deuxième stratégie commence avec la libération du naphtol par réaction avec le trichlorure de bore dans le dichlorométhane. Le naphtol **104** est obtenu avec un rendement de 68%. L'alkylation de celui-ci en présence du bromure de 4-nitrobenzyl a conduit au composé **105** avec un rendement de 65%.

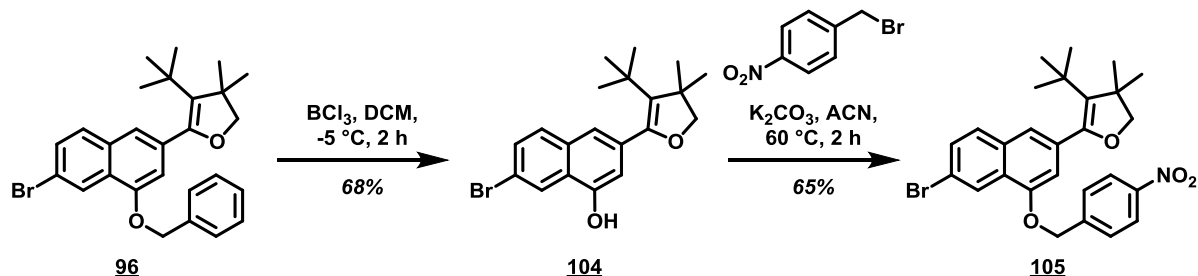


Figure III.45 : Synthèse du composé **105**

Nous avons souhaité vérifier la possibilité d'accéder au 1,2-dioxétane sur un motif naphtol protégé par un groupement para-nitrobenzyl, en réalisant la réaction de cycloaddition de type [2+2] entre l'oxygène singulet et le composé **105** pour obtenir le composé **106a** (Figure III.46). Nous avons utilisé les mêmes conditions que celles employées pour la formation du 1,2-dioxétane sur le cœur phénolique (*i.e.* composé **29a**, Figure II.59) : le composé **105** est mis en réaction avec le bleu de méthylène dans le sous atmosphère d'oxygène et irradiation à l'aide d'une lampe de 60 W. Pour éviter la formation spontanée du produit d'ouverture **106b**, la réaction s'effectue à 0°C . Nous avons également utilisé le chloroforme deutéré pour que l'oxygène singulet est une durée de vie optimale et également pour faciliter le suivi de la réaction par RMN du ^1H .

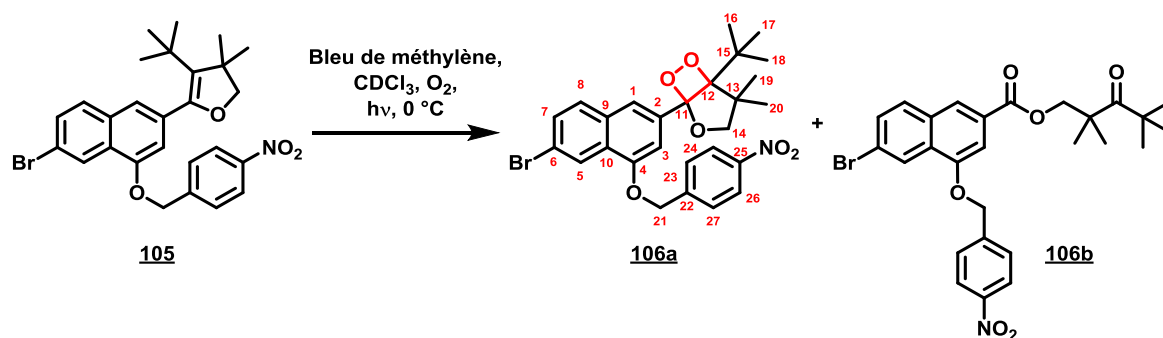


Figure III.46 : Synthèse du 1,2-dioxétane **106a**

Malgré le contrôle permanent de la température, nous avons observé, au cours de la réaction, la formation simultanée des composés **106a** et **106b** comme l'indique le spectre RMN du ^1H représenté en Figure III.47 (spectre bleu). Nous avons tenté de séparer les deux composés par purification sur gel de silice native ou neutralisée par addition de triéthylamine, cependant le produit de dégradation **106b** est encore observé (*i.e.* spectre orange sur la Figure III.47). Ceci pourrait s'expliquer par une photosensibilité du naphthalène **105**, notamment par la présence d'un atome lourd, l'atome de brome. En effet, par irradiation continue, des réactions de type radicalaires pourraient avoir lieu et serait la cause d'une ouverture spontanée du motif 1,2-dioxétane.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

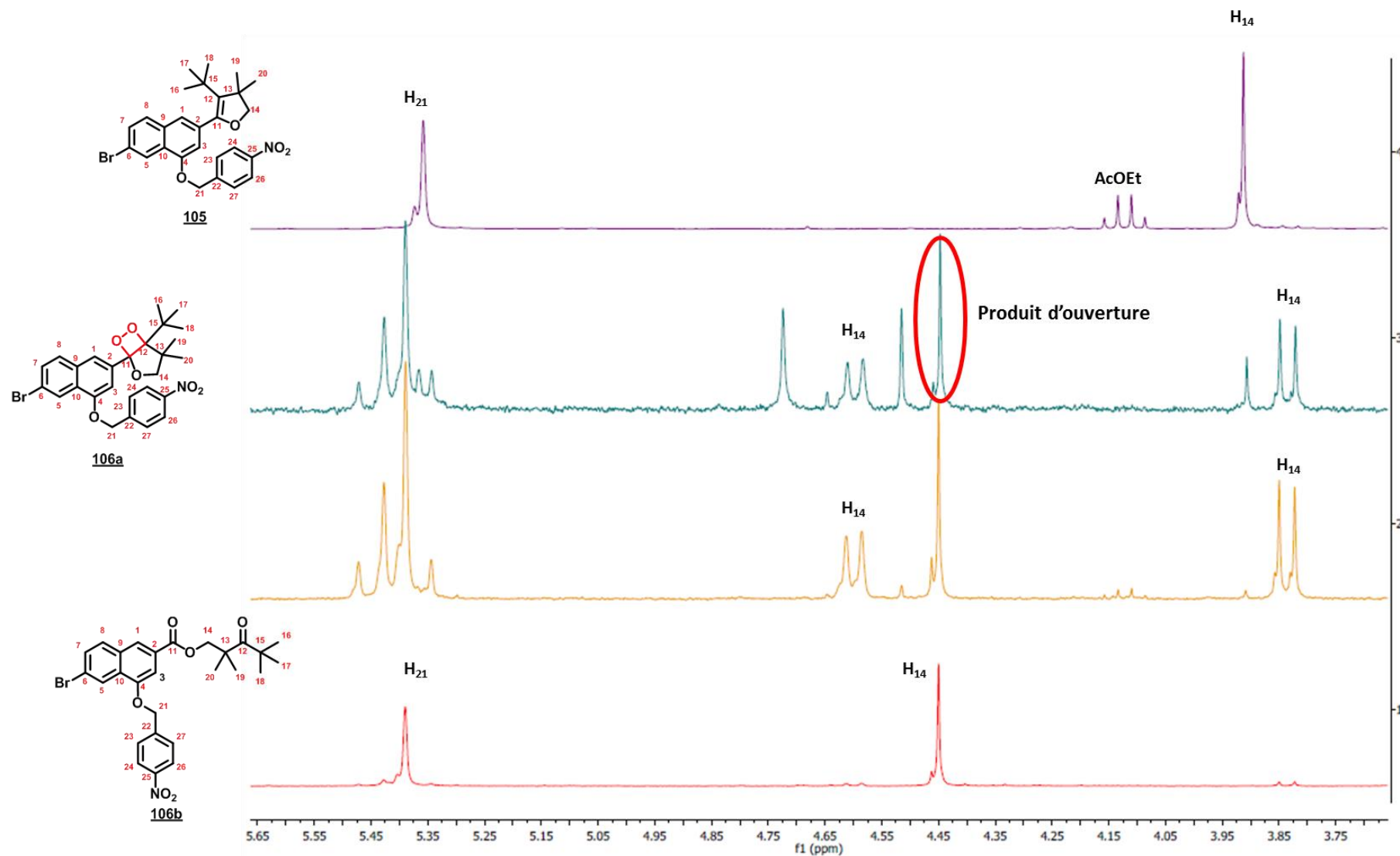


Figure III.47 : Représentation des spectres RMN ^1H (300 MHz, dans le CDCl_3) respectifs des composés **105** (en violet) et **106** (en bleu : produit brut, ; en orange : purification par colonne chromatographique sur gel de silice et isolation d'un mélange **106a** + **106b** ; en rouge : purification par colonne chromatographique sur gel de silice et isolation du composé **106b**)

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

Nous avons alors tenté une autre méthode de formation du motif 1,2-dioxétane, déjà utilisée au laboratoire (*i.e.* pour la synthèse de la sonde **RJA-1**)¹⁷⁹, qui ne nécessite pas une irradiation lumineuse. L'oxygène singulet est généré cette fois-ci à partir de l'ozone et du triphénylphosphite.¹⁷⁹ La réaction opère comme suit : à basse température (*i.e.* -78 °C), l'ozone réagit sur le triphénylphosphite pour former une espèce trioxaphosphétane stable (Figure III.48). Lorsque la température de réaction remonte à -20 °C, cet oxaphosphétane se décompose pour former le triphénylphosphate et l'oxygène singulet.

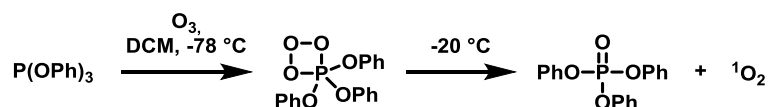


Figure III.48 : Représentation schématique de la formation de l'oxygène singulet via une approche non photochimique

Nous avons mis en réaction le naphthalène **105** dans ces conditions, et l'abris d'une source lumineuse, pour conduire au composé **106a** (Figure III.49). Malheureusement, aucune conversion du composé **105** de départ n'a été observée.

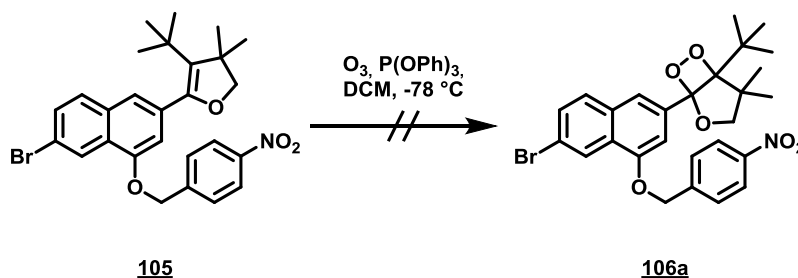


Figure III.49 : Essai de synthèse du composé **106a**

La triple liaison protégée par un groupement de type TMS, a été introduite selon les mêmes conditions que précédemment pour conduire à l'alcyne **107** avec un rendement de 72% (Figure III.50). Afin de vérifier si l'atome de brome était responsable de la décomposition spontanée du composé **106a**, nous avons tenté de réaliser la cycloaddition [2+2] sur le composé **107** via l'utilisation du bleu de méthylène sous atmosphère d'oxygène. Néanmoins, les résultats obtenus dans cette réaction sont identiques aux résultats observés précédemment.

¹⁷⁹ L. M. Stephenson, M. B. Zielinski *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5819.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

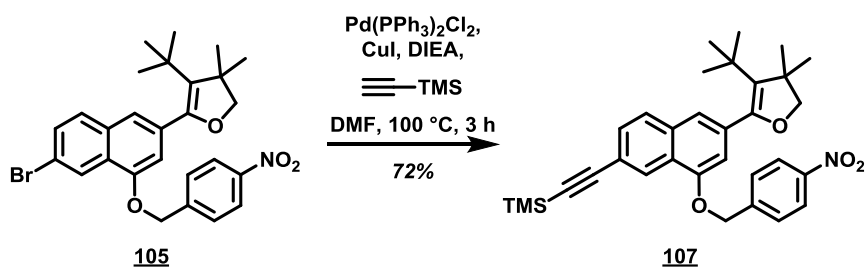


Figure III.50 : Synthèse du composé **107**

Pour atteindre la cible **103**, il nous reste la formation de l'alcyne vrai par déprotection du groupement silylé. De même que pour le composé **99**, le naphthalène **107** est mis en réaction avec le TBAF dans le THF à température ambiante pendant une heure (Figure III.51). Or, ces conditions ne nous ont pas permis de former le composé **103** désiré mais plutôt son analogue **107** ayant perdu le bras *para*-nitrobenzyle. D'après des exemples de la littérature, le TBAF est un réactif de choix pour déprotéger les esters de 4-nitrobenzyle, notamment sur des chaînes peptidiques.¹⁸⁰ Dans notre cas, et ce de manière assez surprenante, il permet également de déprotéger les éthers aromatiques de 4-nitrobenzyle, ce qui pourrait s'expliquer par le caractère nucléofuge de ce naphtol. Malheureusement, ce composé **108** nous est, à ce stade de la synthèse, d'aucune utilité. En effet, le déclencheur spécifique de la NTR, doit être introduit de nouveau sur la plateforme. Cette deuxième stratégie n'est donc pas viable en ce qui concerne le déclencheur de type *para*-nitrobenzyle. Il faudrait trouver une autre méthode de déprotection de l'alcyne qui ne s'accompagne pas de la formation d'un dimère.

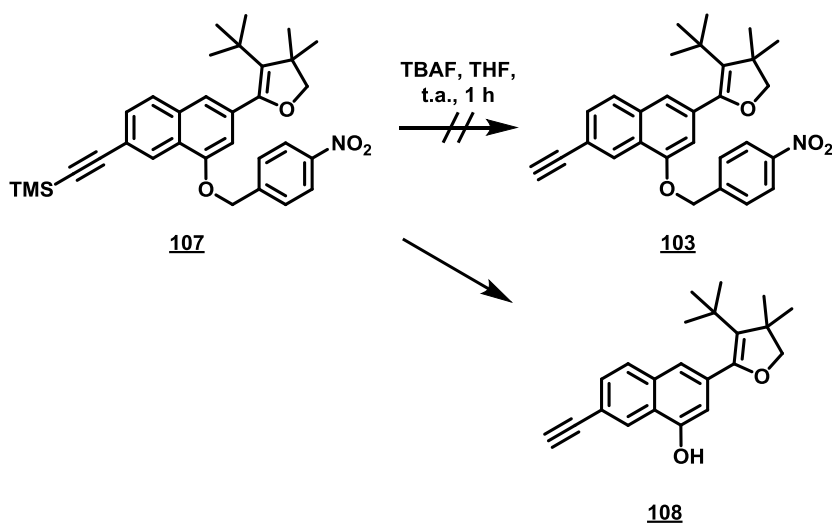


Figure III.51 : Essai de synthèse du composé **103**

¹⁸⁰ M. Namikoshi, B. Kundu, K. L. Rinehart *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5464.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

Une autre solution serait d'introduire l'acétylène sur le fluorophore. Le couplage des deux partenaires (*i.e.* la plateforme naphtol **74** et le fluorophore) devrait en rester le même que celui initialement prévu (Figure III.52).

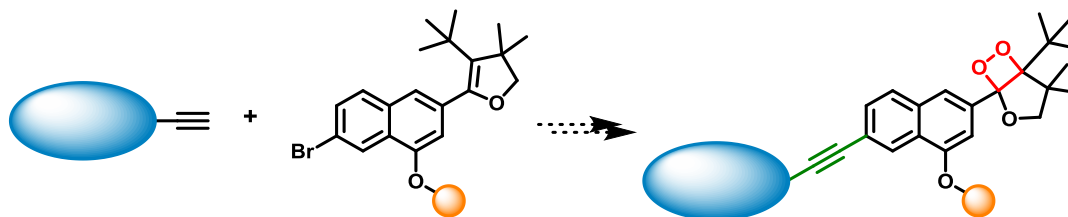


Figure III.52 : Représentation schématique de l'introduction de la triple liaison sur la plateforme naphtol

3. Valorisation du chimiluminophore à cœur naphtol

Parallèlement à la synthèse de la plateforme cible, nous nous sommes intéressés à la formation du produit de dégradation résultant de l'ouverture du motif 1,2-dioxétane. L'objectif, ici, est de vérifier la correspondance du spectre de chimiluminescence de la sonde désirée avec le spectre d'émission de fluorescence du produit d'ouverture **110**. De plus, ceci nous permettrait de vérifier l'hypothèse établie par le Dr. Grandclaude quant à un transfert d'énergie incomplet de l'ester vers le Nile red. Notre stratégie commence avec le composé **90** sur lequel la chaîne diol **22** est introduite (Figure III.53). Puis une étape d'oxydation de l'alcool secondaire **109** suivie d'une étape déprotection du groupement benzyle nous permettrait d'obtenir le céto-ester **110**. La plateforme **111** ciblée serait alors obtenue après introduction de la triple liaison suivie de celle du fluorophore.

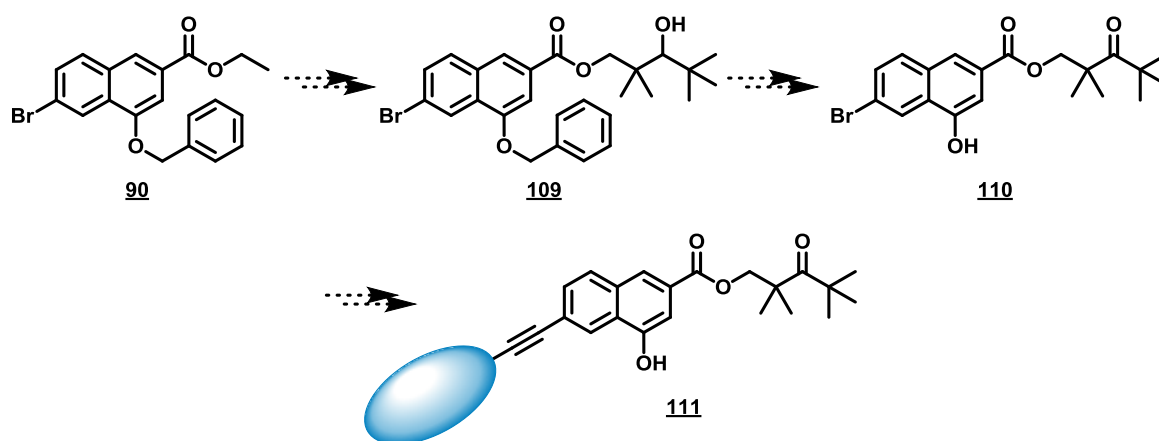


Figure III.53 : Représentation de la stratégie visée pour la synthèse du composé **111**

Nous avons tenté en premier lieu d'introduire le diol **22** sur le naphtolène **90** selon une réaction de trans-estérification en présence de carbonate de potassium dans le DMF à reflux (Figure III.54).

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

Cependant, seule une multitude de produits non exploitables a été observée. Nous sommes donc orientés vers une synthèse du composé **109** en deux temps. Une étape de saponification en présence de lithine (LiOH), dans un mélange THF/MeOH/H₂O : 3/1/1, permet l'obtention de l'acide **112** avec un rendement quasi quantitatif (*i.e.* 98%). Le diol **22** est ensuite introduit sur la plateforme par réaction d'estérification de Steglich en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et de N,N'-dicyclocarbodiimide (DCC) dans le DMF. Le composé **113** est alors obtenu avec un rendement 67 % (Figure III.55).

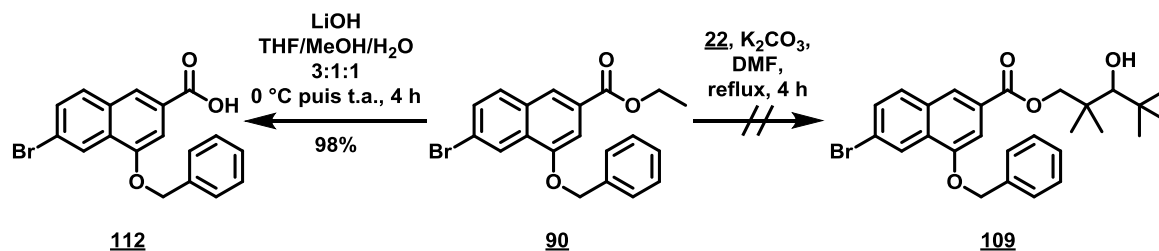


Figure III.54 : Synthèse du composé **112**

L'alcool secondaire est converti en sa cétone **114** correspondante, avec un bon rendement de 95%, par utilisation du PCC dans le dichlorométhane. Enfin, la libération du naphtol est réalisée par réaction du céto-ester **114** avec le trichlorure bore pour conduire au composé **110** avec un rendement de 41%.

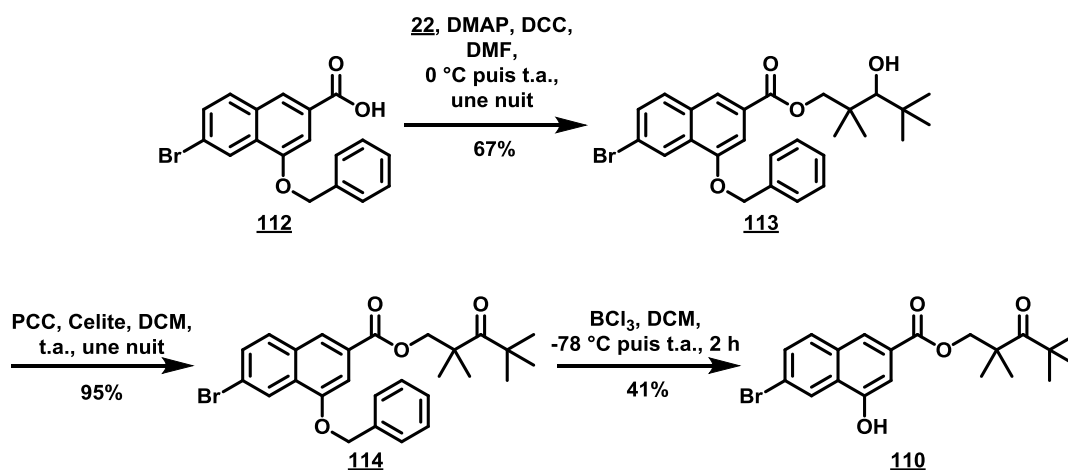


Figure III.55 : Synthèse du naphtol **110**

4. Extension de la chimiluminescence vers le proche IR : synthèse et introduction de fluorophore de type benzo[*a*]phénoxazine

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

4.1 Synthèse de fluorophores

Nous avons vu, au début de ce chapitre, quelques motifs benzophénoxazines décrits dans la littérature, et notamment les versions hydrosolubles élaborés par le groupe du Prof. Burgess. Afin d'augmenter l'hydrosolubilité de ces fluorophores, nous avons souhaité élaborer de nouvelles phénoxazines et benzophénoxazines par introduction de bras di-sulfonaté sur la fonction amine. Ainsi, quatre fluorophores ont été envisagés : deux benzophénoxazines hydrosolubles fondées sur le Nile red et deux phénoxazines dont une version hydrosoluble (Figure III.56).

