



HAL
open science

Synthèse in situ de fluorophores organiques : formation de liaisons covalentes par déclenchement enzymatique et applications en biodétection

Sylvain Debieu

► To cite this version:

Sylvain Debieu. Synthèse in situ de fluorophores organiques : formation de liaisons covalentes par déclenchement enzymatique et applications en biodétection. Chimie organique. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCK051 . tel-01842378

HAL Id: tel-01842378

<https://theses.hal.science/tel-01842378v1>

Submitted on 20 Jul 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.



THESE DE DOCTORAT

présentée par

Sylvain DEBIEU

Ingénieur ESCOM

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Mention : Chimie - Spécialité : Chimie Organique

Synthèse *in situ* de fluorophores organiques - Formation de liaisons covalentes par déclenchement enzymatique et applications en biodétection

Volume I : Etat de l'art, résultats et discussions

Soutenance le 18 octobre 2017 devant la commission d'examen :

FERY-FORGUES Suzanne	Directrice de Recherche CNRS (UPS (Toulouse-III))	Rapporteur
HASSERODT Jens	Professeur (ENS Lyon)	Rapporteur
DECREAU Richard	Maître de Conférences (UBFC)	Examineur
ROMIEU Anthony	Professeur (UBFC)	Directeur de thèse

*Thèse préparée au sein de l'équipe "Polyamines, Porphyrines, Développements et Applications" (P2DA)
de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) - UMR 6302*



THESE DE DOCTORAT

présentée par

Sylvain DEBIEU

Ingénieur ESCOM

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Mention : Chimie - Spécialité : Chimie Organique

Synthèse *in situ* de fluorophores organiques - Formation de liaisons covalentes par déclenchement enzymatique et applications en biodétection

Volume I : Etat de l'art, résultats et discussions

Soutenance le 18 octobre 2017 devant la commission d'examen :

FERY-FORGUES Suzanne	Directrice de Recherche CNRS (UPS (Toulouse-III))	Rapporteur
HASSERODT Jens	Professeur (ENS Lyon)	Rapporteur
DECREAU Richard	Maître de Conférences (UBFC)	Examineur
ROMIEU Anthony	Professeur (UBFC)	Directeur de thèse

*Thèse préparée au sein de l'équipe "Polyamines, Porphyrines, Développements et Applications" (P2DA)
de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) - UMR 6302*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse : le professeur Anthony Romieu (ou Tony). Au cours de ces trois ans, ce fut un véritable plaisir d'évoluer à tes côtés tant par ton professionnalisme que par ta disponibilité. Ta culture de la chimie m'a permis d'apprendre énormément sur la synthèse des fluorophores et sur les techniques de purification. Je ne te remercierai jamais assez pour avoir rendu ce manuscrit lisible par le commun des mortels ainsi que de la patience dont tu as fait preuve tout au long de l'écriture de celui-ci.

Je tiens également à remercier le professeur Franck Denat et le professeur Claude Gros pour m'avoir accueilli au sein de l'ICMUB et de l'équipe P2DA.

Je souhaiterais adresser mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger et d'évaluer mon travail.

J'aimerais également remercier le laboratoire COBRA et notamment les docteurs Benoît Roubinet et Arnaud Chevalier pour le don de molécules synthétisées "in house". Et à l'ICMUB, le docteur Adrien Normand pour la synthèse du réactif de Schwartz, Ludovic Palladino pour la synthèse des divers acides aminés protégés, le docteur Victor Goncalves pour son expertise en synthèse peptidique et la possibilité d'utiliser son synthétiseur, ainsi que le docteur David Monchaud pour nous avoir dépannés, en nous prêtant son spectromètre d'absorption UV-vis et son spectrofluorimètre.

Mes remerciements vont aussi à nos divers collaborateurs, à commencer par le docteur Jean-Alexandre Richard, pour son accueil chaleureux à Singapour et dans les laboratoires d'A*STAR, pour ses vastes connaissances en synthèse organique et le don de molécules d'intérêt. Je poursuis en remerciant le docteur Valérie Chalansonnet et M. Sylvain Orenge pour avoir réalisé les tests *inbacterio* de certains de nos composés.

Je n'oublie pas non plus toute l'équipe P2DA, permanents, doctorants et post-doc qui ont œuvrés à la réussite de ce projet en fournissant un cadre des plus agréables pour pouvoir travailler sans jamais manquer de rien et de venir travailler (quasiment) tous les matins avec plaisir.

J'aimerais remercier quelques amis, Johnny, Romain, Vincent, Johan, Julien, Clément, Morgan, Thomas pour les soirées et leurs conseils plus ou moins éclairés mais toujours pleins de douceur.

Bien sûr, je remercie ma mère pour l'amour inconditionnel qu'elle me porte et qui va de pair avec une inquiétude permanente concernant ma santé. Je remercie également mon père pour sa tranquillité d'esprit et un sens de l'humour toujours très fin. Ils m'ont toujours soutenu et le cadeau qu'il m'ont fait en me donnant la vie dépasse de loin tous les remerciements possibles.

J'aimerai aussi avoir une pensée pour mon frère Vincent et ma belle-sœur Djanan, je vous transmets tout mon amour et mon soutien dans ces épreuves que la vie vous envoie.

Abréviations, acronymes et anglicismes

En plus des abréviations et des acronymes listés et explicités ci-dessous, un certain nombre d'anglicismes ont été volontairement conservés et utilisés tout au long de ce manuscrit afin de ne pas dénaturer la signification originale de ces termes. La plupart sont difficiles à traduire en français et ils sont écrits entre guillemets.

Réactifs, solvants, biomolécules, enzymes et méthodes d'analyse

Abs	absorption
Ac	acétyle
Ac ₂ O	anhydride acétique
ADN	acide désoxyribonucléique
AcOH	acide acétique glacial
AIE	émission induite par agrégation
AM	acétoxyméthyle
ANSM	agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
aq.	aqueux
Ar	argon
ARN	acide ribonucléique
Asp ou D	acide aspartique
β -Gal	β -galactosidase
BPO	benzophénoxazine
BOP	hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthyl amino)phosphonium
BSA	albumine de sérum bovin
Bu ₃ N	tributylamine
BZT	2-benzothiazolyle
CAN	nitrate de cérium et d'ammonium
CAS	chemical abstract service
CBT-AT	2-cyanobenzothiazole-1,2-aminothiol
CD ₃ OD	méthanol deutéré
CET	transfert d'énergie par chimiluminescence
CHCl ₃ (CDCl ₃)	chloroforme (deutééré)
cmpd	composé
CuAAC	cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre(I)
Cy	cyanine
18-C-6	éther 18-couronne-6
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM	dichlorométhane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DHX	dihydroxanthène
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine

DIBAL-H	hydrure de diisobutylaluminium
DMA	<i>N,N</i> -diméthylaniline
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO (DMSO- <i>d</i> ₆)	diméthylsulfoxyde (deutéié)
DNBS	2,4-dinitrobenzènesulfonyle
EDCI	chlorhydrate de <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthyl carbodiimide
equiv.	équivalent molaire
Et	éthyle
Et ₂ O	éther diéthylique
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
ESI	ionisation électrospray
ESIPT	transfert de proton intramoléculeire à l'état excité
Em	émission
Ex	excitation
FA	acide formique
FDA	"food and drug administration"
FMN	flavine mononucléotide ou riboflavine-5'-phosphate
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster
GFP	protéine fluorescente verte
GGT	γ -glutamyltranspeptidase
Glu ou E	acide glutamique
GSH	glutathion
H ₂	dihydrogène
Hb	hémoglobine
HMPA	hexaméthylphosphoramide
(RP-)HPLC	chromatographie liquide haute performance (en phase inverse)
HPQ	2-(2-hydroxyphényl)quinazolin-4(3 <i>H</i>)-one
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOMO	orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée
HRMS	spectrométrie de masse haute résolution
IBX	acide 2-iodoxybenzoïque
ICG	vert d'indocyanine
(T)ICT	transfert de charge intramoléculeire ("twisté" ou de torsion)
IEDDA	réaction de Diels-Alder à demande inverse
Ile	isoleucine
IRM	imagerie par résonance magnétique
(N)IR	(proche) infrarouge
LAP	leucine aminopeptidase
LUMO	orbitale moléculaire la plus basse en énergie non occupée
MAO	monoamine oxydase
MB	bleu de méthylène
<i>m</i> -CPBA	acide <i>meta</i> -chloroperbenzoïque
Me	méthyle
MeCN ou CH ₃ CN	acétonitrile
MeOH	méthanol
MeONa	méthylate de sodium

LRMS	spectrométrie de masse (basse résolution)
(DiF)MUP	phosphate de 6,8-difluoro-4-méthylumbelliféryle
N ₂	diazote
NAD(P)H	forme réduite du nicotinamide adénine nucléotide (phosphate)
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NTR	nitroréductase
OTR	"oligonucleotide-templated reaction"
PABA	alcool de <i>para</i> -aminobenzyle
PB	tampon phosphate
PBS	tampon phosphate salin
Pd / C	palladium sur charbon
PDT	thérapie photo-dynamique
PDPA	polymère de méthacrylate de 2-(diisopropylamino)éthyle
PE	éther de pétrole
PeT	transfert d'électron photo-induit
PGA	"penicillin G acylase" ou "penicillin amidase"
PhAc(Cl)	(chlorure de) phényalcétyle
pH	potentiel hydrogène
PHBA	alcool <i>para</i> -hydroxybenzylique
Pic	acide picolinique
PLE	estérase de foie de cochon
PMPC	polymère de "2-methacryloyloxyethyle phosphorylcholine"
PMT	tubes photo-multiplieurs
R&D	recherche et développement
RMC	réaction multicomposants
RMN / NMR	résonance magnétique nucléaire
RNS	espèce réactive de l'azote
ROS	espèce réactive de l'oxygène
sat.	saturé
SPAAC	"strain-promoted alkyne-azide cycloaddition"
TEMP / SPECT	tomographie par émission monophotonique
Tf ₂ O	Anhydride triflique
SNARF	"seminaphthorhodafluors"
S _N Ar	réaction de substitution nucléophile aromatique
S _N 2	réaction de substitution nucléophile bimoléculaire
S _N 2t	réaction de substitution nucléophile bimoléculaire, passage par un intermédiaire de type tétrahédrique
STS	sulfatases stéroïdiennes
T.A. / RT	température ambiante
TAMRA / TMR	tétraméthylrhodamine
TBAB	bromure de tétrabutylammonium
TBET	transfert d'énergie à travers les liaisons
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TCF	tricyanofurane
TEA	triéthylamine
TEMPO	(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy ou oxy
TEP / PET	tomographie par émission de positons
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane

Thr	thréonine
TIPS	triisopropylsilane
TMDHS	2,7- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-9-diméthyl-10-hydro-9-silaanthracène
TNT	trinitrotoluène
UV(-vis)	ultraviolet(-visible)
Val ou V	valine
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Grandeurs physico-chimiques et unités

ε	coefficient d'extinction molaire exprimé en $M^{-1}.cm^{-1}$
τ	durée de vie de l'état excité
λ	longueur d'onde
ν	nombre d'onde en cm^{-1}
B	Brillance, exprimée en $M^{-1}.cm^{-1}$
g	gramme
M	molarité exprimée en moles par litre
mM	10^{-3} M
min	minute
mmol	10^{-3} mole
m/z	rapport masse/charge
μm	micromètre
nm	nanomètre
ppm	partie par million
QY	rendement quantique
sec	seconde
Z	numéro atomique

Définition des principaux termes et anglicismes inhérents à la thématique de recherche étudiée

"covalent assembly principle" ou "covalent assembly dye" : approche de détection fluorogénique pour laquelle l'analyte à détecter induit la synthèse (chimie covalente) *in situ* du fluorophore à l'origine de sa détection.

"oligonucleotide-templated reaction" : réaction entre deux oligonucléotides portant chacun une fonction chimique complémentaire de l'autre, favorisée par l'appariement à une séquence d'acide nucléique complémentaire et donc par la proximité des deux fonctions chimiques. Cette approche est surtout utilisée à des fins de détection.

"quenching reactive unit" : motif moléculaire d'une sonde fluorescente intelligente qui est généralement efficace pour éteindre la fluorescence jusqu'à qu'il soit éliminé ou transformé par réaction avec l'analyte que l'on souhaite détecter. Il contient généralement un (ou plusieurs) site(s) réactionnel(s) qui constitue ce que l'on nomme site de déclenchement ou "trigger".

"reaction-based fluorescent probe" : sonde fluorescente intelligente dont l'activation repose sur une (ou plusieurs) réaction(s) organique(s) avec l'analyte que l'on souhaite détecter ou sur une réaction domino induite par cet analyte.

"trigger" : amorce subissant un changement dans sa structure moléculaire et enclenchant de manière causale le mécanisme d'effondrement qui aboutira à la réponse souhaitée.

Préambule

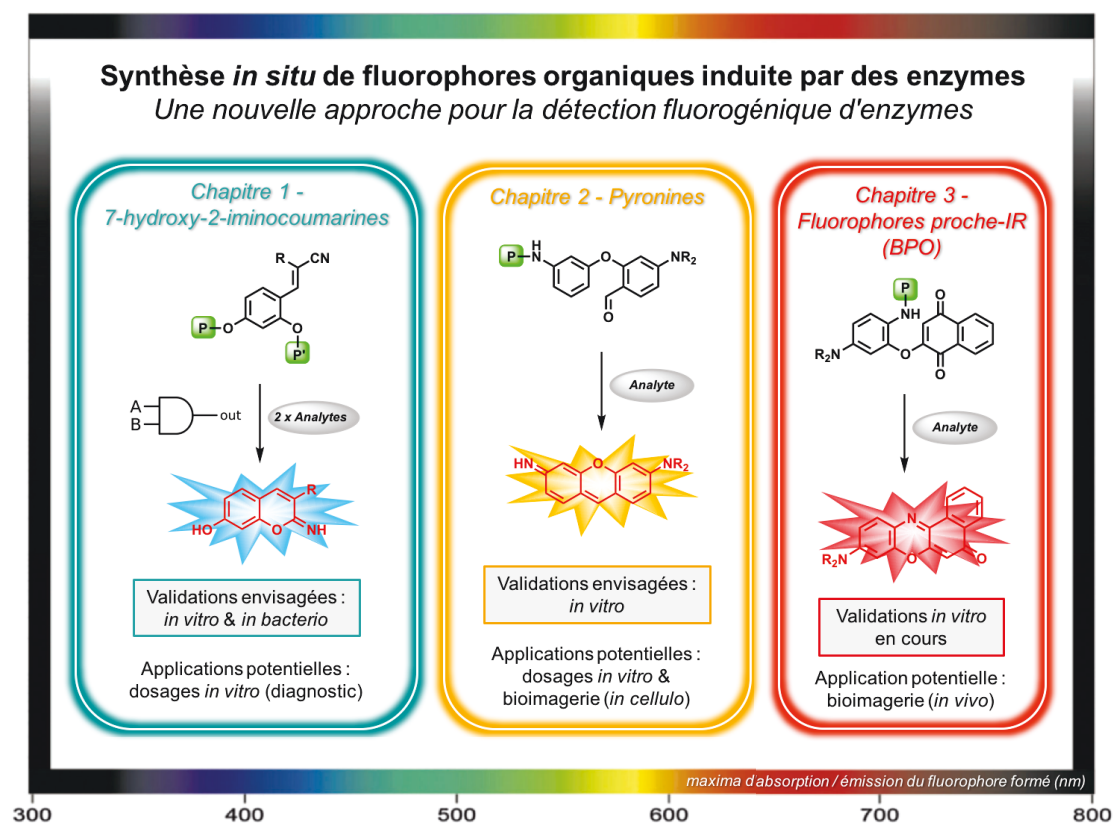
Ces travaux de thèse ont été effectués entre le 10 novembre 2014 et le 9 novembre 2017 au sein de l'équipe "Polyamines, Porphyrines, Développements et Applications (P2DA)" (ICMUB, UMR CNRS 6302, Université de Bourgogne Franche-Comté, Bât. Mirande situé sur le campus de l'Université de Dijon, <http://www.icmub.fr/>) dirigée par le Prof. Claude Gros. Cette thèse a été encadrée par le Prof. Anthony Romieu.

Tous les travaux expérimentaux rapportés dans ce manuscrit sont issus de mon travail personnel sauf mention explicite du contraire. Ainsi, la validation biologique de quelques molécules synthétisées et présentées dans ce mémoire, notamment les expériences sur cultures bactériennes, a été effectuée au sein du département R&D Microbiologie de la société bioMérieux localisé à la Balme-les-Grottes (Isère) et dans l'équipe de Monsieur Sylvain Orega. Les travaux portant sur la synthèse des fluorophores proche-IR (et des sondes fluorogéniques apparentées) de la famille des hybrides dihydroxanthène-hémicyanine (chapitre III) ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Jean-Alexandre Richard, actuellement en poste à l'"Institute of Chemical & Engineering Sciences (ICES)" ("Agency for Science, Technology & Research (A*STAR), Singapour, <https://www.a-star.edu.sg/ices/>). Ces travaux ont été en partie financés par un Partenariat Hubert-Curien Merlion intitulé "Toward better cancer diagnostics : Development of near-infrared emitting probes for *in vivo* imaging of tumor hypoxia" (référence projet : 5.04.15) et d'une durée de deux ans (2016-2017). Ceci s'est, notamment, matérialisé par un séjour d'une quinzaine de jours dans le laboratoire du Dr. Jean-Alexandre Richard en juin 2016. Les caractérisations analytiques (RMN, IR, HPLC, UV-vis, fluorescence et spectrométrie de masse (haute ou basse résolution)) des molécules synthétisées ont été effectuées par moi-même mais aussi par des personnels de PACSMUB ("Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne", <http://wpcm.fr/index.php?page=presentation-generale>). L'ensemble des résultats expérimentaux sont reportés dans les cahiers de laboratoire X003922, X003995 et C75637. Ces travaux ont été financés par des fonds de la région Bourgogne Franche-Comté dans le cadre du dispositif FABER ("Favoriser l'Accueil en Bourgogne d'Equipes de Recherche") et l'Institut Universitaire de France (IUF) dont le Prof. Anthony Romieu est membre junior depuis octobre 2013, et ce pour une durée de cinq ans. Par ailleurs, il est également important de souligner l'aide matérielle (dons de nombreux réactifs et de produits synthétisés "in house") apportée par l'ancien laboratoire du Prof. Anthony Romieu (équipe de Chimie Bio-Organique du laboratoire COBRA, UMR CNRS 6014, Université & INSA de Rouen, Bât. IRCOF situé sur le campus de Mont-Saint-Aignan de l'Université de Rouen, <http://www.lab-cobra.fr/>) dans la réalisation de ces travaux.

Ce travail s'est inscrit dans une thématique émergente qui concerne la synthèse *in situ* de fluorophores organiques pour des applications en biodétection. Plus précisément, il a concerné le développement d'outils chimiques permettant de valider ce concept *via* une activation enzymatique modèle. Différents types de précurseurs "cagés" (sondes fluorogéniques) ont été envisagés dans le but de former, *via* des processus domino plus ou moins complexes et biocompatibles, divers fluorophores couvrant des gammes spectrales complémentaires.

Ce mémoire de doctorat est rédigé sous forme de thèse sur publications pour une grande partie des résultats obtenus. Par ailleurs, il se compose de deux volumes dont le second est réservé aux seules parties expérimentales (principalement les fichiers "Supporting Information" des trois publications présentées dans le premier

volume). Le premier tome, constitué d'une introduction bibliographique et de trois chapitres de résultats, portera sur l'élaboration de sondes fluorogéniques dont l'activation (enzymatique) libère un fluorophore appartenant soit à la famille des coumarines, des xanthènes ou des oxazines (voir résumé graphique ci-dessous). Chacune des familles explorées fera l'objet d'un état de l'art dans leur chapitre respectif. Ainsi, le chapitre I se concentrera sur la formation d'un fluorophore de type 7-hydroxy-(2-imino)coumarine. Ce concept a déjà été développé pour une approche de détection "mono-analyte", et cela constituait un point de départ intéressant pour élaborer une preuve de concept portant sur une détection "multi-analytes" mettant en jeu un seul outil chimique présentant deux positions distinctes de déclenchement. Les chapitres II et III développeront les premiers pas effectués vers des systèmes libérant des fluorophores aux propriétés spectrales plus compatibles avec des utilisations *in cellulo* et *in vitro*. Le type de fluorophore libéré dans ces deux chapitres appartiennent à la catégorie des pyronines (dont le concept pourrait à l'avenir s'étendre à d'autres dérivés xanthènes) et à celle des benzophénoxazines. Un point sera également effectué sur les hybrides dihydroxanthène-hémicyanine (DHX-hémicyanine), une famille émergente de fluorophores proche-IR, dont la synthèse *in situ* pourrait s'avérer extrêmement utile dans le cadre d'une détection *in vivo*.



Les différents systèmes fluorogéniques, classés suivant les maxima d'absorption / émission du fluorophore formé *in situ*, mis au point au cours de ces travaux de thèse.

Une feuille annexe, représentant les molécules synthétisées et évoquées dans ce manuscrit, est disponible pour les chapitres I à III afin de faciliter la lecture du document. Par ailleurs, ce manuscrit vise également à fournir des pistes et des solutions pouvant être envisagées pour la conception d'outils chimiques de détection fluorogénique toujours plus performants. Ainsi, nous espérons qu'ils pourront servir aux actuels et futurs membres de notre équipe ainsi qu'aux nombreux chercheurs (des secteurs académique et privé) travaillant dans les domaines de la(bio)détection et de l'imagerie moléculaire par modalité optique.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

0.1. Fluorescence	21
0.1.1. Principe de la fluorescence et paramètres pouvant l'influencer.....	23
0.1.2. Fluorophores organiques, sondes fluorescentes et bioimagerie.....	26
0.1.3. Modulation de la fluorescence et sondes pro-fluorescentes.....	33
0.2. "Logic gates" moléculaires fluorescents	45
0.2.1. Généralités.....	45
0.2.2. Sondes fluorogéniques multi-déclenchables.....	49
0.3. Concepts et outils chimiques pour la conception de sondes fluorogéniques fonctionnelles en milieu physiologique	54
0.3.1. Réactions bioorthogonales et chimie in situ.....	54
0.3.2. Synthèse in situ photo-induite.....	58
0.3.3. Chimie des bras espaceurs auto-immolables.....	60
0.3.4. Optimisation de la solubilité des fluorophores et des sondes fluorescentes en milieu physiologique.....	64

CHAPITRE I - DETECTION DE DEUX ENZYMES BASEE SUR LA FORMATION DU CŒUR 7-HYDROXY-2-IMINOCOUMARINE

I.1. Etat de l'art	69
I.1.1. Généralités et propriétés photophysiques des 7-hydroxy & 7-N,N-dialkylaminocoumarines.....	69
I.1.2. Libération de la position 7 : Effet "Push-Pull".....	77
I.1.3. Réaction de Pinner ou lactonisation : élément clé pour la réaction domino formant le cœur coumarine.....	80
I.1.4. Enzymes détectées / Substrats et intérêt en biologie.....	83
I.2. Sondes "dual" pour une détection multi-enzymatique	91
I.2.1. Travaux préliminaires : Sonde "mono-analyte" pour la détection d'une activité NTR.....	91
I.2.2. Article 1 : Dual enzyme-responsive "turn-on" fluorescence sensing systems based on in situ formation of 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds.....	92
I.2.3. Points de discussion de l'article 1.....	107
I.2.4. Sonde pour la détection "dual" des activités β -Gal et NTR dans les bactéries.....	108

I.3. Difficultés rencontrées et améliorations possibles des sondes "dual" de première génération **115**

I.3.1. Difficultés synthétiques.....	115
I.3.2. Pistes possibles pour améliorer la stabilité, la solubilité et les propriétés spectrales.....	116

I.4. Perspectives issues des travaux sur les précurseurs cinnamonnitriles **118**

CHAPITRE II - DETECTION DE PEPTIDASES ET DE NITROREDUCTASES BASEE SUR LA FORMATION D'UNE PYRONINE

II.1. Etat de l'art **123**

II.1.1. Xanthènes : historique et propriétés spectrales.....	123
II.1.2. Sondes fluorogéniques à cœur xanthène et méthodes conventionnelles de déclenchement.....	137
II.1.3. Formation <i>in situ</i> du cœur pyronine.....	142

II.2. Détection d'une activité enzymatique basée sur la formation d'une pyronine **145**

II.2.1. Article 2 : <i>In situ formation of pyronin dyes for fluorescence protease sensing</i>	145
II.2.2. Travaux complémentaires - Détection d'une activité nitroréductase.....	156

II.3. Vers des sondes "dual-analytes" : premiers essais et problèmes rencontrés **159**

II.3.1. Stratégie N-acylhémiacétal.....	159
II.3.2. Stratégie inspirée des bras espaceurs auto-immolables de type PABA ("PABA-like").....	163
II.3.3. Piste pour une autre voie de synthèse des sondes à cœur éther de biaryle.....	166
II.3.4. Conclusion sur les stratégies mises en œuvre pour la synthèse <i>in situ</i> du cœur pyronine.....	167
II.3.5. Complément d'information sur les problèmes de synthèse rencontrés.....	168
II.3.6. Complément d'information sur les problèmes de déclenchement des sondes.....	174

II.4. Perspectives immédiates **175**

II.4.1. Application du concept de formation <i>in situ</i> de pyronines à l'imagerie de fluorescence <i>in vivo</i>	175
II.4.2. Formation <i>in situ</i> de silicium- / sulfone-pyronines pour atteindre des caractéristiques spectrales dans le rouge lointain et le proche-IR.....	178
II.4.3. "Screening" d'additifs pour améliorer les cinétiques de cyclisation en pyronine.....	179

II.4.4. "Screening" d'oxydants utilisables pour la synthèse ou l'activation fluorogénique des sondes.....	181
---	-----

II.5. Perspectives plus lointaines sur la base des précurseurs de type éther de diaryle	183
--	------------

CHAPITRE III - HYBRIDES DHX-HEMICYANINE HYDROSOLUBLES ET BENZOPHENOXAZINES

III.1. Benzophénoxazines	187
---------------------------------	------------

III.1.1. Bibliographie.....	187
III.1.2. Précurseurs "cagés" envisagés et synthèses préliminaires.....	197

III.2. Hybrides DHX-hémicyanine	202
--	------------

III.2.1. Bibliographie.....	202
III.2.2. Article 3 : Synthesis of N,N-Dialkylamino-nor-Dihydroxanthene-Hemicyanine Fused Near-Infrared Fluorophores and Their First Water-Soluble and/or Bioconjugatable Analogues.....	207
III.2.3. Formation in situ de fluorophores proche-IR de type cyanine (Cy5 / Cy7) ou hybrides DHX-hémicyanines.....	219

CONCLUSION

Introduction générale

Introduction générale

Si le monde nous apparaît tel qu'il est, avec cette infinité de couleurs, c'est l'interaction de la lumière avec la matière qui en est à l'origine. Cette interaction puissante nourrit la curiosité de l'humanité, à juste titre, car elle est à la fois source de vie (par l'intermédiaire de la photosynthèse et du cycle nyctéméral par exemple), et pilier de la plupart des théories de la physique (spectre électromagnétique, relativité générale, vitesse de la lumière ou plus récemment la détection des ondes gravitationnelles). Notre vision nous a permis de sonder l'univers par l'intermédiaire du télescope mais aussi de mieux comprendre la vie et l'infiniment petit au moyen de microscopes. Nous comprenons alors qu'en maîtrisant les interactions entre lumière et matière, l'humanité peut rendre visible des phénomènes invisibles auparavant et peut, grâce à son ingéniosité, s'entourer d'objets la rendant sensible à ce qu'elle ne peut percevoir de manière "naturelle". Ainsi, il est possible de mieux comprendre, d'analyser et d'adopter des théories non intuitives qui peuvent renforcer ou démonter les théories précédentes et ainsi bâtir la Science.

Aujourd'hui, l'utilisation de la lumière en médecine est largement répandue aussi bien en diagnostic qu'en thérapie¹ et elle est appelée à s'épanouir à travers de multiples applications émergentes. Une de celles-ci est la recherche fondamentale en biologie qui a un besoin continu de nouveaux outils (notamment chimiques) pour explorer le vivant au niveau moléculaire et pour mieux comprendre les mécanismes qui le régissent. C'est dans ce contexte d'applications biologiques que s'inscrit cette thèse de chimie organique portant sur l'élaboration de sondes fluorescentes intelligentes originales (on parle aussi souvent de sondes fluorescentes activables ou de "smart fluorescent probes" en anglais) permettant la détection d'analytes d'intérêt.

0.1. Fluorescence²

Parmi les interactions lumière / matière, celle qui va nous intéresser dans ce manuscrit est la fluorescence. Elle fait partie des phénomènes dits de luminescence qui se définissent comme étant l'émission de lumière (on parle aussi d'émission de photons) par une espèce (atome ou molécule) dans un état électronique excité, qui s'accompagne par un retour à l'état fondamental. En fonction du processus mis en jeu pour provoquer l'excitation de l'atome ou de la molécule, on distingue différents types de luminescence qui sont listés dans le tableau ci-dessous.

¹ a) S. H. Yun et S. J. J. Kwok, *Nat. Biomed. Engin.*, **2017**, (1), 0008 ; b) J. R. Albani, Phosphorescence, Fluorescence, and Chemiluminescence and Clinical Chemistry, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, **2006**.

² Quelques livres sur le sujet : a) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3ème édition, **2006** ; b) D. E. Wolf, *Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy, Digital Microscopy*, Academic Press, 3ème édition, **2007** ; c) B. Valeur et M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, 2ème édition, **2012** ; d) D. M. Jameson, *Introduction to Fluorescence*, CRC Press, **2014**.

Types de luminescence	Mode d'excitation	Exemples
Photoluminescence (fluorescence, phosphorescence)	lumière ou UV	colorants fluorescents, azurants optiques
Électroluminescence	champ électrique	LED
Chimiluminescence	réaction chimique	bâtons lumineux
Bioluminescence	réaction enzymatique	vers luisants, lucioles
Cathodoluminescence	électrons accélérés	tube cathodique
Radioluminescence	RX, rayonnements α , β , γ	écran de radioscopie X
Triboluminescence	frottement, rupture, déformation	sucre frotté ou broyé
Sonoluminescence	ultrasons	crevettes claquantes
Thermoluminescence	élévation de température	datation archéologique d'objets

Figure 0.1 - Tableau résumant les différents types de luminescence édité sur le site internet de Futura-Sciences par B. Valeur³.