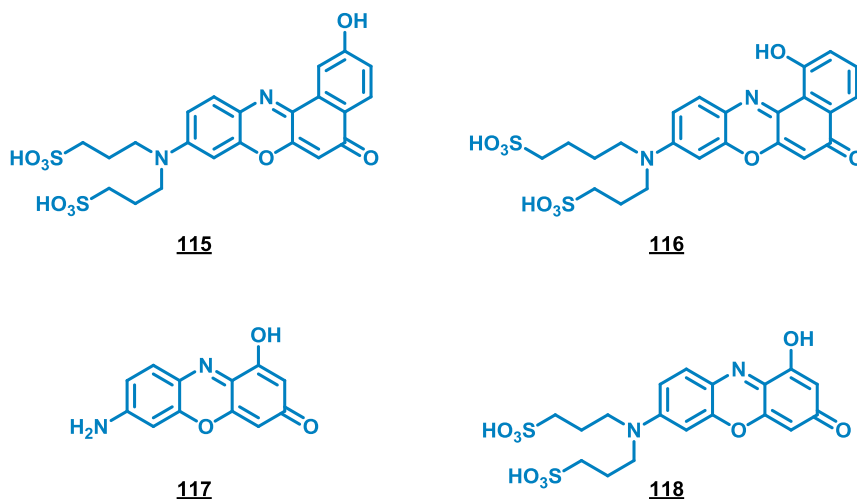


Figure III.56 : Représentation schématique de la gamme de fluorophores visés

La synthèse des BPO **115** et **116** est fondée sur les travaux d'hydrosolubilisation des modèles du groupe du Prof. Burgess.¹⁷³ Elle est réalisée en quatre étapes avec une purification intermédiaire et commence avec le 2-aminophénol commercial **119**. Celui-ci est une première fois alkylé en présence de la 1,3-propane sultone, dans le n-butanol à reflux pour conduire au composé monosulfonaté **120** avec un rendement de 61 %. La deuxième alkylation se réalise également en présence de 1,3-propane sultone, mais cette fois-ci, dans le DMF à reflux. Le phénol bis-alkylé **121** est obtenu avec un rendement de 25% après purification en phase inverse en utilisant une solution à 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA) comme phase aqueuse mobile. Le composé **121** est ensuite engagé dans une étape de nitrosation en présence de nitrite de sodium (NaNO₂) dans une solution d'acide chlorhydrique [6 M] pour conduire au dérivé nitroso **122**. Celui-ci étant fortement instable, a été directement engagé dans la suite de la synthèse.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

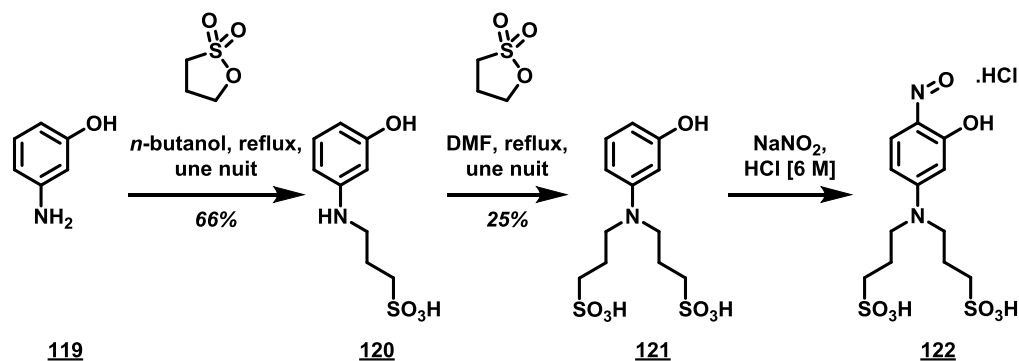


Figure III.57 : Synthèse du dérivé nitroso **122**

Le BPO **115** est alors obtenu par condensation du composé **122** avec le 1,6-dihydroxynaphtalène **123** dans le DMF à 130 °C avec un rendement de 51 % sur deux étapes après purification par HPLC semi-préparative en phase inverse en utilisant le tampon triéthylammonium bicarbonate (TEAB, 50 mM, pH 7.5) comme phase aqueuse mobile, suivie d'un dessalage sur résine échangeuse de cations de type Dowex® H⁺ afin d'éliminer les sels de triéthylammonium résiduels. Dans le but de moduler la luminescence du squelette, nous avons également réalisé une condensation avec un autre motif hydroxynaphtalène (Figure III.58). Nous avons choisi d'intégrer le 5-amino-2-naphtol **124**, selon les conditions précédentes. Cependant, la BPO **116** attendue n'a pas été observée.

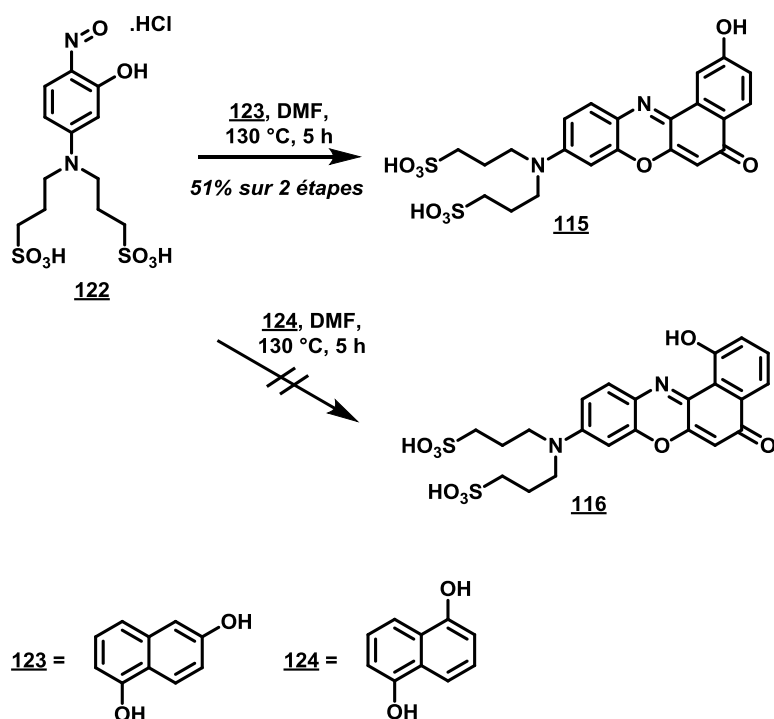


Figure III.58 : Représentation schématique des essais de synthèse de BPO à partir du dérivé nitroso **122**

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

La synthèse de la phénoxazine **117** est réalisée en deux étapes. La première étape permet d'obtenir la 4-nitrosoaniline **127** à partir du nitrobenzène **125** avec un rendement de 21%. Cette réaction de substitution nucléophile aromatique met en jeu l'urée **126** en présence de carbonate de potassium et d'hydroxyde de potassium dans le DMSO sous atmosphère d'oxygène. Le dérivé nitrosyl **127** ainsi formé est ensuite engagé dans une étape de condensation avec le phloroglucinol **128**, en présence de chlorure de zinc (ZnCl₂) dans l'éthanol pour conduire à la phénoxazine **117** avec un rendement de 9% contrairement à une conversion de 54% décrite dans la littérature.¹⁸¹ Ce faible rendement pourrait s'expliquer par une perte importante de matière à la suite d'une purification en phase inverse (*i.e.* en utilisant le TFA 0.1% comme phase aqueuse mobile) en lieu et place d'une purification sur gel de silice.

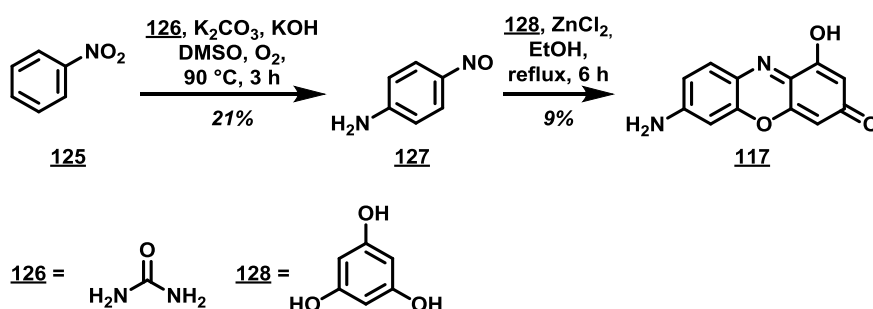


Figure III.59 : Synthèse du composé **117**

Pour la synthèse de l'analogue en version hydrosoluble, nous avons décidé de reprendre le même schéma synthétique que celui de la BPO 114. Ainsi, le dérivé nitroso **121** est engagé dans une étape de condensation par réaction avec le résorcinol **129** dans le DMF à reflux. Cependant, le composé **117** attendu n'a pas été observé, seul le résorcinol **129** a été récupéré.

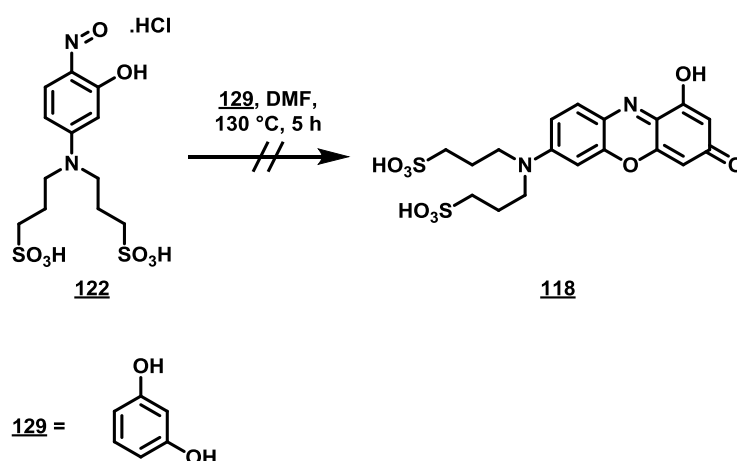


Figure III.60 : Essai de synthèse du composé **118**

¹⁸¹ B. Chen, C. Lv, X. Tang *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **2012**, 404, 1919.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

4.2 Synthèse de la cassette chimiluminescente par introduction d'une version hydrosoluble du Nile red

Avec la BPO **115** à disposition, nous avons poursuivi la synthèse de la **cible 5** désirée. Le composé **115** est donc converti en dérivé triflate par le biais du phényltriflimide **130** en présence de pyridine dans le DMF. Le dérivé **131** est ensuite engagé dans un couplage de Sonogashira avec le triméthysilylacétylène, selon les conditions développées par le Prof. Burgess sur le Nile Red c'est-à-dire en présence de palladium tétrakis ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), de CuI et de triéthylamine dans le DMF. La conversion de cette réaction a été suivie par HPLC analytique en phase inverse en utilisant le tampon triéthylammonium acétate (TEAA, 25 mM, pH 7.4) comme phase aqueuse mobile. Nous avons alors observé la formation du composé issu du couplage et, de façon inattendue, celle d'un produit supplémentaire plus polaire : l'alcyne vrai **132**. Il semblerait que l'ion acétate contenu dans le tampon TEAA suffise à générer le produit de désilylation. Nous avons alors entrepris de réaliser l'étape de déprotection du groupement TMS par utilisation du tampon TEAA (25 mM, pH 7.4) pour fournir la BPO **132** avec un rendement 10 % sur trois étapes après purification par HPLC semi-préparative en phase inverse en utilisant ce même tampon comme phase aqueuse mobile.

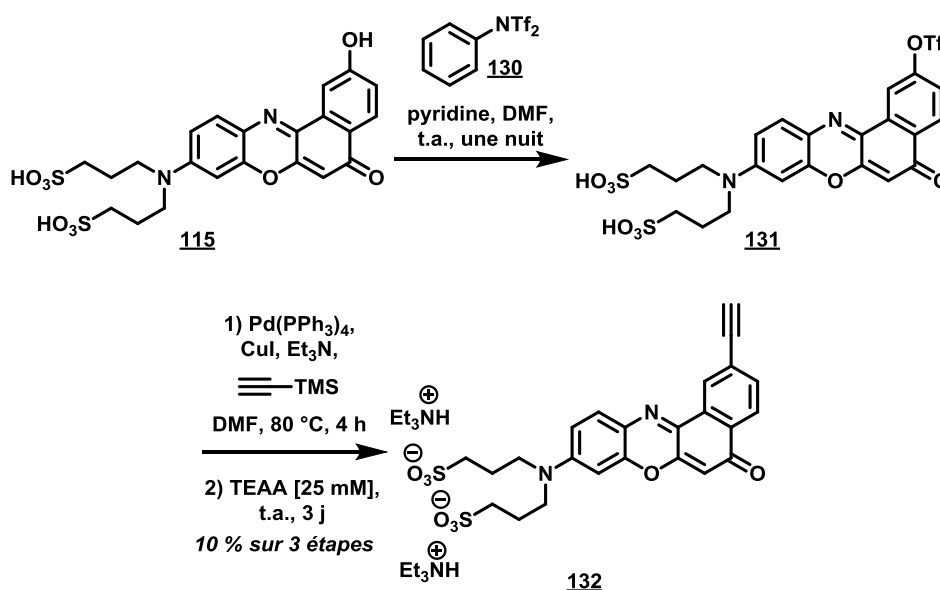


Figure III.61 : Synthèse du composé **132**

Proches de notre but, nous avons tenté de réaliser le couplage de Sonogashira entre le sel du composé **132** et le naphthalène **105** pour former le précurseur **133** de notre **cible 5** finale ou le naphtol **110** pour former le produit **134** issu de l'ouverture du 1,2-dioxétane. Les conditions employées dans ces réactions sont identiques à celles utilisées pour la formation de la BPO **132**. Malheureusement, ce couplage ne nous a pas permis, pour le moment, d'obtenir les composé **133** et **134** souhaités. Des solutions d'optimisation sont actuellement en cours de recherche.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

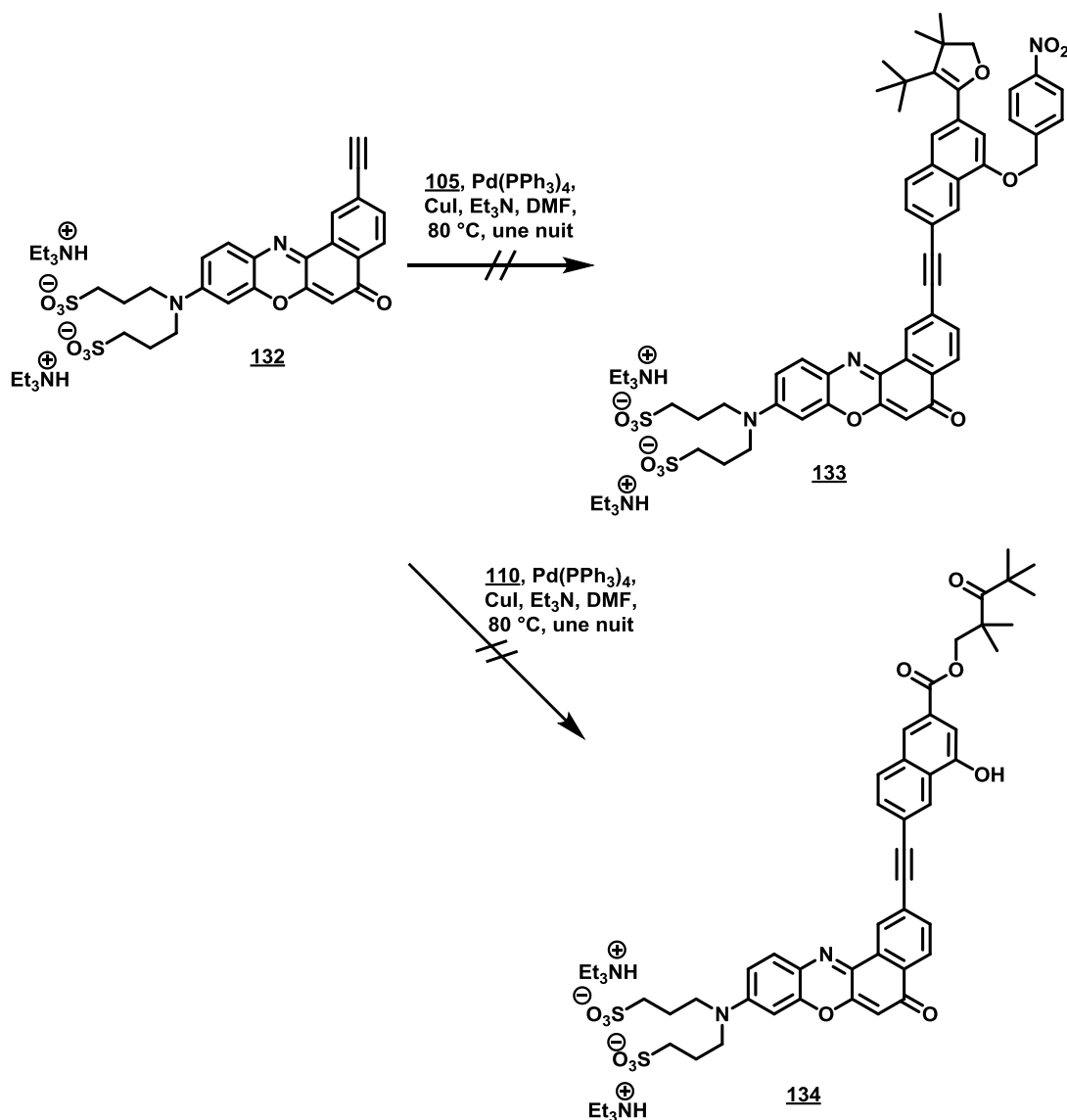


Figure III.62 : Essai de synthèse des composés **133** et **134**

4.3 Caractéristiques photophysiques : spectres d'absorption et d'émission

Afin de valoriser notre travail, nous avons souhaité déterminer les caractéristiques photophysiques des composés **110**, **115**, **117** et **132**. Malheureusement, en raison d'une panne inattendue du spectrofluoromètre mis à notre disposition, les spectres d'absorption et d'émission n'ont pu être enregistrés, à ce jour, qu'en milieu purement organique (*i.e.* dans le DMSO, à 25 °C) et uniquement pour les composés **115**, **117** et **132**. Les rendements quantiques vont être établis ultérieurement.

Ainsi, comme l'indique la Figure III.63, la BPO **115** possède un maximum d'absorption à 553 nm et une émission de 627 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm).

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

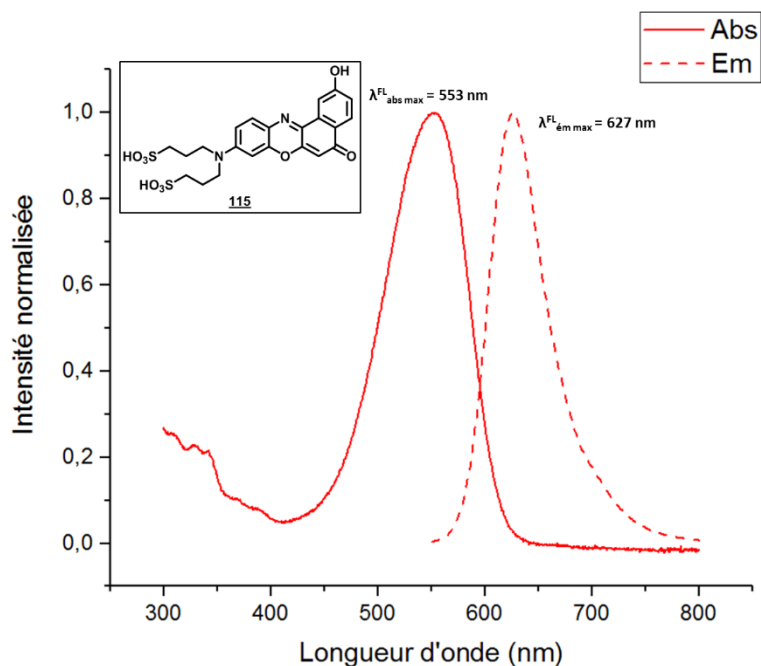


Figure III.63 : Spectre d'absorption et d'émission du composé **115**

Concernant la BPO **132**, la présence de la triple liaison augmente la conjugaison et engendre donc un déplacement des longueurs d'onde d'absorption de 30 nm ($\lambda_{\text{abs max}} = 583 \text{ nm}$) et d'émission de 19 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 648 \text{ nm}$) par rapport au précurseur **115**.

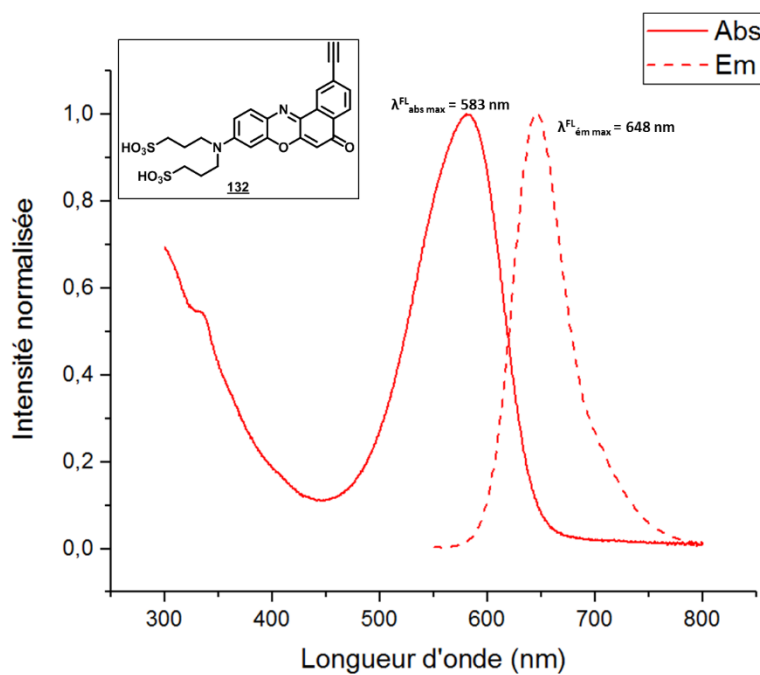


Figure III.64 : Spectre d'absorption et d'émission du composé **132**

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtolique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

La phénoxazine **117**, moins conjuguée que les fluorophores précédents, présente des longueurs d'onde d'absorption et d'émission plus basse : 516 nm et 590 nm respectivement.

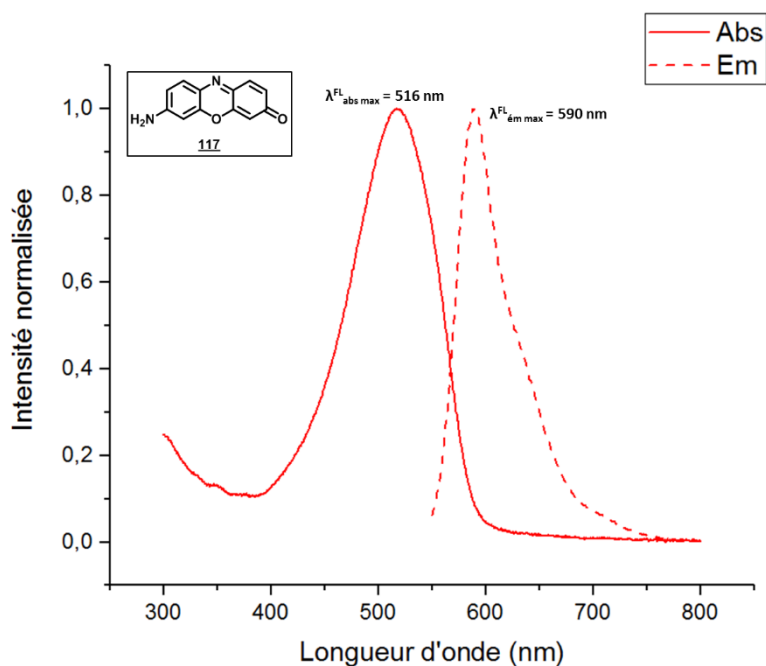


Figure III.65 : Spectre d'absorption et d'émission du composé **117**

Il est à noter que les mesures d'émission des composés **115**, **132** et **117** peuvent être faussées en raison de la panne survenue sur le spectrofluorimètre.

Des mesures spectrales supplémentaires vont être réalisées prochainement, notamment en conditions aqueuses (*e.g.* tampon PBS), afin de comparer les données avec celles des analogues décrits dans la littérature et vérifier la compatibilité avec le milieu utilisé pour les déclenchements par activation enzymatique.

5. Conclusion et perspectives à ces travaux

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence les difficultés rencontrées lors de la synthèse de la plateforme naphtolique qui repose sur une méthodologie nécessitant de nombreuses réflexions quant au choix du groupement protecteur du naphtol, notamment en raison du nombre d'étapes conséquent (*i.e.* 25 étapes pour atteindre la **cible 5**). En effet, nous avons vu qu'un groupement de type MOM, par exemple, n'est pas orthogonal à l'ensemble des conditions utilisées (*i.e.* l'étape de déshydratation en présence de chlorure de thionyle n'est pas reproductible).

Le couplage de Sonogashira entre le naphthalène **105** et la BPO **133** n'ayant pas fonctionné à ce jour, il nous reste à trouver une alternative.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

Nous avons également montré la possibilité de former le motif 1,2-dioxétane par cycloaddition [2+2] sur un cœur naphthol. Nos observations nous ont mené à penser que la stabilité du motif 1,2-dioxétane avec un dihydrofurane comme groupement stabilisant, est bien trop faible pour un déclencheur en position 4 du cycle naphthalénique. Ceci pourrait être la raison pour laquelle aucune étude sur cette position, ni sur la position 5, n'a été menée, à ce jour, par le Prof. Matsumoto.

Nous avons aussi évalué quelques propriétés photophysiques (i.e. mesures d'absorption et d'émission de fluorescence et calculs de rendements quantiques), en milieu organique, des composé **115**, **117** et **132**. Des mesures supplémentaires vont être prochainement réalisées en conditions aqueuses.

Chapitre III. Développement d'une sonde chimiluminescente à cœur naphtholique : formation d'une cassette « TBET » hydrosoluble

Chapitre IV. Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion générale

L'imagerie optique est devenue un outil essentiel dans la mise en évidence de processus biologiques, notamment grâce à ses nombreux avantages tels que son faible coût et sa forte sensibilité. De plus, elle possède la propriété d'être non invasive contrairement aux autres méthodes d'imagerie moléculaire telles que les techniques radio-isotopiques (*e.g.* la TEMP) ou d'IRM, fréquemment employées comme outil diagnostique ou thérapeutique. Elle a également connu de multiples avancées avec le développement de sondes fluorescentes fondées sur un comportement de type pro-fluorescence, tel un interrupteur « OFF-ON ». Pour ainsi dire, un signal lumineux n'est observé qu'après interaction de la sonde avec un analyte d'intérêt (Figure IV.1). Ces sondes, bien qu'intelligentes, ne suffisent pas à s'affranchir complètement d'un bruit de fond. En effet, le signal n'est pas parfaitement éteint avant détection de l'analyte, la sonde émettant toujours un peu de lumière. Une issue à cette problématique est de s'inspirer des processus naturels observés chez certains animaux ou plantes : la bioluminescence. Or, celle-ci n'est, pour le moment, limitée qu'au stade pré-clinique et une transposition à l'Homme n'est pas envisageable. Il peut être plus intéressant de se diriger alors vers sa variante, la chimiluminescence.

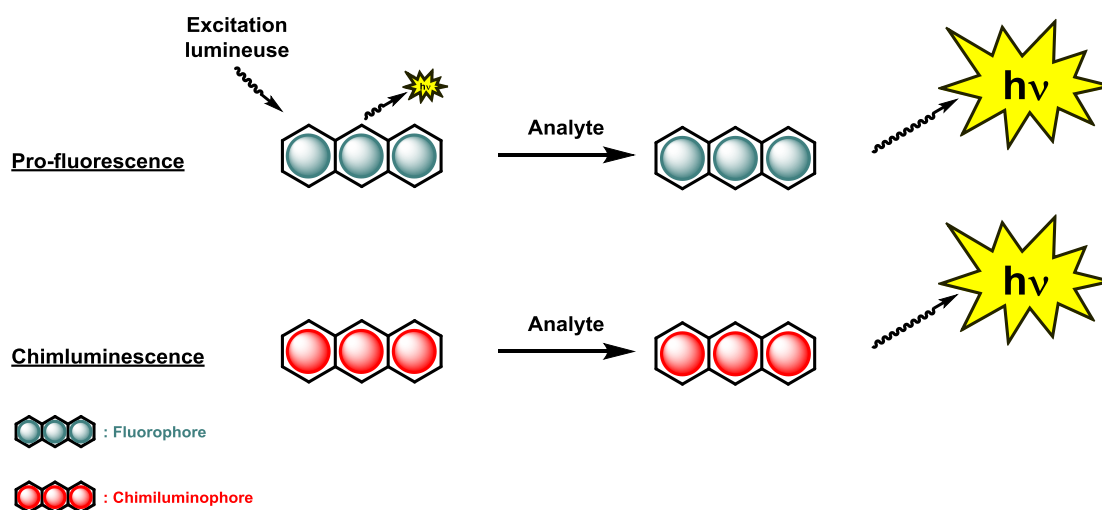


Figure IV.1 : Représentation schématique de la pro-fluorescence et de la chimiluminescence

Ces travaux de thèse ont donc été consacrés à l'élaboration de systèmes innovants visant la détection d'analytes d'intérêt *in vivo* et fondés sur la chimiluminescence. La sonde devant alors émettre dans le « fenêtre d'imagerie » *in vivo*, le but était de développer un système constitué d'un chimiluminophore et d'un fluorophore relais émettant dans le proche IR.

Deux objectifs ont été visés (Figure IV.2) : le premier consistait en l'élaboration d'une plateforme phénolique comportant un complexe de lanthanide et dont l'émission de lumière serait observée grâce à un transfert d'énergie à travers l'espace (*i.e.* de type CRET) du motif 1,2-dioxétane vers le complexe de lanthanide (*i.e.* le phénol jouerait alors le rôle d'antenne); le deuxième objectif, qui reprend les travaux antérieurs au laboratoire amorcés par les Dr. J.-A. Richard et V. Granclaudé, reposait sur la

mise en place d'une cassette chimiluminescente hydrosoluble à cœur naphtolique, sa luminescence serait alors observée grâce à un transfert d'énergie à travers la liaison (*i.e.* de type TBET).

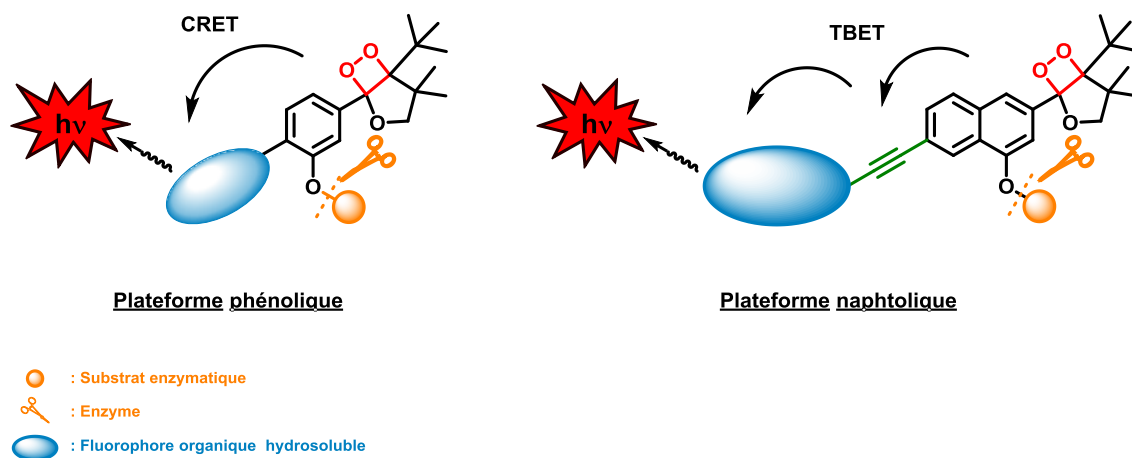


Figure IV.2 : Représentation des cibles visées

Pour chacune de ces plateformes, les stratégies synthétiques élaborées visent à introduire facilement un substrat enzymatique ou d'un analyte d'intérêt, pour des applications *in vivo*.

1. Sondes à cœur phénolique

Dans cette première partie du projet, trois cibles étaient visées : un même squelette phénol comportant soit un groupement phosphate pour une détection de la phosphatase alcaline, soit un éther silylé pour un déclenchement de chimiluminescence en présence d'ions fluorures, ou encore un groupement *para*-nitrobenzyle pour une activation de la nitroréductase (Figure IV.3). Pour chacune d'elles, nous avons sélectionné un complexe de lanthanide comme entité fluorescente. La chimiluminescence serait alors observée dans le proche IR grâce à un transfert de type CRET du motif 1,2-dioxétane vers le complexe de lanthanide.

Chapitre IV. Conclusion générale et perspectives

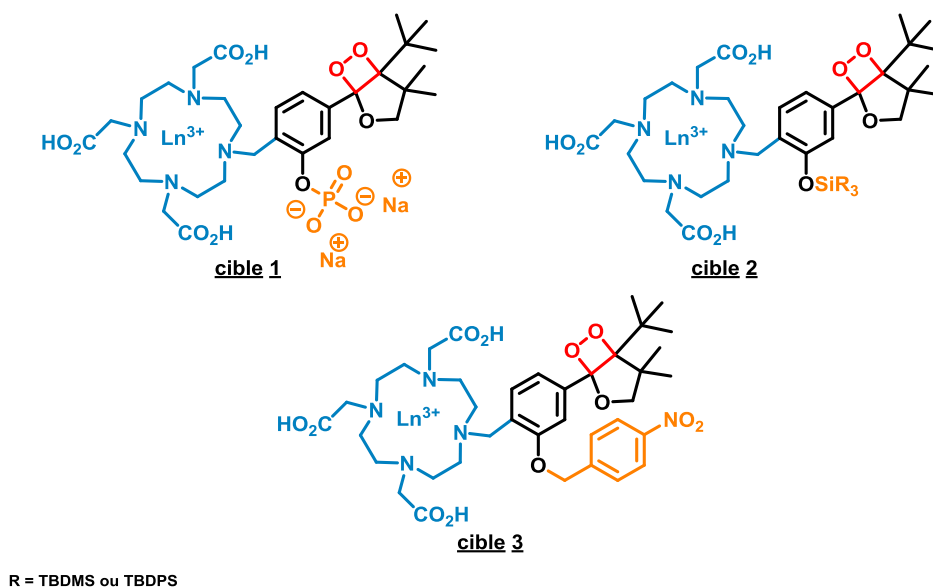


Figure IV.3 : Représentation schématisques des plateformes phénoliques visées

Ces travaux nous ont permis d'obtenir, à ce jour, trois précurseurs des cibles désirées, les composés **43**, **52** et **67** (*i.e.* pour une détection de la phosphatase alcaline et de la nitroréductase) (Figure IV.4).

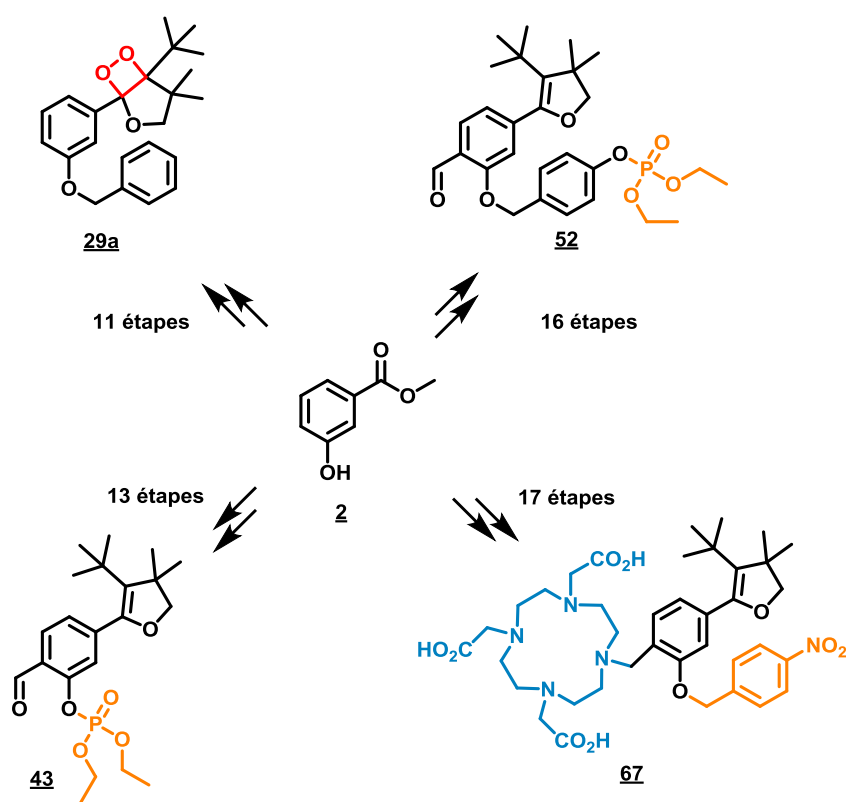


Figure IV.4 : Représentation schématique des composés obtenus à ce jour

Chapitre IV. Conclusion générale et perspectives

Les précurseurs phénoliques **43** et **52**, visant une détection de la phosphatase alcaline, ont été obtenus en faible quantité et leur conception constituait un défi synthétique notamment lors des étapes de phosphorylation. Nous avons donc préférentiellement développé la suite de la stratégie sur un motif réactif vis-à-vis de la nitroréductase. Ainsi, nous avons pu avancer dans la synthèse jusqu'à la formation du composé **67** qui devrait nous permettre prochainement de réaliser la cycloaddition [2+2] donnant accès à la **cible 3** désiré. De ce fait, des premiers tests de déclenchement en conditions *in vivo*, par détection d'une activité de type nitroréductase, pourront être effectués.

Nous avons également pu réaliser l'étape de cycloaddition [2+2] menant à la formation d'un chimiluminophore modèle, le composé **29a**. Nous avons observé, pour cet exemple, une faible stabilité du motif 1,2-dioxétane, lors de sa synthèse et après purification, possiblement causée par la présence d'un groupement benzyl en lieu et place d'un groupement méthoxy, fréquemment employé dans les travaux du Prof. Matsumoto. Ceci remet en question l'utilisation du cycle dihydrofurane comme groupement stabilisant du motif 1,2-dioxétane.

Concernant la **cible 2**, nous n'avons pas réussi, à ce jour, à isoler son précurseur aldéhyde **56** en raison d'une instabilité du groupement TBDMS (*i.e.* lors de sa purification), lorsque celui-ci est directement lié au phénol. Une des alternatives, actuellement en cours, serait d'introduire le groupement silylé par le biais d'un bras réactif auto-immolable de type PHBA, à l'image du dérivé phosphate **43** (Figure IV.5).

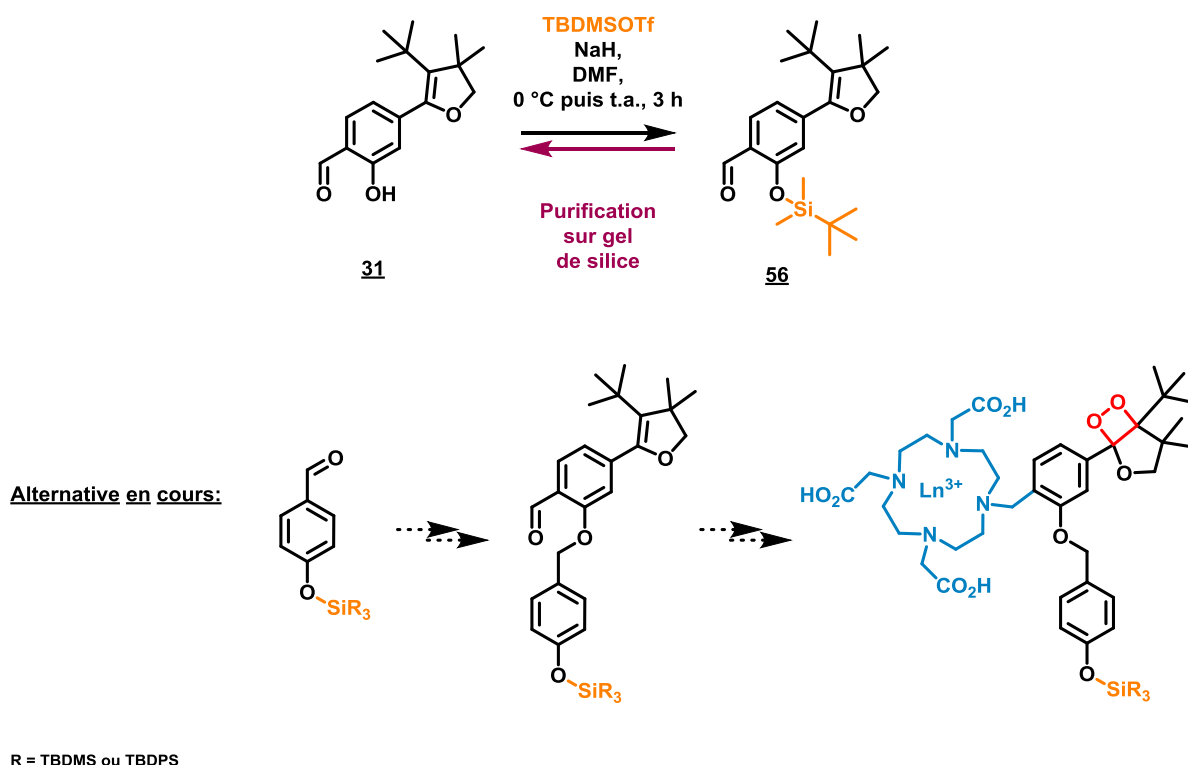


Figure IV.5 : Représentation schématique d'une voie possible de synthèse de la cible 2

2. Sondes à cœur naphtolique

Dans le projet initial, deux sondes à plateforme naphtolique, se différenciant par le substrat enzymatique servant de déclencheur de chimiluminescence, étaient visées (Figure IV.6) : l'une porte un groupement phosphate pour une détection de la phosphatase alcaline, et l'autre, un groupement *para*-nitrobenzyl pour une détection d'activité enzymatique de type nitroréductase. Néanmoins, en raison des difficultés de synthèse rencontrées sur le cœur phénol quant à l'introduction du groupement phosphate, nos efforts ont été exclusivement dirigés vers le groupement *para*-nitrobenzyl.

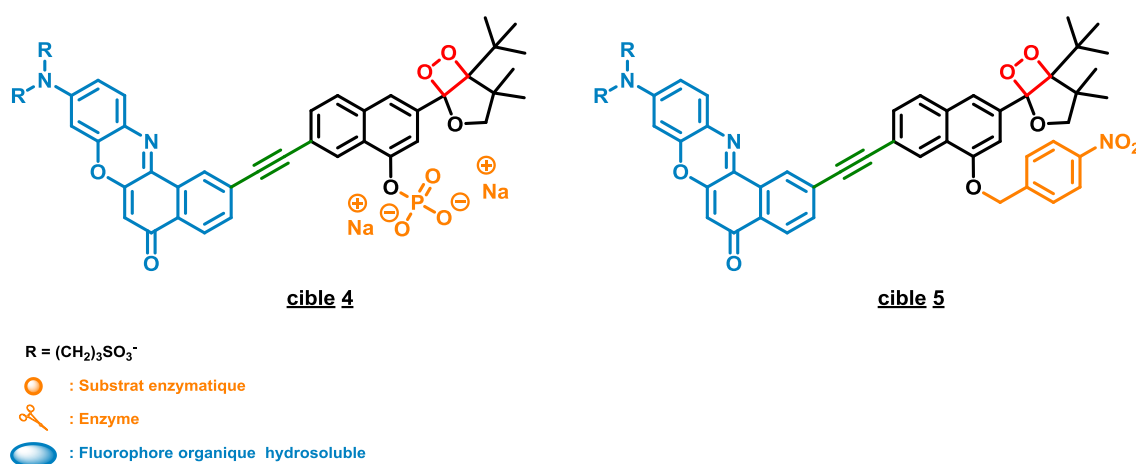


Figure IV.6 : Représentation schématique des plateformes naphtoliques visées

A l'égard des travaux antérieurs au laboratoire, effectués par le Dr. Granclaude, nous avons entrepris une première stratégie qui visait à modifier le groupement protecteur du naphtol. Ainsi, le groupement methoxymethyl ether (MOM) a été utilisé en lieu et place du groupement benzyl (Bn), initialement choisi par le Dr. Grandclaude lors de ses travaux de thèse. Malheureusement, cette stratégie s'est heurtée à un problème d'orthogonalité du groupement MOM avec les conditions utilisées. En effet, l'étape de formation du dihydrofurane nous a permis d'obtenir le composé **73**, mais elle n'est pas reproductible. Nous avons donc modifié notre stratégie initiale et opté pour celle utilisant le groupement benzyl (Figure IV.7).

Chapitre IV. Conclusion générale et perspectives

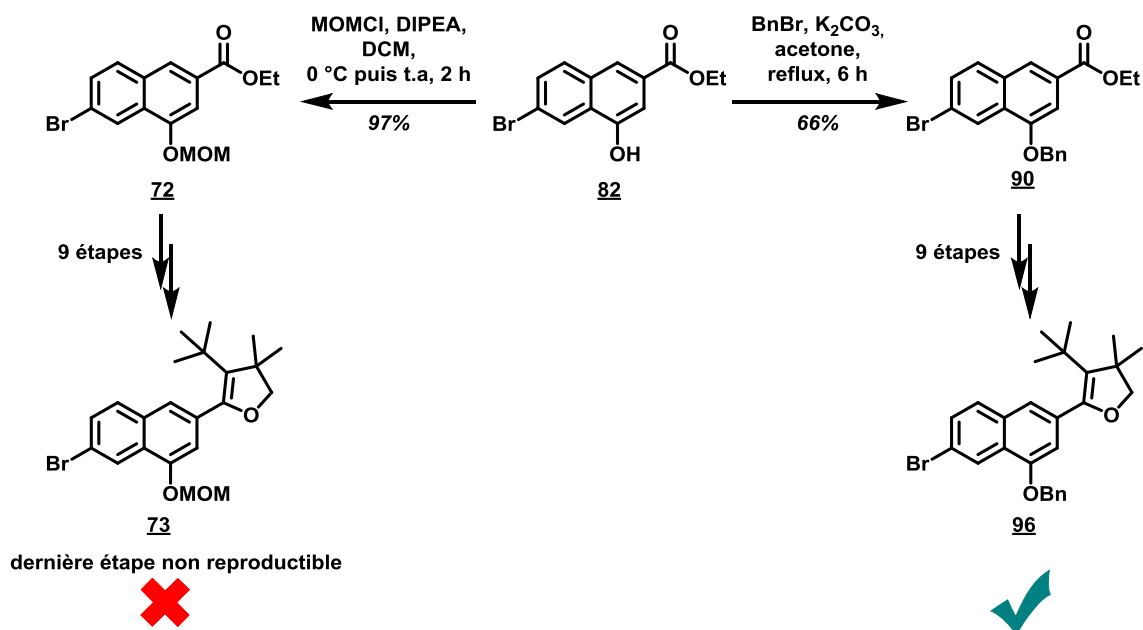


Figure IV.7 : Synthèse des composé **73** et **96**

Par la suite, nous avons pu synthétiser, à partir du composé **82**, le naphthalène **105** comportant le déclencheur (*i.e.* bras *para*-nitrobenzyl) avec un rendement de 7% sur 12 étapes. Nous avons également synthétisé le produit **110** qui est le précurseur du produit résultant de l'ouverture du 1,2-dioxétane de la **cible 5** (*i.e.* après déclenchement par activation enzymatique), afin d'évaluer *in fine* ses propriétés spectrales.