La première description relatée de la fluorescence fait suite à une observation sur des composés "naturels"⁴. En 1565, N. Monardès, botaniste et médecin espagnol, note une couleur bleue à la surface d'une décoction de morceaux de bois de la famille des Fabacées qui provient de la formation de la matlaline (composé 2 dans la Fig. 0.2) par oxydation de la coatline B en solution⁵ (le mécanisme supposé est également présenté Fig. 0.2).

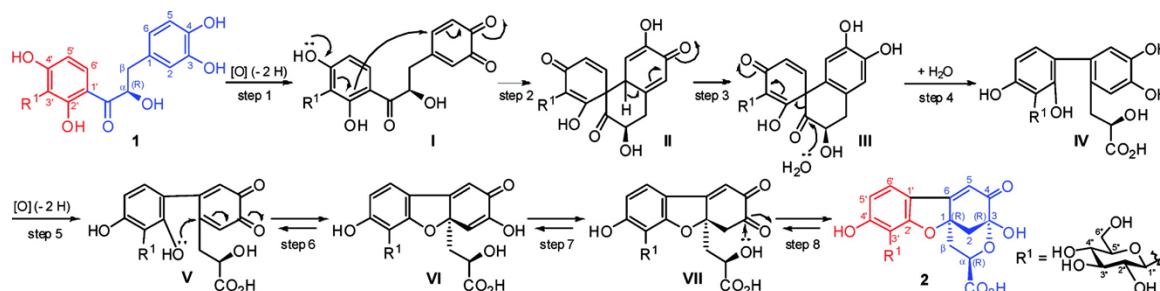


Figure 0.2 - Mécanisme proposé par A. Acuna et ses collaborateurs pour la formation in situ de la matlaline par oxydation de la coatline B dans l'eau, à température ambiante. Illustration issue de la publication [5b].

Ce phénomène lumineux ne sera expliqué que bien plus tard, notamment avec les travaux de G. G. Stokes en 1852⁶ qui lui donnera un nom : la fluorescence. Il faudra attendre l'avènement de la théorie des quanta ("Quantum Theory") de M. Planck pour voir émerger une théorie complète de la fluorescence (photoluminescence) dont les concepts clés seront repris dans les paragraphes suivants. Pour un historique plus complet, les livres cités plus haut² pourront également être consultés.

³ B. Valeur, Les divers types de luminescence, <http://www.futura-sciences.com/sciences/dossiers/physique-luminescence-tous-etats-1498/page/2/> (consulté le 24 juillet 2017).

⁴ Une revue sur les fluorophores "naturels" : M. G. Lagorio, G. B. Cordon et A. Iriel, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, (14), 1538-1559.

⁵ a) A. U. Acuna et F. Amat-Guerri, Early history of solution fluorescence: the Lignum nephriticum of Nicolas Monardes, *Fluorescence of Supermolecules, Polymers, and Nanosystems*, Springer, **2008** ; b) A. U. Acuna, F. Amat-Guerri, P. Morcillo, M. Liras et B. Rodriguez, *Org. Lett.*, **2009**, (11), 3020-3023.

⁶ G. G. Stokes, *Philos. Trans. R. Soc.*, **1852**, (142), 463-562.

0.1.1. Principe de la fluorescence et paramètres pouvant l'influencer

La fluorescence résulte d'un mode d'excitation photonique (le plus souvent par absorption d'un photon ou absorption monophotonique) qui amène une molécule à un état électronique excité (noté S_n)⁷. Il se produit très rapidement une relaxation vibrationnelle qui lui fait perdre une partie de son énergie photonique. La molécule se retrouve alors sur le niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité singulet S_1 . Le retour à son état fondamental (S_0) s'effectue avec une émission de lumière ; on parle de processus radiatif. Celui-ci est en compétition avec deux processus non-radiatifs : la conversion interne et la conversion inter-système (ou croisement inter-système). Cette dernière est une transition entre deux états de spin différents (S_1 et l'état triplet T_1). Une fois peuplé, l'état excité T_1 peut lui aussi se désactiver par un processus radiatif nommé phosphorescence. Contrairement à la fluorescence, il s'agit d'une photoluminescence de longue durée (jusqu'à plusieurs secondes une fois la source d'excitation éteinte) car elle met en jeu une transition interdite entre états de spin différents. L'ensemble des processus photophysiques qui peuvent conduire à la désactivation des états excités d'une molécule sont résumés par le diagramme de Perrin-Jablonski (Fig. 0.3).

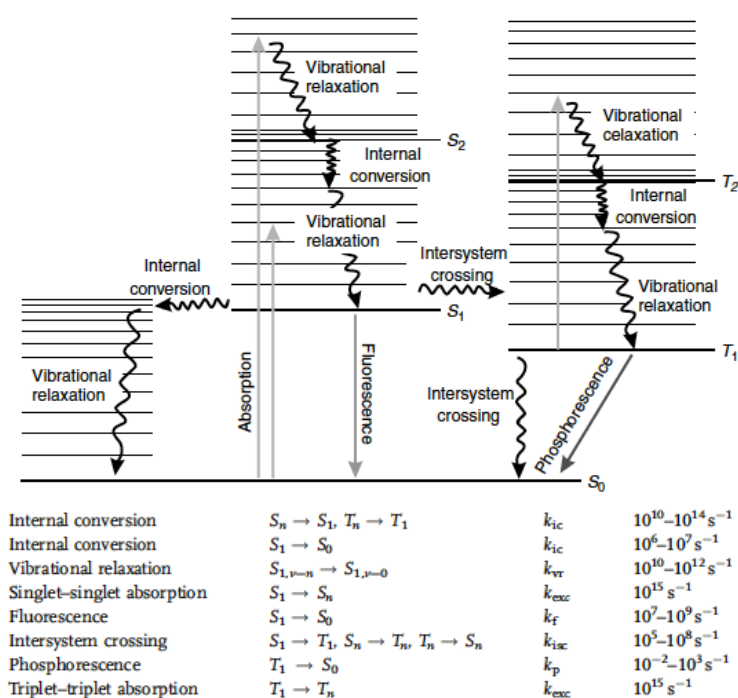


Figure 0.3 - Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié décrivant les états électroniques possibles de molécules après absorption d'un photon ainsi que les transitions radiatives ou non-radiatives impliquées dans la désactivation des états excités. Les constantes de vitesse de ces différents processus sont également données. Illustrations issues du livre de M. Sauers et al.⁸

⁷ Il est important de préciser que sous forte irradiation laser, certaines molécules peuvent aussi absorber deux (ou plusieurs) photons à la fois (absorption multiphotonique). Cependant, cet aspect ne sera pas abordé dans ce manuscrit car notre travail ne concerne pas les sondes fluorescentes pour des applications en microscopie biphotonique.

⁸ M. Sauer, J. Hofkens et J. Enderlein, Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH, 2011. (la figure présente une faute de typos: "vibrational relaxation" et non "celaxation")

Les phénomènes de désexcitation non-radiatifs vont avoir une influence directe sur les propriétés de fluorescence du composé considéré. C'est le cas notamment pour la durée de vie de l'état excité (notée τ) qui s'exprime comme étant l'inverse de la somme des constantes de vitesse de désexcitation radiative et non-radiative et qui permet d'accéder à la fenêtre de temps où l'émission de fluorescence est observable (entre $\tau/100$ et 10τ) après l'excitation (Fig. 0.4).

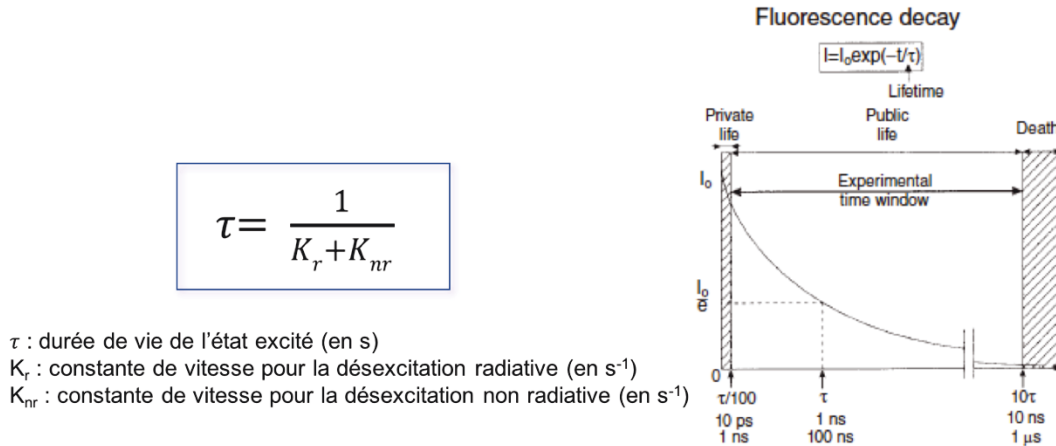


Figure 0.4 - Durée de vie de l'état excité permettant l'observation de la fluorescence ainsi que le déclin de l'intensité de fluorescence qui est directement relié à τ . Illustration issue du livre de B. Valeur et M. N. Berberan-Santos^{2c}.

Comme des relaxations vibrationnelles ont lieu à l'état excité S_1 pour conduire au peuplement du niveau vibrationnel de plus basse énergie, l'énergie du photon émis lors de la transition ($S_1 \rightarrow S_0$), est nécessairement plus faible que celle du photon absorbé lors du processus d'excitation monophotonique. Ceci va se traduire par un déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes du maximum d'émission par rapport à celui d'excitation⁹. Cette différence d'énergie, entre le photon exciteur (et absorbé) et celle du photon émis, est nommée déplacement de Stokes et apparaît comme l'une des grandeurs photophysiques caractérisant une molécule fluorescente (souvent nommée fluorophore) ; son unité est le cm^{-1} mais il est aussi souvent donné en nm (Fig. 0.5). Une autre grandeur photophysique importante est le rendement quantique de fluorescence (QY) qui correspond au rapport entre le nombre de photons émis par le composé excité et le nombre de photons absorbés. Il peut aussi être exprimé en fonction de K_r et K_{nr} et par définition ne peut pas être supérieur à 1. En combinaison avec le coefficient d'extinction molaire ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$) qui traduit la capacité d'une espèce à absorber la lumière (à une longueur d'onde donnée), il permet d'accéder à la brillance B qui donne une idée de l'efficacité d'un fluorophore et permet ainsi de les comparer entre eux.

⁹ Par abus de langage, le terme absorption est souvent employé mais les deux sont identiques uniquement pour les molécules ne présentant qu'une seule espèce émissive en solution et caractérisée par une superposition parfaite des spectres d'absorption et d'excitation.

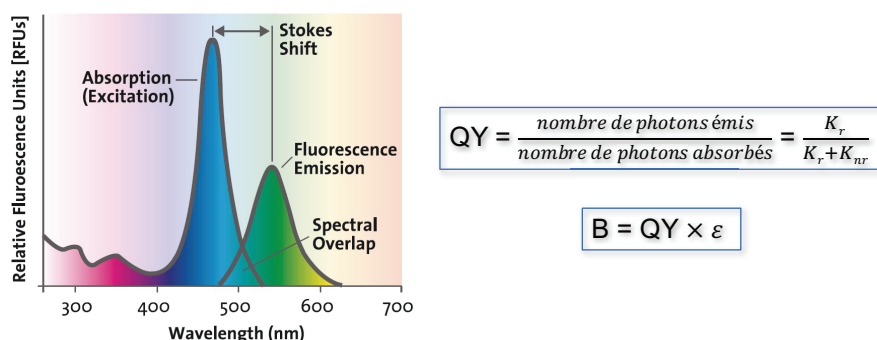


Figure 0.5 - Représentation des spectres d'absorption et d'émission d'un fluorophore¹⁰ et formules mathématiques permettant d'accéder au rendement quantique de fluorescence (QY) et à la brillance B. Illustration disponible sur le site la société Tecan.

Toutes ces caractéristiques sont fortement impactées par l'environnement du fluorophore (pression, température et propriétés physico-chimiques du solvant (pH, polarité, viscosité) Fig. 0.6A) mais également par les interactions entre molécules (formation d'agrégats¹¹ de type H ou J, mécanisme des AIE¹² ou formation d'excimères ou d'exciplexes par exemple¹³). Ainsi, une absence d'émission et un spectre d'absorption décalé vers le bleu (par comparaison avec le spectre d'absorption / excitation de l'espèce émissive monomérique) sont des preuves irréfutables d'agrégats de type H en solution (Fig. 0.6B). Un excimère est un complexe à l'état excité formé entre une molécule à l'état fondamental et une molécule identique à l'état excité. Ce sont souvent des molécules aromatiques (typiquement, le pyrène et ses dérivés) qui forment des excimères et leur présence en solution est confirmée par un déplacement bathochrome et un élargissement de la bande d'émission. Un exciplexe est un complexe à l'état excité entre un donneur d'électrons D et un accepteur d'électrons A ; là encore, leur formation se traduit par un déplacement du spectre d'émission vers les plus grandes longueurs d'onde. En conséquence du caractère à transfert de charge de l'exciplexe, ce spectre est déplacé vers le rouge si la polarité du solvant augmente. Le dernier facteur ayant un profond impact sur la fluorescence est le photoblanchiment qui se définit comme l'extinction irréversible du fluorophore suite à une excitation continue et prolongée. Cette extinction de fluorescence trouve son origine dans les réactions chimiques pouvant avoir lieu à l'état excité entre le fluorophore et certaines molécules du milieu environnant (principalement l'oxygène qui peut réagir directement ou indirectement *via* la production de radicaux libres) pour conduire le plus souvent à des dérivés dont le système d'électrons π conjugués a été altéré¹⁴.

¹⁰ <http://www.tecan.com/blog> (consulté le 9 août 2017).

¹¹ a) M. Kasha, *Radiat. Res.*, **2012**, (178), AV27-AV34. b) Notons que le phénomène de désagrégation a été mis à profit pour la conception de sondes fluorogéniques de type "Off-On", voir : D. Zhai, W. Xu, L. Zhang et Y.-T. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, (43), 2402-2411.

¹² Le phénomène d'émission induite par agrégation ("Aggregation-Induced Emission") ne sera pas développé ici mais les trois revues suivantes peuvent être consultées : a) J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam and B. Z. Tang, *Chem. Rev.*, **2015**, (115), 11718-11940 ; b) Q. Zhao and J. Z. Sun, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, (4), 10588-10609 ; c) Y. Hong, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2016**, (4), 022003.

¹³ Pour des revues sur le sujet : a) S. L. Mattes et S. Farid, *Nature*, **1984**, (226), 917-921 ; b) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher et T. E. Rice, *Chem. Rev.*, **1997**, (97), 1515-1566 ; c) J. Kawakami et S. Ito, *Curr. Top. Anal. Chem.*, **2002**, (3), 135-143.

¹⁴ a) Pour une revue sur le sujet : T. Ha et P. Tinnefeld, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2012**, (63), 595-617. Pour deux revues sur les stratégies mises en oeuvre pour obtenir des fluorophores photostables : b) Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman et S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, (43), 1044-1056 ; c) X. Wu et W. Zhu, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 4179-4184.

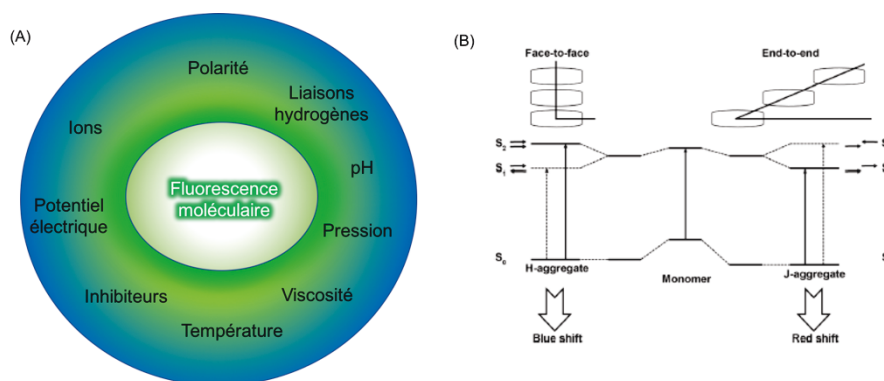


Figure 0.6 - (A) Paramètres influençant la fluorescence. (B) Les deux types d'agrégats et leur effet sur le spectre d'absorption. Illustrations issues des références [2c] et [11b].

Dans les prochains paragraphes, nous allons nous focaliser sur les fluorophores organiques, mais pour avoir une vue d'ensemble des autres types de systèmes fluorescents (protéines fluorescentes, "quantum dots", complexes de lanthanide(III) et nanomatériaux) actuellement disponibles et couramment utilisés en biodétection et bioimagerie, deux revues récentes et très complètes sont disponibles¹⁵.

0.1.2. Fluorophores organiques, sondes fluorescentes et bioimagerie¹⁶

La fluorescence est un phénomène physique dû à la présence d'un ou de plusieurs chromophores (souvent un cœur aromatique polycyclique), éventuellement substitué(s) avec plusieurs groupements auxochromes, au sein d'une molécule¹⁷. On rencontre dans la nature un grand nombre de molécules⁴ qui sont douées de cette propriété et certaines sont couramment utilisées comme sondes ou traceurs en biologie¹⁸. L'exploitation de ce phénomène pour explorer les mécanismes biologiques et biochimiques prend sa source en 1904 avec l'invention de la microscopie de fluorescence et devint incontournable après 1986 et l'apparition de la microscopie confocale à balayage laser (Fig. 0.7), venant ainsi agrandir la palette des applications en biodétection et en bioimagerie de la chimie bioanalytique^{19,20}.

¹⁵ a) M. Ni, S. Zhuo, M. Ni, H. Yu, S. Zhuo, P. T. C. So, H. Yu, P. T. C. So, H. Yu et H. Yu, *J. Biophotonics*, **2017**, (10), 11-23 ; b) I. Martinic, S. V. Eliseeva et S. Petoud, *J. Lumin.*, **2017**, (189), 19-43.

¹⁶ Un cours (formation permanente du CNRS en français) : a) S. C. Brown et C. Poujol, Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie, *Atelier de microscopie confocale*, CNRS, **2013** ; un ouvrage : b) *Fluorescence-Based Biosensors: From Concepts to Applications*, Academic Press, **2013**. et une revue : c) E. A. Specht, E. Braselmann et A. E. Palmer, *Annu. Rev. Physiol.*, **2017**, (79), 93-117 sont disponibles ; d) Pour l'instrumentation, voir : C. A. Combs, *Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods*, *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley & Sons, **2001**.

¹⁷ Pour un ouvrage sur les fluorophores organiques utilisés en industrie et en milieu académique, voir : R. W. Sabnis, *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*, John Wiley & Sons, **2015**.

¹⁸ Pour une revue sur les composés "naturels" fluorescents utilisés comme sondes : R. Duval et C. Duplais, *Nat. Prod. Rep.*, **2017**, (34), 161-193.

¹⁹ Pour différentes ouvrages et revues sur les méthodes en biologie utilisant la fluorescence : a) M. Schäferling, *Fluorescence-Based Biosensors*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 3^{ème} version, **2016** ; b) S. Nagl et O. S. Wolfbeis, *Classification of Chemical Sensors and Biosensors Based on Fluorescence and Phosphorescence, Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I: Techniques*, Springer, **2008** ; c) M. Strianese, M. Staiano, G. Ruggiero, T. Labella, C. Pellecchia et S. D'Auria, *Fluorescence-Based Biosensors, Spectroscopic Methods of Analysis: Methods and Protocols*, ed. W. M. Bujalowski, Humana Press, **2012** ; d) C. Staudinger et S. M. Borisov, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, (3), 042005 ; e) O. Tagit et N. Hildebrandt, *ACS Sens.*, **2017**, (2), 31-45.

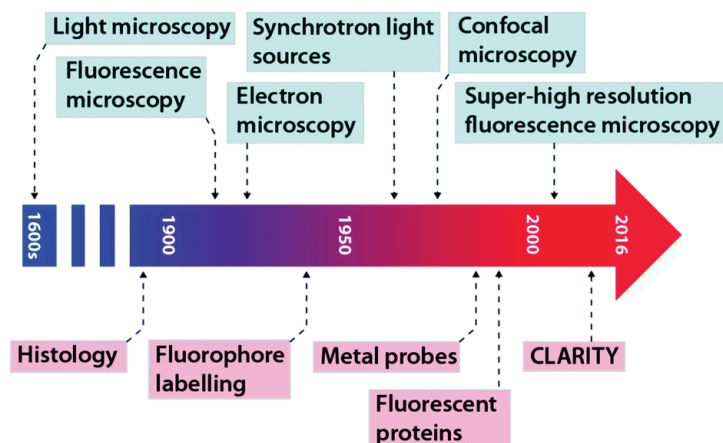


Figure 0.7 - Temporalité des technologies et des applications développées / envisagées dans le contexte de la microscopie de fluorescence. Illustration issue de la référence [20].

Au cours de ces 40 dernières années, de nombreux fluorophores organiques²¹ ont été développés pour la bioimagerie comme l'illustre bien la Fig. 0.8. Concernant les méthodes générales de synthèse des principales classes de fluorophores organiques utilisées dans ce contexte, une revue récente de L. D. Lavis et R. T. Raines les recense²². Elles sont présentées Fig. 0.9. La grande diversité structurale des composés disponibles a ainsi facilité le développement de nombreuses sondes fluorescentes intelligentes dont les mécanismes d'activation sont fondés soit sur des processus de reconnaissance moléculaire réversibles (on parle alors de bio- ou chémosenseurs fluorescents) ou chimiques irréversibles (on parle alors de chémodosimètres fluorescents ou de "reaction-based fluorescent probes")²³.

La chimie combinatoire a aussi été utilisée afin de construire rapidement des bibliothèques de molécules fluorescentes ou pro-fluorescentes²⁴. Celles-ci sont directement évaluées dans des essais biologiques sur cellules vivantes dans le but d'accéder plus facilement à des sondes fluorescentes intelligentes spécifiques d'une cible biologique ou d'un biomarqueur d'une pathologie donnée. Cette approche, nommée "Diversity Oriented Fluorescence Library Approach" (DOFLA), a été utilisée avec succès, principalement par le groupe de Y.-T. Chang²⁵.

²⁰ Pour le rôle et les perspectives de la chimie analytique en biosciences voir D. J. Hare et E. J. New, *Chem. Comm.*, **2016**, (52), 8918-8934.

²¹ Pour des revues : a) L. D. Lavis et R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, (3), 142-155 ; b) "Table 1" de la publication A. Gust, A. Zander, A. Gietl, P. Holzmeister, S. Schulz, B. Lalkens, P. Tinnefeld et D. Grohmann, *Molecules*, **2014**, (19), 15824-15865 ; c) Z. Yang, A. Sharma, J. Qi, X. Peng, D. Y. Lee, R. Hu, D. Lin, J. Qu et J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, (45), 4651-4667.

²² L. D. Lavis et R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, (9), 855-866.

²³ Pour un ouvrage : a) I. D. Johnson, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corp., 11^{ème} édition, **2010** et pour des revues : b) N. Johnsson et K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.*, **2007**, (2), 31-38 ; c) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng et F. Li, *Chem. Rev.*, **2013**, (113), 192-270.

²⁴ a) M. Vendrell, D. Zhai, J. C. Er et Y.-T. Chang, *Chem. Rev.*, **2012**, (112), 4391-4420 ; b) F. de Moliner, N. Kielland, R. Lavilla et M. Vendrell, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, (56), 3758-3769.

²⁵ S.-W. Yun, N.-Y. Kang, S.-J. Park, H.-H. Ha, Y. K. Kim, J.-S. Lee et Y.-T. Chang, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, (47), 1277-1286.

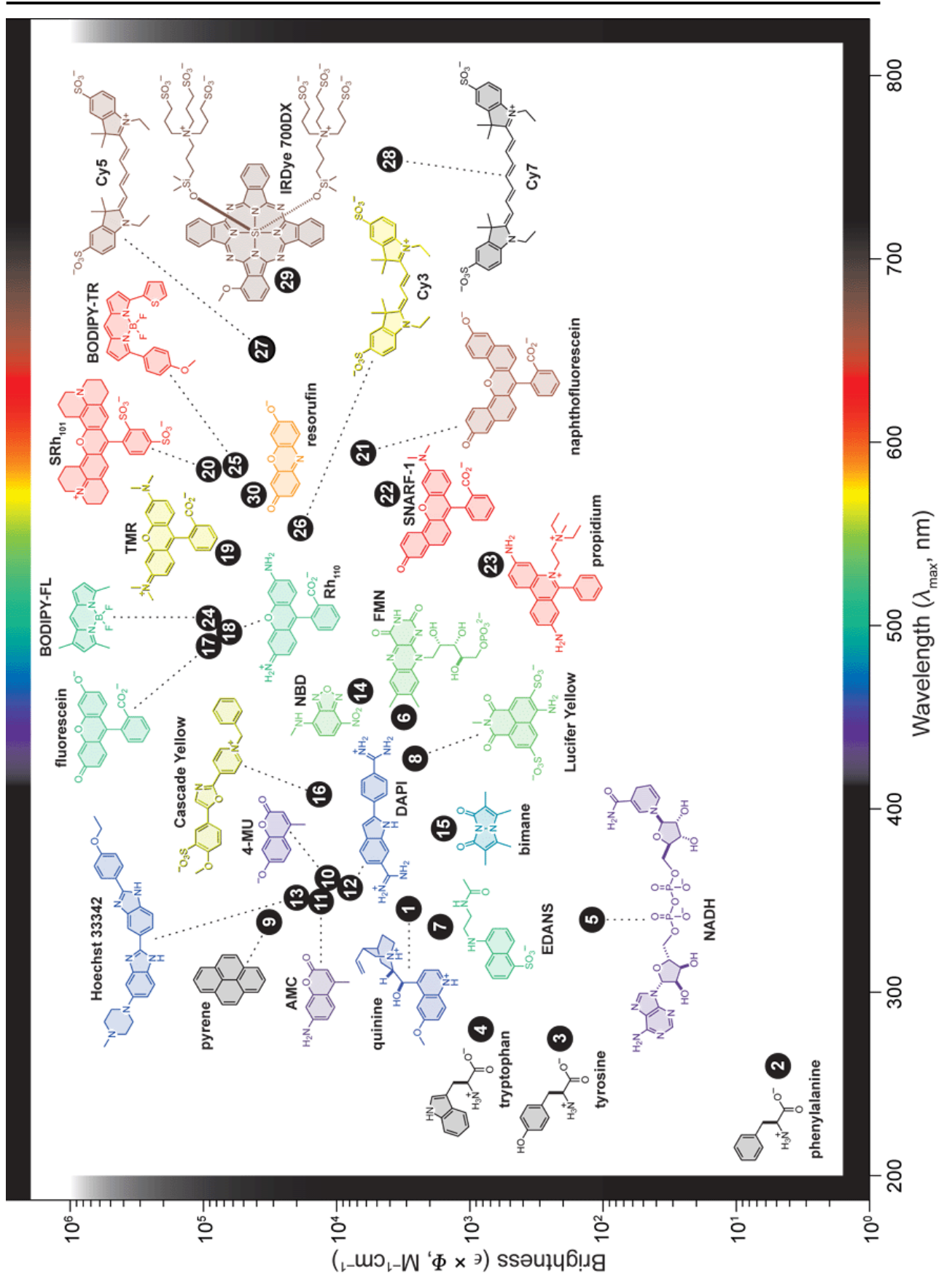


Figure 0.8 - Principaux fluorophores organiques actuellement disponibles et classés en fonction de leur valeur de brillance et de la position de leurs maxima d'absorption. Des informations complémentaires sur les propriétés photophysiques de ces fluorophores sont disponibles dans la partie annexe de ce manuscrit. Illustration issue de la revue [21a].

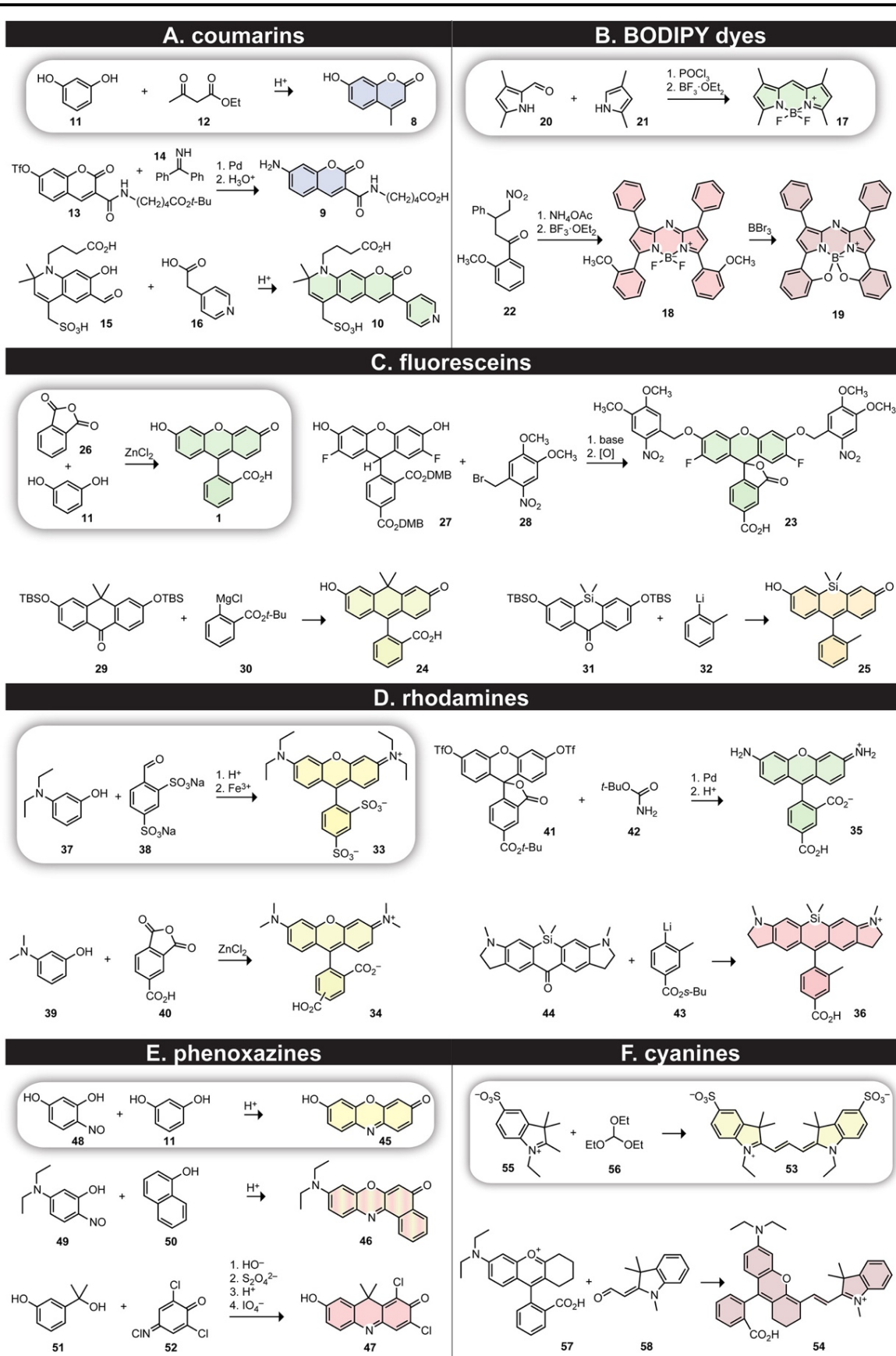


Figure 0.9 - Méthodes de synthèse des principales classes de fluorophores organiques qui peuvent être convertis en sondes fluorescentes intelligentes pour des applications en biodétection / bioimagerie. Illustration issue de la revue [22].

Aujourd'hui, les fluorophores organiques sont des réactifs de choix pour étudier de nombreux phénomènes biologiques et cela dans des contextes très différents : du *in vitro* (prélèvements biologiques) au *in vivo* (petit animal). Les propriétés physico-chimiques particulières de certaines molécules permettent de les utiliser directement dans le marquage fluorescent des cellules ou de certains organites ("staining"²⁶, Fig. 0.10D). Cependant, l'approche la plus utilisée repose sur l'association du fluorophore avec une autre molécule (le plus souvent une biomolécule ou un biopolymère) dans le but de suivre cette dernière et sa possible interaction avec une cible biologique ("biomolécule labelling"²⁷, Fig. 0.10A). Enfin, ils sont de plus en plus utilisés dans la conception de sondes fluorescentes intelligentes pour la mesure de certains paramètres cellulaires (pH et viscosité entre autres), pour la détection d'un grand nombre d'espèces chimiques jouant un rôle biologique clé (ROS, RNS, thiols biologiques, anions et cations métalliques par exemple) ou d'activités enzymatiques (Fig. 10B-C). Dans ce cas, il faut que l'interaction ou la réaction de la sonde avec l'analyte ciblé se traduise par une modification des propriétés de fluorescence. Deux types de réponse sont généralement recherchés : une exaltation de l'émission de fluorescence (réponse "Off-On" qui permet de maximiser le rapport signal / bruit et la résolution spatiale) ou un déplacement (hypso- ou bathochrome, ce dernier étant le plus recherché) des profils d'excitation / émission (réponse ratiométrique qui permet une calibration interne et donc de s'affranchir des artefacts fréquemment observés en imagerie de fluorescence : variations de l'intensité lumineuse, épaisseur et hétérogénéité de l'échantillon, distribution du fluorophore)²⁸. Les différents mécanismes (ainsi que les processus photophysiques sous-jacents) qui permettent d'obtenir une réponse "Off-On" ou ratiométrique seront développés dans la partie 0.1.3 de ce chapitre.

A ce stade, il est important de préciser que la fluorescence intrinsèque de certaines biomolécules (acides aminés comme la L-tyrosine ou le L-tryptophane, les cofacteurs enzymatiques NAD(P)H, FMN et les porphyrines, ces dernières que l'on retrouve entre autres dans les hèmes) contribue à l'auto-fluorescence du milieu biologique et peut donc empêcher une détection correcte en raison d'un bruit de fond trop élevé. Pour les applications *in vivo*, la profondeur du tissu à explorer peut également s'avérer problématique en raison de l'absorption des photons (utilisés pour l'excitation ou ceux émis par le fluorophore) par les tissus eux-mêmes ou par l'hémoglobine (Hb). Il devient alors intéressant d'utiliser des fluorophores, ou des profluorophores libérant des fluorophores, dont les propriétés spectrales sont situées dans la zone du rouge lointain (> 650 nm) ou idéalement dans le proche infrarouge (proche-IR ou NIR, de 700-900 nm, Fig. 0.11)²⁹.

²⁶ Pour des revues sur le sujet : a) I. D. Johnson, Probes for Organelles, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corp., 11ème édition, **2010** ; b) H. Zhu, J. Fan, J. Du et X. Peng, *Acc. Chem. Res.*, **2016**, (49), 2115-2126 ; c) W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang et L. Yuan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 13658-13699.

²⁷ Plusieurs stratégies peuvent être mises en oeuvre. Elles sont présentées dans de nombreuses revues, dont : a) M. S. T. Goncalves, *Chem. Rev.*, **2009**, (109), 190-212 ; b) K. M. Dean et A. E. Palmer, *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, (10), 512-523 ; c) Y. Chen, K. Tsao et J. W. Keillor, *Can. J. Chem.*, **2015**, (93), 389-398 ; d) G. Zhang, S. Zheng, H. Liu et P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 3405-3417 ; e) Y. Ha et H.-K. Choi, *Chem. Biol. Interact.*, **2016**, (248), 36-51.

²⁸ J. Chan, S. C. Dodani et C. J. Chang, *Nat. Chem.*, **2012**, (4), 973-984.

²⁹ Pour des revues sur les fluorophores proche-IR, voir : a) J. O. Escobedo, O. Rusin, S. Lim et R. M. Strongin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, (14), 64-70 ; b) S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng et C. Shi, *Biomaterials*, **2011**, (32), 7127-7138 c) V. J. Pansare, S. Hejazi, W. J. Faenza et R. K. Prud'homme, *Chem. Mater.*, **2012**, (24), 812-

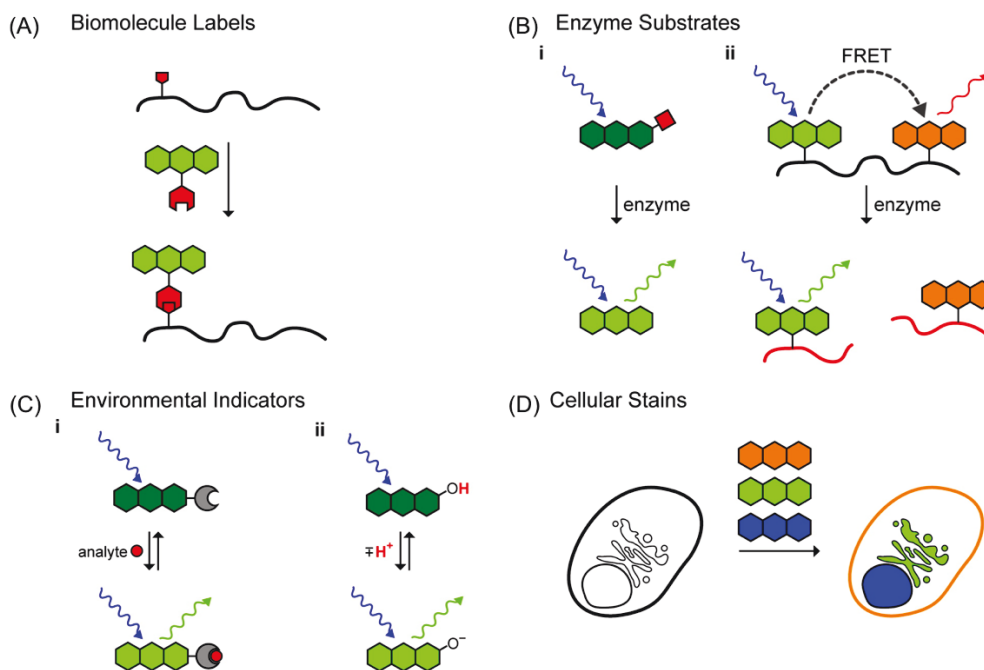


Figure 0.10 - Différentes stratégies mises en œuvre pour l'étude de systèmes biologiques via l'utilisation de fluorophores organiques. (A) Marquage d'une biomolécule (hors protéines fluorescentes), en utilisant par exemple une réaction bioorthogonale. (B) Sonde pro-fluorescente ou FRET pour détecter une activité enzymatique (le plus souvent, une activité de type hydrolase). (C) Sondes fluorescentes intelligentes pour la mesure de certains paramètres cellulaires ou la détection d'espèces chimiques jouant un rôle biologique clé. (D) Marquage des cellules ou de leurs organites. Illustration issue de la revue [21a].

En effet, la faible auto-fluorescence des tissus vivants et la faible absorption des biomolécules dans cette zone du spectre électromagnétique permet d'obtenir une pénétrabilité des photons élevée et un rapport signal sur bruit optimal (Fig. 0.11). Il est également intéressant de préciser ici que les sondes fluorescentes destinées à la bioimagerie, peuvent associer au sein de leur structure un marqueur fluorescent et un médicament (cytotoxique par exemple, pour la chimiothérapie de certains cancers), ce qui permet d'obtenir des agents théranostiques³⁰. L'association avec une autre modalité d'imagerie ("multi-modality imaging"³¹) au sein de la même architecture moléculaire a aussi été explorée, notamment avec un complexe de radionucléide afin d'accéder à des agents d'imagerie bimodaux nucléaire-fluorescence³², tirant partie des avantages de chacune de ces deux modalités.

827 ; d) M. Ptaszek, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2013**, (113), 59-108 ; e) K. Umezawa, D. Citterio et K. Suzuki, *Anal. Sci.*, **2014**, (30), 327-349 ; f) A. Haque, M. S. H. Faizi, J. A. Rather et M. S. Khan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, (25), 2017-2034 ; g) G. Hong, A. L. Antaris et H. Dai, *Nat. Biomed. Engin.*, **2017**, (1), 0010.

³⁰ Pour une revue sur les agents théranostiques à base de petites molécules, voir : R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya et J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 6670-6683.

³¹ Pour des revues sur l'imagerie multimodale, voir : a) S. R. Cherry, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2006**, (8), 35-62 ; b) L. Marti-Bonmati, R. Sopena, P. Bartumeus et P. Sopena, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2010**, (5), 180-189 ; c) T. E. Yankeelov, R. G. Abramson et C. C. Quarles, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2014**, (11), 670-680 ; d) X. Li, X.-N. Zhang, X.-D. Li et J. Chang, *Cancer Biol. Med.*, **2016**, (13), 339-348.

³² Pour des revues sur les sondes bimodales nucléaire-fluorescence, voir : a) F. L. Thorp-Greenwood et M. P. Coogan, *Dalton Trans.*, **2011**, (40), 6129-6143 ; b) U. Seibold, B. Wängler, R. Schirmmacher et C. Wängler, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 153741 ; S. C. Ghosh et A. Azhdarinia, *Curr. Med. Chem.*, **2015**, (22), 3390-3404.

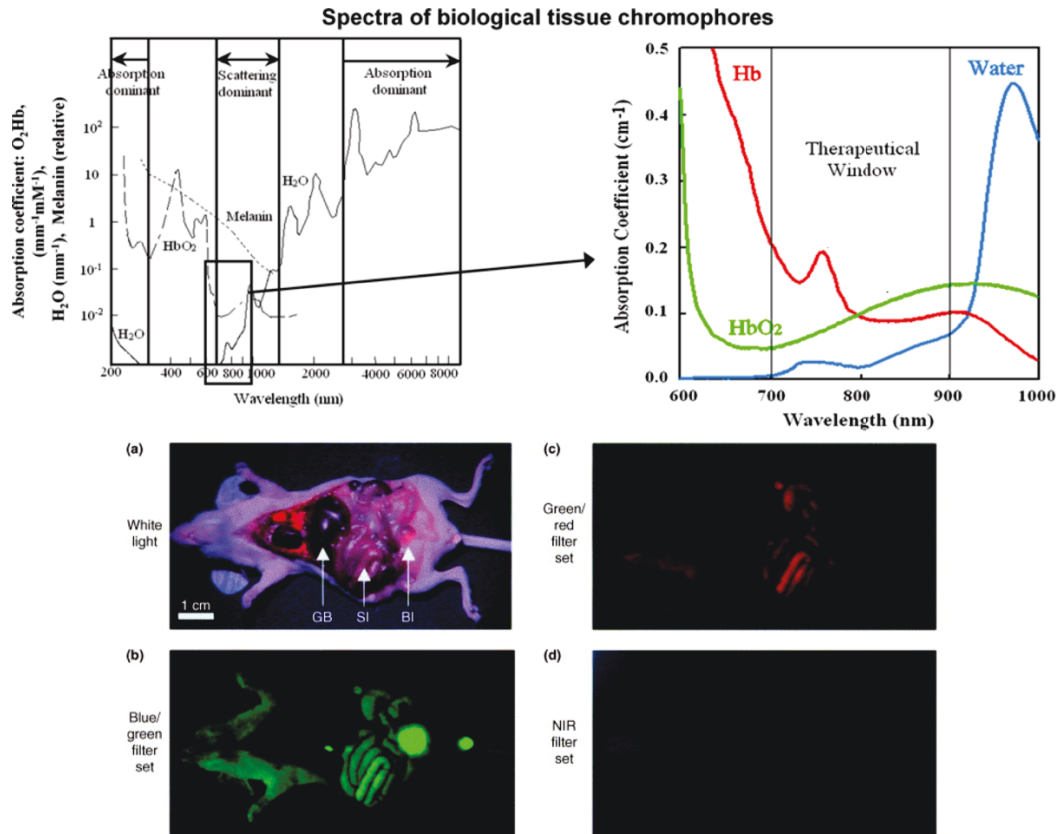


Figure 0.11 - (haut) Absorption des tissus biologiques et définition de la fenêtre de transparence biologique. (bas) Auto-fluorescence des tissus observée suivant les filtres d'excitation / émission utilisés : (a) viscères de souris après sacrifice (GB = vésicule biliaire, SI = petit intestin, BI = vessie) ; (b) filtres bleu / vert (460-500 nm / 505-560 nm) ; (c) filtres vert / rouge (525-555 nm / 590-650 nm) ; (d) filtres proche-IR (725-775 nm / 790-830 nm). Illustrations issues des références [33] et [34].

C'est en respectant ce cahier des charges contraignant que doivent s'inscrire les travaux concernant le développement de molécules destinées à des applications en imagerie préclinique et clinique³⁵. A l'heure actuelle, seulement trois fluorophores proche-NIR ont reçu l'approbation de la FDA (Food & Drug Administration, équivalent américain de l'ANSM). Il s'agit du bleu de méthylène (MB), de la protoporphyrine IX et du vert d'indocyanine³⁶ (ICG) auxquels s'ajoute la fluorescéine qui n'est pas un fluorophore proche-IR (utilisé en angiographie rétinienne) et un dérivé cyanine nommé IRDye 800CW (développé par la société LI-COR) actuellement en phase I dans plusieurs essais cliniques. L'application clinique principale de ces composés est, à ce jour, l'assistance à la chirurgie (ou chirurgie guidée par l'image)³⁷.

³³ S. B. Wigal, C. M. Polzonetti, A. Stehli et E. Gratton, *J. Biomed. Opt.*, **2012**, (17), 127002.

³⁴ J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, (7), 626-634.

³⁵ a) B. Ballou, L. A. Ernst et A. S. Waggoner, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, (12), 795-805 ; b) X. Yi, F. Wang, W. Qin, X. Yang et J. Yuan, *Int. J. Nanomed.*, **2014**, (9), 1347-1365 ; c) E. A. Owens, H. Hyun, T. L. Dost, J. H. Lee, G. Park, D. H. Pham, M. H. Park, H. S. Choi et M. Henary, *J. Med. Chem.*, **2016**, (59), 5311-5323 ; d) E. A. Owens, M. Henary, G. El Fakhri et H. S. Choi, *Acc. Chem. Res.*, **2016**, (49), 1731-1740 ; e) M. Gao, F. Yu, C. Lv, J. Choo et L. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, (46), 2237-2271 ; f) G. Hong, A. L. Antaris et H. Dai, *Nat. Biomed. Engin.*, **2017**, (1), 0010 ; I. Martinic, S. V. Eliseeva et S. Petoud, *J. Lumin.*, **2017**, (189), 19-43.

³⁶ J. T. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso, T. Patila, T. Spillmann, V. V. Tuchin, M. Venermo et P. Valisuo, *Int. J. Biomed. Imaging*, **2012**, 940585.

³⁷ Pour des articles et des revues sur le sujet : a) S. L. Gibbs, *Quant. Imaging Med. Surg.*, **2012**, (2), 177-187 ; b) R. P. Judy, J. J. Keating, E. M. DeJesus, J. X. Jiang, O. T. Okusanya, S. Singhal, S. Nie, D. E. Holt, S. P. Arlauckas,

0.1.3. Modulation de la fluorescence et sondes pro-fluorescentes³⁸

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux processus photophysiques qui conduisent à la désactivation des états excités d'un fluorophore et qui vont donc jouer un rôle majeur dans la modulation de ses propriétés de fluorescence. Leur exploitation pour la conception rationnelle de sondes fluorogéniques sera au centre de cette présentation. Nous focaliserons nos propos uniquement sur les sondes pro-fluorescentes (ou pro-fluorophores). Les différents modes d'activation de ces fluorophores "cagés" seront exposés et illustrés par des travaux récents de la littérature.

La fluorescence est influencée par son environnement comme décrit en Fig. 0.6. Pour le mécanisme de transfert de charge intramoléculaire³⁹ (ICT, "Internal Charge Transfer"), la nature et les propriétés du solvant jouent un rôle clé. Comme les transitions électroniques conduisent à une redistribution des électrons, les moments dipolaires d'un fluorophore dans son état fondamental et dans son état excité sont en général différents. Cela entraîne alors une réorganisation des molécules de solvant autour du fluorophore afin de minimiser l'état de charge et donc de stabiliser l'état excité. Cette réorganisation s'effectue plus ou moins lentement suivant la polarité du solvant et provoque le déplacement bathochrome du maximum d'émission en abaissant l'énergie de l'état excité relaxation du solvant. Le phénomène d'ICT est remarquable dans les molécules présentant un important caractère de transfert de charge à l'état fondamental entre un groupement donneur et un groupement accepteur situé de part et d'autre d'un système π (on parle de systèmes "push-pull"). Selon la nature du fluorophore et du milieu, un autre phénomène peut avoir lieu, le TICT ("Twisted Internal Charge Transfer")⁴⁰. Cela se traduit généralement par une rotation moléculaire à l'état excité et ce nouvel état retourne à l'état fondamental soit par un processus non-radiatif (exemple des dérivés 7-N-alkyl- / 7-N,N-dialkylaminocoumarine ou des rhodamines, voir chapitres 1 et 2) soit de façon radiative. Dans ce cas, un déplacement bathochrome est obtenu pour l'émission. Ainsi, la molécule montre un spectre d'émission duale caractéristique des espèces peuplant à la fois l'état excité et l'état TICT. Le passage ICT / TICT est principalement modulé par la viscosité du solvant.

E. J. Delikatny et P. S. Low, *Sci. Rep.*, **2015**, (5), 16208 ; c) A. V. Dsouza, H. Lin, E. R. Henderson, K. S. Samkoe et B. W. Pogue, *J. Biomed. Opt.*, **2016**, (21), 80901 ; d) B. Asayama, K. Sato, T. Fukui, M. Okuma, Y. Nakagaki, Y. Nakagaki, T. Osato et H. Nakamura, *Interdiscip. Neurosurg.*, **2017**, (9), 8-13 ; e) A. Haque, M. S. H. Faizi, J. A. Rather et M. S. Khan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, (25), 2017-2034.

³⁸ Pour quelques exemples de revues sur les sondes pro-fluorescentes, voir : a) X. Chen, M. Sun et H. Ma, *Curr. Org. Chem.*, **2006**, (10), 477-489 ; b) M. Eun Jun, B. Roy et K. Han Ahn, *Chem. Commun.*, **2011**, (47), 7583-7601 ; c) J. Chan, S. C. Dodani et C. J. Chang, *Nat. Chem.*, **2012**, (4), 973-984 ; d) W. Shi et H. Ma, *Chem. Commun.*, **2012**, (48), 8732-8744 ; e) H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian et X.-J. Zhang, *Chem. Commun.*, **2013**, (49), 429-447 ; f) X. Li, X. Gao, W. Shi et H. Ma, *Chem. Rev.*, **2014**, (114), 590-659 ; g) Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin et J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 5003-5015. Pour des revues sur les pro-fluorophores activés par une enzyme (substrats fluorogéniques d'enzymes), voir : a) et h) J.-L. Reymond, V. S. Fluxa et N. Maillard, *Chem. Commun.*, **2009**, 34-46. Pour une revue sur les perspectives et futurs développements : i) E. J. New, *ACS Sens.*, **2016**, (1), 328-333.

³⁹ Un exemple détaillé est donné dans le chapitre 1.

⁴⁰ Pour une revue détaillée sur le sujet, voir : S. Sasaki, G. P. C. Drummen et G.-i. Konishi, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, (4), 2731-2743.

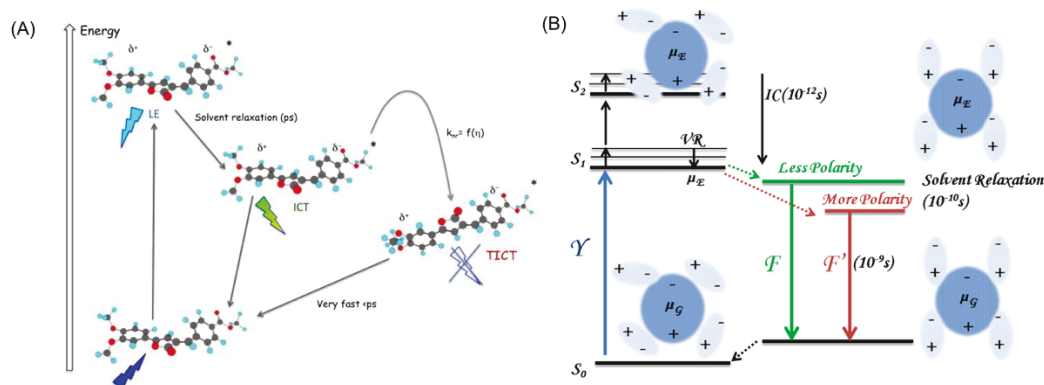


Figure 0.12 - (A) Principe du phénomène d'ICT et formation possible d'un état TICT (ici non-radiatif). (B) Influence du solvant pour l'émission de fluorescence sachant que les molécules mettant en jeu le phénomène d'ICT sont très sensibles à ce paramètre. Illustrations issues des références [41] et [42].

Le phénomène de PET ("Photoinduced Electron Transfer")⁴³ est souvent utilisé pour inhiber la fluorescence depuis l'état excité du fluorophore ; il met en jeu une molécule ou un motif moléculaire (nommé "quencher" ou "quenching unit") dont les propriétés électroniques vont lui permettre d'interagir efficacement avec le fluorophore dans son état excité. Ce phénomène peut avoir lieu de deux manières distinctes (Fig. 0.13A). Soit l'électron du fluorophore excité (i.e., celui promu dans la LUMO) est transféré sur la LUMO vacante du "quencher" plus basse en énergie, on parle alors de PET oxydant. Typiquement, un motif de type nitro-aryle introduit sur le fluorophore favorise ce phénomène. Ou bien, un électron de la HOMO d'un "quencher" riche en électrons, plus haute en énergie que celle du fluorophore, est transféré sur la case laissée vacante de la HOMO du fluorophore excité empêchant ainsi le retour de l'électron promu dans la LUMO et donc l'émission de fluorescence. On parle alors de PET réducteur et il est souvent rencontré avec les fluorophores qui sont fonctionnalisés par un motif aryle substitué par un ou plusieurs groupements électro-donneurs. Ce mécanisme est connu depuis longtemps, il a été mis en œuvre dans de nombreuses réactions photochimiques pour des applications en synthèse organique et plus récemment utilisé avec succès dans la conception de nombreuses sondes fluorogéniques.

Concernant les processus d'interaction entre les états excités d'un fluorophore et d'une seconde molécule et mettant en jeu une réaction de transfert d'énergie entre ces deux entités, plusieurs mécanismes sont possibles : transfert d'énergie radiatif (ou trivial), transfert non-radiatif par mécanisme d'échange (on parle d'un transfert de type Dexter) et processus non-radiatif par interaction dipôle-dipôle (on parle d'un transfert de type Förster). Nous allons nous focaliser uniquement sur ce dernier car il est mis en œuvre dans un grand nombre de sondes fluorogéniques permettant la détection d'un large éventail d'analytes ou la mesure de diverses interactions biomoléculaires.

⁴¹ R. Bizzarri, page du groupe "Intracellular Nanobiophysics" du CNR NANO, <http://www.nano.cnr.it/index.php?mod=men&id=232> (consulté le 07/08/2017).

⁴² S.-C. Yeh, M. Patterson, J. Hayward et Q. Fang, *Photonics*, **2014**, (1), 530-564.

⁴³ Pour des revues sur le phénomène de PET et son application dans la conception de senseurs fluorescents, voir : a) P. Piotrowiak, *Chem. Soc. Rev.*, **1999**, (28), 143-150 ; b) A. Prasanna de Silva, T. S. Moody et G. D. Wright, *Analyst* **2009**, (134), 2385-2393 ; c) W. Zhang, Z. Ma, L. Du et M. Li, *Analyst*, **2014**, (139), 2641-2649 ; d) B. Daly, J. Ling et A. P. de Silva, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 4203-4211.

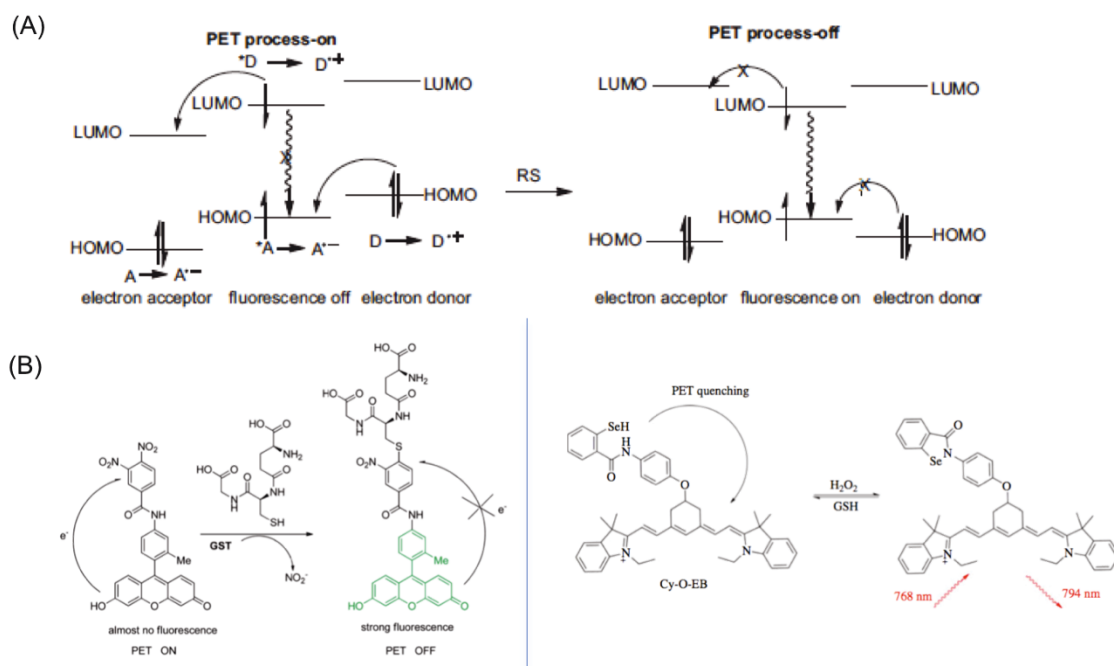


Figure 0.13 - (A) Principe du PET (oxydant et réducteur sont présentés sur le même schéma avec le fluorophore dans son état excité (A^* ou D^*) au milieu et l'inhibiteur à gauche et à droite), illustration issue du livre de F. A. Villamena⁴⁴. (B) Deux exemples de sondes PET pour la détection du glutathion (PET oxydant, gauche)⁴⁵ et pour la détection de H_2O_2 / thiols, espèces impliquées dans l'équilibre rédox cellulaire (PET réducteur, droite)⁴⁶. Illustrations issues des revues [43c] et [47].

Le transfert d'excitation est considéré comme un processus résonant entre le fluorophore excité (on parle de donneur) et un accepteur (qui peut être un "quencher" ou un fluorophore). On doit considérer l'existence de transitions vibroniques iso-énergétiques couplées dans les deux entités, le transfert d'énergie se faisant de manière résonante. Ce transfert se fait dans un seul sens en raison d'une relaxation vibrationnelle (processus (4) indiqué sur la Fig. 0.14) très rapide dans l'état excité de l'accepteur. Pour que le phénomène de FRET (Förster or Fluorescence Resonance Energy Transfer)⁴⁸ soit effectif au sein d'une architecture moléculaire constituée d'une paire fluorophore-quencher ou d'une paire de deux fluorophores (identiques ou différents), plusieurs conditions en général doivent être remplies : (1) un recouvrement (défini par une intégrale de recouvrement J) significatif entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur, (2) la distance séparant les deux partenaires doit être inférieure à 1,8 fois le rayon de Förster R_0 (R_0 = distance donneur-accepteur pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50%) et (3) les dipôles du donneur et de l'accepteur doivent présenter la même orientation (Fig. 0.15B).

⁴⁴ F. A. Villamena, Fluorescence Technique, *Reactive Species Detection in Biology*, Elsevier, **2017**.

⁴⁵ Y. Fujikawa, Y. Urano, T. Komatsu, K. Hanaoka, H. Kojima, T. Terai, H. Inoue et T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, (130), 14533-14543.

⁴⁶ K. Xu, M. Qiang, W. Gao, R. Su, N. Li, Y. Gao, Y. Xie, F. Kong et B. Tang, *Chem. Sci.*, **2013**, (4), 1079-1086.

⁴⁷ K. Yang et J. L. Kolanowski, E. J. New, *Interface Focus*, **2017**, (7), sous presse, DOI: 10.1098/rsfs.2016.0105.

⁴⁸ a) T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.*, **1959**, (27), 7-17 ; b) K. E. Sapsford, L. Berti et I. L. Medintz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, (45), 4562-4588. Pour des revues sur les applications des sondes FRET, voir : c) K. Kikuchi, H. Takakusa et T. Nagano, *Trends Anal. Chem.*, **2004**, (23), 407-415 ; d) C.-H. Tung, *Biopolymers*, **2004**, (76), 391-403 ; e) Y. Arai et T. Nagai, *Microscopy*, **2013**, (62), 419-428 ; f) G. Chen, F. Song, X. Xiong et X. Peng, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2013**, (52), 11228-11245 ; g) L. Yuan, W. Lin, K. Zheng et S. Zhu, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, (46), 1462-1473 ; h) H.-Y. Hu, S. Gehrig, G. Reither, D. Subramanian, M. A. Mall, O. Plettenburg et C. Schultz, *Biotechnol. J.*, **2014**, (9), 266-281 ; i) C. E. Rowland, C. W. Brown, I. L. Medintz et J. B. Delehanty, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, (3), 042006.