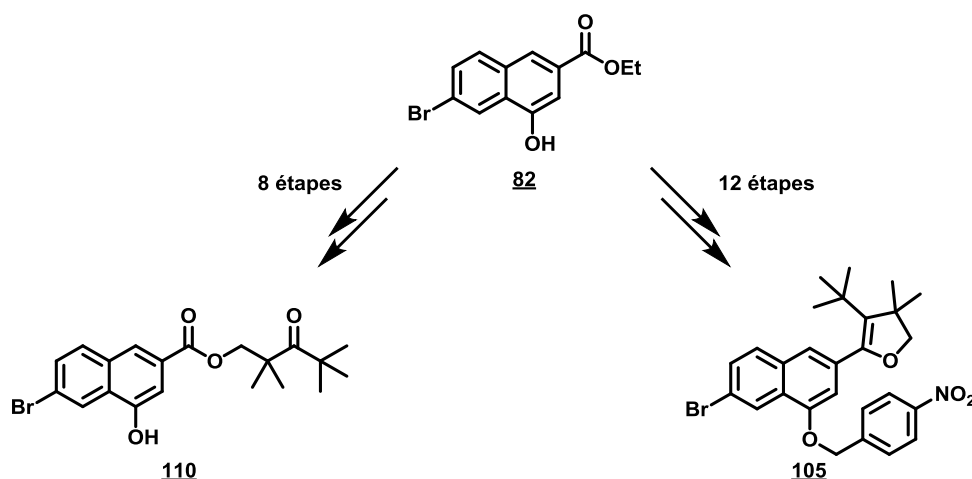


Figure IV.8 : Représentation schématique de la synthèse des composés **110** et **105**

Concernant la synthèse de la **cible 5**, la première stratégie visait à introduire le fluorophore sur le naphthalène **103** comportant à la fois l'acétylène et le déclencheur. Cependant l'étape de déprotection de la triple liaison sur le composé **107** ne nous pas permis d'obtenir le composé **103** désiré mais sa

forme naphтол (i.e. le groupement *para*-nitrobenzyl a été clivé par les conditions de désilylation) (Figure IV.9).

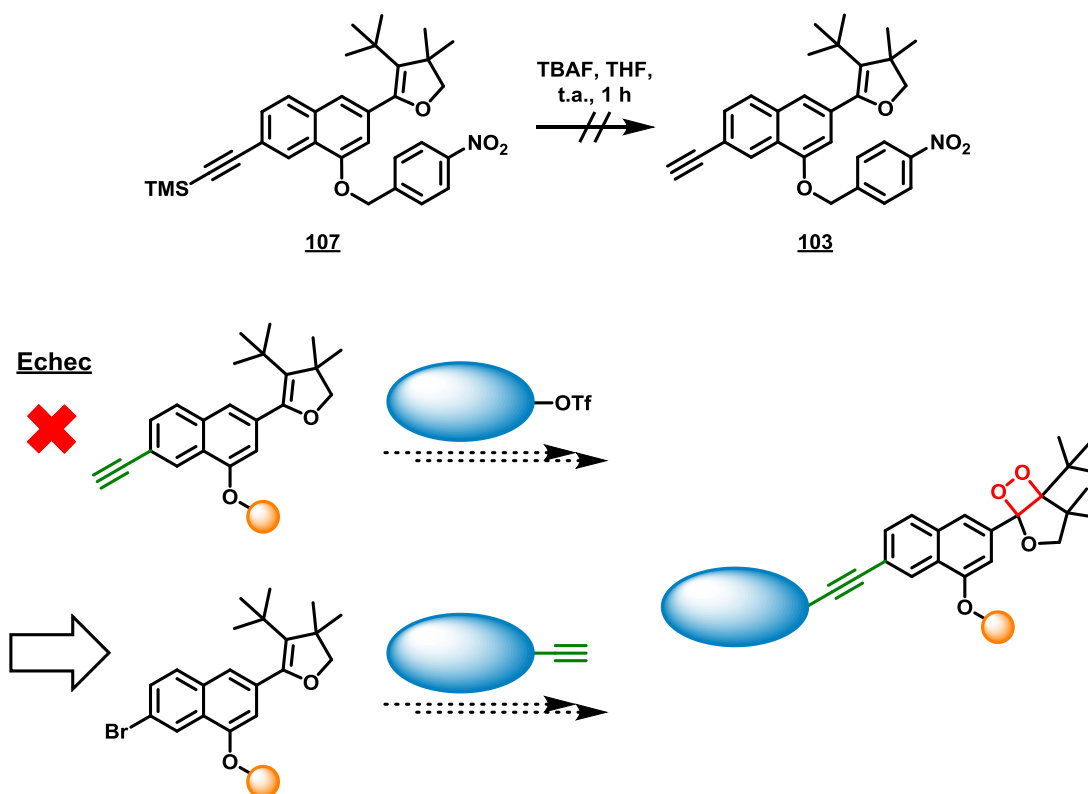


Figure IV.9 : Représentation schématique des stratégies envisagées quant à l'introduction du fluorophore sur le cœur naphtholique

Nous avons donc opté pour une introduction de la triple liaison sur le fluorophore. Ainsi, nous avons procédé à des essais de couplage de Sonogashira entre la BPO **132** le naphthalène **105**. Néanmoins le produit de couplage n'a pas été observé. Les mêmes conditions ont été utilisées pour réaliser le couplage entre le fluorophore et le composé **110**, mais les résultats sont identiques au couplage précédent (Figure IV.10).

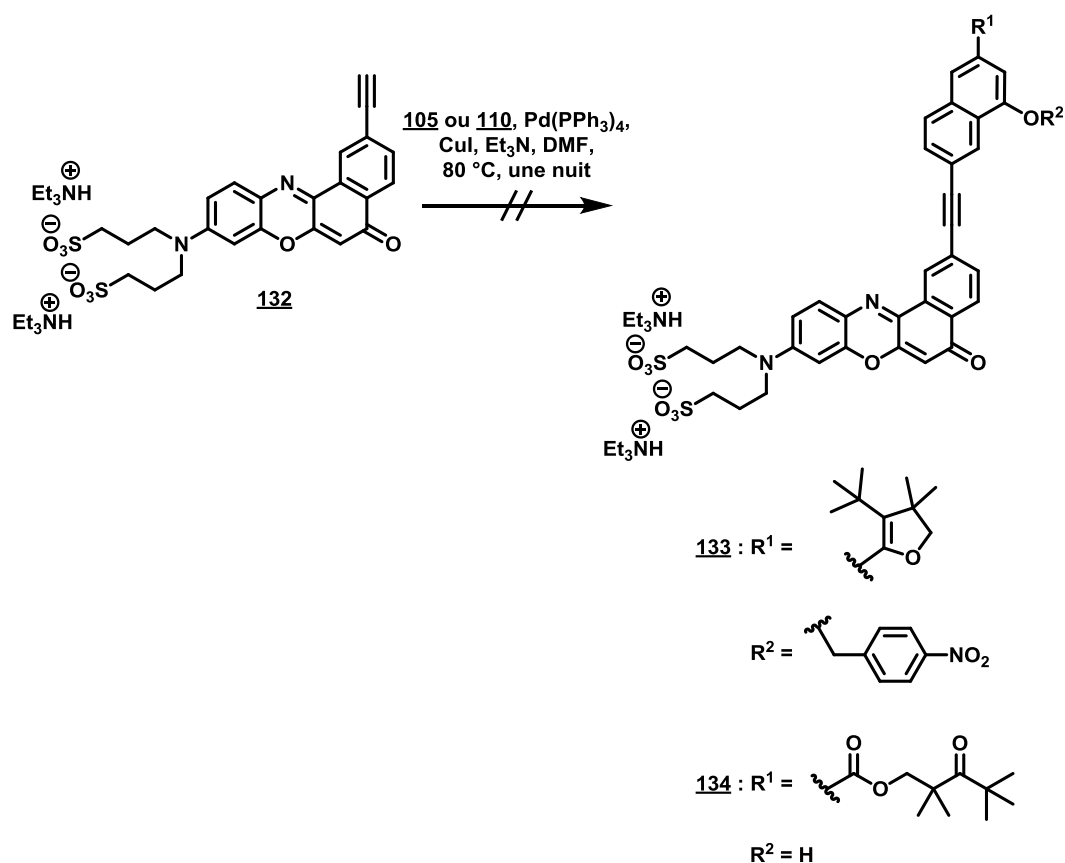


Figure IV.10 : Représentation schématique des essais de couplage de Sonogashira sur les plateformes 105 et 110

II. Perspectives

1. Fin du projet

A partir du composé 68, nous pourrions prochainement obtenir la cible en deux étapes : une étape de complexation avec un lanthanide et une étape de cycloaddition [2+2] formant le motif 1,2-dioxétane. Nous pourrions éventuellement mesurer la chimiluminescence de la sonde et évaluer l'efficacité de transfert d'énergie s'il a lieu.

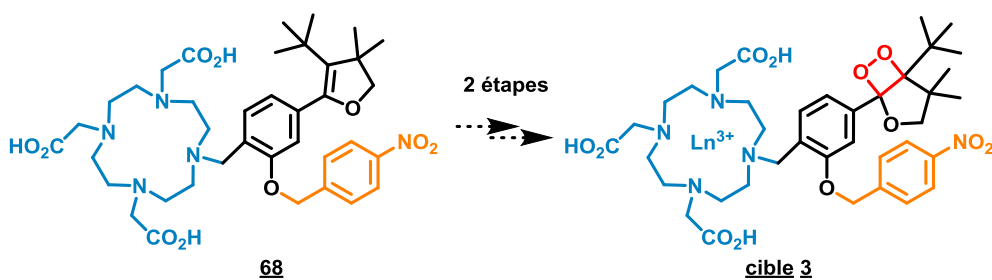


Figure IV.11 : Représentation schématique de la synthèse de la cible 3

Une autre perspective serait d'introduire un groupement électro-attracteur sur le phénol **31**, en position *ortho*, afin d'abaisser le pK_a du phénol, à l'instar des travaux des Prof. Lippert et Shabat présentés dans la chapitre II. Ainsi, il nous serait plus aisé de réaliser des déclenchements de chimiluminescence en conditions physiologiques. Deux options sont possibles : introduire un atome d'halogène (*e.g.* l'atome de fluor qui est fortement électronégatif) ou insérer une amine tertiaire qui, par liaison hydrogène, rend l'atome d'hydrogène du phénol bien plus acide (Figure IV.12). Dans l'idéal, il faudrait utiliser une amine telle que la sarcosine qui apporterait une hydrosolubilité supplémentaire.

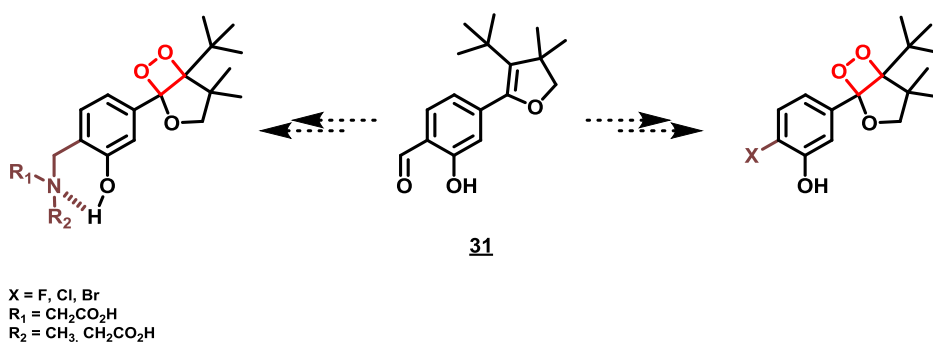


Figure IV.12 : Représentation schématique d'une stratégie visant une réduction du pK_a du phénol

Concernant la plateforme naphtholique, les efforts doivent être concentrés sur la recherche de conditions douces de désilylation qui n'induit pas le départ du groupement *para*-nitrobenzyl, afin de pouvoir réaliser le couplage de Sonogashira avec la BPO. Par ailleurs, des mesures spectrales des fluorophores synthétisés vont être prochainement réalisées, notamment en conditions physiologiques.

Enfin le point le plus important, commun aux deux plateformes, est le manque de stabilité du motif 1,2-dioxétane-dihydrofurane. Effectivement, nous avons observé dans chaque cas, une ouverture spontanée du cycle dioxétane sur des motif phénol et naphthol simple. Cette observation conforte les résultats obtenus par le Dr. Granclaude lors de la conception de la sonde naphtholique liposoluble. Une première alternative serait de modifier la position du déclencheur vis-à-vis du dioxétane, en référence aux travaux réalisés par le Prof. Matsumoto (cf chapitre III). Cependant ceci représente un énorme défi synthétique, puisque cette modification induit également une modification du point d'ancrage du fluorophore.

Une autre alternative à cette problématique et commune aux deux plateformes, repose sur la conception de sondes à motif 1,2-dioxétane-adamantylidene. En effet, nous avons pu voir au cours du chapitre II, que les travaux fondés sur ce motif et réalisés par les Prof. Schaap, Lippert, Shabat et Matsumoto, ont permis de développer plusieurs sondes chimiluminescentes avec notamment des émissions allant jusque dans le proche IR. De plus, le groupe du Prof. Shabat a montré la capacité de ce motif à résister devant des réactions chimiques et des purifications sur gel de silice. Cette entité est

vraisemblablement thermiquement plus stable que le motif 1,2-dioxétane-dihydrofurane. Dans cette alternative, les principes de transfert d'énergie seraient les mêmes que ceux initialement prévus, à savoir un transfert d'énergie de type CRET pour le cœur phénolique et un transfert d'énergie de type TBET pour le cœur naphtholique (Figure IV.13).

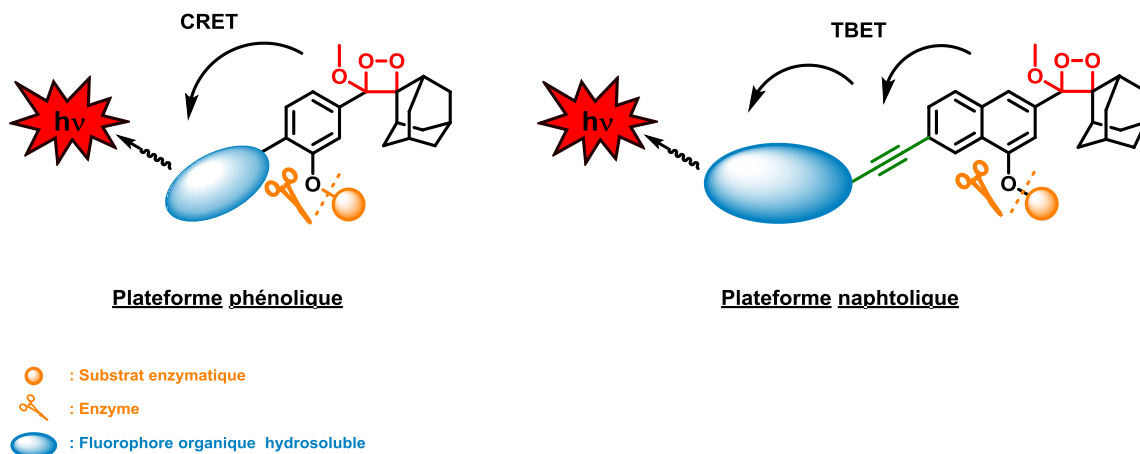


Figure IV.13 : Représentation schématique d'une stratégie alternative

2. Vers une stratégie plus convergente

Les plateformes phénolique et naphtholique présentent chacune une synthèse très linéaire avec un nombre d'étapes conséquent (xxx étapes pour xxx). Nous avons pu voir que la moindre modification d'une fonction chimique ou l'introduction d'un nouveau groupement fonctionnel, notamment avec la plateforme naphtol, nous incite à réviser la stratégie initialement prévue. Une alternative à cette problématique est de synthétiser d'une part un cœur phénol ou naphtol **136** et, d'autre part, le motif dihydrofurane **137**, précurseur du cycle 1,2-dioxétane. Comme l'indique la Figure IV.14, les deux partenaires seraient ensuite assemblés par couplage organométallique.

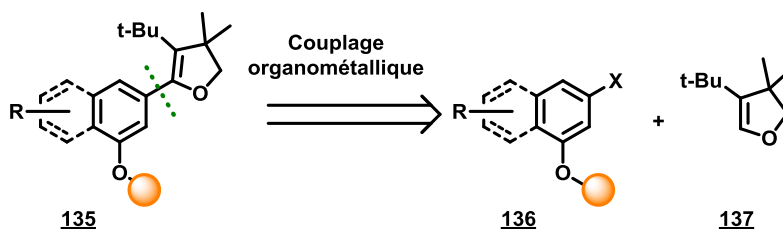


Figure IV.14 : Représentation schématique d'une rétrosynthèse du composé **135**

Nous avons mené des premières investigations quant à la synthèse du cycle dihydrofurane. Nous avons envisagé une synthèse du dihydrofurane **137** en 5 étapes démarrant avec le céto-ester **21**, également utilisé dans l'élaboration de nos sondes chimiluminescentes (Figure IV.15). La fonction cétone de ce composé **21** serait convertie en une oléfine **139** dont la fonction ester serait alors réduite en alcool

secondaire. L'alcène du composé **140** résultant serait le siège d'une réaction d'époxydation donnant accès à l'étape suivante de cyclisation intramoléculaire par ouverture de l'époxyde pour fournir le lactol **142**. Une déshydratation de ce dernier permettrait d'obtenir le dihydrofurane **137** désiré.

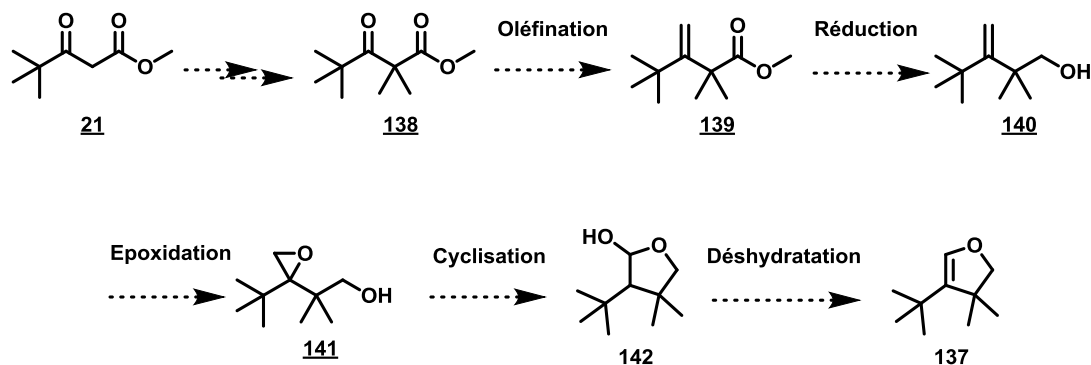
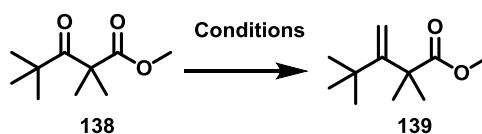


Figure IV.15 : Représentation schématique de la première stratégie envisagée

Nous avons donc tenté différentes conditions d'oléfination, représentées dans le Tableau IV.1, avec une variation de la température et du solvant. Cependant aucune d'elles nous a permis d'accéder au composé **139**. Ces échecs sont certainement liés à l'encombrement stérique des groupes tert-butyl et *gem*-diméthyl. Nous nous sommes alors proposés de réaliser un test sur le composé **143** mono-méthylé. De même, la réaction fut sans succès. Par ailleurs, si les conditions utilisées pour convertir la cétone en un alcène peuvent être réalisées sur le céto-ester **20**, les deux étapes de méthylation n'en restent pas moins difficiles à mettre en place, les hydrogènes restant étant devenus moins acides. De plus la double liaison ainsi formée pourrait être le siège d'isomérisations.



Substrat	Réactifs	Solvant (anhydre)	Température
KS 09	MePPh ₃ Br, ^t BuOK	Toluène	Reflux, 24 h
KS 09	MePPh ₃ Br, ^t BuOK	Et ₂ O	Reflux, 24 h
KS 09	MePPh ₃ Br, NaH	Toluène	25 °C, 24 h
KS 09	MePPh ₃ Br, ^t BuOK (1M dans THF)	THF	TA, 16 h
KS 09	MePPh ₃ Br, ^t BuOK (1M dans THF)	THF	M.W. : 100 °C (10 min) puis 140 °C (15 min)
KS 09	Réactif de Tebbe	THF	0 °C puis TA, 2 h
KS 09	RhCl(PPh ₃) ₃ , PPh ₃ , ⁱ PrOH, TMSCHN ₂	THF	TA, 48 h
KS 08	RhCl(PPh ₃) ₃ , PPh ₃ , ⁱ PrOH, TMSCHN ₂	THF	TA, 7 h

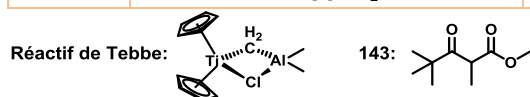


Tableau IV.1 : Conditions d'oléfination utilisées pour la synthèse du composé xxx

Ainsi, une deuxième stratégie de synthèse peut être envisagée (Figure IV.16). Elle commence avec l'acide 2,2-diméthylsuccinique **144** commercial qui suivant une étape de cyclisation serait transformé en anhydride succinique **145**. La réduction sélective d'une cétone conduirait à la lactone **146** et le groupement tert-butyl serait ensuite introduit sur le composé **147** via une étape d'alkylation pour conduire au composé **147**. La lactone **147** serait réduite en lactol **142**, suivant des conditions douces afin d'éviter une ouverture spontanée du cycle, puis l'élimination de la fonction alcool permettrait d'obtenir le dihydrofurane **137** cible.

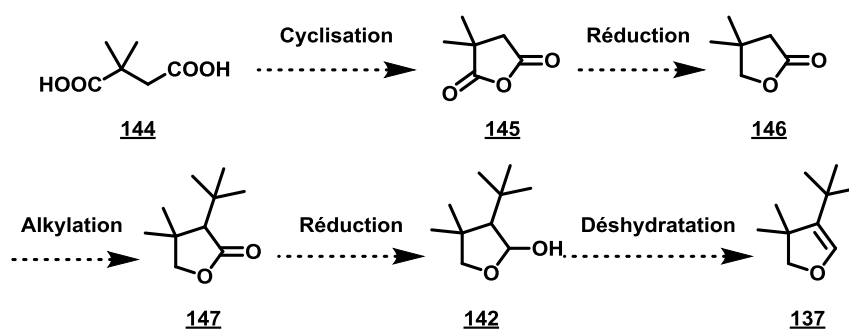


Figure IV.16 : Représentation schématique de la deuxième stratégie

Chapitre V. Experimental section

I. General procedures

1. Chemicals and reagent

Flash-column chromatography purifications were performed either on Geduran[®] Si 60 silica gel (40-63 or 63-200 or μm) from Merck Millipore. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp ($\lambda = 254/365 \text{ nm}$) and/or staining with KMnO_4 or phosphomolybdic acid (PMA) or 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) solutions. Unless otherwise noted, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. Anhydrous DMF were purchased from Sigma Aldrich and stored over 4Å molecular sieves. CH_3CN , THF, toluene, CH_2Cl_2 and Et_2O are dried over alumina cartridges using a solvent purification system MBRAUN MB SPS-800[®]. Filtrations were performed on Celite SDS 545 from Acros Organic. HPLC gradient-grade acetonitrile (CH_3CN) was obtained from VWR. Mobile layers for RP-HPLC were prepared with ultrapure water (18.2 M Ω .cm) provided by a PURELAB[®] flex 1 (Elga Veolia). Triethylammonium acetate (TEAA, 2.0 M) and triethylammonium bicarbonate (TEAB, 1.0 M) buffers were prepared from distilled triethylamine (TEA) and glacial acetic acid or CO_2 gas, respectively.

Compound **117**¹⁸² and **122**¹⁸³ were prepared according syntheses reported in the literature.

2. Instrument

Ion-exchange chromatography (for desalting sulfonated compounds) was performed with an Econo-Pac[®] Disposable chromatography column filled with an aq. solution of Dowex[®] 50WX8-400 (Alfa Aesar), regenerated using 10% aq. HCl solution and equilibrated with deionized water. ¹H, ¹³C and ³¹P NMR spectra were recorded with a Bruker DPX 300 (COBRA, UMR CNRS 6014). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) using the residual solvent peak for calibration. J values are expressed in Hz. Analytical RP-HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument or Thermo Scientific Ultimate 3000 both equipped with a PDA detector. Semi-preparative HPLC was performed on a Thermo Scientific SPECTRASYSTEM liquid chromatography system (P4000) equipped with a UV-Vis 2000 detector. Automated flash purifications on RP-C18 cartridges were performed with an Interchim puriFlash[®]430 system. Low-resolution mass spectra (LRMS) were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded either on a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an ESI source or on a LCT Premier XE bench top orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an ESI source. UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, light path 10 × 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 × 4 mm, chamber volume: 1400 μL , excitation filter: auto and emission filter: open, excitation and emission slit: 5 nm). Fluorescence quantum yields were measured at 25 °C by a relative method using

¹⁸² B. Chen, C. Lv, X. Tang *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 1919.

¹⁸³ N.-h. Ho, R. Weissleder, C.-H. Tung *Tetrahedron* **2006**, *62*, 578.

cresyl violet ($\phi^F = 54\%$ in EtOH) as a standard. The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_F(x) = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2 \Phi_F(s)$$

where A is the absorbance (in the range of 0.01-0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.479 for DMSO, and 1.337 for PBS.

3. Methods

3.1 HPLC systems

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments and purification steps (by semi-preparative HPLC or automated flash purification system) :

System A: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C18 column, 5 μm , 2.1 \times 100 mm) with CH₃CN and 0.1% trifluoroacetic acid (aq. TFA 0.1%, pH 2.0) as eluents [100% TFA (5 min) then linear gradient from 0% to 100% (30 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.25 mL/min. Triple UV-vis detection was achieved at 280, 360, and 580 nm.

System B: System A with TEAA buffer (25 mM, pH 7.0) as aq. mobile layer [100% TEAA (5 min) then linear gradient from 0% to 100% (45 min) of CH₃CN]. Triple UV-vis detection was achieved at 280, 360, and 580 nm

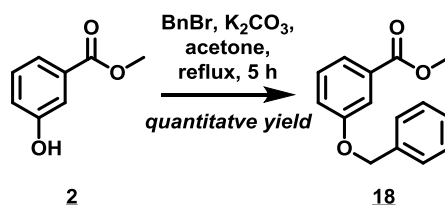
System C: RP-HPLC (Synchronis C₁₈ column, 3 μm , 100 \times 2.1 mm) with CH₃CN and aq. TEAA buffer (25 mM, pH 7.0) as eluents [90% TEAA (5 min) then linear gradient from 10% to 100% (25 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.25 mL/min. Double UV-vis detection was achieved at 254 and 530 nm.

Systeme D: Automated flash purification (Interchim®SNAP cartridge KP-C18-HS, 25 g) with TEAB buffer (50 mM, pH 7.5) as aq. mobile phase [100% TEAB (10 min) then linear gradient from 0% to 15% (40 min) then from 15% to 65% (30 min) then from 65% to 100% (15 min) of CH₃CN] at a flow rate of 15 mL/min. UV detection was achieved at 264 nm

II. Unpublished experimental data

1. Synthesis of phenol chemiluminescent platform

Synthesis of methyl 3-(benzyloxy)benzoate (18) :



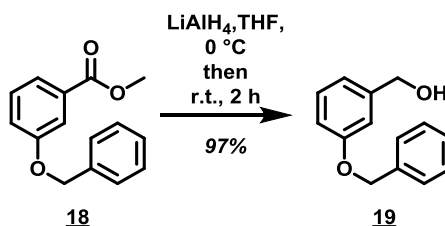
In a solution of methyl 3-hydroxybenzoate (2 g, 13.1 mmol, 1 equiv.) in synthesis grade acetone (60 mL), anhydrous K_2CO_3 (2.172 g, 15.72 mmol, 1.2 equiv.) then benzyl bromide (1.7 mL, 14.41 mmol, 1.1 equiv.) were added. The mixture was stirred under reflux for 5 h. The reaction medium was allowed to cool to room temperature then concentrated. The crude was dissolved in DCM (50 mL) and washed thrice with 3.0 M HCl (50 mL) then dried over anhydrous MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to yield methyl 3-(benzyloxy)benzoate **18** as a white solid (3.17 g, quantitative yield).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.80 – 7.73 (m, 2H), 7.53 – 7.32 (m, 6H), 7.21 (dd, J = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.93 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 166.25 (Cq), 158.33 (Cq), 136.23 (Cq), 131.11 (Cq), 129.03 (CH_{arom}), 128.15 (2 CH_{arom}), 127.61 (CH_{arom}), 127.09 (2 CH_{arom}), 121.77 (CH_{arom}), 119.58 (CH_{arom}), 114.79 (CH_{arom}), 69.55 (CH_2), 51.58 (CH_3).

GC-MS (FI+): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$ 242.09, found 242.09

Synthesis of (3-(benzyloxy)phenyl)methanol (19):



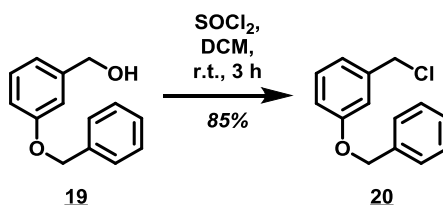
To a suspension of LiAlH_4 (1.57 g, 41.28 mmol, 1 eq) in 30 mL of dry THF methyl 3-(benzyloxy) benzoate **18** (10 g, 41.28 mmol, 1 eq) in 60 mL of dry THF was slowly added at 0°C under argon atmosphere. The mixture was stirred 2 h at room temperature. LiAlH_4 was then neutralised at 0°C by water (20 mL). Thereafter, an aqueous solution of NaOH 0.1M (40 mL) was added and the aqueous layer was extracted thrice by DCM (3x 10 mL), dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to give (3-(benzyloxy) phenyl) methanol **19** as a yellow solid (8.47 g, yield 97%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.46 – 7.30 (m, 5H), 7.26 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.95-6.89 (m, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.55 (s, 1H), 3.84 (bs, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 158.5 (C_q), 142.4 (C_q), 136.67 (C_q), 129.1 (CH_{arom}), 128.2 (2 CH_{arom}), 127.5 (CH_{arom}), 127.1 (2 CH_{arom}), 119.02 (CH_{arom}), 113.5 (CH_{arom}), 112.8 (CH_{arom}), 69.4 (CH_2), 64.1 (CH_2), 60.1 (CH_2).

GC-MS (FI+): calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2$ [M] $^+$ 214.1, found 214.1

Synthesis of 1-(benzyloxy)-3-(chloromethyl)benzene (**20**)



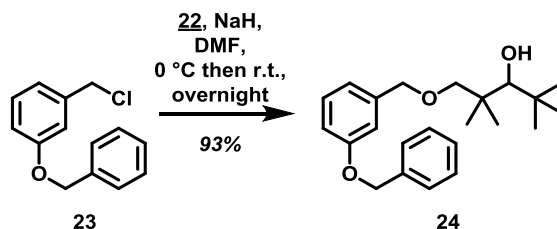
To a solution of (3-(benzyloxy)phenyl)methanol **19** (7.7 g, 35.9 mmol, 1equiv.) in dry DCM (100 mL) under argon atmosphere, SOCl_2 (5 mL, 71.8 mmol, 2 equiv.) was slowly added at 0°C . The mixture was allowed to cool for 3 h. SOCl_2 was neutralized by slowly adding at 0°C of sat. aq. NH_4Cl solution (20 mL). The layers were separated and the organic phase was washed with NaOH 0.1M then brine and dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to give a yellow oil (7g, yield 84%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.46 – 7.25 (m, 6H), 7.03-6.92 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.56 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 138.98 (C_q), 136.81 (C_q), 129.85 (CH_{arom}), 128.66 (2 CH_{arom}), 128.09 (CH_{arom}), 127.56 (2 CH_{arom}), 121.12 (CH_{arom}), 115.08 (CH_{arom}), 114.94 (CH_{arom}), 70.10 (CH_2), 46.22 (CH_2).

GC-MS (FI+): calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClO}$ [M] $^+$ 232.07 and 234.06, found 232.06 and 234.06

Synthesis of 1-((3-(benzyloxy)benzyl)oxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ol (**24**):



To a suspension of NaH (482 mg, 12.04 mmol, 1.4 equiv.) in 40 mL of dry DMF under argon atmosphere, a solution of 2,2,4,4-tetramethylpentane-1,3-diol **22** (1.56 g, 9.46 mmol, 1.1 equiv.) was added by cannula at 0°C . The mixture was stirred at room temperature for 1 h, then a solution of 1-(benzyloxy)-3-(chloromethyl)benzene **23** (2 g, 8.6 mmol, 1 eq) in 20 mL of dry DMF was added by cannula at 0°C . The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. The reaction mixture was slowly quenched by addition of a solution of a sat. aq. NH_4Cl solution (100 mL) at 0°C , and the DMF was removed. The crude product was extracted by EtOAc (3 x 30 mL), washed

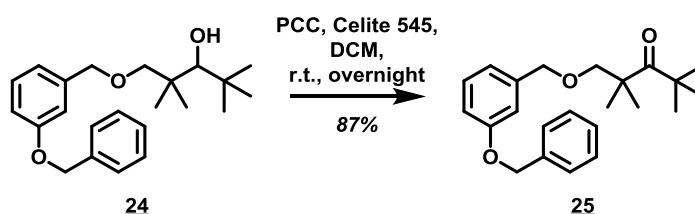
successively with water and brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The yellow oil obtained was recrystallized in cyclohexane to give a white solid (3.01 g, yield 98%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.50 – 7.23 (m, 6H), 7.01– 6.91 (m, 3H), 5.12 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.28 (m, 2H), 1.10 (s, 15H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 158.8 (C_q), 139.3 (C_q), 136.8 (C_q), 129.3 (CH_{arom}), 128.3 (2 CH_{arom}), 127.7 (CH_{arom}), 127.2 (2 CH_{arom}), 119.8 (CH_{arom}), 114.0 (CH_{arom}), 113.6 (CH_{arom}), 84.3 (CH), 81.8 (CH₂), 73.1 (CH₂), 69.6 (CH₂), 40.4 (C_q), 37.0 (C_q), 28.5 (3 CH₃), 25.5 (CH₃), 21.7 (CH₃).

GC-MS (FI+): calcd. for C₂₃H₃₂O₃ [M]⁺ 356.2, found 356.2

Synthesis of 1-((3-(benzyloxy)benzyl)oxy)-2,2,4-tetramethylpentan-3-one (25):



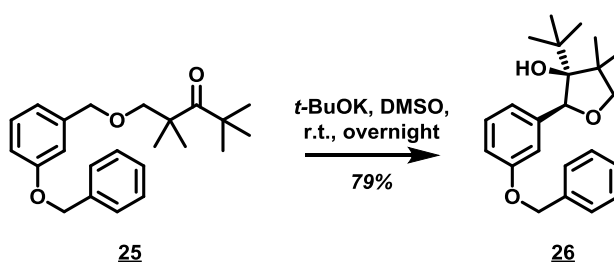
PCC (2 g, 11.2 mmol, 2 equiv.) and Celite 545 (2 g) were suspended into 30 mL of dry DCM under argon atmosphere. A solution of alcohol **22** (2 g, 5.6 mmol, 1 equiv.) in 15 mL of dry DCM was added through a canula. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The resulting black solution was filtrated on a silica pad with EtOAc then concentrated under vacuum. The resulting solid was filtrated thrice on a Celite 545 pad with Et₂O, and again concentrated under vacuum to give a yellow oil (1.65 g, 83% yield). In order to avoid any degradation, the product is stocked at -25 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.45–7.32 (m, 5H), 7.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.94–6.86 (m, 3H), 5.07 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.49 (s, 2H), 1.28 (s, 6H), 1.24 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 217.4 (C_q), 158.9 (C_q), 140.3 (C_q), 137.1 (C_q), 129.3 (CH_{arom}), 128.6 (2 CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 119.9 (CH_{arom}), 114.0 (CH_{arom}), 113.6 (CH_{arom}), 78.6 (CH₂), 73.1 (CH₂), 69.9 (CH₂), 50.2 (C_q), 45.8 (C_q), 28.1 (3 CH₃), 24.0 (2 CH₃).

GC-MS (FI+): calcd. for C₂₃H₃₀O₃ [M]⁺ 354.2, found 356.2

Synthesis of 2-(3-(benzyloxy)phenyl)-3-(tert-butyl)-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (26):



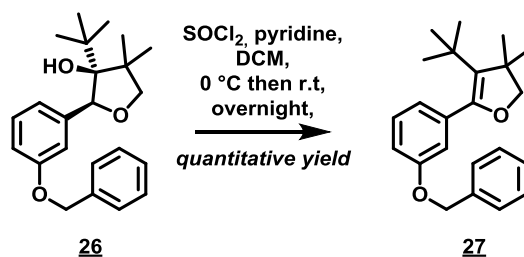
Potassium dimsyl was formed by complete dissolution of t-BuOK (974.4 mg, 8.7 mmol, 3 eq) in 10 mL of dry DMSO under argon atmosphere at room temperature for 30 minutes. Ketone **25** (1 g, 2.9 mmol, 1 equiv.) was slowly added and the reaction was stirred overnight. The reddish solution was quenched by adding few drops of a sat. aq. NH₄Cl solution and the crude product was five to six times extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum to give furan **27** as a white solid (867 mg, 79% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.44 – 7.24 (m, 6H), 7.08 – 7.03 (m, 2H), 6.92 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.10 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.37 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 0.92 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 158.7 (C_q), 141.8 (C_q), 136.9 (C_q), 129.2 (CH_{arom}), 128.5 (2 CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 121.8 (CH_{arom}), 115.6 (CH_{arom}), 114.7 (CH_{arom}), 84.0 (C_q), 83.9 (CH), 81.9 (CH₂), 69.9 (CH₂), 48.1 (C_q), 37.9 (C_q), 27.8 (3 CH₃), 26.4 (CH₃), 20.1 (CH₃).

LR-MS (ESI+): calcd. for C₂₃H₃₀O₃ [M+H]⁺ 354.2, found 354.2

Synthesis of 5-(3-(benzyloxy) phenyl)-4-(tert-butyl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (27**):**

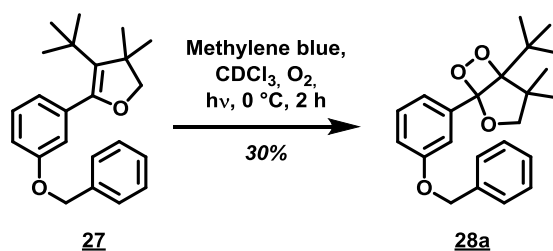


To a solution of alcohol **26** (100 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) in 3 mL of dry DCM, pyridine (90.5 μL, 1.2 mmol, 4 equiv.) and SOCl₂ (326.8 μL, 4.48 mmol, 16 equiv.) were successively added at 0°C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then sat. aq. NH₄Cl (1 mL) was added at 0°C. The organic layer was extracted, washed with brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum to give dihydrofuran as an orange oil (90 mg, yield 95%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.49 – 7.20 (m, 6H), 6.94 – 6.89 (m, 3H), 5.07 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.33 (s, 6H), 1.04 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 128.9 (CH_{arom}), 128.6 (2 CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 122.6 (CH_{arom}), 116.3 (CH_{arom}), 114.8 (CH_{arom}), 83.1 (CH₂), 70.0 (CH₂), 32.4 (3 CH₃), 27.4 (2 CH₃). *Not sufficient amount of this compound was obtained to be well-characterized by ¹³C spectroscopy (7 C_q are missing)*

Synthesis of 1-(3-(benzyloxy)phenyl)-5-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptane (28a):

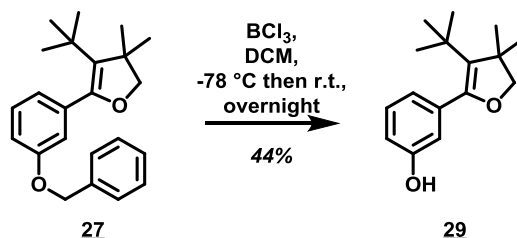


To a solution of dihydrofuran **27** (10 mg, 0.03 mmol, 1 equiv.) in 1 mL of CDCl_3 was added a small amount (spatula tip) under argon atmosphere. The blue solution was flushed with O_2 for 10 min then irradiated with a 60 W lamp under O_2 for 2 h. The crude product was concentrated at $0\text{ }^\circ\text{C}$ then purified on a silica preparative layer plate (cyclohexane/ EtOAc , 8:2, v/v). During the elution, the tub was carefully protected from light to avoid any spontaneous decomposition. The purified fractions were concentrated at $0\text{ }^\circ\text{C}$ and protected from light to give the dioxetane **28a** as white solid (3.32 mg, yield 30%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.44 – 7.20 (m, 8H), 7.03 – 6.98 (m, 1H), 5.10 (s, 1H), 5.09 (s, 1H) 4.56 (d, J = 8.13 Hz, 1H), 3.80 (d, J = 8.13 Hz 1H), 1.33 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 0.94 (s, 9H).

Due to the poor stability of this product, it was not possible to record both ^{13}C NMR and ESI mass spectra.

Synthesis of 3-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)phenol (29):

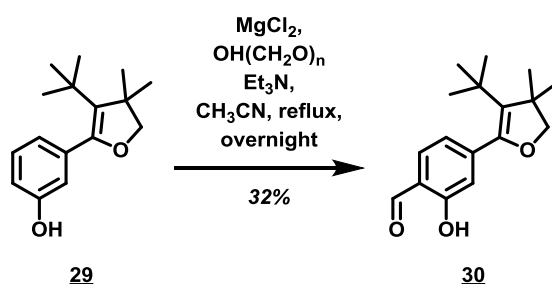


To a solution dihydrofuran **27** (850 mg, 2.53 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (35 mL) under argon atmosphere at $-78\text{ }^\circ\text{C}$, a 1M solution of BCl_3 in DCM (5 mL, 5.06 mmol, 2 equiv.) was added. The reaction mixture was allowed to cool overnight, then 1M NaOH (5 mL) were added. The solution was stirred at room temperature for one hour, then 2 M HCl (5 mL) was added. The organic layer was extracted with DCM, then washed with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to give dihydrofuran as a brown amorphous solid (620 mg, quantitative yield). Due to possible degradation the product is quickly used for the next step.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.13 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.89 – 6.79 (m, 1H), 6.76 – 6.71 (m, 1H), 6.70 – 6.63 (m, 1H), 3.89 (s, 2H), 1.34 (s, 6H), 1.06 (s, 9H).

Due to the poor stability of this product, it was not possible to record both ^{13}C NMR and ESI mass spectra.

Synthesis of 4-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxybenzaldehyde (30**):**



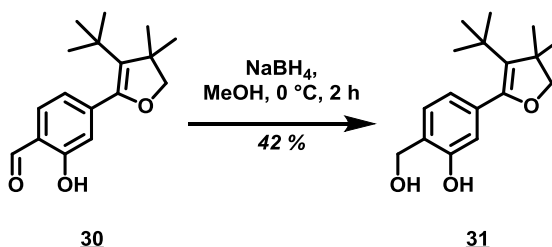
Phenol **29** (1 g, 4 mmol, 1 equiv.), Et_3N (2.1 mL, 15 mmol, 3.75 equiv.) and MgCl_2 (583.3 mg, 6 mmol, 1.5 eq) were dissolved in dry ACN (50 mL). Then paraformaldehyde (810.8 mg, 27 mmol, 6.75 equiv.) was added and the solution mixture was stirred under reflux overnight. The crude was concentrated then directly purified on a silica preparative layer plate (cyclohexane/EtOAc, 9:1, v/v) to give yellow crystals (356 mg, yields 32%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 11.00 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 7.52 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 1.33 (s, 6H), 1.07 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 196.2 (CHO), 161.08 (C_q), 148.0 (C_q), 145.3 (C_q), 133.1 (CH_{arom}), 127.0 (C_q), 121.7 (CH_{arom}), 120.1 (C_q), 119.2 (CH_{arom}), 83.4 (CH_2), 47.4 (C_q), 32.4 (3 CH_3), 29.7 (C_q), 27.2 (2 CH_3).

LR-MS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 274.16, found 274.16

Synthesis of 5-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-(hydroxymethyl)phenol (31**):**



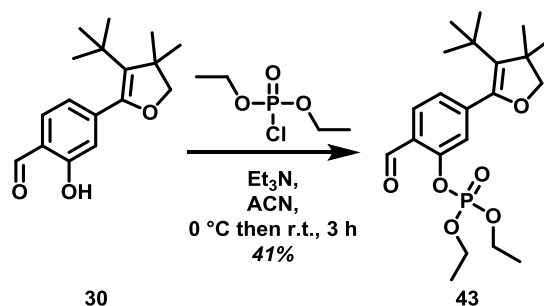
To a solution of aldehyde **30** (50 mg, 0.2 mmol, 1 equiv.) in MeOH (2 mL), NaBH_4 (8.7 mg, 0.23 mmol, 1.1 equiv.) was slowly added at 0 °C and the solution mixture was stirred at 0 °C for 2 h. The reaction mixture was quenched at 0 °C by addition of water (1 mL) and MeOH was removed by vacuum. The organic layer was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 9:1, v/v) to give yellow crystals (23 mg, yields 32%)

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ = 7.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 1.30 (s, 6H), 1.03 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) : δ =, 137.5 (C_q), 128.8 (C_q), 128.6 (CH_{arom}), 122.2 (CH_{arom}), 117.6 (CH_{arom}), 83.9 (CH_2), 60.8 (CH_2), 32.42 (3 CH_3), 27.7 (2 CH_3) *Not sufficient amount of this compound was obtained to be well-characterized by ^{13}C spectroscopy.*

LR-MS (ESI+): calcd. for $C_{17}H_{24}O_3$ $[M+H]^+$ 277.18, found 277.13

Synthesis of 5-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-formylphenyl diethyl phosphate (43):



To a solution of aldehyde **30** (10 mg, 0.04 mmol, 1 equiv.) and Et_3N (6 μL , 0.044 mmol, 1.1 equiv.) in 500 μL of dry ACN, diethylphosphonate (6 μL , 0.044 mmol, 1.1 equiv.) was added at $0\text{ }^\circ\text{C}$ and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The solution was filtrated then concentrated to give **43** as a white solid (7 mg, yields 42%).

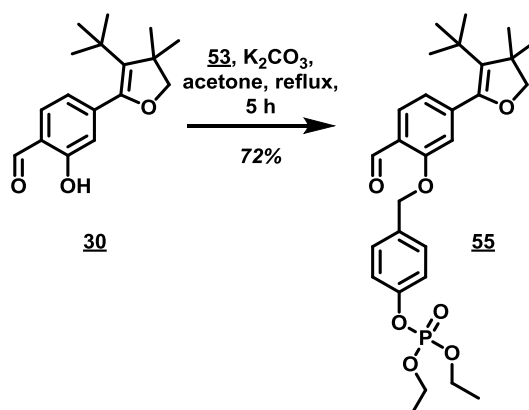
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 1.30 (s, 6H), 1.03 (s, 9H).

^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) : δ = - 6.85 (s, 1P).