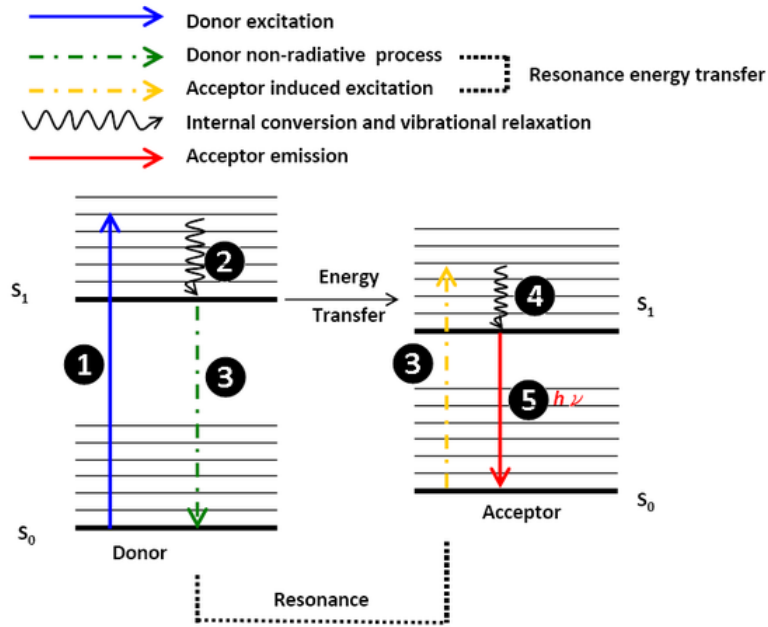


Figure 0.14 - Interaction entre les états excités d'un fluorophore (donneur) et d'un accepteur selon un processus de transfert de type Förster. Transitions énergétiques couplées lors de ce transfert d'énergie non-radiatif. Illustration issue du site internet https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer.

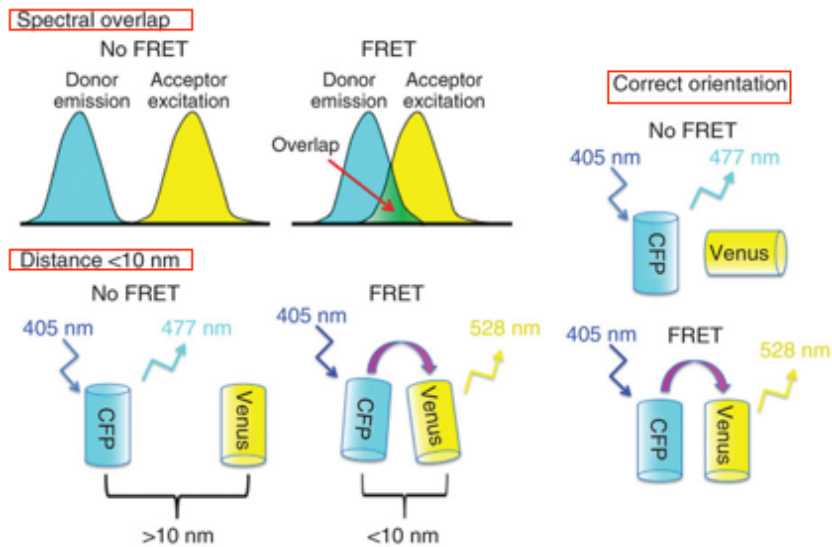


Figure 0.15 - Conditions pour obtenir des sondes FRET présentant une efficacité de transfert optimale entre le donneur et l'accepteur. Illustration issue de la référence [49].

⁴⁹ J. A. Broussard, B. Rappaz, D. J. Webb et C. M. Brown, *Nat. Protocols*, **2013**, (8), 265-281.

Suivant la nature du donneur et de l'accepteur, différents types de sondes mettant en jeu un transfert de type Förster, peuvent être élaborés^{48c-i}. S'il s'agit d'une paire de deux fluorophores identiques, un transfert de type Homo-FRET conduisant à un quenching du système est observé ; on parle souvent pour ce type de sondes de dimères intramoléculaires de type H (ou d'homodimères intramoléculaires) par analogie avec la formation d'agrégats de type H⁵⁰ (*vide supra*). Lorsqu'un événement (bio)chimique (rupture d'un lien covalent unissant les deux partenaires ou un changement de conformation) se produit et provoque un éloignement de deux fluorophores, l'émission de fluorescence de l'espèce monomérique est alors observée (réponse de type "Off-On"). Une réponse fluorogénique du même type est obtenue avec les sondes FRET mettant en jeu un fluorophore comme donneur et un "quencher" comme accepteur (Fig. 0.16A), ce dernier étant un chromophore non-fluorescent, le plus souvent appartenant à la famille des colorants diazoïques⁵¹. Dans le cas où deux fluorophores différents sont associés, on peut suivre l'évolution de l'émission de fluorescence du donneur (augmentation) et de l'accepteur (diminution) à une même longueur d'onde excitatrice et ainsi obtenir une réponse de type ratiométrique.

Un dernier cas peut se présenter lorsque deux fluorophores différents forment un hétérodimère intramoléculaire non-fluorescent ; on parle alors de "quenching" statique *via* la formation d'un complexe à l'état fondamental ("ground state complex")⁵². Un recouvrement des spectres d'émission et d'excitation des deux partenaires n'est pas nécessaire et ce sont les interactions non-covalentes entre les deux molécules qui régissent en grande partie ce phénomène. L'activation de la sonde se traduira par une exaltation de l'émission de fluorescence des deux partenaires, dans deux canaux de détection distincts (Fig. 0.16B). Précisons qu'une autre utilité des sondes FRET, est l'obtention d'architectures fluorescentes présentant des (pseudo)-déplacements de Stokes très importants (100-200 nm). Enfin, pour conclure ce paragraphe sur les processus de transfert d'énergie, il est intéressant de mentionner le TBET ("Through Bond Energy Transfer")⁵³ que l'on rencontre avec des systèmes donneur-accepteur au sein desquels les deux partenaires sont liés par un espaceur conjugué à électrons π ; on parle alors de cassettes TBET (Fig. 0.16C). Même si les théories décrivant ce phénomène sont à l'heure actuelle encore floues et contradictoires, on peut préciser qu'il s'agit d'un transfert d'énergie au travers des liaisons, sans doute favorisé par extension du système conjugué de la molécule à l'état excité. En effet, à l'état fondamental, le donneur et l'accepteur sont situés dans deux plans perpendiculaires l'un de l'autre et le système n'est donc pas totalement conjugué.

⁵⁰ Pour un exemple de ce type de sondes, voir : M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke et H. Kobayashi, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, (4), 535-546.

⁵¹ Pour une revue sur les "quenchers" de la famille des colorants diazoïques, voir : A. Chevalier, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Chem. - Asian. J.*, **2017**, sous presse, DOI: 10.1002/asia.201700682.

⁵² Pour une revue sur le sujet, voir : M. K. Johansson et R. M. Cook, *Chem. - Eur. J.*, **2003**, (9), 3466-3471.

⁵³ Pour deux revues sur les cassettes TBET, voir : a) A. Loudet, C. Thivierge et K. Burgess, *Dojin News*, **2011**, (137), 1-7 ; b) J. Fan, M. Hu, P. Zhan et X. Peng, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, (42), 29-43.

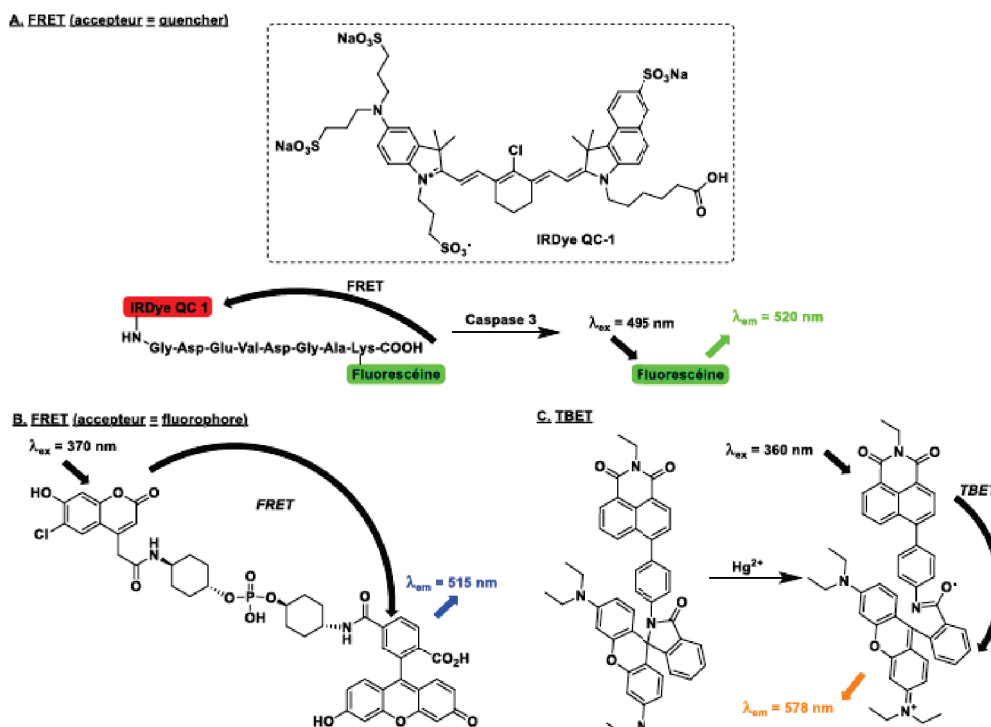


Figure 0.16 - (A) Exemple de sonde FRET mettant en jeu une paire fluorophore-quencher pour la détection d'une activité de type caspase-3⁵⁴. (B) Exemple de sonde FRET mettant en jeu une paire de fluorophores différents pour la détection d'une activité de type phosphatase⁵⁵. (C) Exemple de cassette TBET pour la détection du cation Hg(II)⁵⁶. Illustration issue du manuscrit de thèse de B. Roubinet⁵⁷.

Le phénomène d'ESIPT ("Excited State Intramolecular Proton Transfer")⁵⁸ fait intervenir un transfert de proton intramoléculaire à l'état excité. Celui-ci ne peut avoir lieu qu'au sein de structures pouvant former une liaison hydrogène intramoléculaire (formation d'un pseudo-cycle à 6 chaînons favorable d'un point de vue thermodynamique), le plus souvent entre un groupe X-H (amino ou hydroxyle) et un hétéroatome portant un ou plusieurs doublets libres (typiquement l'atome d'oxygène d'un carbonyle). Ce phénomène induit donc le passage d'une forme énon (stabilisée dans son état fondamental par cette liaison hydrogène intramoléculaire) à une forme cétone beaucoup moins stable dans son état fondamental (tautomérie céto-énonique, Fig. 0.16A). Ainsi, les fluorophores ESIPT possèdent des déplacements de Stokes très importants et cette caractéristique a été mise à profit dans la conception de sondes fluorogéniques mettant en jeu la déprotection du groupe X-H par l'analyte ciblé (Fig. 0.16B). De plus, la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire confère fréquemment au fluorophore ESIPT la propriété de fluorophore précipitant ou fluorophore AIE (Fig. 0.16C)⁵⁹.

⁵⁴ X. Peng, H. Chen, D. R. Draney, W. Volcheck, A. Schutz-Geschwender et D. M. Olive, *Anal. Biochem.*, **2009**, (388), 220-228.

⁵⁵ Y. Kawanishi, K. Kikuchi, H. Takakusa, S. Mizukami, Y. Urano, T. Higuchi et T. Nagano, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**, (39), 3438-3440.

⁵⁶ M. Kumar, N. Kumar, V. Bhalla, H. Singh, P. R. Sharma et T. Kaur, *Org. Lett.*, **2011**, (13), 1422-1425.

⁵⁷ B. Roubinet, "Développement de nouveaux outils chimiques pour la conception d'un système de détection fluorogénique des réactions catalysées par les polymérases", Université de Rouen, **2015**.

⁵⁸ Pour une revue sur le sujet : J. E. Kwon et S. Y. Park, *Adv. Mater.*, **2011**, (23), 3615-3642.

⁵⁹ Pour des revues sur les fluorophores AIE, voir : a) J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam et B. Z. Tang, *Chem. Rev.*, **2015**, (115), 11718-11940 ; b) Q. Zhao et J. Z. Sun, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, (4), 10588-10609 ; c) Y. Hong, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2016**, (4), 022003.

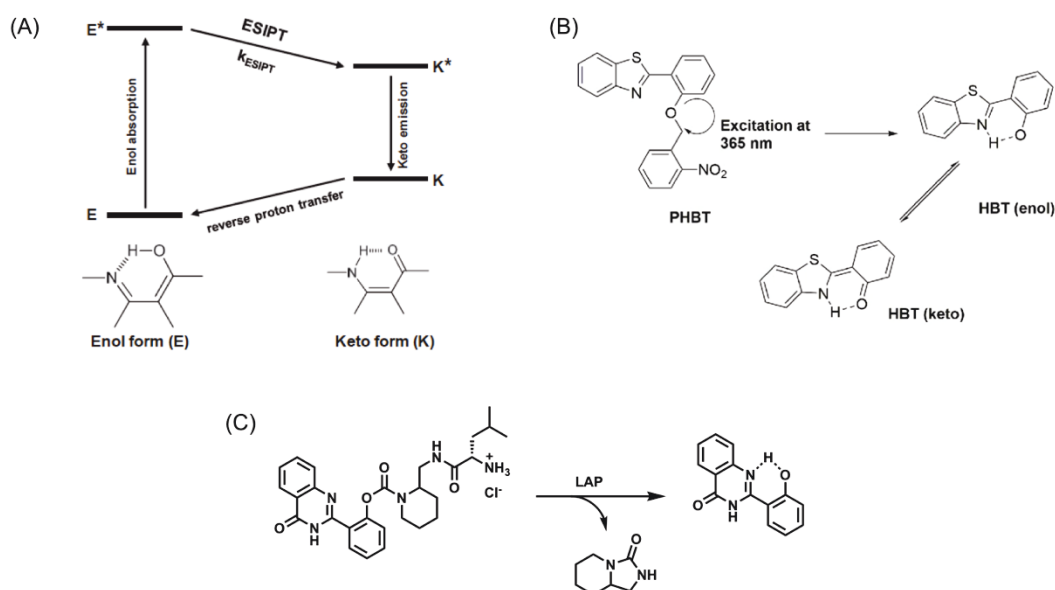


Figure 0.17 - (A) Principe de l'ES IPT. (B) Exemple de sonde ES IPT photoactivable, pour des applications en bioimagerie spatio-temporelle ratiométrique. (C) Sonde ES IPT à bras espaceur auto-immolable, activée par la LAP et libérant un fluorophore précipitant, développée par le groupe de J. Hasserodt⁶⁰. Illustrations (A) et (B) issues des références [58] et [61].

Le dernier processus, discuté brièvement, se nomme l'effet d'atome lourd interne ("Heavy Atom Effect") et il est lié à la présence au sein de la molécule fluorescente d'atomes lourds pour lesquels l'interaction spin-orbite est forte car grossièrement proportionnelle à Z^4 , Z étant la charge du noyau de ces atomes. Ils favorisent le croisement inter-système et donc les processus de désactivation de l'état excité T_1 mais aussi la formation d'espèces réactives de l'oxygène (radical HO^\bullet et radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ via des réactions de photosensibilisation de type I et oxygène singulet 1O_2 via des réactions de photosensibilisation de type II)⁶², au détriment de la fluorescence. Ce phénomène est notamment mis à profit dans la conception de sondes fluorogéniques de type "Off-On" dont le mécanisme d'activation repose sur une réaction de substitution du ou des atome(s) lourd(s) par l'analyte nucléophile ciblé⁶³. Il est également couramment utilisé pour convertir des fluorophores organiques en photosensibilisateurs pour des applications en thérapie photodynamique (PDT)⁶⁴. Enfin, il est important de souligner que le couplage spin-orbite peut aussi se faire par l'intermédiaire de collisions des molécules de fluorophores avec des molécules de solvants comportant des atomes lourds (e.g., le diiodométhane) ou avec des gaz dissous à numéro atomique élevé (e.g., le xénon). C'est l'effet d'atome lourd externe.

⁶⁰ M. Prost, L. Canaple, J. Samarut et J. Hasserodt, *ChemBioChem*, **2014**, (15), 1413-1417.

⁶¹ X. Zhou, Y. Jiang, X. Zhao et D. Guo, *Sensors*, **2016**, (16), 1684.

⁶² Pour des revues sur les réactions de photosensibilisation, voir : a) A. Greer, *Acc. Chem. Res.*, **2006**, (39), 797-804 ; b) M. S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, M. Vignoni et T. M. Yoshimura, *Photochem. Photobiol.*, **2017**, (93), 912-919. Pour une revue sur l'oxygène singulet, voir : c) P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, (39), 3181-3209.

⁶³ Pour un exemple, voir : L. He, Q. Xu, Y. Liu, H. Wei, Y. Tang et W. Lin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, (7), 12809-12813.

⁶⁴ Pour des revues sur les colorants organiques utilisés comme photosensibilisateurs en PDT, voir : a) A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung et K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, (42), 77-88 ; b) H. Abrahamse et Michael R. Hamblin, *Biochem. J.*, **2016**, (473), 347-364.

Notons que plusieurs de ces mécanismes peuvent être mis en œuvre de manière simultanée au sein d'un même fluorophore ou d'une paire de fluorophores (cas des sondes FRET) dans le but le plus souvent de concevoir des sondes fluorogéniques "multi-analytes" ou d'améliorer la spécificité d'une sonde fluorogénique pour un analyte donné (*vide infra*). Une revue récente publiée par le groupe de W. Lin décrit les principales combinaisons (ICT-FRET, PET-FRET, PET-ICT-ESIPT, ...) déjà explorées et utilisées avec succès pour la détection d'analytes⁶⁵. Pour illustrer notre propos, un exemple de sonde fluorescente de pH (nommée CN-pH) est donné Fig. 0.18. Elle présente la particularité de posséder deux sites distincts de déclenchement (sites protonables-déprotonables, à savoir l'atome d'azote du motif *N*-alkylmorpholine et le groupe hydroxyle de la coumarine) ses propriétés de fluorescence sont modulées par le triptyque ICT-PET-FRET. Ainsi, en fonction du pH (acide, neutre ou basique) cette sonde va émettre dans 3 canaux différents⁶⁶.

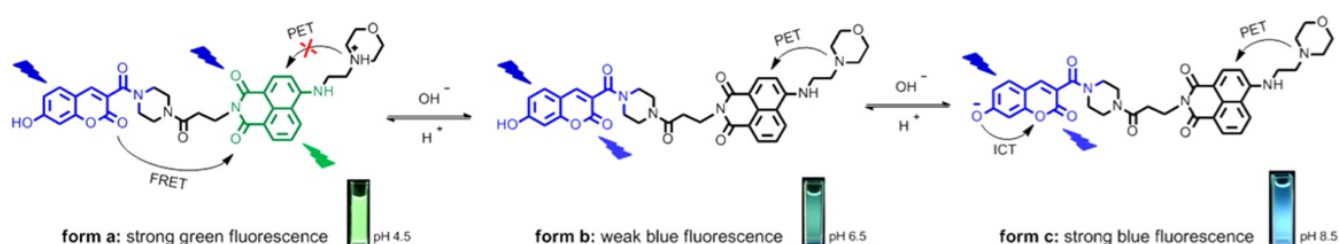


Figure 0.18 - Exemple de sonde fluorescente de pH possédant deux sites de déclenchement et qui repose sur le triptyque ICT-PET-FRET. Illustration issue de la référence [66].

Cette diversité dans les processus photophysiques pouvant désactiver des états excités alliée à la richesse de la chimie des fluorophores font de la fluorescence un outil remarquable d'analyse et de visualisation du vivant. Le développement exponentiel qu'a connu le domaine des sondes fluorescentes intelligentes au cours de la dernière décennie en est l'une des preuves. On entend par sonde fluorescente intelligente, tout système photo-actif dont l'interaction ou la réaction avec un analyte (défini au sens large comme un stimulus) se traduit par une modification de ses propriétés de fluorescence. A ce stade, il est important de préciser qu'il existe un nombre considérable de systèmes moléculaires fluorescents qui répondent à cette définition mais pour le reste de cette partie, les systèmes composés de plusieurs fluorophores (e.g., cassettes FRET ou TBET) ne seront pas abordés en détails. Le propos portera sur les sondes fluorogéniques dérivées d'un fluorophore unique et dont le mécanisme d'activation repose sur une ou plusieurs réactions chimiques (le plus souvent irréversible(s), exception faite de quelques processus de complexation d'ions métalliques) avec l'analyte ciblé ("reaction-based fluorescent probe")³⁸. On parle alors de sondes pro-fluorescentes ou pro-fluorophores. Le terme de pro-fluorophore (dans la littérature, "latent fluorophore", "fluorogenic dye" et "fluorescent chemodosimeter" sont les différentes dénominations anglaises employées) a été introduit pour la première fois par R. T. Raines dans un article publié en 2005 dans le *Journal of The American Chemical Society*. Il y décrit une sonde fluorogénique permettant la détection d'estérases dans des cellules vivantes (Fig. 0.19)⁶⁷. Il est cependant important de préciser que ces sondes fluorogéniques appliquées à la détection / quantification d'activités enzymatiques (principalement des hydrolases) sont connues depuis les années 60 sous le nom de substrats fluorogéniques enzymatiques^{38h}.

⁶⁵ L. He, B. Dong, Y. Liu et W. Lin, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, (45), 6449-6461.

⁶⁶ B. Dong, X. Song, C. Wang, X. Kong, Y. Tang et W. Lin, *Anal. Chem.*, **2016**, (88), 4085-4091.

⁶⁷ S. S. Chandran, K. A. Dickson et R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, (127), 1652-1653.

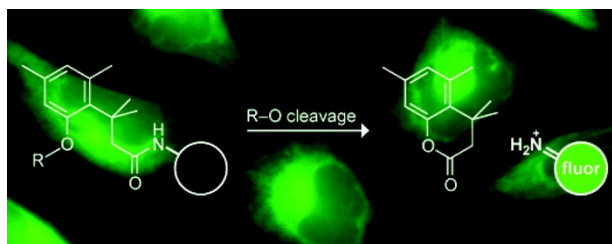


Figure 0.19 - Principe général du pro-fluorophore développé par le groupe de R. T. Raines pour la détection *in cellulo* des estérases, dont le mécanisme d'activation fait intervenir un processus d'auto-immolation et la libération finale de la rhodamine 110. Illustration issue de la référence [67].

Concernant la structure générale de ces sondes pro-fluorescentes (Fig. 0.20), elle repose souvent sur un fluorophore organique (appartenant à l'une des familles listées Fig. 0.8) qui est modifié chimiquement par un ou plusieurs motifs capable(s) d'induire l'extinction de la fluorescence, en jouant avec les phénomènes photophysiques précédemment décrits, et qui est réactif vis-à-vis de l'analyte que l'on souhaite détecter. On parle souvent de motif "quencher" réactif ou de "quenching reactive unit". Ce dernier peut également être associé au fluorophore *via* l'emploi d'un bras espaceur auto-immolable qui va permettre d'optimiser la stabilité et/ou les propriétés physico-chimiques du pro-fluorophore résultant (*vide infra*). Typiquement, l'approche la plus simple et la plus populaire pour obtenir des pro-fluorophores est de substituer le(s) motif(s) aniline primaire ou phénol d'un fluorophore (e.g., dérivés de 7-amino/hydroxycoumarine et dérivés de fluorescéine ou rhodamine) par un groupement électroattracteur et réactif vis-à-vis de l'analyte ; ce qui va avoir pour conséquence d'altérer le caractère "push-pull" de la molécule et donc d'éteindre sa fluorescence⁶⁸. On dira dans ce cas que l'aniline ou le phénol est un centre fluorogénique ou dans un langage plus imagé, un interrupteur de fluorescence. La réaction de déprotection de l'aniline ou du phénol induite par l'analyte va permettre de libérer le fluorophore et donc d'obtenir une réponse de type "Off-On" (on rencontre aussi souvent le terme "Turn-On" dans la littérature, Fig. 0.20A)⁶⁹. Cette exaltation de fluorescence peut également être obtenue *via* une réaction d'addition ou de complexation de l'analyte (Fig. 0.20B). Quelques exemples illustrant ces deux modes d'activation des pro-fluorophores sont présentés Fig. 0.21 et Fig. 0.22. Il est également possible de concevoir des pro-fluorophores donnant une réponse de type ratiométrique. Le principal avantage des pro-fluorophores (mais aussi des autres classes de sondes fluorescentes intelligentes) est de pouvoir détecter *in situ* et en temps réel l'analyte ciblé, en minimisant le bruit de fond inhérent à toute analyse de fluorescence réalisée dans un milieu biologique complexe.

⁶⁸ Pour une revue complète sur la modulation "chimique" du caractère "push-pull" des fluorophores, voir : F. Bures, *RSC Adv.*, **2014**, (4), 58826-58851.

⁶⁹ Pour deux revues sur le sujet, voir : a) M. E. Jun, B. Roy et K. H. Ahn, *Chem. Comm.*, **2011**, (47), 7583-7601 ; b) Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin et J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 5003-5015.

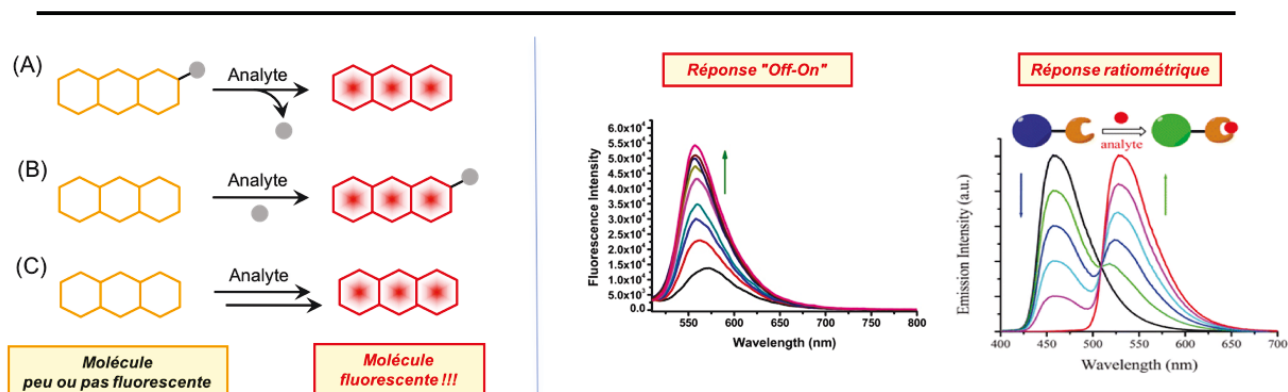


Figure 0.20 - Principe des pro-fluorophores. (à gauche) Structure générale et réaction chimique mise en jeu lors de l'activation par l'analyte ciblé : (A) élimination avec rupture d'une ou plusieurs liaisons (covalente ou dative) ; (B) addition ou complexation avec formation d'une ou plusieurs liaisons (covalente ou dative) ; (C) réaction en cascade (ou réaction tandem et domino). Illustration reproduite à partir de la figure 1 de la revue [38c]. (à droite) Les deux réponses possibles suite à la réaction avec l'analyte.

Il est important de préciser que les performances d'un pro-fluorophore sont intimement liées à l'efficacité de la réaction libérant le fluorophore (on parle souvent de réaction fluorogénique). En effet, elle doit être efficace en milieu biologique, c'est-à-dire qu'elle doit fonctionner dans un environnement aqueux, à pH physiologique et en présence de nombreux interférents (protéines, thiols et autres réducteurs biologiques, ...) dont les concentrations locales sont parfois élevées. De plus, les métabolites issus de sa décomposition (e.g., produits issus de la décomposition de la "reactive quenching unit" et / ou d'un bras espaceur auto-immolable) doivent présenter la plus faible toxicité possible. Par ailleurs, le pro-fluorophore et son fluorophore parent (qui sera libéré *in situ*) doivent présenter des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques favorables (stabilité, sélectivité, toxicité, clairance). Certains inconvénients majeurs peuvent être rencontrés avec les pro-fluorophores. D'une part le "quenching" de la sonde n'est pas toujours de 100% et dans certains cas, cela entraîne un bruit de fond élevé qui impacte négativement le rapport signal / bruit et donc la résolution spatiale de la détection. D'autre part, la stabilité parfois limitée en milieu physiologique peut conduire à des faux positifs. En effet, les pro-fluorophores activés *via* le mécanisme décrit Fig. 0.20A sont souvent des dérivés d'aniline ou de phénol caractérisés par la présence d'un centre électrophile (au niveau du lien covalent avec la "quenching reactive unit") qui peut parfois réagir avec l'eau ou d'autres nucléophiles biologiques et conduire à une élimination prématurée du fluorophore qui est un bon groupe partant.

Pour surmonter ces problèmes, plusieurs stratégies ont été récemment développées. On peut mentionner l'approche "synthèse *in situ* de fluorophores" à partir d'un précurseur "cagé" *via* des réactions domino déclenchées par l'analyte ciblé (voir Fig 0.20C pour le principe simplifié et Fig. 0.23 pour deux exemples de formation *in situ* d'un cœur fluorescent émettant dans le bleu) qui est au centre de ce travail de thèse et qui sera discutée en détails dans les chapitres suivants. D'autres approches reposent sur la conception de pro-fluorophores possédant plusieurs "quenching (reactive) units" (généralement deux ou trois) identiques ou différentes au sein de leur structure. L'activation de ces systèmes pro-fluorescents est à rapprocher de celle des portes logiques moléculaires fluorescentes de type "ET" (dans la suite du manuscrit, on emploiera le terme anglais "logic gates" de type "AND") dont nous allons dire quelques mots dans la partie suivante.

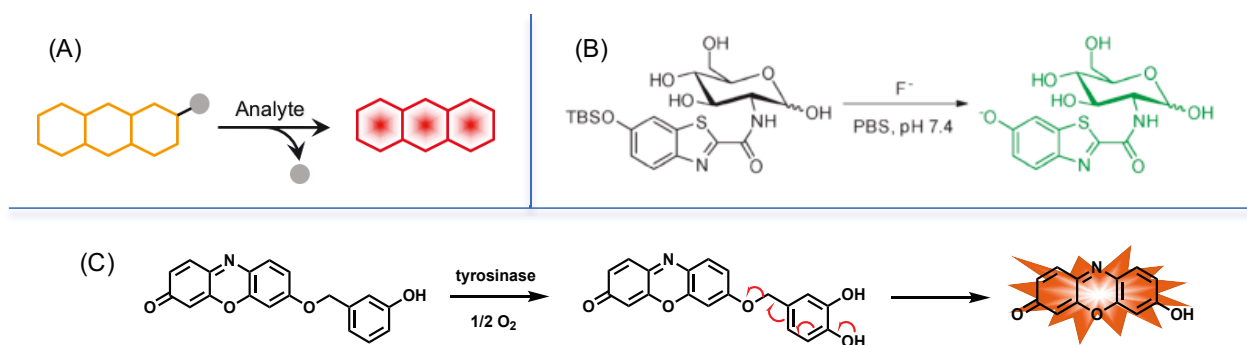


Figure 0.21 - Deux exemples de pro-fluorophores illustrant la stratégie d'activation décrite Fig. 0.20A. (B) Détection des ions fluorure via une réaction de déprotection d'un éther silylé⁷⁰. Illustration issue de la référence [70]. (C) Détection de la tyrosinase via une réaction d'oxydation de phénol (catalysée par l'enzyme) suivie d'une élimination 1,6 d'un bras espaceur auto-immolable de type PHBA pour libérer la résorufine fluorescente⁷¹.

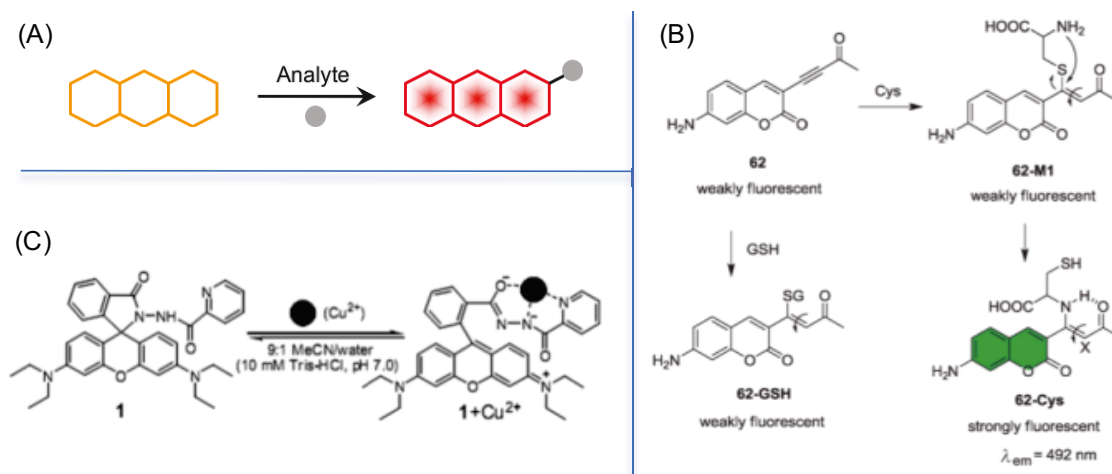


Figure 0.22 - Deux exemples de pro-fluorophores illustrant la stratégie d'activation décrite Fig. 0.20B. (B) Détection sélective de la cystéine (vs. glutathion) via une réaction de Michael et un réarrangement ("S-to-N alkyl shift") qui favorise la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Celle-ci entraîne une rigidification de la double liaison et empêche sa photo-isomérisation à l'état excité (à l'origine du "quenching" de fluorescence), la fluorescence du cœur 7-aminocoumarine est alors observée⁷². (C) Détection des ions Cu(II) via l'ouverture du spirolactame d'un dérivé N-picolinyl rhodamine B, révélant ainsi la fluorescence de ce xanthène⁷³. Illustrations issues des références [72] et [73].

⁷⁰ B. Ke, W. Chen, N. Ni, Y. Cheng, C. Dai, H. Dinh et B. Wang, *Chem. Comm.*, **2013**, (49), 2494-2496.

⁷¹ X. Wu, X. Li, H. Li, W. Shi et H. Ma, *Chem. Comm.*, **2017**, (53), 2443-2446.

⁷² Y. Liu, S. Zhang, X. Lv, Y.-Q. Sun, J. Liu et W. Guo, *Analyst*, **2014**, (139), 4081-4087.

⁷³ Y.-L. Liu, Y. Sun, J. Du, X. Lv, Y. Zhao, M.-L. Chen, P. Wang et W. Guo, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, (9), 432-437.

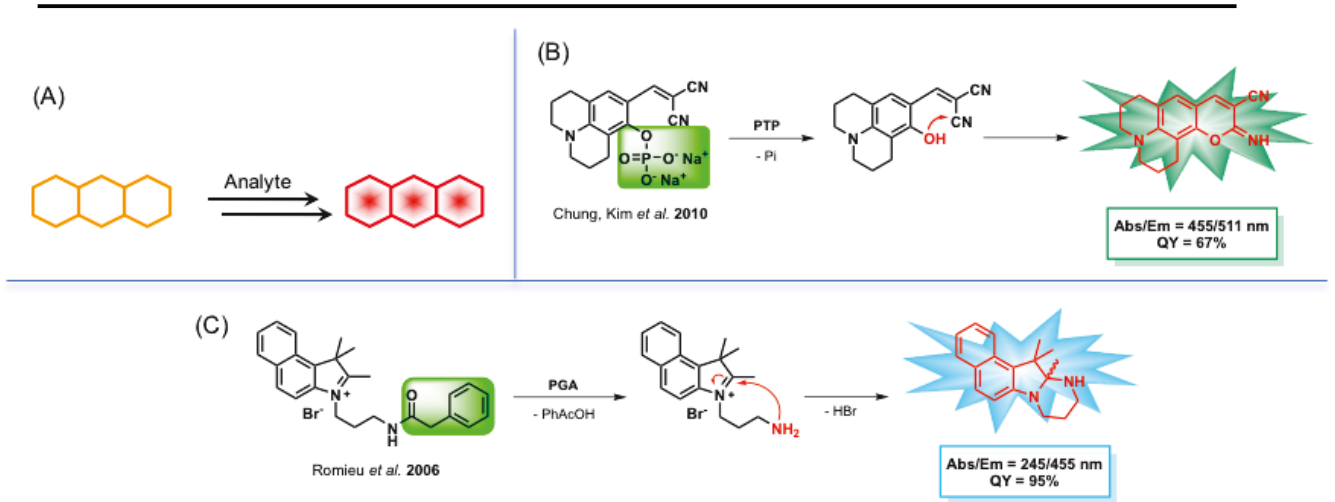


Figure 0.23 - Deux exemples illustrant le concept de "synthèse in situ de fluorophores" déclenchée par l'analyte ciblé. (B) Détection de la protéine tyrosine phosphatase (PTP) qui déclenche une réaction de Pinner conduisant à la formation d'une 7-N,N-dialkylamino-2-iminocoumarine⁷⁴. (C) Détection de la penicillin G acylase (PGA) qui déclenche une réaction de Mannich intramolécule conduisant à la formation d'un dérivé pyrazino-benz[e]indole⁷⁵. Illustrations issues de la revue [76].

⁷⁴ T.-H. Kim, H. Kim, Y. Choi et Y. Kim, *Chem. Comm.*, **2011**, (47), 9825-9827.

⁷⁵ G. Clavé, A. Bernardin, M. Massonneau, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, (47), 6229-6233.

⁷⁶ A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 1294-1306.

0.2. "Logic gates" moléculaires fluorescents

0.2.1. Généralités

Les bases théoriques des portes logiques sont posées en 1705 par G.W. Leibniz⁷⁷ qui combine les principes de l'arithmétique avec ceux de la logique en utilisant le système binaire. Ces concepts seront ensuite repris et des circuits électroniques vont être conçus pour pouvoir mimer les différentes fonctions logiques ; ils vont devenir essentiels avec l'avènement de l'ère informatique. Ainsi une fonction (porte) logique consiste à générer une donnée de sortie ("output" : 1 (vrai) ou 0 (faux)) à partir de données d'entrées ("inputs") et d'opérations logiques prédéfinies (l'ensemble des fonctions logiques de l'algèbre de Boole et leurs résultats sont présentés Fig. 0.24).

Input (A)	Output			
0	0	1	1	0
1	1	0	1	0
Name	YES	NOT	PASS 1	PASS 0
Symbol				
Algebraic expression	A	\bar{A}	1	0

Input		Output						Output		Output	
(A)	(B)	AND	OR	INH	XOR	XNOR	NOR	(Carry)	(Sum)	(Borrow)	(Diff.)
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Name		AND	OR	INH	XOR	XNOR	NOR	Half-adder		Half-subtractor	
Symbol											
Algebraic expression		$A \cdot B$	$A + B$	$\bar{A} \cdot B$	$A \bar{B} + \bar{A} B$	$\overline{A \bar{B} + \bar{A} B}$	$\overline{A + B}$				

Figure 0.24 - L'ensemble des fonctions logiques de l'algèbre de Boole. (en haut) Celles fonctionnant avec une seule valeur d'entrée. (en bas) Celles fonctionnant avec deux valeurs d'entrée. Les portes logiques "AND", "OR" et "INH" sont parmi celles les plus utilisées dans la conception de "logic gates" moléculaires. Figure issue de la revue [78].

⁷⁷ Pour un livre sur le sujet, voir : M. Davis, *The Universal Computer: The Road from Leibniz to Turing*, CRC Press, 2ème édition, 2011.

⁷⁸ A. P. de Silva et S. Uchiyama, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, (2), 399-410.

Concernant les "logic gates" moléculaires⁷⁹, la preuve de concept est apportée par A. P. de Silva en 1993⁸⁰ avec un travail publié dans *Nature* sur la conception d'un système fluorogénique de type "Off-On" produisant son signal de sortie sous l'effet conjugué de deux analytes (proton H⁺ et cation Na⁺) capables de mettre fin au phénomène de PET réducteur à l'origine de l'extinction de la fluorescence du cœur anthracène (Fig. 0.25). Actuellement, de nombreux groupes de recherche académiques⁸¹ (dont le nôtre) s'intéressent à cette thématique dans l'optique de développer des schémas de détection fluorogéniques originaux et performants qui pourront avoir des applications notamment en bioanalyse.

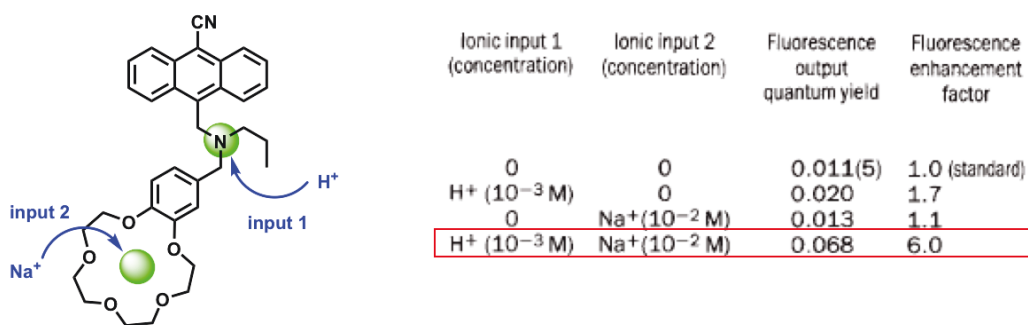


Figure 0.25 - Preuve de concept historique des "molecular logic gates" publiée par le groupe de A. P. de Silva. (à gauche) La structure de la sonde fluorogénique mettant en jeu un double phénomène de PET réducteur. (à droite) Les principaux résultats obtenus une fois cette sonde mise en présence d'un seul analyte ou de la paire d'analytes⁸⁰.

Ainsi pour le développement de biosenseurs, trois éléments sont essentiels : l'analyte que l'on veut détecter (acide nucléique, protéine, petite molécule ou ion), le mécanisme de reconnaissance qui doit être spécifique de cet analyte et enfin le signal de sortie de nature physique ou chimique rapportant de façon qualitative ou quantitative la présence de l'analyte dans le milieu considéré. Pour les "logic gates", la conception doit prendre en compte la multiplicité des analytes (activation concurrente, simultanée ou séquentielle) et le fait d'accepter que le signal de sortie soit seulement qualitatif (réponse oui / non).

⁷⁹ Pour des revues sur les "logic gates" moléculaires, voir : a) A. Prasanna de Silva et N. D. McClenaghan, *Chem. - Eur. J.*, **2004**, (10), 574-586 ; b) J. Andreasson et U. Pischel, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, (39), 174-188 ; c) A. Prasanna de Silva, *Chem. - Asian J.*, **2011**, (6), 750-766 ; d) N. Kaur, *Curr. Org. Chem.*, **2014**, (18), 2892-2909 ; e) Y.-H. Lai, S.-C. Sun et M.-C. Chuang, *Biosensors*, **2014**, (4), 273-300 ; f) J. Andreasson et U. Pischel, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 1053-1069. Pour un chapitre de livre : g) C. Karnati et H.-F. Ji, *Molecular logic gates, Micromanufacturing and Nanotechnology*, Springer, **2006**. Pour les possibilités d'utilisation de ces "logic gates" moléculaires en tant que mémoires et processeurs, voir : h) C. P. Collier, E. W. Wong, M. Belohradsky, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, P. J. Kuekes, R. S. Williams et J. R. Heath, *Science*, **1999**, (285), 391-394. Pour un numéro spécial du journal *ChemPhysChem* consacré au développement de la logique moléculaire, voir "Special Issue: Molecular Logic", <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphc.v18.13/issuetoc> (consulté le 07/08/2017).

⁸⁰ A. Prasanna de Silva, H. Q. N. Gunaratne et C. P. McCoy, *Nature*, **1993**, (364), 42-44.

⁸¹ Les groupes de recherche travaillant sur les "molecular logic gates" sont nombreux (> 500) et ils sont représentés sur une mappemonde, figure 1 de la publication suivante : B. O. F. McKinney, B. Daly, C. Yao, M. Schroeder et A. Prasanna de Silva, *ChemPhysChem*, **2017**, (18), 1760-1766.

Parmi les applications autres que les sondes fluorogéniques "classiques" développées dans le paragraphe suivant, nous pouvons citer les travaux des groupes de J. Wang et E. Katz sur les "logic gates" enzymatiques (Fig. 0.26)⁸² et les nombreux travaux portant sur les "logic gates" construits à partir de molécules d'acides nucléiques (un exemple est donné Fig. 0.27)⁸³. Dans tous les cas, l'identification de biomolécules par le biais de "logic gates" moléculaires devrait aboutir au développement futur de systèmes "lab-on-molecule" combinant la détection et la logique dans un but de diagnostic, de soins ou d'analyses, le tout regroupé dans un format portatif voire implantable / injectable.

⁸² Pour des revues sur le sujet, voir : a) E. Katz et S. Minko, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 3493-3500 ; b) E. Katz, A. Poghossian et M. J. Schoning, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, (409), 81-94 ; c) E. Katz, *ChemPhysChem*, **2017**, (18), 1688-1713.

⁸³ Pour une revue sur le sujet, voir : C. Wu, S. Wan, W. Hou, L. Zhang, J. Xu, C. Cui, Y. Wang, J. Hu et W. Tan, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 3723-3734.

No	Injury	Enzyme Cascade	Logic Gate	Truth Table																				
1.	Soft Tissue Injury (STI)			<table border="1"> <thead> <tr> <th>CK</th> <th>LDH</th> <th>Output</th> <th>Biomedical conclusions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>Normal</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>Fitness/ Cardiac</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>Cardiac</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>STI</td> </tr> </tbody> </table>	CK	LDH	Output	Biomedical conclusions	0	0	1	Normal	0	1	1	Fitness/ Cardiac	1	0	1	Cardiac	1	1	0	STI
CK	LDH	Output	Biomedical conclusions																					
0	0	1	Normal																					
0	1	1	Fitness/ Cardiac																					
1	0	1	Cardiac																					
1	1	0	STI																					
2.	Traumatic Brain Injury (TBI)			<table border="1"> <thead> <tr> <th>NE</th> <th>GLU</th> <th>Output</th> <th>Biomedical conclusions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Normal</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>Epilepsy</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Anomalous</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>TBI</td> </tr> </tbody> </table>	NE	GLU	Output	Biomedical conclusions	0	0	0	Normal	0	1	0	Epilepsy	1	0	0	Anomalous	1	1	1	TBI
NE	GLU	Output	Biomedical conclusions																					
0	0	0	Normal																					
0	1	0	Epilepsy																					
1	0	0	Anomalous																					
1	1	1	TBI																					
3.	Liver Injury (LI)			<table border="1"> <thead> <tr> <th>ALT</th> <th>LDH</th> <th>Output</th> <th>Biomedical conclusions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>Normal</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>Fitness/ Cardiac</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>Hepatitis</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>LI</td> </tr> </tbody> </table>	ALT	LDH	Output	Biomedical conclusions	0	0	1	Normal	0	1	1	Fitness/ Cardiac	1	0	1	Hepatitis	1	1	0	LI
ALT	LDH	Output	Biomedical conclusions																					
0	0	1	Normal																					
0	1	1	Fitness/ Cardiac																					
1	0	1	Hepatitis																					
1	1	0	LI																					
4.	Abdominal Trauma (ABT)			<table border="1"> <thead> <tr> <th>LAC</th> <th>LDH</th> <th>Output</th> <th>Biomedical conclusions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Normal</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>Fitness/ Cardiac</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Exertion</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>ABT</td> </tr> </tbody> </table>	LAC	LDH	Output	Biomedical conclusions	0	0	0	Normal	0	1	0	Fitness/ Cardiac	1	0	0	Exertion	1	1	1	ABT
LAC	LDH	Output	Biomedical conclusions																					
0	0	0	Normal																					
0	1	0	Fitness/ Cardiac																					
1	0	0	Exertion																					
1	1	1	ABT																					
5.	Hemorrhagic Shock (HS)			<table border="1"> <thead> <tr> <th>NE</th> <th>GLC</th> <th>Output</th> <th>Biomedical conclusions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Normal</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>Sugar intake</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Anomalous</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>HS</td> </tr> </tbody> </table>	NE	GLC	Output	Biomedical conclusions	0	0	0	Normal	0	1	0	Sugar intake	1	0	0	Anomalous	1	1	1	HS
NE	GLC	Output	Biomedical conclusions																					
0	0	0	Normal																					
0	1	0	Sugar intake																					
1	0	0	Anomalous																					
1	1	1	HS																					
6.	Oxidative Stress (OS)			<table border="1"> <thead> <tr> <th>GSSG</th> <th>GR</th> <th>Output</th> <th>Biomedical conclusions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Normal</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>Anomalous</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>Fitness</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>OS</td> </tr> </tbody> </table>	GSSG	GR	Output	Biomedical conclusions	0	0	0	Normal	0	1	0	Anomalous	1	0	0	Fitness	1	1	1	OS
GSSG	GR	Output	Biomedical conclusions																					
0	0	0	Normal																					
0	1	0	Anomalous																					
1	0	0	Fitness																					
1	1	1	OS																					

No.	Injury	Biomarkers	Physiological	Pathological	Output
1	Soft tissue injury (STI)	Creatine kinase (CK) Lactate dehydrogenase (LDH)	100 U L ⁻¹ 150 U L ⁻¹	710 U L ⁻¹ 1000 U L ⁻¹	NADH decrease
2	Traumatic brain injury (TBI)	Norepinephrine (NE) Glutamate (GLU)	2.2 nM 40 μM	3.5 μM 140 μM	Norepinequinone increase
3	Liver injury (LI)	Alanine transaminase (ALT) Lactate dehydrogenase (LDH)	20 U L ⁻¹ 150 U L ⁻¹	200 U L ⁻¹ 1000 U L ⁻¹	NADH decrease
4	Abdominal trauma (ABT)	Lactate (LAC) Lactate dehydrogenase (LDH)	1.6 mM 150 U L ⁻¹	6 mM 1000 U L ⁻¹	NADH increase
5	Hemorrhagic shock (HS)	Norepinephrine (NE) Glucose (GLC)	2.2 nM 4 mM	3.5 μM 26 mM	Norepinequinone increase
6	Oxidative stress (OS)	Glutathione disulfide (GSSG) Glutathione reductase (GR)	150 μM 556 U L ⁻¹	400 μM 650 U L ⁻¹	GSH increase

Figure 0.26 - "Logic gates" moléculaires utilisant des enzymes et pouvant être insérés dans un micro-dispositif afin de déterminer le(s) type(s) de blessures enduré(s) par le patient (développé pour être porté par des soldats sur une zone de conflit afin d'établir au plus vite un diagnostic et d'apporter les soins adaptés en cas de blessures). Présentation de six pathologies différentes ainsi que leurs biomarqueurs ("inputs") et leurs modes de détection ("output") suivant la cascade enzymatique impliquée⁸⁴. Illustrations issues de la référence [84].

⁸⁴ J. Halamek et al., *Analyst*, 2010, (135), 2249-2259.

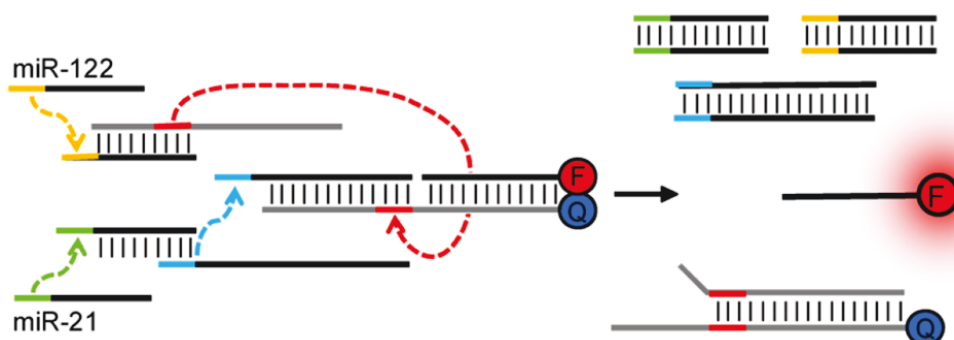


Figure 0.27 - Diagramme schématisé d'un "logic gate" de type "AND" pour la détection de microARNs⁸⁵ : le miR-21 (sur-régulé dans certaines tumeurs solides) et le miR-122 (indicateur d'une déficience hépatique). Cette méthode repose sur le déplacement successif de brins d'ARN plus ou moins complémentaires pour aboutir à la séparation d'un double brin marqué par une paire fluorophore-quencheur, allumant ainsi la sonde au sein de cellules exprimant ces deux microARNs⁸⁶. Illustration issue de la référence [86].

0.2.2. Sondes fluorogéniques multi-déclenchables⁸⁷

Cette partie va mettre en lumière des exemples de sondes fluorogéniques (principalement des pro-fluorophores et des sondes FRET) qui ont été conçues pour détecter un ou plusieurs analytes par mesure de fluorescence et selon des opérations logiques que nous venons d'évoquer⁸⁸. Le mode d'activation met en jeu plusieurs événements (bio)chimiques se produisant de façon séquentielle ou simultanée. Le terme de sondes fluorogéniques multi-déclenchables est souvent employé pour les qualifier.

Deux stratégies sont possibles pour concevoir ces sondes. La première, décrite dans quelques publications, repose généralement sur l'introduction d'une seule "quenching reactive unit" sur le fluorophore, qui présente la particularité d'être réactive vis-à-vis de deux analytes différents. Soit ces deux analytes réagissent de façon séquentielle, soit ils réagissent de façon simultanée et indépendante pour donner respectivement des réponses de type "AND" ou "OR".

⁸⁵ Les microARN (ou miARN) sont propres aux cellules eucaryotes et régulent l'expression d'un gène en s'appariant à la séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible qui conduit à sa dégradation et donc à sa non-traduction par l'organisme.

⁸⁶ J. Hemphill et A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, (135), 10512-10518.

⁸⁷ Pour exemples de sondes fluorogéniques fonctionnant comme des "logic gates" autres que ceux de type "OR" et "AND", voir les références suivantes : a) D. Zhang, J. Su, X. Ma et H. Tian, *Tetrahedron*, **2008**, (64), 8515-8521 ; b) H.-S. Kim, S. Angupillai et Y.-A. Son, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2016**, (222), 447-458 ; c) Madhuprasad, M. P. Bhat, H.-Y. Jung, D. Losic et M. D. Kurkuri, *Chem. - Eur. J.*, **2016**, (22), 6148-6178 ; d) H. Ding, B. Li, S. Pu, G. Liu, D. Jia et Y. Zhou, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2017**, (247), 26-35 ; e) Z.-H. Fu, L.-B. Yan, X. Zhang, F.-F. Zhu, X.-L. Han, J. Fang, Y.-W. Wang et Y. Peng, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, (15), 4115-4121 ; f) D. Sarkar, P. Ghosh, S. Gharami, T. K. Mondal et N. Murmu, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2017**, (242), 338-346 ; g) L. Wang, Y. Tian, L. Ding, B. Zhao, X. He, B. Song et S. Liu, *RSC Adv.*, **2017**, (7), 16916-16923.

⁸⁸ Pour des revues sur le sujet : a) K. Chen, Q. Shu et M. Schmittel, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 136-160 ; b) M. Chhatwal, A. Kumar, V. Singh, R. D. Gupta et S. K. Awasthi, *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, (292), 30-55 ; c) A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 1294-1306 ; d) J. Wu, B. Kwon, W. Liu, E. V. Anslyn, P. Wang et J. S. Kim, *Chem. Rev.*, **2015**, (115), 7893-7943 ; e) L. Yu, S. Wang, K. Huang, Z. Liu, F. Gao et W. Zeng, *Tetrahedron*, **2015**, (71), 4679-4706.

Pour les sondes fluorogéniques de type "OR"⁸⁹, la réponse fluorescente peut être différente ou pas suivant l'analyte rencontré (différence en termes d'intensité ou de valeur des maxima d'excitation / émission, pour un exemple, voir Fig. 0.28A). Pour les sondes de type "AND", la réponse fluorescente peut être observée uniquement après la réaction successive des deux analytes⁹⁰ (pour un exemple, voir Fig. 0.28B), ou bien deux réponses fluorescentes différentes sont successivement obtenues⁹¹ (voir Fig. 0.30A).

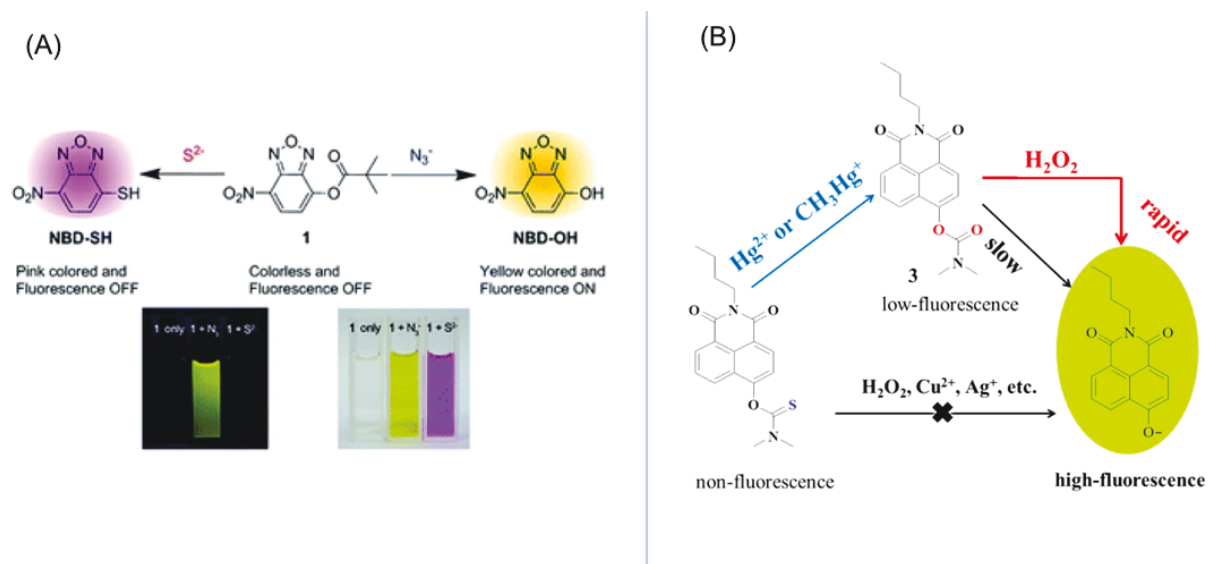


Figure 0.28 Exemples de pro-fluorophores possédant une seule "quenching reactive unit" et fonctionnant comme des "logic gates" moléculaires de type "AND" et "OR". (A) Pro-fluorophore permettant la détection indépendante des anions azoture (détection chromogénique et fluorescente de type "Off-On") et sulfure (détection chromogénique)^{89b}. (B) Pro-fluorophore activé successivement par le cation $Hg(II)$ (ou le cation $MeHg(I)$) et H_2O_2 , pour donner une réponse fluorogénique "Off-On"^{90e}. Illustrations issues des références [89b] et [90e].

La majorité des sondes disposent de deux sites de déclenchement, soit pour cibler le même analyte^{66,92}, ou bien deux analytes différents⁹³.

⁸⁹ Pour des exemples, voir : a) D. P. Murale, H. Kim, W. S. Choi, Y. Kim et D. G. Churchill, *RSC Adv.*, **2014**, (4), 46513-46516 ; b) H. W. Kim, M. G. Choi, H. Park, J. W. Lee et S.-K. Chang, *RSC Adv.*, **2015**, (5), 4623-4627 ; c) S. Samanta, B. K. Datta, M. Boral, A. Nandan et G. Das, *Analyst*, **2016**, (141), 4388-4393 ; d) K. Dou, Q. Fu, G. Chen, F. Yu, Y. Liu, Z. Cao, G. Li, X. Zhao, L. Xia, L. Chen, H. Wang et J. You, *Biomaterials*, **2017**, (133), 82-93.

⁹⁰ Pour de exemples, voir : a) X. Sun, Y. Xu, W. Zhu, C. He, L. Xu, Y. Yang et X. Qian, *Anal. Methods*, **2012**, (4), 919-922 ; b) D. P. Murale, H. Liew, Y.-H. Suh et D. G. Churchill, *Anal. Methods*, **2013**, (5), 2650-2652 ; c) A. P. Singh, D. P. Murale, Y. Ha, H. Liew, K. M. Lee, A. Segev, Y.-H. Suh et D. G. Churchill, *Dalton Trans.*, **2013**, (42), 3285-3290 ; d) M. Prost et J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, **2014**, (50), 14896-14899 ; e) W. Shu, L. Yan, J. Liu, Z. Wang, S. Zhang, C. Tang, C. Liu, B. Zhu et B. Du, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2015**, (54), 8056-8062 ; f) S. Luo, Y. Liu, F. Wang, Q. Fei, B. Shi, J. An, C. Zhao et C.-H. Tung, *Analyst*, **2016**, (141), 2879-2882 ; g) C. Yin, F. Huo, N. P. Cooley, D. Spencer, K. Bartholomew, C. L. Barnes et T. E. Glass, *ACS Chem. Neurosci.*, **2017**, (8), 1159-1162.