LR-MS (ESI+): calcd. for $C_{21}H_{31}O_6\text{P}$ $[M+H]^+$ 411.2, found 411.2

Not sufficient amount of this compound was obtained to be well-characterized by ^{13}C spectroscopy

Synthesis of 4-((5-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-formylphenoxy)methyl)phenyl diethyl phosphate (55):



Aldehyde **30** (10 mg, 0.04 mmol, 1 equiv.), K_2CO_3 (7 mg, 0.048 mmol, 1.2 equiv.) and benzyl bromide **53** (14 mg, 0.044 mmol, 1 equiv.) were dissolved in acetone (500 μL) and stirred under reflux for 5 h.

The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, concentrated and filtrated with Et₂O to give **55** as yellow oil (14 mg, yields 72%).

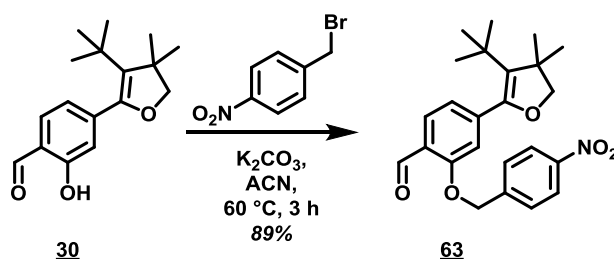
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 10.46 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.98–6.94 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.21–4.16 (m, 4H), 3.84 (s, 2H), 1.34–1.29 (m, 12H), 1.03 (s, 9H).

³¹P NMR (121.5 MHz, CDCl₃) : δ = - 6.40 (s, 1P).

LR-MS (ESI+): calcd. for C₂₈H₃₇O₇P [M]⁺ 517.2, found 517.2

Not sufficient amount of this compound was obtained to be well-characterized by ¹³C spectroscopy

Synthesis of 4-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-((4-nitrobenzyl)oxy)benzaldehyde (63**):**

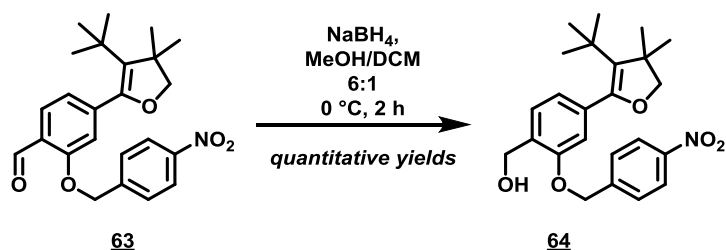


To a solution of aldehyde **30** (50 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) in 2 mL of dry ACN was added K₂CO₃ (50.3 mg, 0.36 mmol, 2 equiv.) and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, *para*-nitrobenzylbromide (43.6 mg, 0.20 mmol, 1.1 equiv.) was slowly added and the solution was heated 3 h at 60°C. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was washed thrice with a sat. aq. NH₄Cl solution, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc : 95/5 to 90/10) to give a yellow oil (66 mg, yields 89 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 10.53 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.63 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 3.87 (s, 2 H), 1.32 (s, 6H), 0.99 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 188.8 (CHO), 159.5 (C_q), 148.1 (C_q), 147.7 (C_q), 144.1 (C_q), 143.2 (C_q), 128.7 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 127.0 (C_q), 124.6 (C_q), 123.9 (2 CH_{arom}), 123.5 (CH_{arom}), 114.4 (CH_{arom}), 83.3 (CH₂), 69.1 (CH₂), 47.3 (C_q), 32.42 (3 CH₃), 27.18 (2 CH₃).

LR-MS (ESI+): calcd. for C₂₄H₂₇NO₅ [M+H]⁺ 410.2, found 410.2

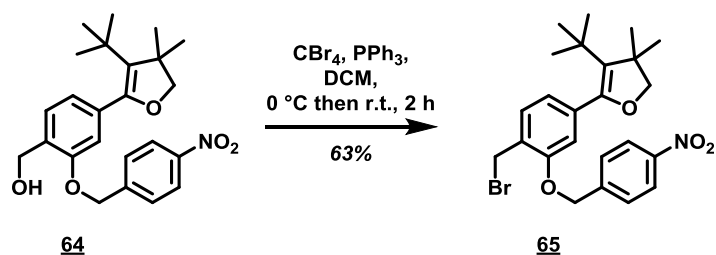
Synthesis of (4-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-((4-nitrobenzyl)oxy)phenyl)methanol (64):

To a solution of benzaldehyde compound **63** (48 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in 7 mL of a mixture of MeOH/DMC 6 :1, NaBH₄ (4.9 mg, 0.13 mmol, 1.1 eq) was added stepwise at 0 °C and the mixture was allowed to cool to room temperature for 4 h. Then NaHCO₃ was added and the organic layer was washed thrice with brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum to give alcohol **64** as yellow oil (243 mg, quantitative yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 1.3 et 7.6 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.76 (s, 2 H), 3.85 (s, 2H), 1.31 (s, 6H), 0.98 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 155.0 (C_q), 149.3 (C_q), 147.5 (C_q), 144.1 (C_q), 136.9 (C_q), 129.3 (C_q), 128.2 (CH_{arom}), 127.4 (2 CH_{arom}), 126.0 (C_q), 123.8 (2 CH_{arom}), 123.2 (CH_{arom}), 113.1 (CH_{arom}), 83.0 (CH₂), 68.2 (CH₂), 61.2 (CH₂), 47.1 (C_q), 32.4 (3 CH₃), 27.3 (2 CH₃).

LR-MS (ESI+): calcd. for C₂₄H₂₉NO₅ [M+H]⁺ 412.2, found 412.2

Synthesis of 5-(4-(bromomethyl)-3-((4-nitrobenzyl)oxy)phenyl)-4-(tert-butyl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (65):

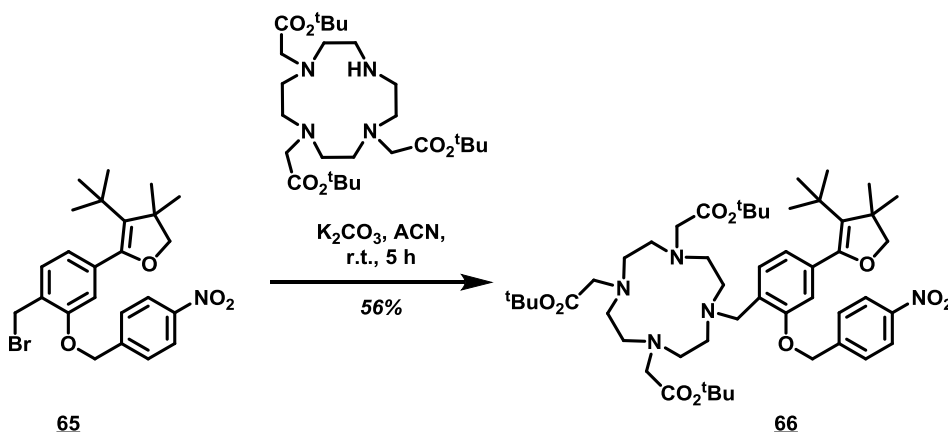
To a solution of alcohol **64** (240 mg, 0.583 mmol, 1 equiv.) in 2 mL of dry THF, PPh₃ (183.2 mg, 0.699 mmol, 1.2 equiv) and CBr₄ (212 mg, 0.641, 1.1 equiv) were successively slowly added and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completion of the reaction, the mixture was quenched with brine. The organic layer was extracted with EtOAc and washed twice with brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc : 95/5) to give benzyl bromide derivative **65** as a yellow oil (173 mg, yields 63 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 1.4 et 7.6 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.60 (s, 2 H), 3.86 (s, 2H), 1.32 (s, 6H), 0.99 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 155.4 (C_q), 149.0 (C_q), 147.6 (C_q), 144.1 (C_q), 138.3 (C_q), 130.6 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 126.4 (C_q), 126.3 (C_q), 123.9 (2 CH_{arom}), 123.2 (CH_{arom}), 113.6 (CH_{arom}), 83.2 (CH_2), 68.8 (CH_2), 47.1 (C_q), 32.4 (3 CH_3), 28.52 (CH_2), 27.3 (2 CH_3).

LR-MS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{BrNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 473.12 and 475.12, found 473.12 and 475.12

Synthesis of tri-tert-butyl 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate compound with tri-tert-butyl 2,2',2''-(10-(4-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-((4-nitrobenzyl)oxy)benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate and 5-(4-(bromomethyl)-3-((4-nitrobenzyl)oxy)phenyl)-4-(tert-butyl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (1:1:1) (66):



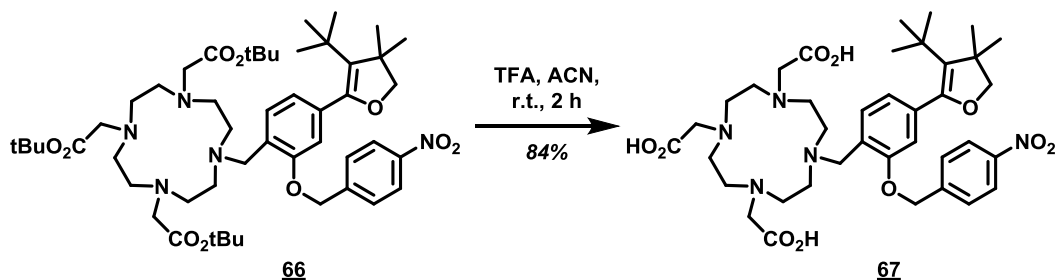
To a solution of DO_3AtBu (221 mg, 0.43 mmol, 1.2 equiv.) in 2 mL of dry ACN at 0 °C, K_2CO_3 (148 mg, 1.074 mmol, 2.5 equiv.) and a solution of benzyl bromide **65** (170 mg, 0.358 mmol, 1 equiv.) in 3 mL of dry ACN successively were added. The mixture was stirred at room temperature for 5 h. The solution was then filtrated and washed with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford DO_3A derivative as a grey solid (183 mg, yields 56%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.05 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.26(d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 1.3 et 7.7 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.65 (s, 2 H), 2.90-2.07 (m,x) 3.86 (s, 2H), 1.32 (s, 11H), 1.28 (s, 19H), 1.27 (s, 6H), 0.73 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 172.3 (C_q), 154.8 (C_q), 148.3 (C_q), 147.0 (C_q), 143.6 (C_q), 138.3 (C_q), 137.0 (C_q), 131.4 (C_q), 127.2 (2 CH_{arom}), 125.8 (CH_{arom}), 125.3 (CH_{arom}), 123.4 (2 CH_{arom}), 122.8 (C_q), 123.2 (CH_{arom}), 113.8 (C_q), 83.2 (CH_2), 68.8 (CH_2), 47.1 (C_q), 32.4 (3 CH_3), 28.52 (CH_2), 27.3 (2 CH_3).

LR-MS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 908.6, found 908.6

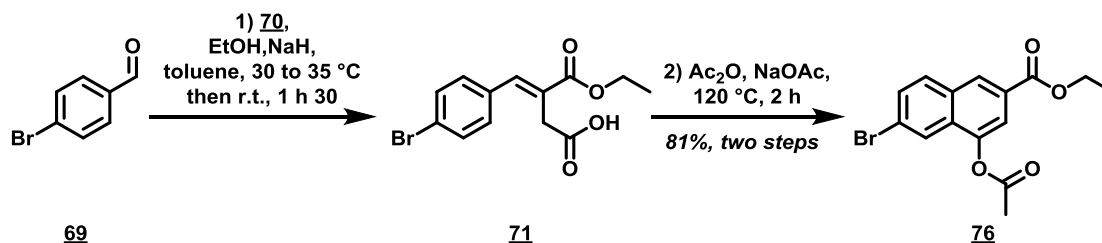
Synthesis of 2,2',2''-(10-(4-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-((4-nitrobenzyl)oxy)benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (xx):



Benzy **66** (30 mg, 0.03 mmol, 1 equiv.) was dissolved in ACN and TFA (2 mL, 0.03 mmol, 1 equiv.) was slowly added at 0 °C. The mixture was stirred at 50 °C until completion monitored by RP-HPLC (*system A*) (2 h). The reaction mixture was concentrated to 200 μ L and poured slowly into a stirring Et₂O solution. The supernatant was removed, and the mixture was washed with Et₂O to give **67** as a yellow powder (22 mg, yields 84%).

HPLC (*system A*): t_R = 23.4 min, purity = 80%.

Not sufficient amount of this compound was obtained to be well-characterized by ¹H and ¹³C spectroscopy.

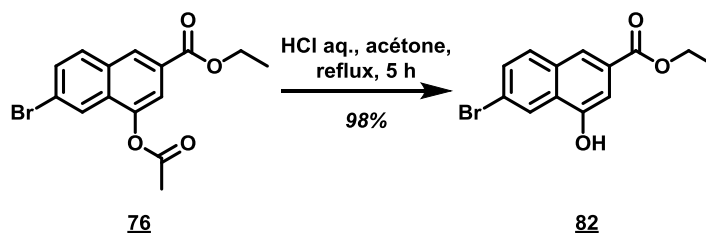
2. Synthesis of naphthol chemiluminescent platformSynthesis of ethyl 4-acetoxy-6-bromo-2-naphthoate (76) :

To a suspension of NaH (4.8 g, 121 mmol, 2.2 equiv.) in 30 mL of dry toluene with 100 μL of EtOH (0.3 equiv.) under argon atmosphere, a mixture of diethyl succinate **70** (25 mL, 159.5 mmol, 2.9 equiv.) and a solution of 4-bromobenzaldehyde **69** (10 g, 55 mmol, 1 equiv.) was carefully and slowly added with temperature controlling between 30 and 35 $^\circ\text{C}$. Once the addition finished the mixture was stirred at room temperature for 1 h 30. Concentrated HCl (20 mL) was carefully and slowly added at 0 $^\circ\text{C}$ before addition of water (25 mL). The organic layer was thrice extracted with K_2CO_3 1M (3 x 25 mL). The aqueous layer was slowly acidified with HCl 37% (15 mL) then extracted thrice with EtOAc (3 x 30 mL), dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to give the Stobbe reaction product **71** as a brown gum. This crude product was directly dissolved in acetic anhydride (165 mL, 275 mmol, 5 equiv.). Sodium acetate was added at room temperature and the resulting reaction mixture was heated at 120 $^\circ\text{C}$ for 2 h. The reaction medium was allowed to cool to room temperature then poured in deionized water (335 mL). The mixture was stirred until precipitation occurred. The solid formed was recovered through filtration and washed thrice with water, dried over vacuum desiccator to give a brown powder (15 g, yields 81% for two steps).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.47 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.65 (dd, J = 1.9 Hz, 8.8 Hz, 1H), 4.45 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.5 (s, 3 H) 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 169.2 (C_q), 165.7 (C_q), 145.7 (C_q), 132.2 (C_q), 131.1 (CH_{arom}), 130.9 (CH_{arom}), 130.1 (C_q), 128.7 (CH_{arom}), 128.3 (C_q), 123.9 (CH_{arom}), 123.6 (C_q), 118.9 (CH_{arom}), 61.6 (CH_2), 21.1 (CH_3), 14.3 (CH_3).

HR-MS (APCI+): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrO}_4$ [$\text{M}+\text{H}_2\text{O}$] $^+$ 336.0 and 338.0 found 353.9 and 355.9

Synthesis of ethyl 6-bromo-4-hydroxy-2-naphthoate (82):

To a solution of ethyl 4-acetoxy-6-bromo-2-naphthoate **82** (10.6 g, 31.4 mmol, 1 equiv.) in synthesis grade acetone (150 mL), 3 M aq. HCl (40 mL, 120 mmol, 4 equiv.) was added and the resulting mixture was stirred under reflux for 5 h. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature then concentrated under vacuum. The crude was dissolved in 50 mL of EtOAc then washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to give ethyl 6-bromo-4-hydroxy-2-naphthoate **82** as a brown solid (9.1 g, yields 98%).

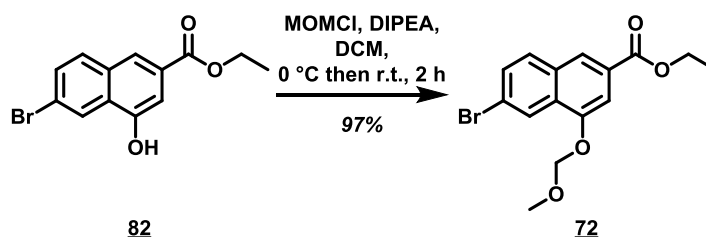
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.43 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.44 (t, *J* = 8.7 Hz, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 167.1 (C_q), 151.4 (C_q), 132.2 (C_q), 130.8 (CH_{arom}), 130.7 (CH_{arom}), 128.2 (C_q), 128.0 (C_q), 125.0 (CH_{arom}), 123.3 (CH_{arom}), 122.2 (C_q), 108.6 (CH_{arom}), 62.2 (CH₂), 14.6 (CH₃).

LR-MS (ESI-): calcd. for C₁₃H₁₁BrO₃ [M-H]⁻ 294.0 and 296.0 found 293.1 and 295.1

2.1 Protection with methoxymethylether (MOM) group

Synthesis of ethyl 6-bromo-4-(methoxymethoxy)-2-naphthoate (72):

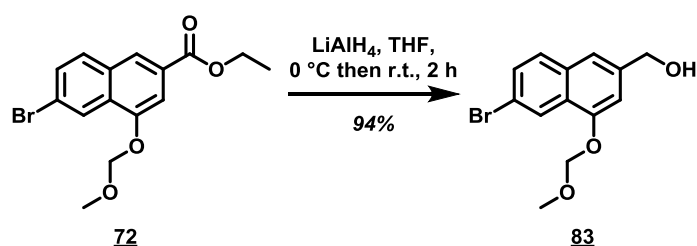


To a solution of ethyl 6-bromo-4-hydro-2-naphthoate **82** (3 g, 10 mmol, 1 equiv.) in 40 mL of dry DCM diisopropyléthylamine (5.1 mL, 30 mmol, 3 equiv.) then MOMCl (1.1 mL, 15 mmol, 1.5 equiv.) were added at 0 °C under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction medium was allowed to cool at room temperature and sat. aq. NH₄Cl solution (15mL) was added to the crude mixture. The phases were separated and the organic layer was washed twice with sat. aq. NH₄Cl (2x15 mL), then twice with aq. NaOH 1M (2x15 mL), and finally with brine (15mL). The organic layer was dried over MgSO₄, then filtrated and concentrated under vacuum to give ethyl 6-bromo-4-(methoxymethoxy)-2-naphthoate **72** as brown solid (3.3g, yields 97%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.43 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 4.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 166.3 (C_q), 151.88 (C_q), 131.8 (C_q), 130.5 (CH_{arom}), 130.4 (CH_{arom}), 128.9 (C_q), 128.4 (C_q), 124.66 (CH_{arom}), 124.0 (CH_{arom}), 122.1 (C_q), 107.5 (CH_{arom}), 94.7 (CH₂), 61.2 (CH₂), 56.5 (CH₃), 14.3 (CH₃).

HR-MS (EI+, 70 eV): calcd. for C₁₅H₁₅BrO₄ [M+]⁺ 338.01 and 340.01 found 308.00 (due to MOM cleavage), 338.02 and 355.9

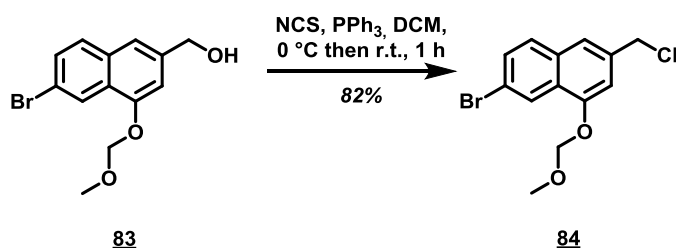
Synthesis of (6-bromo-4-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methanol (83**):**


To a suspension of LiAlH_4 (334 mg, 8.8 mmol, 1 equiv.) in 10 mL of dry THF ethyl 6-bromo-4-(methoxymethoxy)-2-naphthoate **72** (3 g, 8.8 mmol, 1 equiv.) in 30 mL of dry THF was slowly added at 0 °C under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. LiAlH_4 was then slowly neutralised by water at 0 °C. Thereafter, sat. aq. NH_4Cl solution was added and the aqueous layer was thrice extracted by EtOAc. The organic layers were then washed with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to give (6-bromo-4-(methoxymethoxy) naphthalen-2-yl) **83** methanol as a brown solid (2.38 g, yields 94%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.39 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.78 (s, 2H), 3.54 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 152.3 (C_q), 139.3 (C_q), 132.7 (C_q), 130.0 (CH_{arom}), 129.2 (CH_{arom}), 126.4 (C_q), 124.5 (CH_{arom}), 119.5 (C_q), 118.4 (CH_{arom}), 107.6 (C_q), 94.6 (CH_2), 65.4 (CH_3), 56.4 (CH_2).

HR-MS (EI+, 70 eV): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$ $[\text{M}]^+ \cdot$ 296.00 and 298.00 found 265.99 (due to MOM cleavage), 296.00 and 298.0

Synthesis of 7-bromo-3-(chloromethyl)-1-(methoxymethoxy) naphthalene (84**):**


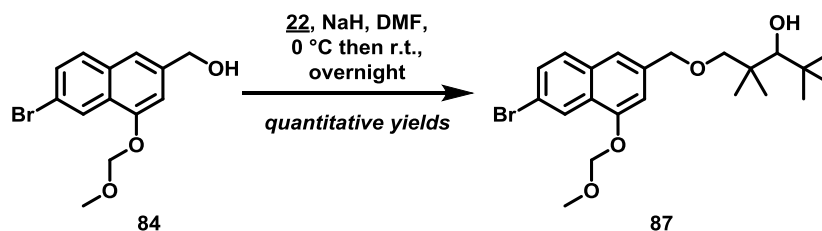
To a solution of (6-bromo-4-(methoxymethoxy) naphthalen-2-yl) methanol **83** (523.30 mg, 1.76 mmol, 1 equiv.) in 1 mL of dry DCM, PPh_3 (485 mg, 3 mmol, 1.05 equiv.) was added. Then, NCS (240.35 mg, 1.80 mmol, 1.02 equiv.) was added to the mixture portionwise at 0 °C. After 40 min of stirring at room temperature, the crude mixture was concentrated under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc : 95/5, v/v) to give 7-bromo-3-(chloromethyl)-1-(methoxymethoxy)naphthalene **84** as a yellow oil (457.3 mg, yields 82%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.40 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.14 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.56 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 135.7 (C_q), 132.5 (C_q), 130.3 (CH_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 126.7 (C_q), 124.6 (CH_{arom}), 120.7 (CH_{arom}), 120.2 (C_q), 108.8 (H_{arom}), 94.8 (CH_2), 56.7 (CH_3), 46.6 (CH_2).