⁹¹ Pour un exemple, voir : Y.-Q. Sun, J. Liu, H. Zhang, Y. Huo, X. Lv, Y. Shi et W. Guo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, (136), 12520-12523.

⁹² Pour des exemples de sondes à thiols ou H_2S , voir : a) C. Zhang, L. Wei, C. Wei, J. Zhang, R. Wang, Z. Xi et L. Yi, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 7505-7508 ; b) H. Zhang, C. Zhang, R. Liu, L. Yi et H. Sun, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 2029-2032 ; c) S. K. Asthana, A. Kumar, Neeraj, Shweta et K. K. Upadhyay, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, (14), 3690-3694 ; d) C. Wei, R. Wang, C. Zhang, G. Xu, Y. Li, Q.-Z. Zhang, L.-Y. Li, L. Yi et Z. Xi, *Chem. - Asian J.*, **2016**, (11), 1376-1381 ; e) C. Zhang, R. Wang, L. Cheng, B. Li, Z. Xi et L. Yi, *Sci. Rep.*, **2016**, (6), 30148 ; f) H. Zhang, W. Feng et G. Feng, *Dyes Pigm.*, **2017**, (139), 73-78.

⁹³ Dans le cas où les deux analytes sont deux enzymes différentes (souvent interdépendantes), il est parfois difficile de définir sans ambiguïté le type "AND" ou "OR" de ces sondes fluorogéniques, en particulier pour celles mettant

Dans ce second cas, soit la réaction des deux analytes est nécessaire pour obtenir une réponse fluorescente (sondes fluorogéniques de type "AND")^{76,94} soit la réaction de chacun des deux analytes avec sa "position" (ou sa "quenching reactive unit") dédiée conduit à une émission de fluorescence bien distincte (détection orthogonale) ou une simple modulation des propriétés spectrales du même chromophore (sondes fluorogéniques de type "OR")⁹⁵. Dans ce dernier cas, si les deux espèces sont présentes, il y en a une qui a souvent un effet plus marqué sur la photophysique du système et c'est sa réponse qui sera majoritairement observée.

L'intérêt de fonctionnaliser un fluorophore avec plusieurs "quenching units" réactives vis-à-vis du même analyte est multiple : (1) efficacité du "quenching" accrue donc diminution du bruit de fond⁹², (2) limitation du nombre de faux positifs et (3) différenciation possible entre deux analytes présentant des réactivités proches (typiquement, les thiols biologiques comme la cystéine, l'homocystéine, le glutathion et le gazotransmetteur H₂S)⁹⁶. Les sondes fluorogéniques de type "OR" peuvent faciliter la mise en œuvre pratique des dosages sériés (on utilise un seul réactif pour détecter plusieurs analytes au sein d'un même échantillon). Dans le contexte biomédical, l'intérêt principal des sondes fluorogéniques de type "AND", réside sans doute dans le fait de pouvoir confirmer la présence au sein d'un même échantillon ou d'un même milieu biologique de deux événements biochimiques corrélés au même dysfonctionnement cellulaire qui conduit à la pathologie (on parlera dans ce cas de biomarqueurs). Le but étant de mettre au point des protocoles de diagnostic plus robustes et plus fiables que ceux actuellement disponibles, en limitant le nombre de faux positifs obtenus lors de la détection et / ou le dosage d'un seul biomarqueur. En conclusion de cette partie, quelques exemples supplémentaires de sondes fluorogéniques multi-déclenchables sont présentés Fig. 0.29 et Fig. 0.30.

en jeu le phénomène de FRET et l'hydrolyse de plusieurs substrats enzymatiques marqués par des paires fluorophore-quencher ou fluorophore-fluorophore. Pour des exemples, voir : a) Y. Li, H. Wang, J. Li, J. Zheng, X. Xu et R. Yang, *Anal. Chem.*, **2011**, (83), 1268-1274 ; b) S.-Y. Li, L.-H. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu et X.-Z. Zhang, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 14520-14523 ; c) H. Cheng, S.-Y. Li, H.-R. Zheng, C.-X. Li, B.-R. Xie, K.-W. Chen, B. Li et X.-Z. Zhang, *Anal. Chem.*, **2017**, (89), 4349-4354. Cas particulier avec une paire de fluorophores AIE, voir : Y. Yuan, C.-J. Zhang, R. T. K. Kwok, D. Mao, B. Z. Tang et B. Liu, *Chem. Sci.*, **2017**, (8), 2723-2728.

⁹⁴ Pour les principaux exemples publiés dans la littérature (incluant également quelques sondes FRET), voir : a) L. Yuan, W. Lin, Y. Xie, B. Chen et S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, (134), 1305-1315 ; b) J. L. Klockow, K. S. Hettie, K. E. Secor, D. N. Barman et T. E. Glass, *Chem.-Eur. J.*, **2015**, (21), 11446-11451 ; c) I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi et A. Ojida, *Chem. - Eur. J.*, **2015**, (21), 2038-2044 ; d) L. Yi, L. Wei, R. Wang, C. Zhang, J. Zhang, T. Tan et Z. Xi, *Chem. - Eur. J.*, **2015**, (21), 15167-15172 ; e) F. Yu, M. Gao, M. Li et L. Chen, *Biomaterials*, **2015**, (63), 93-101 ; f) P. Zhang, J. Li, B. Li, J. Xu, F. Zeng, J. Lv et S. Wu, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 4414-4416 ; g) C.-G. Dai, X.-L. Liu, X.-J. Du, Y. Zhang et Q.-H. Song, *ACS Sens.*, **2016**, (1), 888-895 ; h) Y. Huang, F. Yu, J. Wang et L. Chen, *Anal. Chem.*, **2016**, (88), 4122-4129 ; i) Y. Wen, F. Xue, H. Lan, Z. Li, S. Xiao et T. Yi, *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, (91), 115-121.

⁹⁵ Pour quelques exemples, voir : a) C. Y. Ang, S. Y. Tan, S. Wu, Q. Qu, M. F. E. Wong, Z. Luo, P.-Z. Li, S. Tamil Selvan et Y. Zhao, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, (4), 2761-2774 ; b) R. Zhang, J. Zhao, G. Han, Z. Liu, C. Liu, C. Zhang, B. Liu, C. Jiang, R. Liu, T. Zhao, M.-Y. Han et Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, (138), 3769-3778 ; c) Q. Fu, G. Chen, Y. Liu, Z. Cao, X. Zhao, G. Li, F. Yu, L. Chen, H. Wang et J. You, *Analyst* **2017**, (142), 1619-1627 ; d) H. Li, P. Zhao, N. Zou, H. Wang et K. Sun, *Tetrahedron Lett.*, **2017**, (58), 30-34.

⁹⁶ Pour des revues sur les sondes fluorogéniques permettant la distinction entre les thiols biologiques et / ou H₂S, voir : a) L.-Y. Niu, Y.-Z. Chen, H.-R. Zheng, L.-Z. Wu, C.-H. Tung et Q.-Z. Yang, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, (44), 6143-6160 ; b) L. Yi et Z. Xi, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, (15), 3828-3839 ; c) C.-X. Yin, K.-M. Xiong, F.-J. Huo, J. C. Salamanca et R. M. Strongin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, sous presse, DOI: 10.1002/anie.201704084.

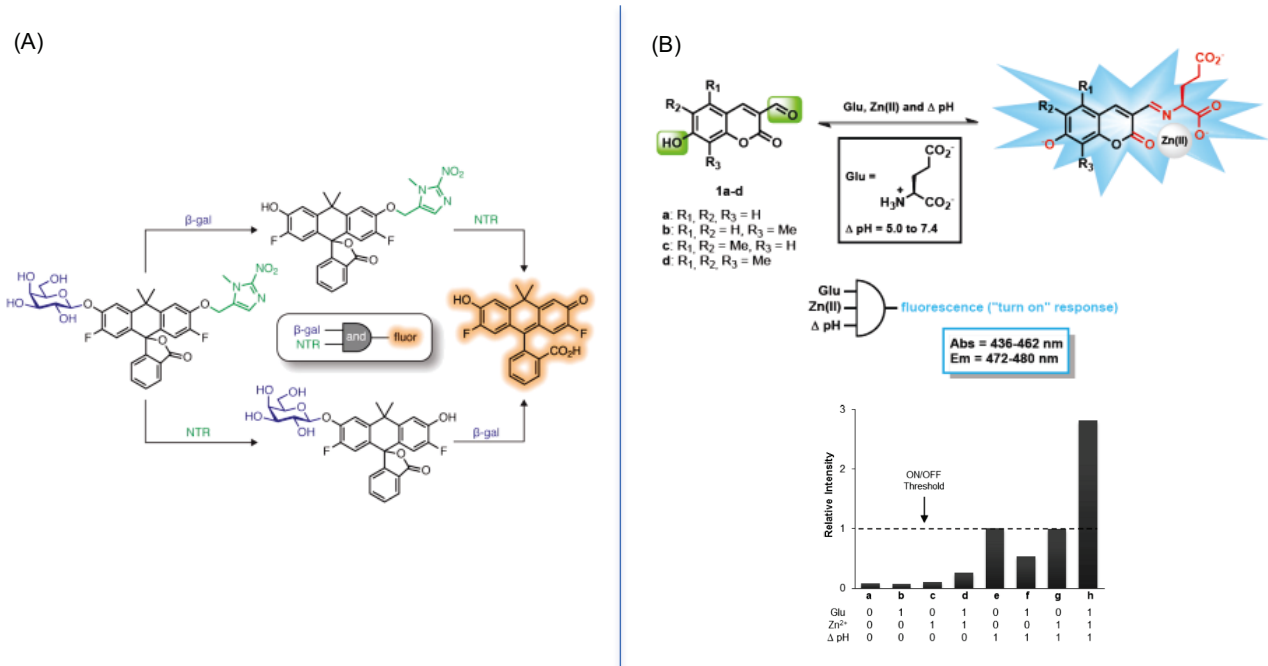


Figure 0.29 - Exemples de pro-fluorophores possédant deux sites de déclenchement et fonctionnant comme des "logic gates" moléculaires de type "AND". (A) Pro-fluorophore possédant deux "quenching reactive units" différentes pour la détection simultanée des enzymes β -Gal et NTR⁹⁷. (B) Pro-fluorophore utilisé pour la détection simultanée du glutamate, des cations Zn(II) et d'une variation de pH dans le contexte de l'imagerie neuronale (étude des dérèglements au niveau de la neurotransmission)⁹⁸. (A) Illustration issue de la référence [97]. (B) Illustration issue de la revue [76].

⁹⁷ J. B. Grimm, T. D. Gruber, G. Ortiz, T. A. Brown et L. D. Lavis, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, (27), 474-480.

⁹⁸ K. S. Hettie, J. L. Klockow et T. E. Glass, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, (136), 4877-4880.

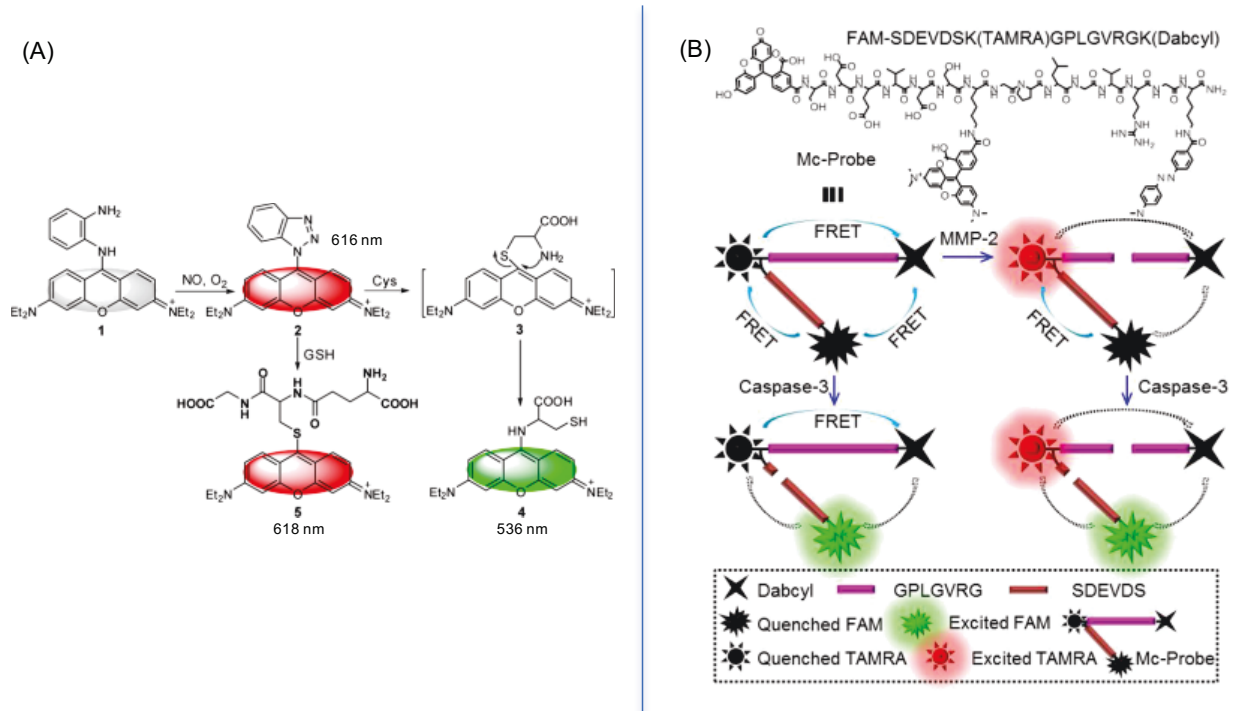


Figure 0.30 - Exemples de sondes fluorogéniques fonctionnant comme des "logic gates" moléculaires. (A) Pro-fluorophore de type "AND" possédant une seule "quenching reactive unit" qui va réagir successivement avec le gazotransmetteur NO et un thiol biologique pour donner deux réponses fluorescentes différentes⁹⁹. (B) Sonde FRET pour la détection de type "AND" ou "OR" de deux protéases : la caspase-3 et la MMP-2 pour une application diagnostique en oncologie. Le clivage séquentiel des deux substrats peptidiques conduit à deux réponses fluorescentes différentes. Seule l'observation simultanée des deux émissions de fluorescence confirme la présence et l'activité des deux protéases^{93c}. Illustrations issues des références [99] et [93c].

⁹⁹ Y.-Q. Sun, J. Liu, H. Zhang, Y. Huo, X. Lv, Y. Shi et W. Guo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, (136), 12520-12523.

0.3. Concepts et outils chimiques pour la conception de sondes fluorogéniques fonctionnelles en milieu physiologique

Dans cette dernière partie, nous allons passer en revue plusieurs concepts et outils chimiques qui ont été développés ou remis au goût du jour au cours des 20 dernières années, notamment dans le contexte des sondes fluorescentes intelligentes pour la bioimagerie ou pour des applications en biochimie. Nous y ferons référence dans la suite du manuscrit car certains d'entre eux seront mis en œuvre dans le cadre de notre projet de "synthèse *in situ* de fluorophores" dont l'une des difficultés majeures réside dans la mise au point de réactions fluorogéniques efficaces en milieu aqueux, à pH physiologique et à 37°C. Ainsi, nous traiterons des réactions bioorthogonales et notamment celles qui ont déjà fait l'objet d'applications en synthèse *in situ*. A ce stade, il est important de définir ce qu'on entend par synthèse *in situ* sachant que dans la littérature, les termes de synthèse *in cellulo* ou de synthèse chimique intracellulaire (voire chimie *in cellulo* ou *in vivo*) sont également employés. La synthèse *in situ* repose sur l'utilisation d'un milieu biologique (idéalement, les cellules vivantes) comme réacteur chimique et tire parfois parti de la réactivité de certains de ses constituants pour les utiliser comme catalyseurs de la réaction. Cela permet de faire construire par les cellules ciblées des nano-objets à partir de précurseurs synthétiques exogènes. Ce concept présente donc un immense potentiel pour de nombreuses applications en biologie et médecine. Notons que pour le marquage de protéines réalisés *in situ*, la réaction doit être hautement spécifique et interférer au minimum avec le milieu. Ensuite, nous dirons quelques mots sur les méthodes de déclenchement photochimiques qui ont l'avantage d'utiliser un réactif (le photon) généralement compatible avec les milieux biologiques pour peu que sa longueur d'onde (et donc son énergie) soit correctement choisie. Enfin, nous terminerons cette étude bibliographique en présentant la chimie des bras espaceurs auto-immolables, historiquement développée pour la conception des prodrugs utilisées en chimie médicinale, et qui a récemment connu des avancées majeures favorisées par le besoin croissant en sondes fluorogéniques toujours plus sophistiquées (e.g., concept d'auto-amplification). Quelques informations majeures sur les moyens "synthétiques" actuellement disponibles pour augmenter le caractère hydrophile (et donc la solubilité en milieu physiologique) des fluorophores organiques et des sondes afférentes seront également fournies.

0.3.1. Réactions bioorthogonales et chimie *in situ*

Parmi les nombreuses réactions fonctionnant en milieu aqueux¹⁰⁰, celles appliquées au milieu biologique doivent répondre à certains critères essentiels comme une haute spécificité qui ne doit pas être compromise par les espèces (bio)chimiques présentes dans ce milieu complexe (bioorthogonalité), une cinétique de réaction élevée et conduire au produit désiré avec de bons rendements (quantitatifs si possible) sans générer de sous-produits toxiques.

¹⁰⁰ Pour des revues sur le sujet, voir : a) U. M. Lindstroem, *Chem. Rev.*, **2002**, (102), 2751-2771 ; b) C.-J. Li, *Chem. Rev.*, **2005**, (105), 3095-3165 ; c) C.-J. Li et L. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, (35), 68-82 ; d) A. Chanda et V. V.

Ces réactions historiquement développées pour la ligation chimique sont nommées réactions bioorthogonales¹⁰¹. Parmi leurs nombreuses applications, on peut mentionner le marquage *in cellulo* ou *in vivo* de biomolécules d'intérêt afin de pouvoir suivre leur devenir en temps réel, par mesure de fluorescence¹⁰², ainsi que la manipulation sélective de systèmes biologiques plus complexes¹⁰³. Il est ainsi possible d'agir sur ces systèmes de façon chimio-sélective afin de stimuler ou d'inhiber une ou plusieurs de leurs fonctions et ce dans un but bien précis. On peut également mentionner la modification chimique sélective (ou "site-specific") d'un ou plusieurs acides aminés d'une séquence peptidique ou d'une protéine¹⁰⁴ dans le but notamment de développer des agents d'imagerie¹⁰⁵ ou des agents thérapeutiques¹⁰⁶ plus efficaces. Parmi les réactions bioorthogonales développées pour être compatibles et donc utilisables dans le contexte *in vivo*¹⁰⁷, nous pouvons citer : la ligation de Staudinger, la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne contraint (connue sous le nom anglais "strain-promoted alkyne-azide cycloaddition", et l'acronyme SPAAC) et plus récemment les ligations tétrazine mettant en jeu des réactions de Diels-Alder à demande inverse (IEDDA) entre une tétrazine et un alcyne ou un alcène contraint (Fig. 0.31A)¹⁰⁸. Il est aussi intéressant de noter le développement de plateformes multivalentes au sein desquelles coexistent plusieurs fonctions chimiques orthogonales entre elles (le plus souvent, elles sont également bioorthogonales) dans le but de pouvoir mettre au point des stratégies de bioconjugaison multiple, selon un mode séquentiel et si possible "one-pot"¹⁰⁹.

Des cas particuliers de chimie *in situ* appliqués à la détection chromogénique d'activité enzymatique peuvent aussi être mis en lumière. Si le cas du X-Gal (voir I.1.4) est l'un des plus connu, les molécules Aldol® développées par la société BIOSYNTH se base également sur une formation du cœur chromogénique après leur activation par l'analyte d'intérêt¹¹⁰.

Fokin, *Chem. Rev.*, **2009**, (109), 725-748 ; e) R. N. Butler et A. G. Coyne, *Chem. Rev.*, **2010**, (110), 6302-6337 ; f) M.-O. Simon et C.-J. Li, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, (41), 1415-1427 ; g) R. N. Butler et A. G. Coyne, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, (14), 9945-9960. Pour des livres sur le sujet, voir : h) P. A. Grieco, *Organic Synthesis in Water*, Springer, **1998** ; i) U. M. Lindstrom, *Organic Reactions in Water: Principles, Strategies and Applications*, Blackwell Publishing, **2007**.

¹⁰¹ Pour une revue et un chapitre de livre sur le sujet, voir : a) M. Zheng, L. Zheng, P. Zhang, J. Li et Y. Zhang, *Molecules*, **2015**, (20), 3190-3205 ; b) A. Godinat, H. Karatas, G. Budin et E. A. Dubikovskaya, *Chemical Ligation for Molecular Imaging, Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification*, John Wiley & Sons, **2017**.

¹⁰² Pour une revue sur ce type d'application, voir : G. B. Cserép, A. Herner et P. Kele, *Meth. Appl. Fluores.*, **2015**, (3), 042001.

¹⁰³ Pour une revue sur le sujet, voir : a) M. J. C. Long, J. R. Poganik et Y. Aye, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, (138), 3610-3622. Pour une revue sur les inhibiteurs covalents, voir : b) R. Lagoutte, R. Patouret et N. Winssinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, (39), 54-63.

¹⁰⁴ Pour une revue sur le sujet, voir : J. N. deGruyter, L. R. Malins et P. S. Baran, *Biochemistry*, **2017**, (56), 3863-3873.

¹⁰⁵ Pour des revues sur le sujet, voir : a) P. Adumeau, S. K. Sharma, C. Brent et B. M. Zeglis, *Mol. Imaging Biol.*, **2016**, (18), 1-17 ; b) P. Adumeau, S. K. Sharma, C. Brent et B. M. Zeglis, *Mol. Imaging Biol.*, **2016**, (18), 153-165.

¹⁰⁶ Pour une revue sur le sujet, voir : Q.-Y. Hu, F. Berti et R. Adamo, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, (45), 1691-1719.

¹⁰⁷ Pour un chapitre de livre sur les applications *in vivo*, voir : C. G. Gordon et C. R. Bertozzi, *In Vivo Applications of Bioorthogonal Chemistries, Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions: Concepts and Applications*, Wiley-VCH, 1ème édition, **2017**.

¹⁰⁸ Pour des revues sur les réactions IEDDA voir : a) S. Mayer et K. Lang, *Synthesis*, **2017**, (49), 830-848 ; b) J. M. J. M. Ravasco, C. M. Monteiro et A. F. Trindade, *Org. Chem. Front.*, **2017**, (4), 1167-1198.

¹⁰⁹ Pour une revue sur le sujet, voir : D. M. Beal et L. H. Jones, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, (51), 6320-6326.

¹¹⁰ A. Bayer, T. Mayer, G. Schabert, U. Spitz, C. Weymuth et L. Wick, *WO2012059583*, **2012** et U. Spitz, L. Wick, A. Bayer, C. Weymuth et G. Schabert, *EP2427431*, **2013**.

Il est intéressant de préciser que le domaine de la synthèse *in situ* ne concerne pas que les réactions évoquées ci-dessus, mais couvre également le domaine des (nano)matériaux intelligents. Ces systèmes sont conçus pour répondre à un stimulus biologique particulier, dans le but notamment de libérer une molécule d'intérêt dans un milieu donné (Fig. 0.31B).

Ils sont appelés matériaux biosensibles¹¹¹ (ou en anglais, "bioresponsive materials") et ils appartiennent à la famille des "gated materials"¹¹². Ils sont utilisés dans diverses applications biomédicales : diagnostic par détection *in vitro* ou imagerie¹¹³ et "drug delivery" notamment.

(A)

Reaction	Reagent X	Reagent Y	Ligation product
Staudinger Ligation (SL)			
Copper-cat. Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)		$\equiv \text{C} \text{---} \text{R}^*$, Cu(I)	
Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC)	R-N ₃		
Inverse Electron Demand Diels-Alder reaction (IED DA)			
Cyanobenzothiazole Condensation with 1,2-aminothiols (CBT-AT)			

(B)

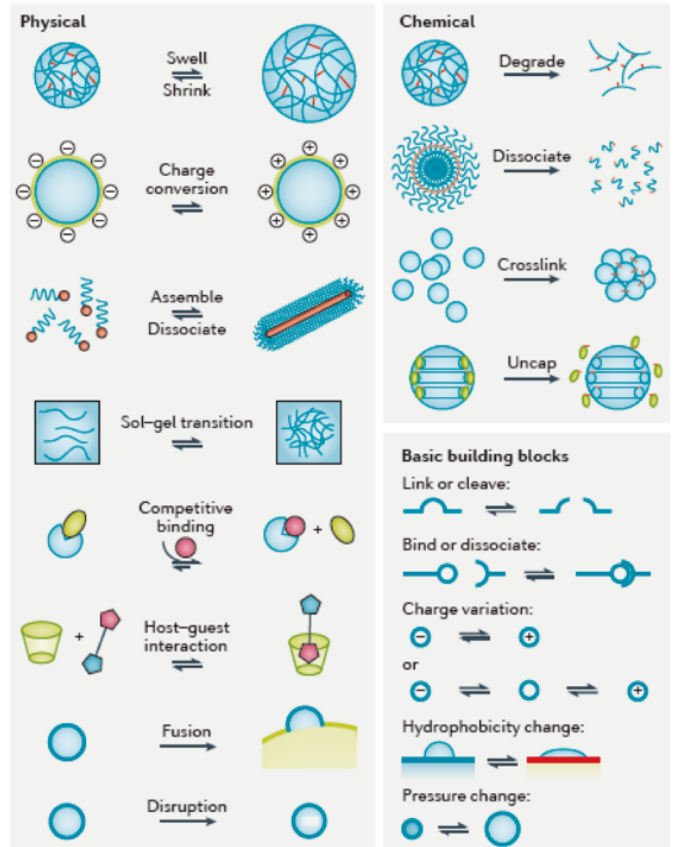


Figure 0.31 - (A) Tableau présentant les principales réactions bioorthogonales utilisées en milieu biologique. (B) Principaux mécanismes d'activation (stimuli physiques et / ou chimiques) des matériaux biosensibles. Illustrations issues des références [101b] et [111a].

¹¹¹ Pour une revue sur les matériaux biosensibles, voir : a) Y. Lu, A. A. Aimetti, R. Langer et Z. Gu, *Nat. Rev. Mater.*, **2017**, (2), 16075. Pour une revue sur les matériaux biosensibles activés par les ROS, voir : b) C. Tapeinos et A. Pandit, *Adv. Mater.*, **2016**, (28), 5553-5585. Pour une revue sur les matériaux biosensibles activés par les biomarqueurs enzymatiques de l'hypoxie, voir : c) T. Thambi, J. H. Park et D. S. Lee, *Chem. Commun.*, **2016**, (52), 8492-8500.

¹¹² Pour une revue sur les "gated materials", voir : E. Aznar, M. Oroval, L. Pascual, J. R. Murguia, R. Martinez-Manez et F. Sancanon, *Chem. Rev.*, **2016**, (116), 561-718.

¹¹³ M. Chen et M. Yin, *Progr. Polym. Sci.*, **2014**, (39), 365-395.

Pour conclure sur ce paragraphe, il est intéressant de mentionner la réaction de ligation entre un motif de type 2-cyanobenzothiazole (un motif 2-cyanoquinoléine peut aussi être utilisé) et un dérivé 1,2-aminothiols (e.g., la cystéine), connue sous l'acronyme CBT-AT et qui a été développée par le groupe de J. Rao (Fig. 0.32A)¹¹⁴. Contrairement aux réactions bioorthogonales discutées précédemment, elle présente l'avantage d'être bien adaptée à la synthèse de nanostructures dont la formation résulte de l'auto-assemblage des produits issus de multiples condensation CBT-AT¹¹⁵.

De plus, le déclenchement contrôlé de cette réaction de condensation par un ou plusieurs stimuli (bio)chimiques est possible et a été utilisé avec succès pour imager *in vivo* des protéases d'intérêt (Fig. 0.32B) (i.e., la furine et plusieurs caspases) en utilisant différentes modalités : fluorescence, IRM, imagerie photoacoustique et nucléaire (TEP)¹¹⁶. Comme nous le verrons dans le chapitre 2, une autre application majeure de la réaction de ligation CBT-AT concerne l'imagerie de bioluminescence chez le petit animal car elle permet de générer *in situ* (et sous l'effet d'un seul ou de deux analytes que l'on souhaite détecter) la molécule de D-luciférine (ou des analogues comme la 6-amino-D-luciférine) qui sera métabolisée par la luciférase, provoquant alors l'émission de lumière.

¹¹⁴ Pour un article et une revue sur la ligation CBT-AT, voir : a) G. Liang, H. Ren et J. Rao, *Nat. Chem.*, **2010**, (2), 54-60 ; b) Y. Yuan et G. Liang, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, (12), 865-871.

¹¹⁵ Pour des revues sur le concept d'auto-assemblage de petites molécules en milieu biologique, voir : a) F. Versluis, J. H. van Esch et R. Eelkema, *Adv. Mater.*, **2016**, (28), 4576-4592 ; b) H. Wang, Z. Feng et B. Xu, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, (46), 2421-2436.

¹¹⁶ Pour des références sur le sujet, voir : a) D. Ye, G. Liang, M. L. Ma et J. Rao, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, (50), 2275-2279 ; b) A. Dragulescu-Andrasi, S.-R. Kothapalli, G. A. Tikhomirov, J. Rao et S. S. Gambhir, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, (135), 11015-11022 ; c) B. Shen, J. Jeon, M. Palmer, D. Ye, A. Shuhendler, F. T. Chin et J. Rao, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, (52), 10511-10514 ; d) D. Ye, P. Pandit, P. Kempen, J. Lin, L. Xiong, R. Sinclair, B. Rutt et J. Rao, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, (25), 1526-1536 ; e) D. Ye, A. J. Shuhendler, L. Cui, L. Tong, S. S. Tee, G. Tikhomirov, D. W. Felsher et J. Rao, *Nat. Chem.*, **2014**, (6), 519-526 ; f) D. Ye, A. J. Shuhendler, P. Pandit, K. D. Brewer, S. S. Tee, L. Cui, G. Tikhomirov, B. Rutt et J. Rao, *Chem. Sci.*, **2014**, (5), 3845-3852 ; g) H. Nejadnik, D. Ye, O. D. Lenkov, J. S. Donig, J. E. Martin, R. Castillo, N. Derugin, B. Sennino, J. Rao et H. Daldrup-Link, *ACS Nano*, **2015**, (9), 1150-1160.

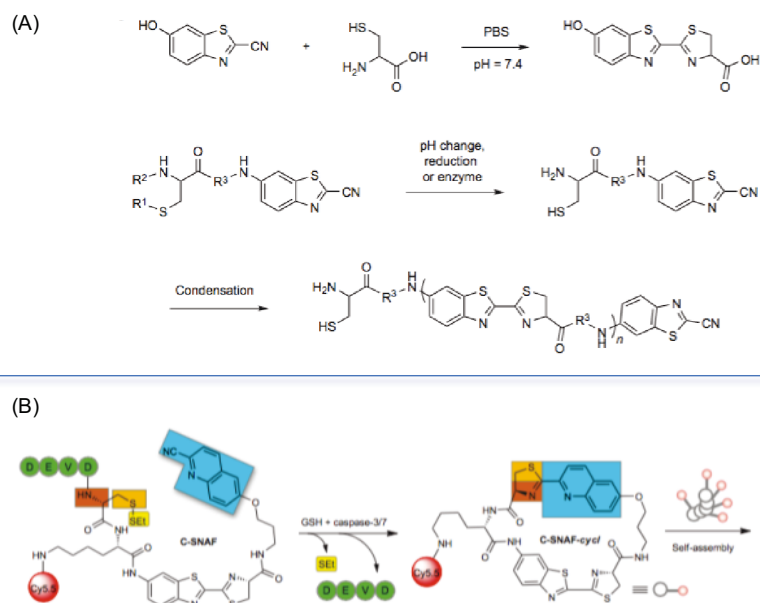


Figure 0.32 - Principe et exemple d'application de la réaction de ligation CBT-AT. (A) (haut) Synthèse de la luciférine par réaction de condensation entre le 2-cyano-6-hydroxybenzothiazole et la cystéine; (bas) Structure générale d'un précurseur "cagé" de luciférine qui sous l'effet de deux stimuli va pouvoir donner lieu à un processus de polycondensation (de type CBT-AT). (B) Application de ce concept à la détection *in vivo* des caspases-3/7 via la formation de nanoagrégats fluorescents (dans le proche-IR). Illustrations issues des références [114a] et [116e]

0.3.2. Synthèse *in situ* photo-induite

Comme évoqué dans la partie introductive de ce chapitre puis illustré au travers de nombreux exemples de la littérature, la lumière est un outil de choix pour interroger les systèmes biologiques. Par ailleurs, les photons sont des stimuli intéressants pour initier des réactions en référence au domaine de la photochimie organique. Si l'utilisation de photons trop énergétiques (i.e., UV-C) est exclue et / ou si les processus de photosensibilisation connus pour leur effets délétères sur les systèmes biologiques^{62b} sont limités, la mise en œuvre assez aisée de divers processus photo-induits dans les systèmes biologiques sans provoquer de perturbations autres que celle recherchée et induite par l'activation photochimique peut être envisagée¹¹⁷. De plus, des réactions photo-induites judicieusement choisies sont actuellement des outils précieux pour réaliser le marquage covalent (principalement fluorescent) et spécifique de protéines ou pour préparer divers bioconjugués.

¹¹⁷ Pour des revues sur le sujet, voir : a) W. Szymanski, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema et B. L. Feringa, *Chem. Rev.*, **2013**, (113), 6114-6178 ; b) J. Lee, *Asian J. Org. Chem.*, **2014**, (3), 830-837 ; c) G. Bassolino et P. Rivera-Fuentes, *Chimia*, **2016**, (70), 796-799 ; d) L. Kowalik et J. K. Chen, *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, (13), 587-598.

Citons le marquage par photo-affinité ("photoaffinity labeling", voir Fig. 0.33A pour un exemple)¹¹⁸ qui fait généralement intervenir la génération photochimique d'un intermédiaire de type nitrène et les réactions "photoclick" (i.e., la réaction de cycloaddition photo-induite entre un tétrazole et un alcène¹¹⁹ et la réaction thiol-ène photo-induite entre un thiol et un alcène non-actif¹²⁰, voir Fig. 0.33B-C pour des exemples).

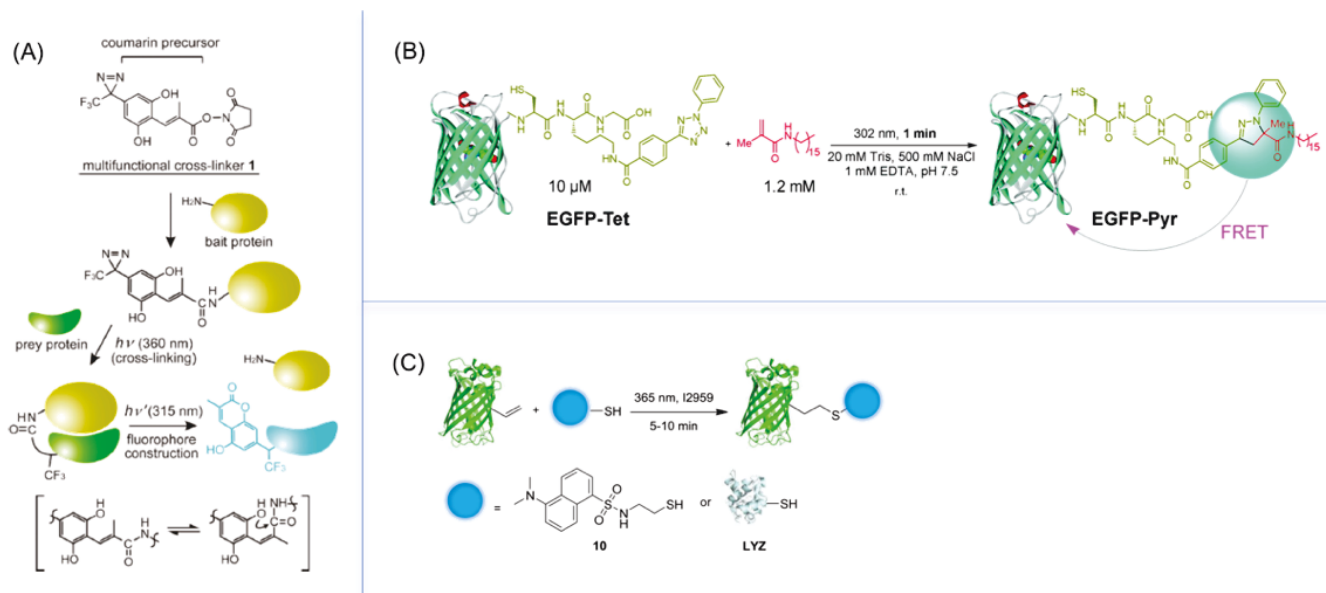


Figure 0.33 - Exemples de réactions photo-induites utilisées pour le marquage de protéines. (A) Approche de marquage par photo-affinité développée par le groupe de Y. Hatanaka et mettant en jeu la formation *in situ* d'une coumarine^{118a}. (B) Modification chimique (lipidation) d'une protéine recombinante "Enhanced Green Fluorescent Protein" (EGFP)¹²¹. (C) Marquage fluorescent ou conjugaison à un lysozyme de la protéine "superfolder Green Fluorescent Protein" (sfGFP)^{120b}. Illustrations issues des références [118a], [119a] et [120b].

¹¹⁸ Pour les travaux du groupe de Y. Hatanaka, voir : a) T. Tomohiro, K. Kato, S. Masuda, H. Kishi et Y. Hatanaka, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, (22), 315-318 ; b) S. Morimoto, T. Tomohiro, N. Maruyama et Y. Hatanaka, *Chem. Commun.*, **2013**, (49), 1811-1813 ; c) T. Tomohiro, S. Morimoto, T. Shima, J. Chiba et Y. Hatanaka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, (53), 13502-13505 ; d) S. Masuda, T. Tomohiro, S. Yamaguchi, S. Morimoto et Y. Hatanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, (25), 1675-1678 ; e) T. Suzuki, T. Okamura, T. Tomohiro, Y. Iwabuchi et N. Kanoh, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, (26), 389-395.

¹¹⁹ Pour des revues sur le sujet, voir : a) R. K. V. Lim et Q. Lin, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, (44), 828-839 ; b) C. P. Ramil et Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2014**, (21), 89-95.

¹²⁰ Pour une revue et un exemple, voir : a) V. Bordoni, M. V. Lombardo et A. Wolosiuk, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 77410-77426 ; b) J. Torres-Kolbus, C. Chou, J. Liu et A. Deiters, *PLoS One*, **2014**, (9), e105467.

¹²¹ W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden et Q. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, (47), 2832-2835.

0.3.3. Chimie des bras espaceurs auto-immolables

Dans les années 90 et le début des années 2000, l'émergence et le développement rapide de techniques de synthèse organique en phase solide, en particulier pour la préparation de bibliothèques de petites molécules selon des approches de chimie combinatoire ou parallèle ont stimulé la recherche de nouveaux espaceurs ("linkers") ainsi que de nouvelles méthodes pour les cliver efficacement et dans les conditions les plus douces possibles¹²². Pour éviter la présence au sein du composé final de résidus inhérents au "linker" clivé, des "traceless linkers" ont été développés¹²³. Les innovations réalisées dans ce domaine ont depuis bénéficié à d'autres disciplines comme la chimie médicinale et plus récemment la conception de substrats fluorogéniques d'enzymes et de sondes imageantes¹²⁴.

En effet, leur utilisation facilite l'accès à de nouvelles prodrugs qui sont principalement utilisées dans le contexte des thérapies anti-cancéreuses¹²⁵. Pour ces dernières, l'utilisation de médicaments cytotoxiques augmente le besoin d'une sélectivité accrue qui est le point clé pour minimiser les effets secondaires. Cette sélectivité peut être obtenue en rendant inactif (le temps d'atteindre la zone ciblée) le principe actif *via* son association covalente à d'autres motifs moléculaires qui peuvent en outre améliorer sa solubilité et / ou sa stabilité. La présence au sein de cet édifice d'un "linker" (bras espaceur dans le vocabulaire de la chimie médicinale) et d'un "trigger" (i.e., un motif capable de répondre efficacement à un stimulus (bio)chimique spécifique du microenvironnement ciblé) vont permettre la libération contrôlée de la substance active. En effet, l'activation du "trigger" va induire la décomposition du bras espaceur selon une réaction domino¹²⁶ dénommé processus d'auto-immolation.

¹²² Pour une revue sur le sujet, voir : F. Guillier, D. Orain et M. Bradley, *Chem. Rev.*, **2000**, (100), 2091-2157.

¹²³ Pour des revues sur les "traceless linkers", voir : a) S. Bräse et S. Dahmen, *Chem. - Eur. J.*, **2000**, (6), 1899-1905 ; b) A. C. Comely et S. E. Gibson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, (40), 1012-1032 ; c) P. Blaney, R. Grigg et V. Sridharan, *Chem. Rev.*, **2002**, (102), 2607-2624 ; d) A. J. Wills et S. Balasubramanian, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, (7), 346-352 ; e) C. Gil et S. Bräse, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, (8), 230-237.

¹²⁴ Pour des revues sur l'utilisation des bras espaceurs auto-immolables dans ces deux disciplines, voir : a) F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa et A. Warnecke, *ChemMedChem*, **2008**, (3), 20-53 ; b) J.-L. Reymond, V. S. Fluxa et N. Maillard, *Chem. Commun.*, **2009**, 34-46 ; c) S. Gnaim et D. Shabat, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, (47), 2970-2984.

¹²⁵ Pour une revue sur le sujet, voir : I. Tranoy-Opalinski, A. Fernandes, M. Thomas, J. P. Gesson et S. Papot, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2008**, (8), 618-637.

¹²⁶ Pour d'autres dénominations des réactions domino dans la littérature : "cascade reactions", "domino reactions" ou "tandem reactions" en anglais.

La recherche académique et industrielle dans ce domaine est actuellement très active¹²⁷, dans le but notamment de diversifier les structures moléculaires des bras espaceurs auto-immolables, d'améliorer leurs performances (stabilité, cinétique d'auto-immolation élevée, propriétés de multivalence pour libérer plusieurs molécules d'un même principe actif ou bien des molécules différentes dans une optique de polythérapie ou de théranostique)¹²⁸ et d'explorer de nouvelles approches de vectorisation ("drug delivery" (e.g., les conjugués d'anticorps ("antibody drug conjugates" ou ADCs))¹²⁹.

Enfin, il est intéressant de noter que plusieurs avancées notables en chimie des bras espaceurs auto-immolables sont le fruit de travaux remarquables émanant de laboratoires académiques français. Citons pêle-mêle les équipes de J. Hasserodt (ENS Lyon)¹³⁰, L. Jullien (ENS Paris)¹³¹, S. Papot (Université de Poitiers)¹³², P.-Y. Renard (Université de Rouen)¹³³, et F. Schmidt / C. Monneret (Institut Curie)¹³⁴.

Concernant la classification de ces bras espaceurs, elle repose principalement sur le type de mécanisme mis en jeu lors du processus d'auto-immolation (Fig. 0.34). La première catégorie rassemble les structures capables de s'auto-immoler *via* des réactions d'élimination 1,6 ou apparentées (e.g., les bras dérivés de l'alcool *para*-aminobenzyle (PABA) ou de l'alcool *para*-hydroxybenzyle (PHBA)). La réaction clé pour la décomposition des molécules possédant un bras espaceur de la seconde catégorie est une cyclisation intramoléculaire.

L'utilisation des bras espaceurs auto-immolables pour la conception de pro-fluorophores est plus récente car comme nous l'avons déjà précisé, les premiers travaux publiés datent de 2005 (cf. travaux du groupe de R. T Raines, Fig. 0.19).

Depuis, ces outils chimiques sont devenus incontournables car ils présentent plusieurs avantages :

¹²⁷ A titre d'exemple, une recherche sur le portail Espacenet (https://worldwide.espacenet.com/?locale=fr_EP) réalisée durant la période estivale 2017, en utilisant les mots clés "linker" et "drug" a conduit à plus 1400 brevets dont plus de 170 publiés lors des 18 derniers mois.

¹²⁸ Pour un revue très complète sur les bras espaceurs auto-immolables, voir : a) A. Alouane, R. Labrière, T. Le Saux, F. Schmidt et L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, (54), 7492-7509. Pour des revues sur le sujet de la multivalence dans les contextes de la biodétection, de la bioimagerie et du "drug delivery", voir : b) D. Shabat, R. J. Amir, A. Gopin, N. Pessah et M. Shamis, *Chem. - Eur. J.*, **2004**, (10), 2626-2634 ; c) D. Shabat, *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.*, **2006**, (44), 1569-1578 ; d) M. Avital-Shmilovici et D. Shabat, *Soft Matter*, **2010**, (6), 1073-1080 ; e) M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim et D. Shabat, *Chem. Rev.*, **2016**, (116), 1309-1352 ; f) S. Goggins et C. G. Frost, *Analyst*, **2016**, (141), 3157-3218.

¹²⁹ Pour un livre sur le sujet, voir : F. Kratz, P. Senter et H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*, Wiley-VCH, **2011**.

¹³⁰ Pour des exemples de réalisations, voir : a) M. Waibel, X.-B. Zhang et J. Hasserodt, *Synthesis*, **2009**, 318-324 ; b) O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon et J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, **2012**, (48), 6253-6255.

¹³¹ Pour un exemple de réalisation, voir : S. Huelle, A. Alouane, T. Le Saux, L. Jullien et F. Schmidt, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, (15), 3435-3443.

¹³² Pour des exemples de réalisations, voir : a) A. Fernandes, A. Viterisi, F. Coutrot, S. Potok, D. A. Leigh, V. Aucagne et S. Papot, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, (48), 6443-6447 ; b) M. Grinda, T. Legigan, J. Clarhaut, E. Peraudeau, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, M. Thomas, F. Guilhot et S. Papot, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, (11), 7129-7133.

¹³³ Pour des exemples de réalisations, voir : a) Y. Meyer, J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Org. Lett.*, **2008**, (10), 1517-1520 ; b) Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, (8), 1777-1780.

¹³⁴ Pour des exemples de réalisations, voir : a) A. E. Alaoui, N. Saha, F. Schmidt, C. Monneret et J.-C. Florent, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, (14), 5012-5019 ; b) A. El Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J.-C. Florent et L. Johannes, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, (46), 6469-6472.

(1) Dans le cas des pro-fluorophores réactifs vis-à-vis d'enzymes, l'introduction d'un bras espaceur entre le fluorophore (souvent une molécule volumineuse) et le motif de reconnaissance jouant le rôle de déclencheur ("trigger") permet de diminuer l'encombrement stérique et donc de favoriser la cinétique d'activation enzymatique¹³⁵. (2) Ils autorisent une grande diversité des combinaisons "trigger" / fluorophore possibles, donc une grande diversité des analytes que l'on pourra détecter. En effet, la présence du bras espaceur rend possible la libération d'une molécule fluorescente qui ne possède pas nécessairement comme centre fluorogénique, le groupe fonctionnel révélé lors de l'activation de la sonde par l'analyte ciblé. (3) Un effet bénéfique sur la stabilité du pro-fluorophore en milieu aqueux est souvent observé car en éloignant le centre électrophile du motif de reconnaissance du centre fluorogénique du fluorophore (typiquement, une aniline ou un phénol), on limite le phénomène d'hydrolyse non-spécifique¹³⁶. Quelques exemples illustrant l'immense potentiel de bras espaceurs auto-immolables sont présentés Fig. 0.35 et Fig. 0.36.

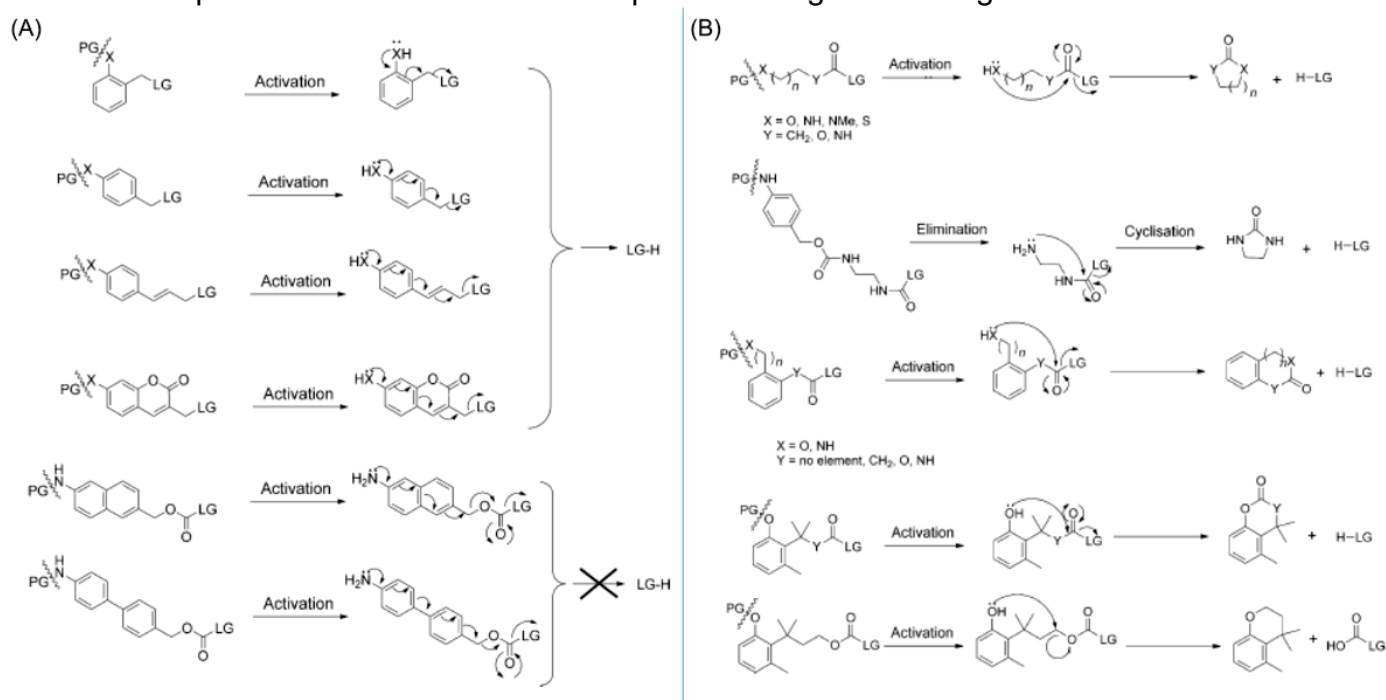


Figure 0.34 - Principaux bras espaceurs auto-immolables décrits dans la littérature. (A) Structures dont le processus d'auto-immolation repose sur une réaction d'élimination, de haut en bas : élimination 1,4 ; élimination 1,6 ; élimination 1,8 ; élimination 1,8 (cœur coumarine) et élimination 1,8 (cœur naphtalène) / élimination 1,10 (cœur biphenyle) qui ne fonctionnent pas. (B) Structures dont le processus d'auto-immolation repose sur une réaction de cyclisation¹³¹, les deux dernières structures mettent en jeu la lactonisation "trimethyl lock"¹³⁷ et les autres mettent en jeu une réaction de type S_N2t (addition-élimination) intramoléculaire¹³⁸. Illustration issue de la revue [128a].

¹³⁵ Pour quelques travaux illustrant ce premier avantage, voir : a) G. B. Jones, C. F. Crasto, J. E. Mathews, L. Xie, M. O. Mitchell, A. El-Shafey, A. V. D'Amico et G. J. Bublely, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, (14), 418-425 ; b) L. D. Lavis, T.-Y. Chao et R. T. Raines, *ChemBioChem*, **2006**, (7), 1151-1154 ; J.-A. Richard, Y. Meyer, V. Jolivel, M. Massonneau, R. Dumeunier, D. Vaudry, H. Vaudry, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, (19), 1707-1718.

¹³⁶ Pour un exemple, voir : N.-H. Ho, R. Weissleder et C.-H. Tung, *ChemBioChem*, **2007**, (8), 560-566.

¹³⁷ Pour une revue sur ce type de bras espaceurs auto-immolables, voir : a) M. N. Levine et R. T. Raines, *Chem. Sci.*, **2012**, (3), 2412-2420. Pour un exemple récent, voir : b) D. P. Walton et D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, (139), 4655-4658.

¹³⁸ Pour une mini-revue récente sur le sujet : E. Brenna, F. Distanti, F. G. Gatti et G. Gatti, *Catal. Sci. Technol.*, **2017**, (7), 1497-1507.

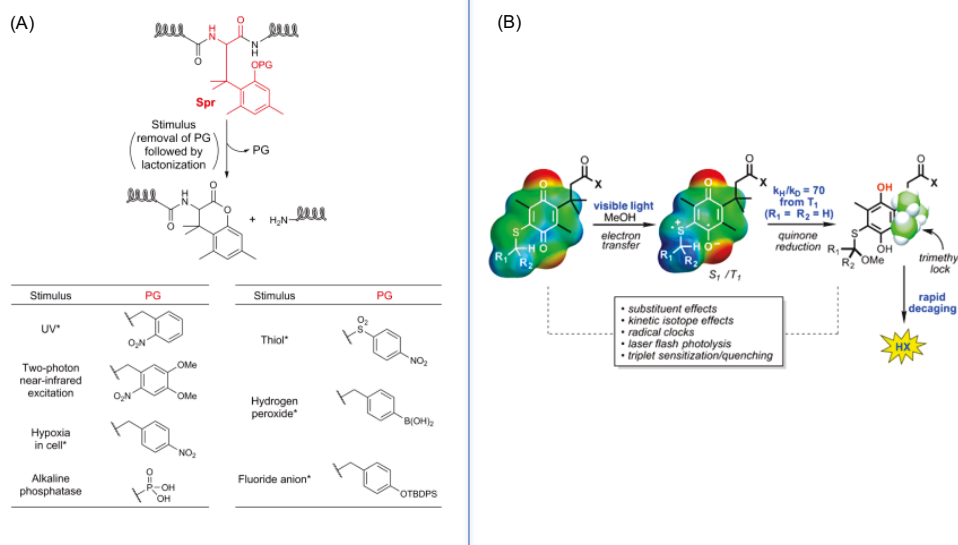


Figure 0.35 - Exemples de bras espaceurs auto-immolables de type "trimethyl lock" récemment développés. (A) Incorporation d'un motif "trimethyl lock" au sein d'une séquence peptidique pouvant être clivée par l'action de divers stimuli¹³⁹. (B) Bras espaceur auto-immolable de type "trimethyl lock" pour des applications en "photodecaging"¹⁴⁰. Illustrations issues des références [139] et [140].

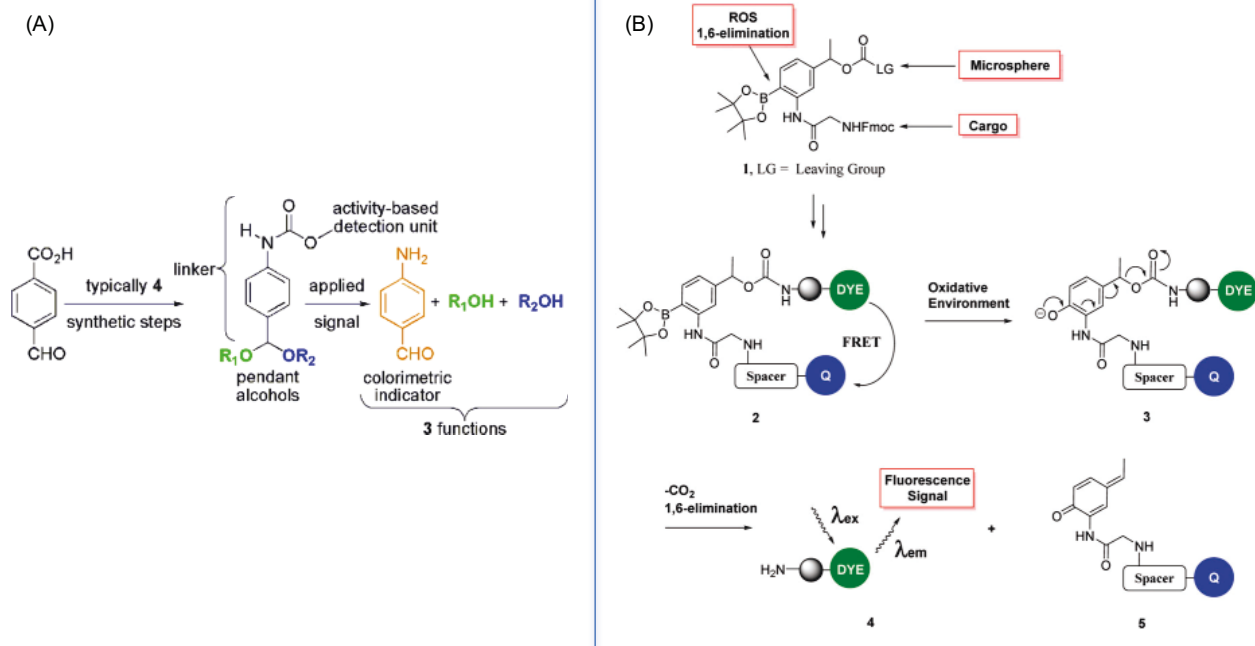


Figure 0.36 - Autres exemples récents. (A) Système moléculaire auto-immolable permettant la libération de deux molécules d'intérêt et d'un indicateur colorimétrique, développé par le groupe de S. T. Phillips¹⁴¹. (B) Système moléculaire auto-immolable développé par le groupe de M. Bradley et appliqué à la préparation d'une cassette FRET réactive vis-à-vis des ROS¹⁴². Illustrations issues des références [141] et [142].

¹³⁹ A. Shigenaga, J. Yamamoto, T. Kohiki, T. Inokuma et A. Otaka, *J. Pept. Sci.*, **2017**, (23), 505-513.

¹⁴⁰ C. J. Regan, D. P. Walton, O. S. Shafaat et D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, (139), 4729-4736.

¹⁴¹ S. A. Nunez, K. Yeung, N. S. Fox et S. T. Phillips, *J. Org. Chem.*, **2011**, (76), 10099-10113.

¹⁴² A. M. Perez-Lopez, E. Valero et M. Bradley, *New J. Chem.*, **2017**, (41), 2392-2400.

0.3.4. Optimisation de la solubilité des fluorophores et des sondes fluorescentes en milieu physiologique

Pour tout chimiste qui s'intéresse au développement de nouveaux fluorophores organiques et / ou de sondes fluorescentes intelligentes pour des applications bioanalytiques ou biomédicales, la solubilité dans l'eau est un paramètre à ne pas négliger et qui nécessitera souvent des efforts importants de synthèse. En effet, une optimisation préalable de ce paramètre facilitera l'utilisation de ces molécules dans les milieux aqueux sans ajout d'un co-solvant et donc la mise en œuvre pratique des applications ciblées. Par ailleurs, si l'on souhaite obtenir des fluorophores possédant une brillance élevée en milieu physiologique, il est nécessaire d'utiliser des stratégies d'hydrosolubilisation ne conduisant pas à des molécules amphiphiles (qui sont connues pour former des agrégats de type H non-fluorescents) mais favorisant l'obtention de "bolaamphiphiles"¹⁴³.

A notre connaissance, il n'existe aucune revue dans la littérature résumant l'ensemble des stratégies moléculaires développées et couramment utilisées pour obtenir des fluorophores organiques solubles et fortement fluorescents en milieu aqueux. Cependant, pour quelques familles de fluorophores (les Bodipys¹⁴⁴ et les pérylènediimides¹⁴⁵) et pour les dendrimères¹⁴⁶, ce type d'articles est disponible.

Citons tout de même une revue, publiée en 2014 dans *Chemical Reviews*, émanant du groupe de H. Ma^{38f} recensant un grand nombre de sondes chromogéniques et / ou fluorogéniques solubles dans l'eau. Malheureusement, dans cet article, l'accent est mis sur les réactions fluorogéniques à l'origine de l'activation des sondes et non pas sur les méthodes d'hydrosolubilisation.

Notre groupe a une grande expérience dans la synthèse de fluorophores organiques et il a été à l'origine d'une nouvelle approche d'hydrosolubilisation "post-synthétique"¹⁴⁷ qui consiste à introduire un ou plusieurs groupes polaires sur un cœur fluorescent (hydrophobe et possédant au moins une fonction chimique dérivatisable) conventionnel ou facilement accessible *via* une réaction efficace et facile à mettre en œuvre (i.e., réaction S_N2, réaction d'amidification de type Schotten-Baumann, réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) (CuAAC) et couplage de Sonogashira). Ainsi, la manipulation et la purification généralement fastidieuses de composés fortement polaires ne sont limitées qu'à la dernière étape de synthèse. C'est un avantage majeur par rapport aux stratégies de synthèse *de novo* plus classiques, qui mettent en jeu l'utilisation de synthons polaires pour la préparation du cœur fluorescent hydrophile.