HR-MS (EI+, 70 eV): calcd. for $C_{13}H_{12}BrClO_2$ $[M+]^+$ 313.97 and 315.97 found 265.99 (due to MOM cleavage), 313.97 and 316.0

Synthesis of 1-((6-bromo-4-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methoxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ol (87**):**



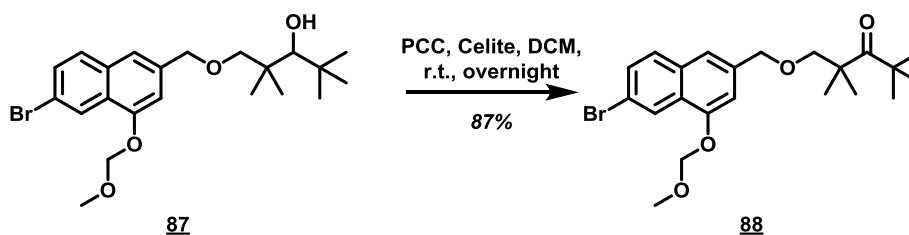
2,2,4,4-tetramethylpentane-1,3-diol **22** (445.2 mg, 2.78 mmol, 1.1 equiv.) in 3 mL of dry DMF was added to a suspension of NaH (141.6 mg, 2.78 mmol, 1.4 equiv.) in 20 mL of dry DMF at 0 °C under argon atmosphere. After 1 h of stirring, a solution of 7-bromo-3-(chloromethyl)-1-(methoxymethoxy)naphthalene **84** (800 mg, 2.53 mmol, 1 equiv.) in 5 mL of dry DMF was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, sat aq. NH_4Cl solution (10 mL) was slowly added. The crude product was extracted by EtOAc. The organic layer was thrice washed with brine (45 mL) then dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated under vacuum to give an orange oil (1 g, quantitative yield).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.39 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.10 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.45 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.28 – 3.19 (m, 2H), 1.08 (s, 3H), 1.03 (s, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 152.3 (C_q), 136.5 (C_q), 132.6 (C_q), 130.0 (CH_{arom}), 129.2 (CH_{arom}), 126.5 (C_q), 124.5 (CH_{arom}), 119.5 (C_q), 119.4 (CH_{arom}), 112.9 (C_q), 108.0 (CH_{arom}), 94.7 (CH_2), 84.3 (CH_{arom}), 81.9 (CH_2), 73.4 (CH_2), 56.3 (CH_3), 40.6 (C_q), 37.2 (C_q), 28.6 (3 CH_3), 25.8 (CH_3), 21.8 (CH_3).

LR-MS (ESI+): calcd. for $C_{22}H_{31}BrO_4$ $[M+H]^+$ 438.1 and 440.1 found 279.1, 281.1 (due to MOM cleavage) 438.9 and 441.0.

Synthesis of 1-((6-bromo-4-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methoxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-one (88**):**



PCC (2 g, 9.18 mmol, 2.7 equiv.) and Celite 545 (2 g) were suspended in 5 mL of dry CH_2Cl_2 under argon atmosphere. To this suspension, a solution of the alcohol **87** (1.5 g, 3.4 mmol, 1 equiv.) in 12 mL of dry

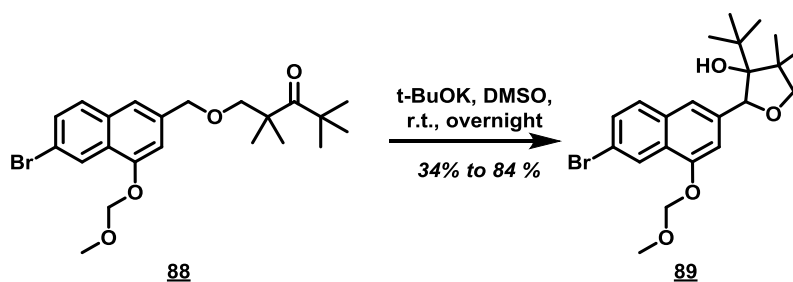
DCM was added, and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. *i*-PrOH (4 mL) were added and the reaction mixture was stirred for further 1 h. The crude was thrice filtrated on silica/Celite 545 pad before being concentrated under vacuum to provide ketone **88** as an orange oil (1.3 g, yields 87%)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.39 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.53 (s, 5H), 1.26 (d, J = 4.2 Hz, 15H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 217.27 (C_q), 152.11 (C_q), 137.15 (C_q), 132.58 (C_q), 129.81 (CH_arom), 129.17 (CH_arom), 126.42 (C_q), 125.91, 124.44 (CH_arom), 119.27 (C_q), 119.05 (CH_arom), 108.07 (CH_arom), 94.69 (CH_2), 78.76 (CH_2), 73.21 (CH_2), 56.35 (CH_3), 50.08 (C_q), 45.76, 37.06, 32.71, 31.89, 29.67 (C_q), 28.42, 28.01, 27.05, 24.00, 22.66, 19.70, 14.09.

LR-MS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{BrO}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 436.1 and 438.1 found 279.1, 281.1 (due to MOM cleavage) 437.0 and 440.2.

Synthesis of 2-(6-bromo-4-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)-3-(tert-butyl)-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (89**):**

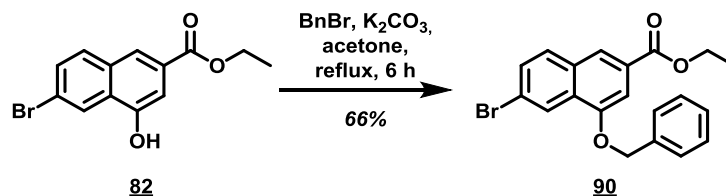


Potassium dimsyl was formed by complete dissolution of t-BuOK (1 g, 9 mmol, 3 equiv..) in 10 mL of dry DMSO under argon atmosphere at room temperature for 1 h. Ketone **88** (1.3 g, 3 mmol, 1 equiv..) was slowly added and the reaction was stirred overnight. The black solution was quenched by adding 20 mL of a solution of saturated NH_4Cl and the crude product was five to six times extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc, 100/0 to 95/5, v/v) to give furan **89** as an orange oil (438 mg, yields 34%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.38 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 7.24 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.17 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.54 – 3.50 (m, 1H), 1.40 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 1.16 (s, 3H), 0.95 (s, 8H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 151.6 (C_q), 138.7 (C_q), 132.4 (C_q), 129.9 (CH_arom), 129.4 (CH_arom), 126.7 (C_q), 124.4 (CH_arom), 121.3 (CH_arom), 119.7 (C_q), 110.0 (CH_arom), 94.6 (CH_2), 85.1 (C_q), 84.2 (CH), 81.9 (CH_2), 56.2 (CH_3), 48.2 (C_q), 37.9 (C_q), 27.9 (3 CH_3), 26.5 (CH_3), 20.1 (CH_3).

LR-MS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{BrO}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 436.1 and 438.1 found 279.1, 281.1 (due to MOM cleavage) 437.1 and 439.9.

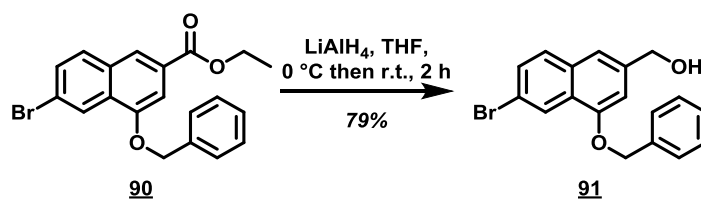
2.2 Protection with benzyl (Bn) group**Synthesis of ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate (90):**

In a solution of bromonaphthoate **82** (1.5g, 5.1 mmol, 1 equiv.) in synthesis grade acetone (25 mL), anhydrous K_2CO_3 (856.9 g, 6.12 mmol, 1.2 equiv.) then benzyl bromide (671 μL , 5.61 mmol, 1.1 equiv.) were added. The mixture was stirred under reflux 6 h. The reaction medium was allowed to cool to room temperature then concentrated. The crude was dissolved in DCM (20 mL) and washed thrice with 3.0 M HCl (20 mL) then dried over anhydrous MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude was crystallized with Et_2O to give ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate **90** as white crystals (1.3 g, yields 66%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.48 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 7.57 – 7.51 (m, 3H), 7.50 – 7.35 (m, 3H), 5.30 (s, 2H), 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.45 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 166.6 (C_q), 153.7 (C_q), 136.4 (C_q), 132.0 (C_q), 130.7 (CH_{arom}), 130.6 (CH_{arom}), 128.9 (C_q), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.4 (C_q), 128.3 (CH_{arom}), 127.8 (2 CH_{arom}), 125.0 (CH_{arom}), 123.4 (CH_{arom}), 122.2 (C_q), 105.2 (CH_{arom}), 70.6 (CH_2), 61.3 (CH_2), 14.4 (CH_3).

HR-MS (APCI-): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ 384.0 and 386.0 found 383.1 and 385.1.

Synthesis of (4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methanol (91):

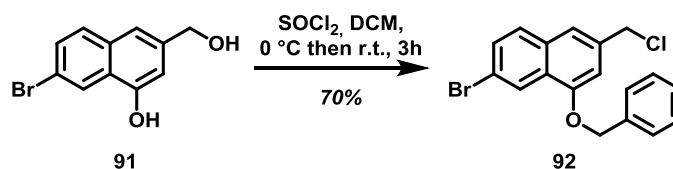
To a suspension of LiAlH_4 (400 mg, 10.4 mmol, 2 equiv.) in 20 mL of dry THF ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate **90** (2 g, 5.2 mmol, 1 equiv.) in 30 mL of THF was slowly added at 0°C under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature 2 h. LiAlH_4 was then neutralised by water (10 mL). Thereafter, an aqueous solution of NaOH 0.1M (10mL) was added and the aqueous layer was extracted thrice by EtOAc (3x 40 mL), dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to give (4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methanol **91** as a beige solid (1.3 g, yields 87%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.44 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.56 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.50 (m, 2H), 7.48 – 7.35 (m, 4H), 6.96 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.81 (d, J = 5.6 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 153.8 (C_q), 139.2 (C_q), 136.5 (C_q), 132.6 (CH_{arom}), 130.0 (CH_{arom}), 129.1 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.1 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 126.2 (C_q), 124.6 (CH_{arom}), 117.4 (CH_{arom}), 104.9 (CH_{arom}), 70.1 (CH_3), 65.2 (CH_3).

HR-MS (APCI +): calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrO}_2$ [$\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$] $^+$ 342.0 and 344.0 found 325.0 and 327.0.

Synthesis of 1-(benzyloxy)-7-bromo-3-(chloromethyl)naphthalene (92):



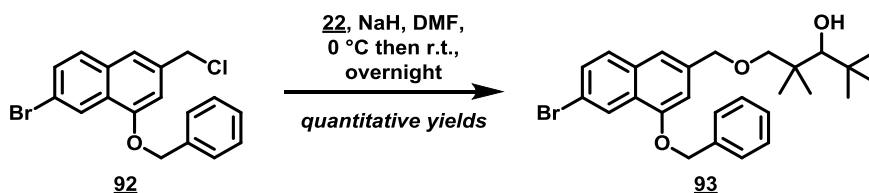
To a solution of (4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methanol **91** (4 g, 12 mmol, 1equiv.) in dry DCM (40 mL) under argon atmosphere, SOCl_2 (1.7 mL, 24 mmol, 2 equiv.) was slowly added at 0 °C. The mixture was allowed to cool to room temperature for 3 h. SOCl_2 was neutralized by slowly adding sat. aq. NH_4Cl solution (2 mL) at 0 °C. The organic layer was washed with NaOH 0.1M then brine and dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The compound was then purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/ EtOAc , 100/0 to 98/2, v/v) to give a yellow oil (3 g, yields 70%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.44 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.55 – 7.39 (m, 6H), 6.95 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.70 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 154.2 (C_q), 136.4 (C_q), 135.6 (C_q), 132.6 (C_q), 130.5 (CH_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 127.7 (2 CH_{arom}), 126.7 (C_q), 124.8 (CH_{arom}), 120.2 (C_q), 119.9 (CH_{arom}), 106.2 (CH_{arom}), 70.4 (CH_3), 47.0 (CH_3).

HR-MS (EI +): calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrClO}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 360.0 and 362.0 found 362.0, 207.0, 127.0 and 91.

Synthesis of 1-(benzyloxy)-7-bromo-3-(chloromethyl)naphthalene (93):



To a suspension of NaH (465 mg, 11.62 mmol, 1.4 equiv.) in 16 mL of dry DMF, a solution of 2,2,4,4-tetramethylpentane-1,3-diol **22** (1.5 g, 9.1 mmol, 1.1 equiv.) in 12 mL of dry DMF was added by cannula at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 45 min, then a solution of 1-(benzyloxy)-7-bromo-3-(chloromethyl)naphthalene **92** (4 g, 8.3 mmol, 1 equiv.) in 10 mL of dry DMF was added by cannula at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. 40 mL of a solution of $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ was slowly added to the yellow mixture at 0 °C. After removal of volatiles, the crude product

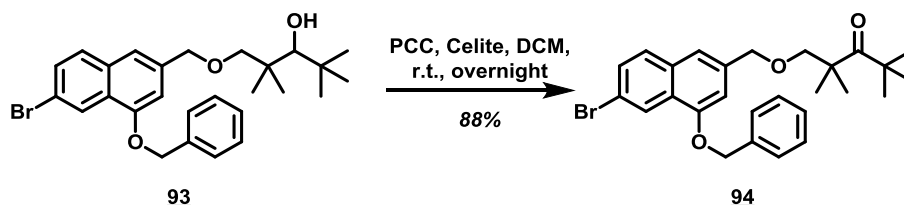
was extracted thrice by EtOAc (3 x 30 mL), washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum to give an orange oil (3.9 g, quantitative yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.49 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.61 – 7.36 (m, 5H), 7.35 (s, 1H), 6.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.47 – 3.42 (m, 2H), 3.33 – 3.28 (m, 2H), 1.08 (s, 15H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 154.2 (C_q), 136.7 (C_q), 136.4 (C_q), 132.7 (C_q) 130.3 (CH_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 127.7 (2 CH_{arom}), 126.6 (C_q), 124.8 (CH_{arom}), 119.6 (C_q), 118.8 (CH_{arom}), 105.6 (CH_{arom}), 84.8 (CH₂), 82.1 (CH), 73.8 (CH₂), 70.4 (CH₂), 40.8 (CH₂), 37.4 (C_q), 28.28 (3 CH₃), 25.9 (CH₃), 21.9 (CH₃).

HR-MS (ESI +): calcd. for C₂₇H₃₃BrO₃ [M+H]⁺ 484.2 and 486.2 found 483.1, 485.1, 487.2 and 488.2.

Synthesis of 1-(benzyloxy)-7-bromo-3-(chloromethyl)naphthalene (94):

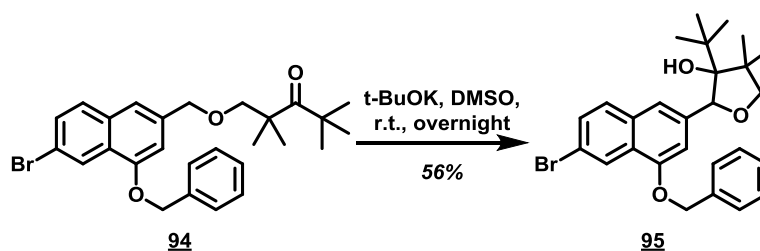


To a solution of alcohol **93** (741 mg, 1.53 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (7 mL), PCC (660 mg, 3.06 mmol, 2 equiv.) and Celite 545 (660 mg) were added DCM under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The resulting black solution was filtrated on a silica pad with EtOAc then concentrated under vacuum. The resulting solid was thrice filtrated on a Celite 545 pad with Et₂O, and again concentrated under vacuum to give a brown oil (651.5 mg, yields 88%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.43 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.30 (m, 5H), 7.28 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 1.28 (s, 6H), 1.25 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 217.4 (C_q), 153.8 (C_q), 137.1 (C_q), 136.7 (C_q), 132.6 (C_q) 130.1 (CH_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 127.6 (2 CH_{arom}), 126.4 (C_q), 124.8 (CH_{arom}), 119.3 (C_q), 118.4 (CH_{arom}), 105.6 (CH_{arom}), 78.8 (CH₂), 73.4 (CH₂), 70.2 (CH₂), 50.2 (C_q), 45.9 (C_q), 28.2 (3 CH₃), 24.1 (2 CH₂)

LR-MS (ESI +): calcd. for C₂₇H₃₁BrO₃ [M+H₂O]⁺ 482.1 and 484.1 found 500.0 and 502.07.

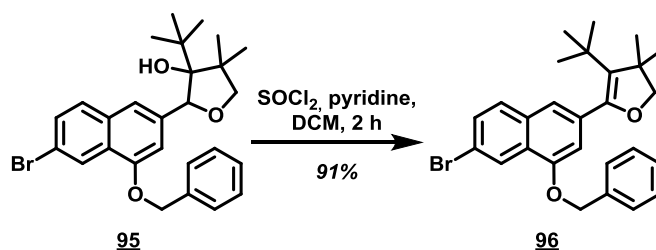
Synthesis of 2-(4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)-3-(tert-butyl)-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (95):

Potassium dimsyl was formed by complete dissolution of t-BuOK (436.8 mg, 3.9 mmol, 3 equiv.) in 5 mL of dry DMSO under argon atmosphere at room temperature for 30 minutes. Ketone **94** (651 mg, 1.3 mmol, 1 equiv.) was slowly added and the reaction was stirred overnight. The reddish solution was quenched by adding few drops of sat. aq. NH₄Cl solution and the crude product was five to six times extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The product was purified by column chromatography on silica gel using a mixture Cyclohexane-EtOAc (9:1, v/v) to give furan **95** as an orange oil (365.4 mg, yields 56%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.53 – 7.32 (m, 5H), 7.03 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.29 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.41 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 0.89 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 153.3 (C_q), 138.8 (C_q), 136.7 (C_q), 132.5 (C_q), 130.2 (CH_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 127.5 (2 CH_{arom}), 126.7 (C_q), 124.7 (CH_{arom}), 120.8 (CH_{arom}), 119.8 (CH_{arom}), 107.5 (CH_{arom}), 84.3 (CH), 82.1 (CH₂), 70.2 (CH₂), 48.2 (C_q), 37.9 (C_q), 27.9 (3 CH₃), 26.6 (CH₃), 20.2 (CH₃).

LR-MS (ESI +): calcd. for C₂₇H₃₁BrO₃ [M+H₂O]⁺ 482.1 and 484.1 found 500.0 and 502.07.

Synthesis of 5-(4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)-4-(tert-butyl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (96):

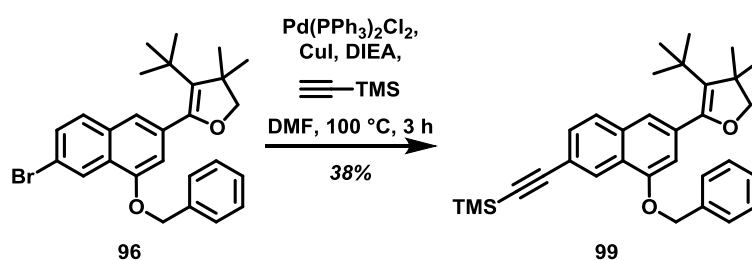
To a solution of of alcohol **95** (365 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.) in 10 mL of dry DCM, pyridine (242.6 μL, 3 mmol, 4 equiv.) and thionyl chloride (875 μL, 12 mmol, 16 equiv.) were successively added at 0 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature 3 h, then sat. aq. NH₄Cl (1 mL) was added at 0 °C. The phases were separated and the organic layer was extracted, washed with brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum to give dihydrofuran as brown oil (318 mg, yields 91%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.44 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.55 – 7.33 (m, 6H), 6.83 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 1.37 (s, 6H), 1.03 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 153.3 (C_q), 149.8 (C_q), 136.7 (CH_{arom}), 134.4 (C_q), 132.5 (C_q), 130.2 (CH_{arom}), 129.5 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 127.7 (2 CH_{arom}), 126.5 (C_q), 126.4 (C_q), 124.8 (CH_{arom}), 121.8 (CH_{arom}), 120.0 (C_q), 108.3 (CH_{arom}), 83.4 (CH_2), 70.5 (CH_2), 47.4 (CH_2), 32.6 (C_q , 3 CH_3), 27.6 (2 CH_3).

LR-MS (ESI +): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{BrO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 464.1 and 466.1 found 465.1 and 467.2

Synthesis of ((8-(benzyloxy)-6-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-2-yl)ethynyl)trimethylsilane (99):



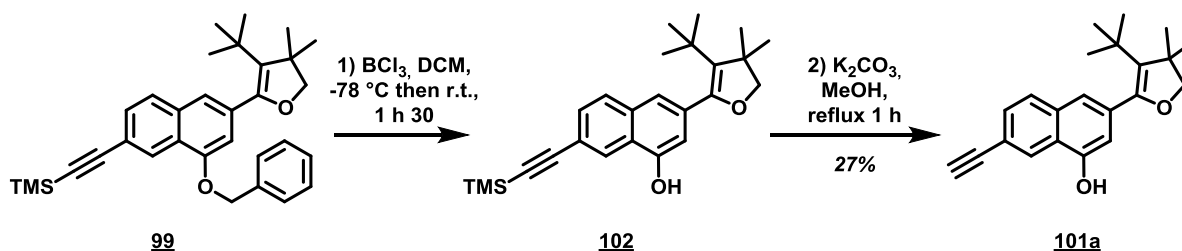
Aryl bromide **96** (620 mg, 1.3 mmol, 1 equiv.), DIEA (2.3 mL, 13 mmol, 10 equiv.), and ethynyltrimethylsilane (900 μL , 6.5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in 14 mL of dry DMF. The mixture was degassed with argon before addition of $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ (91 mg, 0.13 mmol, 0.1 equiv.) then CuI (49 mg, 0.26 mmol, 0.2 equiv.) under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at 100 $^\circ\text{C}$ for 3 h then concentrated under vacuum and directly purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, v/v, 98:2) to give a brown oil (238 mg, yields 38%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.46 (s, 1H), 7.72 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 3H), 7.48 – 7.37 (m, 4H), 6.84 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 3.94 (s, 1H), 1.39 (s, 6H), 1.07 (s, 9H), 0.30 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 153.9 (C_q), 150.0 (C_q), 136.9 (CH_{arom}), 135.6 (C_q), 134.9 (C_q), 134.3 (C_q), 133.5 (C_q), 129.7 (CH_{arom}), 128.8 (2 CH_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 127.8 (3 CH_{arom}), 126.4 (C_q), 126.3 (C_q), 125.0 (CH_{arom}), 121.8 (C_q), 120.2 (C_q), 107.9 (CH_{arom}), 105.9 (C_q), 94.6 (C_q), 83.4 (CH_2), 70.4 (CH_2), 47.4 (C_q), 32.6 (C_q , 3 CH_3), 27.6 (2 CH_2), 0.2 (3 CH_3).

LR-MS (ESI +): calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{Si}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 482.3 found 483.2.

Synthesis of 3-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-7-ethylnaphthalen-1-ol (101a):



TMS-alkyne **99** (200 mg, 0.41 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in freshly distilled DCM (4 ml) and a 1.0 M solution of BCl₃ in hexanes (1.4 ml, 1.4 mmol, 3.4 equiv.) was slowly added at -78°C under argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at -78°C for 1 h 30. Thereafter, 1.0 M aq. NaOH (5ml) was added. After decantation, the organic phase was washed with brine (10 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄ filtrated and concentrated under vacuum. The crude naphthol **102** was directly used in the next step without further purification.

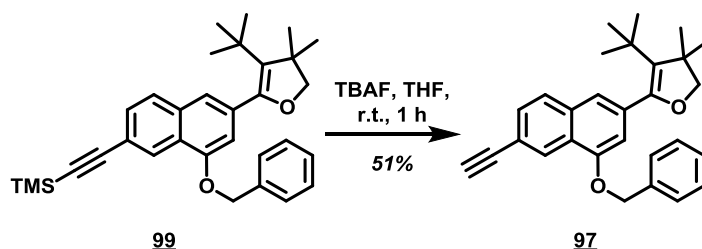
Naphthol **102** was dissolved in MeOH (15 ml) and K₂CO₃ (270 mg, 1.9 mmol, 1.5 equiv.) was added. The resulting reaction mixture was stirred under reflux for 1 h. Thereafter, the reaction medium was concentrated under vacuum and the residue was purified by column chromatography on a silica gel (cyclohexane/EtOAc, 0:100 to 80:20, v,v) to afford the alkyne **101a** as an orange oil (38 mg, overall yield for the two steps 27%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.33 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.5 Hz 1H), 7.37 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.14 (s, 1H), 1.37 (s, 6H), 1.07 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 151.2 (C_q), 149.4 (C_q), 134.8 (C_q), 133.8 (C_q), 134.3 (C_q), 129.4 (CH_{arom}), 128.0 (CH_{arom}), 126.8 (C_q), 126.6 (CH_{arom}), 123.9 (C_q), 121.8 (CH_{arom}), 119.0 (C_q), 111.3 (CH_{arom}), 84.3 (C_q), 83.3 (CH₂), 77.4 (CH), 47.4 (C_q), 32.7 (C_q), 32.6 (3 CH₃), 27.6 (2 CH₂).

LR-MS (ESI -): calcd. for C₂₂H₂₄O₂ [M-H]⁻ 320.2 found 319.4

Synthesis of 5-(4-(benzyloxy)-6-ethynynaphthalen-2-yl)-4-(tert-butyl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (97**):**



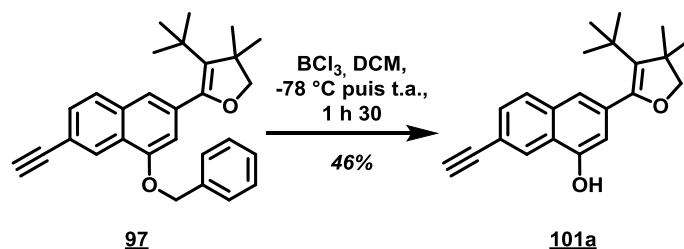
To a solution of the TMS-alkyne (100 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) in dry THF (2 mL), a solution of TBAF in 1M of THF (250 μL, 0.25, 1.2 equiv.) was added. The dark black solution was stirred at room temperature under argon atmosphere and was then stopped by adding 1 mL of brine. The crude product was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The drak brown oil was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 95:5, v/v) to give a yellow oil (44 mg, 51% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.50 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.57-7.37 (m, 5H), 7.37 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.15 (s, 1H), 1.39 (s, 6H), 1.06 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 153.8 (C_q), 149.8 (C_q), 136.7 (CH_{arom}), 135.0 (C_q), 133.6 (C_q), 129.5 (CH_{arom}), 128.7 (2 CH_{arom}), 128.1 (CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 127.6 (CH_{arom}), 126.8 (C_q), 126.3 (C_q), 124.8 (CH_{arom}), 121.8 (CH), 119.0 (C_q), 107.9 (CH_{arom}), 84.3 (C_q), 83.2 (C_q), 79.3 (CH), 70.3 (CH₂), 47.4 (C_q), 32.6 (C_q, 3 CH₃), 27.6 (2 CH₂).

LR-MS (ESI +): calcd. for C₂₉H₃₀O₂ [M+H]⁺ 410.2 found 411.2

Synthesis of 3-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-7-ethynynaphthalen-1-ol (101a):



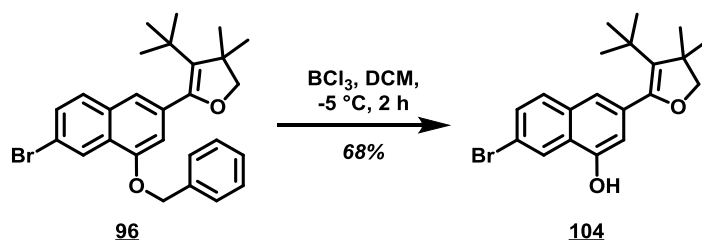
To a solution of alkyne (44 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (1.5 mL), a solution of BCl₃ 1M in cyclohexane (220 μL, 0.22 mmol, 2 equiv.) was slowly added at -78 °C. The mixture was then stirred at 0 °C for 2 hours. The reaction was stopped by adding a solution of NaOH 1M (4 mL) and the crude was extracted by DCM, thrice washed by brine (10 mL) dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The product was obtained by purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 9:1, v/v) as yellow oil (10 mg, 28% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.33 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.5 Hz 1H), 7.37 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.14 (s, 1H), 1.37 (s, 6H), 1.07 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 151.2 (C_q), 149.4 (C_q), 134.8 (C_q), 133.8 (C_q), 134.3 (C_q), 129.4 (CH_{arom}), 128.0 (CH_{arom}), 126.8 (C_q), 126.6 (CH_{arom}), 123.9 (C_q), 121.8 (CH_{arom}), 119.0 (C_q), 111.3 (CH_{arom}), 84.3 (C_q), 83.3 (CH₂), 77.4 (CH), 47.4 (C_q), 32.7 (C_q), 32.6 (3 CH₃), 27.6 (2 CH₂).

LR-MS (ESI -): calcd. for C₂₂H₂₄O₂ [M-H]⁻ 320.2 found 319.4

Synthesis of 7-bromo-3-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-1-ol (104):

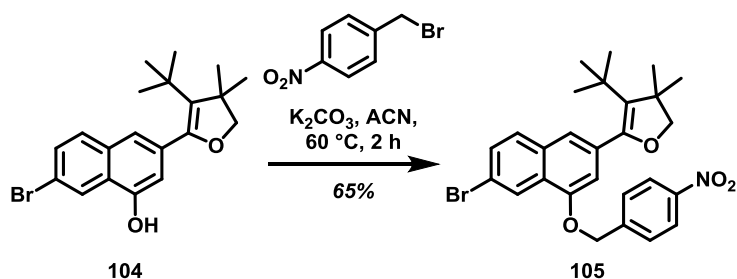


To a solution of naphthalen **96** (150 mg, 0.32 mmol, 1 equiv.) in 3.5 mL of dry DCM, a solution of BCl₃ 1M in cyclohexane (640 μL, 0.64 mmol, 2 equiv.) was slowly added at -5 °C. The mixture was then stirred at 0 °C for 2 hours. The reaction was stopped by adding a solution of NaOH 1M (10 mL) and the crude was extracted by DCM, thrice washed by brine (15 mL) dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The product was obtained by purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 9:1, v/v) as brown oil (81 mg, yields 68%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.30 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 1.39 (s, 6H), 1.07 (s, 9H).

Due to the poor stability of this product, it was not possible to record both ^{13}C NMR and ESI mass spectra.

Synthesis of 5-(6-bromo-4-((4-nitrobenzyl)oxy)naphthalen-2-yl)-4-(tert-butyl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (105):



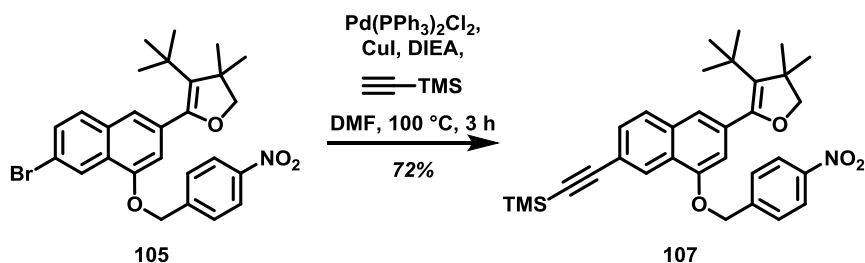
To a solution of naphthol **104** (50 mg, 0.13 mmol, 1 equiv.) in 2 mL of dry ACN, was added K_2CO_3 (36 mg, 0.26 mmol, 2 equiv.) and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, *para*-nitrobenzylbromide (31 mg, 0.14 mmol, 1.1 equiv.) was slowly added and the solution was heated 2 h at 60°C. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was washed thrice with a sat. aq. NH_4Cl solution, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc : 95/5 to 90/10) to give a brown oil (43 mg, yields 65 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.43 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H), 7.59 (m, 2H), 7.39 (s, 1 H), 6.77 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.52 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 1.36 (s, 6H), 1.01 (s, 9H).

LR-MS (ESI +): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{BrNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509.1 and 511.1 found 510.1 and 512.1

Not sufficient amount of this compound was obtained for a well characterization by ^{13}C spectroscopy

Synthesis of ((6-(3-(tert-butyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-8-((4-nitrobenzyl)oxy)naphthalen-2-yl)ethynyl)trimethylsilane (107):



Aryl bromide **96** (43 mg, 0.08 mmol, 1 equiv.), DIEA (139 μL , 0.8 mmol, 10 equiv.), and ethynyltrimethylsilane (55 μL , 0.4 mmol, 5 equiv.) were dissolved in 5 mL of dry DMF. The mixture was degassed with argon before addition of $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ (6 mg, 0.008 mmol, 0.1 equiv.) then CuI (3 mg, 0.016 mmol, 0.2 equiv.) under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at 100 °C for 3 h

then concentrated under vacuum and directly purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc, v/v, 9:1) to give an orange oil (30 mg, yields 38%).

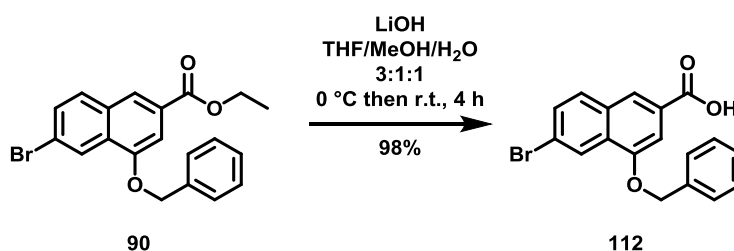
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.75 – 7.65 (m, 3H), 7.54 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 1.35 (s, 6H), 1.01 (s, 9H), 0.28 (s, 9H).

LR-MS (ESI +): calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 527.2 found 528.2

Not sufficient amount of this compound was obtained for a well characterization by ^{13}C spectroscopy.

2.3 Synthesis of naphthol platform from 1,2-dioxetane decomposition

Synthesis of 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoic acid (112):



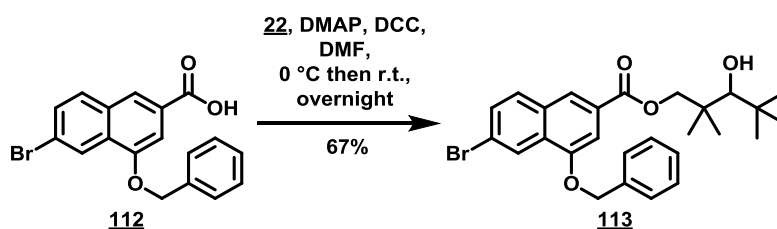
To a solution of ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate **90** (50 mg, 0.13 mmol, 1 equiv.) in 1 mL of a mixture of THF/MeOH/H₂O (3:1:1) was added LiOH (15.6 mg, 0.65 mmol, 5 equiv.). the white suspension was stirred at room temperature overnight. To the then-uncoloured solution, HCl 2M was added at 0°C until pH = 1. The mixture was filtrated to give a white powder (41.51 mg, yields 90%)

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : $\delta = 8.42$ (d, $J = 2$ Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.87 (dd, $J = 2$ Hz et $J = 8$ Hz, 4H), 7.68-7.64 (m, 3H), 7.58-7.53 (m, 2H), 7.50-7.48 (m, 1H), 5.48 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) : $\delta = 203.83$ (C_q), 166.75 (C_q), 136.14 (C_q), 131.29 (C_q), 131.09 (CH_{arom}), 129.99 (CH_{arom}), 128.67(C_q), 128.18 (CH_{arom}), 127.63 (CH_{arom}), 127.56 (C_q), 127.20 (CH_{arom}), 123.24 (CH_{arom}), 122.58 (CH_{arom}), 121.06 (C_q), 105.23 (CH_{arom}), 69.45 (CH_2).

LR-MS (ESI -): calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 356.0 and 358.0 found 355.0 and 357.0

Synthesis of 3-hydroxy-2,2,4,4-tetramethylpentyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate (113):



Chapitre V. Experimental section

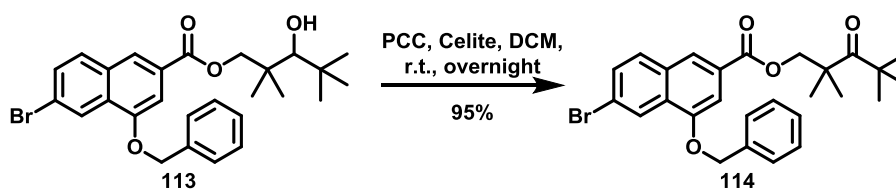
To a solution of 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoic acid **112** (40 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.), DMAP (0.4 mg, 0.0033 mmol, 3 mol%) and diol **22** (35 mg, 0.22 mmol, 2 equiv.) in 110 μL of dry DMF, DCC (25 mg, 0.121 mmol, 1.1 equiv.) was added at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 5 min then at room temperature overnight. The yellow suspension was filtrated and concentrated under vacuum. The crude was dissolved in DCM and washed with HCl 0.5M and sat. aq. NaHCO_3 , then dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane / EtOAc : 7/3, v/v) to give a yellow oil (37 mg, yields 67%)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.49 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.63– 7.35 (m, 7H), 5.30 (s, 2H), 4.51 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.04 (d, J = 8 Hz, 1H), 3.30 (bs, 1H), 1.22(s, 3H), 1.15(s, 3H), 1.08 (s, 9H).

LR-MS (ESI +): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 498.1 and 500.1 found 499.1 and 501.2

Not sufficient amount of this compound was obtained for a well characterization by ^{13}C spectroscopy.

Synthesis of 2,2,4,4-tetramethyl-3-oxopentyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate (**114**):



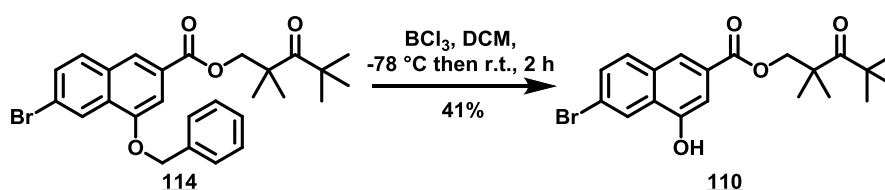
Alcohol **113** (37 mg, 0.07 mmol, 1 equiv.), PCC (30 mg, 0.14 mmol, 2 equiv.) and Celite (30 mg) was dissolved in 500 μL of dry DCM under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature overnight, then filtrated on a Celite pad and concentrated under vacuum. The crude was dissolved in Et_2O and filtrated thrice on a Celite pad, then concentrated under vacuum to give an orange oil (30 mg, yields 86%)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.47 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.7 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 1.8, 8.8 Hz, 1H), 7.54-7.52 (m, 2H), 7.47-7.38 (m, 4 H), 5.27 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 1.41(s, 6H), 1.31(s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 216.04 (C_q), 166.22 (C_q), 153.72 (C_q), 136.27 (C_q), 131.91 (C_q), 130.77 (CH_arom), 130.63 (C_q), 128.78 (2 CH_arom), 128.32 (CH_arom), 127.94 (C_q), 127.72 (2 CH_arom), 124.97 (CH_arom), 123.47 (CH_arom), 122.33 (CH_arom), 105.05 (CH_arom), 72.37 (C_q), 70.49 (CH_2), 49.31 (C_q), 45.96 (C_q), 28.24 (3 CH_3), 23.81 (2 CH_3).

LR-MS (ESI +): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{BrO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 496.1 and 498.1 found 497.1 and 499.1

Synthesis of 2,2,4,4-tetramethyl-3-oxopentyl 6-bromo-4-hydroxy-2-naphthoate (**110**):



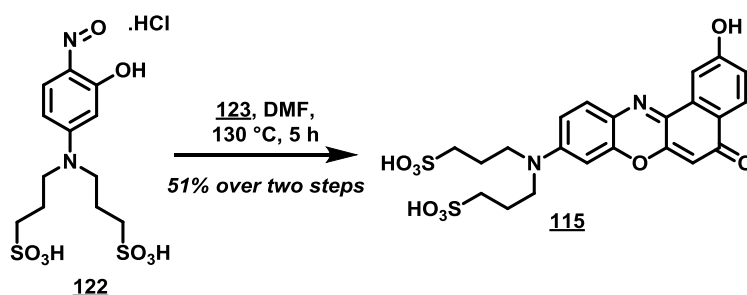
To solution of ketoester (50 mg, 0.10 mmol, 1 equiv.) in 1.4 mL of dry DCM at -78°C was slowly added a solution of BCl₃ 1M in DCM (200 µL, 0.20 mmol, 2 equiv.). The mixture was allowed to cool for 4 h. After completion, 1mL of NaOH 1M was added and the solution was stirred for 1h. The organic layer was then extracted and washed with HCl 2M and brine, dried on Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc : 8/2, v/v) to give an orange oil (16 mg, yields 41%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.41 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 1.9, 8.8 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 5.62 (bs, 1 H), 4.45 (s, 2H), 1.41 (s, 6H), 1.30 (s, 9H).

Not sufficient amount of this compound was obtained for a well characterization either by ¹³C or ESI mass spectroscopy.

3. Synthesis of water-soluble Nile red derivatives

Synthesis of 3,3'-(2-hydroxy-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-9-yl)azanediy]bis(propane-1-sulfonic acid) (115):



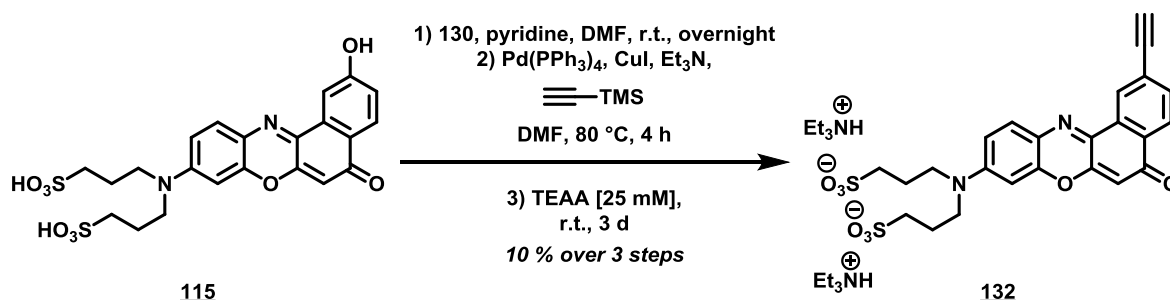
To a solution of 1,5-dihydroxynaphtalene **123** (394 mg, 2.5 mmol, 3 equiv.) in DMF (15 mL), nitroso compound **122** (0.82 mmol, 1 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5 hours. The red solution was concentrated under vacuum and purified by semi preparative RP-HPLC (system D). The product was thrice lyophilized to give the TEA salt which was protonated on Dowex® 50WX8 to give a blue powder (215 mg, 51 % over two steps).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) : δ = 8.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.06 (dd, *J* = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.66 – 3.56 (m, 10H), 2.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.96 – 1.83 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) : δ = 179.52, 160.70, 152.06, 151.57, 146.87, 137.40, 133.82, 131.20, 127.32, 125.80, 122.85, 118.48, 111.89, 107.91, 102.82, 96.47, 49.75, 48.40, 40.36, 40.08, 39.80, 39.52, 39.24, 38.96, 38.68, 23.17.

HPLC (system C): *t_R* = 7.3 min

LR-MS (ESI -): calcd. for C₂₂H₂₂N₂O₉S₂ [M-H]⁻ 522.1 found 521.0

Synthesis of 3,3'-((2-ethynyl-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-9-yl)azanediyl)bis(propane-1-sulfonate) (132**):**

To a solution of BPO **115** (76 mg, 0.14 mmol, 1 equiv.), pyridine (30 μ L, 0.35 mmol, 2.5 equiv.) and phenyltriflimide **130** (125 mg, 0.35 mmol, 2.5 equiv.) were successively added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The volatiles were evaporated and the triflate compound **131** was directly used without further purification in the next step.

BPO **131** (0.14 mmol, 1 equiv.), trimethylsilylacetylene (194 μ L, 1.4 mmol, 10 equiv.), Et₃N (195 μ L, 1.4 mmol, 10 equiv.), CuI (5 mg, 0.028 mmol, 0.2 equiv.) and Pd(Ph₃)₄ (16 mg, 0.014 mmol, 0.1 equiv.) were dissolved in 10 mL of dry DMF. The reaction mixture was degassed with argon for 10 min then stirred at 80 °C for 4 h. This procedure was repeated a second time for the reaction to be completed. The volatiles were removed and the crude product was directly dissolved into TEAA buffer (25 mM, pH 7). The reaction mixture was stirred at room temperature until completion monitored by RP-HPLC (system C). The crude product was purified by semi preparative RP-HPLC (system D). The product was thrice lyophilized to give the TEA salt of benzophénoxazine **132** (10.5 mg, yields 10%)

HPLC (system C): t_R = 20.1 min

Not sufficient amount of this compound was obtained to be well-characterized by ¹H and ¹³C spectroscopy.

Résumé : Depuis plusieurs années, il est devenu plus aisé de détecter et d'étudier les mécanismes biologiques *in cellulo* grâce aux techniques d'imagerie optique que sont la fluorescence, la bioluminescence et la chimiluminescence. Bien que la fluorescence soit la technique la plus employée de nos jours, la bioluminescence et la chimiluminescence, qui sont la conséquence d'une cascade de réactions (bio)chimiques, sont très étudiées depuis quelques décennies. En effet, elles permettent de contourner la source des problèmes rencontrés dans l'utilisation d'un fluorophore : la lumière excitatrice. La chimiluminescence est par conséquent une méthode de choix pour s'affranchir de l'auto-fluorescence tissulaire.

Le 1,2-dioxétane est un des motifs chimiluminescent qui, par décomposition, peut générer un état excité sur un fluorophore auquel il est connecté, autorisant ainsi sa luminescence intrinsèque.

Ainsi, le but de ce projet de thèse a été de développer et d'étudier des nouvelles sondes chémioluminescentes à motif 1,2-dioxétane à cœurs naphtholique et phénolique, compatibles avec le vivant pour une détection ciblée de complexes enzymatiques.

La stratégie envisagée passait par la préparation d'une plateforme chimiluminescente comportant un motif 1,2-dioxétane thermiquement stable, sur laquelle il est possible de faire varier le déclencheur (*i.e.* possibilité d'adapter cette plateforme à l'analyte ou événement que l'on souhaite détecter) et d'accrocher un fluorophore NIR. Deux méthodes ont été tentées : d'une part une greffe d'une version hydrosoluble d'un fluorophore connu (*i.e.* le Nile red) pour réaliser un transfert d'énergie à travers les liaisons (*i.e.* TBET), et d'autre part un couplage à un complexe de lanthanide permettant un transfert d'énergie à travers l'espace (*i.e.* CRET).

Mots clés : 1,2-dioxétane, chimiluminescence, hydrosolubilisation, CRET, TBET, sonde à détection enzymatique

Abstract: Since several years, it is easier to exploit biological phenomena *in cellulo* through technologies dealing with bioimaging. This method gathers fluorescence, bioluminescence and chemiluminescence. Even though fluorescence is the most employed technic, bioluminescence and chemiluminescence, being the consequence of (bio)chemical reaction, have been widely studied for decades. In fact, they can avoid the main problems encountered in fluorophore use: exciting light. Chemiluminescence is thus the appropriate approach to avoid biological autofluorescence.

1,2-dioxetane is one of the moieties that, upon decomposition, can generate an excited state on a connected fluorophore, giving rise to its intrinsic luminescence.

The aim of our project was to develop and study new 1,2-dioxetan chemiluminescent probes based on phenol or naphthol moieties, for targeted enzymatic complexes detection with *in cellulo* and *in vivo* bioimaging.

The strategy relied on the synthesis of chemiluminescent scaffolds comprising thermally stable 1,2-dioxetan, on which the trigger and the connected NIR fluorophore can be easily diversified. Two methods have been attempted: 1) coupling to a water-soluble version of a known fluorophore (*i.e.* Nile red) allowing an energy transfer through bonds (*i.e.* TBET) 2) connection with a lanthanide complex giving rise to an energy transfer through space (*i.e.* CRET).

Keywords: 1,2-dioxétane, chemiluminescence, water-solubilisation, CRET, TBET, enzymatic probe