¹⁴³ Pour une revue sur le sujet, voir : J.-H. Fuhrhop et T. Wang, *Chem. Rev.*, **2004**, (104), 2901-2938.

¹⁴⁴ Pour une revue sur les Bodipys hydrosolubles, voir : G. Fan, L. Yang et Z. Chen, *Front. Chem. Sci. Eng.*, **2014**, (8), 405-417.

¹⁴⁵ Pour une revue sur les pérylènediimides hydrosolubles, voir : M. Sun, K. Mullen et M. Yin, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, (45), 1513-1528.

¹⁴⁶ Pour une revue sur les dendrimères hydrosolubles, voir : A.-M. Caminade, A. Hameau et J.-P. Majoral, *Chem. - Eur. J.*, **2009**, (15), 9270-9285.

¹⁴⁷ Pour les publications relatives à cette méthode d'hydrosolubilisation des fluorophores organiques, voir : a) B. Chipon, G. Clavé, C. Bouteiller, M. Massonneau, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, (47), 8279-8284 ; b) C. Bouteiller, G. Clavé, A. Bernardin, B. Chipon, M. Massonneau, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, (18), 1303-1317 ; c) A. Romieu, D. Brossard, M. Hamon, H. Outaabout, C. Portal et P.-Y. Renard, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, (19), 279-289 ; d) S. L. Niu, G. Ulrich, R. Ziessel, A. Kiss, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Org. Lett.*, **2009**, (11), 2049-2052 ; e) S. L. Niu, C. Massif, G. Ulrich, R. Ziessel, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Org.*

Un grand nombre de motifs hydrosolubilisants est actuellement disponible et une classification en fonction de la charge à pH physiologique (positive¹⁴⁸, négative¹⁴⁹ ou nulle¹⁵⁰) est bien connue. Les plus fréquemment utilisés sont présentés Fig. 0.37. Précisons qu'en fonction de l'application et du contexte biologique ciblés, l'emploi de certains motifs au détriment d'autres sera privilégié. Par exemple, pour favoriser la pénétration cellulaire d'un fluorophore soluble dans l'eau (ou d'une sonde dérivée de ce fluorophore), il est préférable d'introduire sur sa structure des groupes polaires chargés positivement ou zwitterioniques.

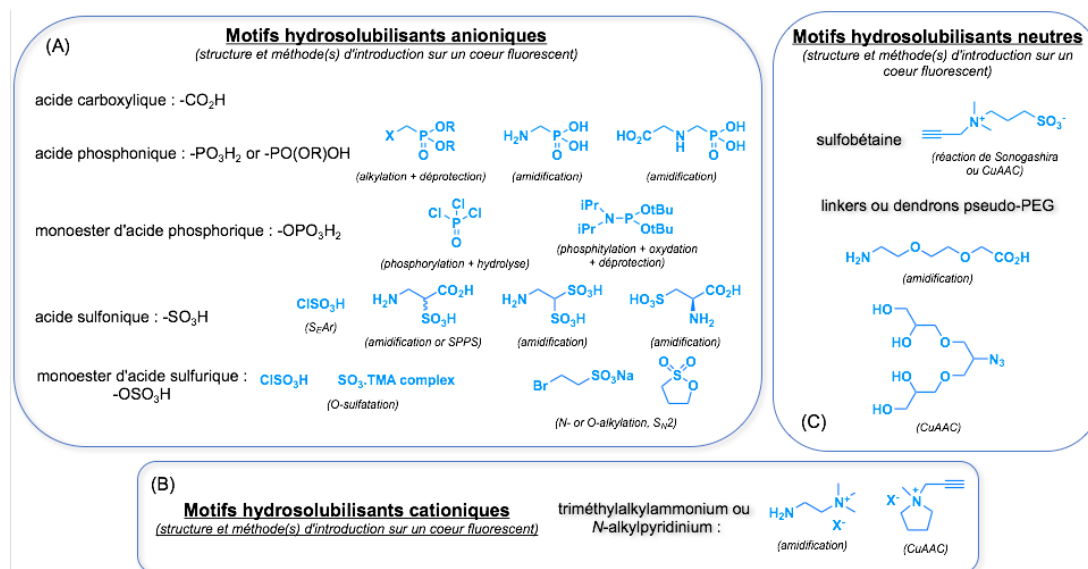


Figure 0.37 - Principaux motifs utilisés pour optimiser la solubilité des fluorophores organiques et des sondes fluorescentes en milieu physiologique. Les synthons ou les réactifs couramment utilisés pour réaliser leur introduction sur des cœurs fluorescents sont présentés et les réactions mises en jeu sont mentionnées. Pour des exemples de synthèse de fluorophores organiques hydrosolubles utilisant ces synthons, voir les références [148], [149] et [150].

Biomol. Chem., **2010**, (9), 66-69 ; f) A. Romieu, D. Tavernier-Lohr, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire et P.-Y. Renard, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, (51), 3304-3308 ; g) A. Romieu, T. Bruckdorfer, G. Clavé, V. Grandclaude, C. Massif et P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, (9), 5337-5342 ; h) C. Massif, S. Dautrey, A. Haefele, R. Ziessel, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, (10), 4330-4336 ; i) S.-L. Niu, C. Massif, G. Ulrich, P.-Y. Renard, A. Romieu et R. Ziessel, *Chem. - Eur. J.*, **2012**, (18), 7229-7242 ; j) A. Romieu, C. Massif, S. Rihn, G. Ulrich, R. Ziessel et P.-Y. Renard, *New J. Chem.*, **2013**, (37), 1016-1027 ; k) E. Heyer, P. Lory, J. Leprince, M. Moreau, A. Romieu, M. Guardigli, A. Roda et R. Ziessel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, (54), 2995-2999.

¹⁴⁸ Pour des exemples de fluorophores et / ou de sondes fluorogéniques possédant des motifs hydrosolubilisants cationiques, voir : a) E. L. Cole, E. Arunkumar, S. Xiao, B. A. Smith et B. D. Smith, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, (10), 5769-5773 ; b) A. Chevalier, C. Mercier, L. Saurel, S. Oregna, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Chem. Commun.*, **2013**, (49), 8815-8817 ; c) A. Chevalier, W. Piao, K. Hanaoka, T. Nagano, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, (3), 044004 et référence [146j].

¹⁴⁹ Pour des exemples de fluorophores et / ou de sondes fluorogéniques possédant des motifs hydrosolubilisants anioniques, voir : a) V. P. Boyarskiy, V. N. Belov, R. Medda, B. Hein, M. Bossi et S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.*, **2008**, (14), 1784-1792 ; b) P. Shieh, M. S. Siegrist, A. J. Cullen et C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, (111), 5456-5461 ; c) Y. Bernhard, P. Winckler, R. Chassagnon, P. Richard, E. Gigot, J.-M. Perrier-Cornet et R. A. Decreau, *Chem. Commun.*, **2014**, (50), 13975-13978 ; d) A. Kamkaew et K. Burgess, *Chem. Commun.*, **2015**, (51), 10664-10667 ; e) B. Roubinet, M. L. Bossi, P. Alt, M. Leutenegger, H. Shojaei, S. Schnorrenberg, S. Nizamov, M. Irie, V. N. Belov et S. W. Hell, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 15429-15433 ; f) S. Nizamov, M. V. Sednev, M. L. Bossi, E. Hebisch, H. Frauendorf, S. E. Lehnart, V. N. Belov et S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.*, **2016**, (22), 11631-11642 et référence [146j].

¹⁵⁰ Pour des exemples de fluorophores et / ou de sondes fluorogéniques possédant des motifs hydrosolubilisants non chargés ou zwitterioniques, voir : a) H. Ftouni, F. Bolze et J.-F. Nicoud, *Dyes Pigm.*, **2013**, (97), 77-83 ; b) H. Ftouni, F. Bolze, H. de Rocquigny et J.-F. Nicoud, *Bioconjugate Chem.*, **2013**, (24), 942-950 ; c) O. Redy-Keisar, K. Huth, U. Vogel, B. Lepenies, P. H. Seeberger, R. Haag et D. Shabat, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 4727-4732 et référence [146j].

Chapitre I

*Détection de deux enzymes
basée sur la formation du cœur
7-hydroxy-2-iminocoumarine*

Détection de deux enzymes basée sur la formation du cœur 7-hydroxy-2-iminocoumarine

Ce premier chapitre sera consacré au premier objectif de ma thèse à savoir la possibilité de former *in situ* un cœur 7-hydroxy-2-iminocoumarine à partir d'un précurseur "cagé" non fluorescent et sous l'action conjuguée de deux enzymes distinctes, dans le but de démontrer la viabilité de cette approche pour la détection simultanée de deux analytes ("dual-analytes"). Avant de présenter les résultats obtenus et de les discuter, la bibliographie concernant les deux positions de déclenchement impliquées dans la formation et la fluorescence du cœur coumarinique sera exposée, ainsi que les enzymes utilisées au cours de ces travaux. Un point sur les propriétés physico-chimiques des coumarines pouvant être synthétisées *in situ* sera effectué afin de mettre en lumière les avantages et les limitations de ces sondes fluorogéniques. Enfin, quelques pistes permettant d'améliorer ce type de pro-fluorophores (qui fonctionnent comme des "logic gates" moléculaires de type "AND") seront également couchées sur le papier.

I.1. Etat de l'art

I.1.1. Généralités et propriétés photophysiques des 7-hydroxy & 7-N,N-dialkylaminocoumarines

La coumarine (Fig. I.1) (N°_{CAS} : 91-64-5) tire son nom du mot "coumarou" (l'arbre de Tonka dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine). Elle fut isolée pour la première fois en 1820 par deux scientifiques de manière indépendante (A. Vogel et N. J. B. G. Guibourt, ce dernier lui donnant ce nom) et fut synthétisée en 1868 par W. H. Perkin.

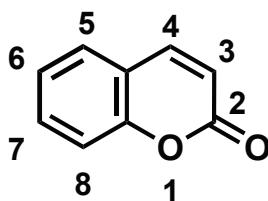


Figure I.1 - Structure et numérotation du cœur coumarine.

Ce cœur, aussi nommé 2H-chromèn-2-one ou 1-benzopyran-2-one, est formé d'un cycle benzénique et d'une lactone fusionnés.

Les coumarines sont des composés provenant le plus souvent des plantes (environ 1400 dérivés recensés) et possédant un grand potentiel en chimie médicinale, comme illustré par les nombreuses études portant sur les diverses propriétés pharmacologiques de cette catégorie d'hétérocycles¹. Si ces propriétés ne sont pas essentielles pour les travaux décrits dans ce manuscrit, elles n'en demeurent pas moins intéressantes pour l'avenir. En effet, combinées aux propriétés de fluorescence qui vont être décrites ultérieurement, elles pourraient imposer le cœur coumarinique comme un motif de base pour le développement d'agents théranostiques.

L'étude des caractéristiques spectrales de ce type de composés et plus particulièrement les dérivés 7-hydroxy et 7-aminocoumarines a fait l'objet de nombreux travaux². Si la 2H-chromèn-2-one possède des propriétés fluorescentes dans des conditions particulières (dans l'EtOH à -196°C)³, elle est connue pour ne pas être émissive en condition standard (dans l'EtOH à T.A.)⁴. Par introduction en position 7 d'un groupement électro-donneur (-O⁻ ; -OH ; -OR ; -NH₂ ; -NR₂), ces molécules présentent alors un caractère "push-pull" prononcé⁵ (Fig. 1.2). Ceci a pour conséquence une forte absorption dans l'UV-A (320-380 nm)⁶, caractéristique d'une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ conduisant à un état excité de type ESICT ("Excited State Internal Charge Transfer"). Un retour à l'état fondamental à partir de l'état S₁ s'accompagne généralement d'une forte fluorescence (rendement quantique = 60-100%) dans la région "violet-bleu" (400-460 nm) du spectre de la lumière visible⁷.

¹ Pour des revues et des travaux sur le sujet, voir : a) I. Kostova, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, **2005**, (5), 29-46 ; b) P. Anand, B. Singh et N. Singh, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, (20), 1175-1180 ; c) C. Kontogiorgis, A. Detsi et D. Hadjipavlou-Litina, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2012**, (22), 437-454 ; d) T. O. Olomola, R. Klein, N. Mautsa, Y. Sayed et P. T. Kaye, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, (21), 1964-1971 ; e) P. O. Patil, S. B. Bari, S. D. Firke, P. K. Deshmukh, S. T. Donda et D. A. Patil, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, (21), 2434-2450 ; f) X.-M. Peng, G. L. V. Damu et C.-H. Zhou, *Curr. Pharm. Des.*, **2013**, (19), 3884-3930 ; g) K. N. Venugopala, V. Rashmi et B. Odhav, *BioMed Res. Int.*, **2013**, 963248 ; h) S. Sandhu, Y. Bansal, O. Silakari et G. Bansal, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, (22), 3806-3814 ; i) A. Witaicenis, L. N. Seito, A. da Silveira Chagas, L. D. de Almeida, A. C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S. H. Cestari et L. C. Di Stasi, *Phytomedicine*, **2014**, (21), 240-246 ; j) M. Huang, S.-S. Xie, N. Jiang, J.-S. Lan, L.-Y. Kong et X.-B. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, (25), 508-513 ; k) F. G. Medina, J. G. Marrero, M. Macias-Alonso, M. C. Gonzalez, I. Cordova-Guerrero, A. G. Teissier Garcia et S. Osegueda-Robles, *Nat. Prod. Rep.*, **2015**, (32), 1472-1507 ; l) A. Thakur, R. Singla et V. Jaitak, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, (101), 476-495 ; m) L. Xu, X.-Y. Zhao, Y.-L. Wu et W. Zhang, Asian-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference (AP3ER), Atlantis Press, **2015** ; o) J. Dandriyal, R. Singla, M. Kumar et V. Jaitak, *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, (119), 141-168 ; p) K. Skalicka-Wozniak, I. E. Orhan, G. A. Cordell, S. M. Nabavi et B. Budzynska, *Pharmacol. Res.*, **2016**, (103), 188-203.

² a) W. R. Sherman et E. Robins, *Anal. Chem.*, **1968**, (40), 803-805 ; b) T. Hinohara, K. Amano et K. Matsui, *Nippon Kagaku Kaishi*, **1976**, 247-251 ; c) I. I. Grandberg, L. K. Denisov et O. A. Popova, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1987**, 147-174 ; d) G. M. Huitink, *Talanta*, **1988**, (35), 973-976 ; e) S. I. Druzhinin, B. D. Bursulaya et B. M. Uzhinov, *Zh. Prikl. Spektrosk.*, **1991**, (55), 768-773 ; f) V. F. Traven, L. I. Vorobjeva, T. A. Chibisova, E. A. Carberry et N. J. Beyer, *Can. J. Chem.*, **1997**, (75), 365-376 ; g) X. Liu, Z. Xu et J. M. Cole, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, (117), 16584-16595.

³ P. S. Song et W. H. Gordon, 3rd, *J. Phys. Chem.*, **1970**, (74), 4234-4240.

⁴ B. N. Mattoo, *Trans. Faraday Soc.*, **1956**, (52), 1184-1194.

⁵ X. Liu, J. M. Cole, P. G. Waddell, T.-C. Lin, J. Radia et A. Zeidler, *J. Phys. Chem. A*, **2012**, (116), 727-737.

⁶ Pour un ouvrage recensant les propriétés d'absorption de certaines coumarines, voir H. Wagner et S. Bladt, *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, 2ème édition, **1996**.

⁷ V. P. Georgievskii et A. I. Rybachenko, *Khim. Prir. Soedin.*, **1985**, 766-769.

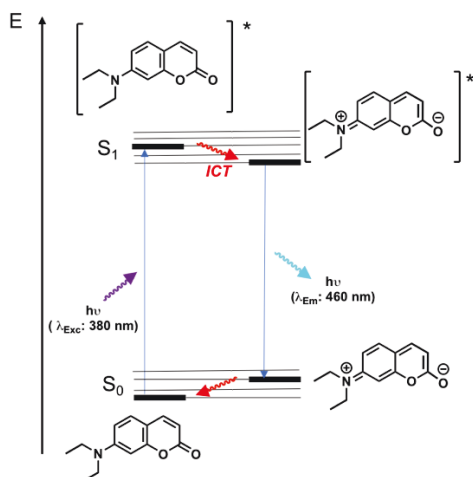


Figure I.2 - Processus supposé d'excitation et d'émission ayant lieu au sein de la 7-*N,N*-diéthylaminocoumarine dans le méthanol et mettant en jeu un transfert de charge intramoléculaire (ICT).

A titre d'exemple, pour la 7-hydroxycoumarine (également connue sous le nom d'ombelliférone / umbelliférone), cet effet "push-pull" est beaucoup plus prononcé lorsque le phénol est déprotoné, ce qui va conduire à une espèce phénolate fortement fluorescente en solution possédant un déplacement de Stokes supérieur à 100 nm, un rendement quantique en milieu aqueux à pH 7.5 de 76% et une émission caractéristique dans le bleu centrée à 452 nm⁸.

Considérant la déprotonation, il est notable que le pKa de ce phénol joue un rôle important dans la modulation de la fluorescence et particulièrement au niveau du rendement quantique. Ainsi il est montré⁹ que l'introduction, soit d'un motif *N,N*-dialkylaminométhyle en 8 (formation d'une liaison hydrogène avec le phénol)¹⁰ soit d'halogènes sur les positions 5, 6 et 8 permet de diminuer le pKa et ainsi favoriser la forme phénolate fortement fluorescente (Fig. I.3). Les halogènes vont aussi diminuer la sensibilité du fluorophore au photo-blanchiment¹¹. En revanche, cela influe peu sur les valeurs des maxima d'excitation et d'émission de l'espèce considérée, contrairement à l'introduction en position 3 ou 4 de groupements électro-attracteurs (-CF₃; -CN; -CO₂H; -CONHR; hétéroaryle; styryle)^{9,12}. En effet, ces derniers auront tendance à induire un effet bathochrome des maxima d'émission vers la gamme spectrale du vert mais aussi à diminuer le pKa des 7-hydroxycoumarines. Quelques études ont eu pour objectif d'essayer de tendre vers la fenêtre de transparence biologique (700-900 nm) en travaillant sur la fonctionnalisation de deux positions simultanées¹³ mais des problèmes de solubilisation en milieu aqueux et des baisses drastiques de rendement quantique (du fait d'une trop grande flexibilité des structures

⁸ K.-i. Setsukinai, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi et T. Nagano, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 2453-2457.

⁹ W.-C. Sun, K. R. Gee et R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, (8), 3107-3110.

¹⁰ M. Adamczyk, M. Cornwell, J. Huff, S. Rege et S. V. T. Rao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, (7), 1989-1988.

¹¹ I. D. Johnson, Enzyme Substrates and Assays, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corp., 11^{ème} édition, **2010**.

¹² a) O. S. Wolfbeis et H. Marhold, *Chem. Ber.*, **1985**, (118), 3664-3672 ; b) N. A. Gordeeva, M. A. Kirpichenok, N. S. Patalakha et I. I. Grandberg, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1990**, 1600-1609 ; c) M. Fakhfakh, H. Turki, S. Abid, R. El Gharbi et S. Fery-Forgues, *J. Photochem. Photobiol., A*, **2007**, (185), 13-18 ; d) T. Deligeorgiev, T. Tsvetkova, D. Ivanova et I. Timtcheva, *Color. Technol.*, **2008**, (124), 195-203 ; e) K. K. Sadhu, S. Mizukami, A. Yoshimura et K. Kikuchi, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, (11), 563-568 ; f) A. K. Sanap, K. K. Sanap et G. S. Shankarling, *Dyes Pigm.*, **2015**, (120), 190-199.

¹³ a) O. S. Wolfbeis, E. Koller et P. Hochmuth, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, (58), 731-734 ; b) J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Org. Lett.*, **2008**, (10), 4175-4178 ; c) E. Kisin-Finfer et D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, (21), 3602-3608.

favorisant la désexcitation non-radiative) en font des candidats médiocres pour une utilisation *in vivo*.

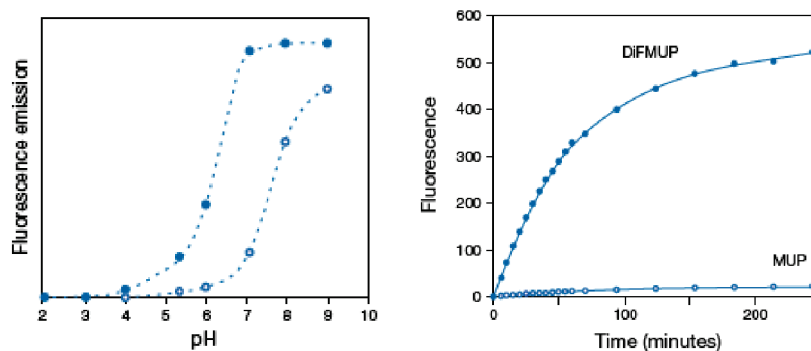


Figure 1.3 - (gauche) Comparaison de la dépendance au pH de la fluorescence de l'acide 7-hydroxy-4-méthylcoumarine-3-acétique (cercles bleus sans remplissage) et de la 6,8-difluoro-7-hydroxy-4-méthylcoumarine (cercles bleus avec remplissage bleu) avec une Ex / Em à 360/450 nm. (à droite) Comparaison des profils d'activation de fluorescence entre le phosphate de 4-méthylumbelliféryle (MUP) et le phosphate de 4-méthylumbelliféryle 6,8-difluoré (DiFMUP - Marina Blue) par la phosphatase acide prostatique à pH 5.5 (Ex / Em à 360/460 nm \pm 20 nm). Illustrations issues de l'ouvrage [11].

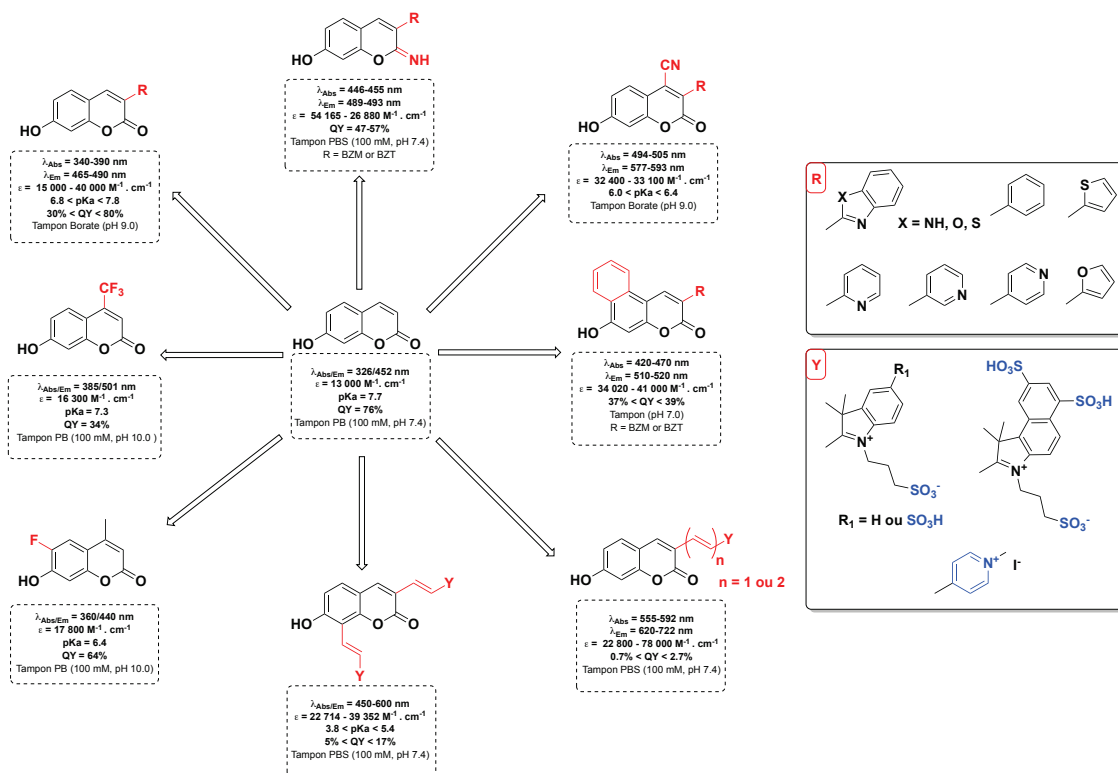


Figure 1.4 - Influence de diverses substitutions sur les caractéristiques spectrales des 7-hydroxycoumarines (BZM = 2-benzimidazolyle, BT = 2-benzothiazolyle)¹⁴.

¹⁴ B. Roubinet, "Développement de nouveaux outils chimiques pour la conception d'un système de détection fluorogénique des réactions catalysées par les polymérases", Université de Rouen, 2015.

Contrairement au comportement de ces coumarines phénoliques, les caractéristiques spectrales de la 7-aminocoumarine et ses dérivés 7-*N,N*-disubstitués¹⁵ ne sont que peu ou pas affectées par la variation de pH du milieu¹⁶ (Fig. I.6). Par contre, la dépendance de la fluorescence vis-à-vis de la polarité du solvant est mise en exergue par un fort solvatochromisme¹⁷ (Fig. I.5). L'existence d'une fluorescence à l'état solide pour certaines coumarines est également à relever¹⁸. Pour ce type de coumarines, le transfert de charge intramoléculaire par rotation (TICT pour "Twisted Intramolecular Charge-Transfer"¹⁹) induit par les substituants alkyles (qui sont des chaînes carbonées flexibles) de l'amine au sein de la structure va pleinement être influencé par la polarité, la viscosité du solvant²⁰ et les possibles liaisons hydrogènes²¹, entraînant ainsi des variations des caractéristiques spectrales.

Table 1 Effect of substituent on the absorption wavelength(nm) in various solvent

Solvent	Substituent at 4- and 7-positions							
	H	7-OH	7-NH ₂	4-Me 7-OH	4-Me 7-OMe	4-Me 7-NMe ₂	4-Me 7-NEt ₂	4-Me 7-NEt ₂ (carbostyril)
<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₂	312	320	335	318	317	345	360	360
Et ₂ O	310	320	345	318	317	348	368	360
EtOH	312	325	360	323	320	366	374	365
CH ₃ CN	310	320	345	318	318	358	365	360
H ₂ O	310	322	346	320	320	371	381	367
CH ₃ COOH	310	322	—	321	320	368	375	370
C ₂ H ₄ Cl ₂	312	320	341	318	319	361	370	364

Table 2 Effect of substituents on the fluorescence wavelength and relative yield(Φ_f) in various solvent

Solvent	Substituent at 4- and 7-positions													
	4-H 7-OH		4-H 7-NH ₂		4-Me 7-OH		4-Me 7-OMe		4-Me 7-NMe ₂		4-Me 7-NEt ₂		4-Me 7-NEt ₂ (carbostyril)	
	λ (nm)	Φ_f	λ (nm)	Φ_f	λ (nm)	Φ_f	λ (nm)	Φ_f	λ (nm)	Φ_f	λ (nm)	Φ_f	λ (nm)	Φ_f
<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₂	377	0.003	375	0.06	375	0.004	366	0.004	390	1.00	394	0.79	386	0.31
Et ₂ O	379	0.003	400	1.00	375	0.008	368	0.003	404	0.98	404	0.93	386	0.33
EtOH	386	0.18	435	0.66	380	0.33	374	0.11	447	0.71	447	0.55	414	0.83
CH ₃ CN	379	0.01	415	0.60	375	0.01	370	0.01	430	0.69	430	0.61	400	0.49
H ₂ O	452	0.47	448	0.55	449	0.47	381	0.58	464	0.15	462	0.04	440	0.23
CH ₃ COOH	384	0.15	—	—	377	0.23	375	0.18	453	0.33	450	0.20	455	0.23
C ₂ H ₄ Cl ₂	377	0.005	464	0.66	375	0.01	372	0.02	417	0.78	419	0.83	394	0.57

Figure I.5 - Tableaux présentant les maxima d'absorption et d'émission de différentes 7-hydroxy / 7-aminocoumarines dans différents solvants. Illustrations issues de la publication [2b].

¹⁵ N. Kitamura, T. Fukagawa, S. Kohtani, S.-I. Kitoh, K.-K. Kunitomo et R. Nakagaki, *J. Photochem. Photobiol., A*, **2007**, (188), 378-386.

¹⁶ X. Jin, C. Uttamapinant et A. Y. Ting, *ChemBioChem*, **2011**, (12), 65-70.

¹⁷ a) A. R. Reddy, D. V. Prasad et M. Darbarwar, *J. Photochem.*, **1986**, (32), 69-80 ; b) S. Nad, M. Kumbhakar et H. Pal, *J. Phys. Chem. A*, **2003**, (107), 4808-4816 ; c) S. Senthikumar, S. Nath et H. Pal, *Photochem. Photobiol.*, **2004**, (80), 104-111 ; d) H. Turki, S. Abid, R. El Gharbi et S. Fery-Forgues, *C. R. Chim.*, **2006**, (9), 1252-1259 ; e) L. M. Moreira, M. M. de Melo, P. A. Martins, J. P. Lyon, A. P. Romani, L. Codognoto, S. C. dos Santos et H. P. M. de Oliveira, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2014**, (25), 873-881 ; f) A. Rabahi, M. Makhoulfi-Chebli, S. M. Hamdi, A. M. S. Silva, D. Kheffache, B. Boutemur-Kheddis et M. Hamdi, *J. Mol. Liq.*, **2014**, (195), 240-247.

¹⁸ a) H. Turki, S. Abid, S. Fery-Forgues et R. El Gharbi, *Dyes Pigm.*, **2006**, (73), 311-316 ; b) M. Kammoun, H. Turki, S. Fery-Forgues et R. El Gharbi, *Synth. Commun.*, **2010**, (40), 888-900 ; c) N. Abid-Jarraya, K. Khemakhem, H. Turki-Guermazi, S. Abid, N. Saffon et S. Fery-Forgues, *Dyes Pigm.*, **2016**, (132), 177-184.

¹⁹ Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz et W. Rettig, *Chem. Rev.*, **2003**, (103), 3899-4031.

²⁰ a) G. Jones, II, W. R. Jackson, S. Kanoktanaporn et A. M. Halpern, *Opt. Commun.*, **1980**, (33), 315-320 ; b) M. El-kemary et W. Rettig, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, (5), 5221-5228 ; c) V. K. Sharma, P. D. Saharo, N. Sharma, R. C. Rastogi, S. K. Ghoshal et D. Mohan, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2003**, (59A), 1161-1170 ; d) R. S. Moog, D. D. Kim, J. J. Oberle et S. G. Ostrowski, *J. Phys. Chem. A*, **2004**, (108), 9294-9301 ; e) B. D. Wagner, *Molecules*, **2009**, (14), 210-237.

²¹ T. Lopez Arbeloa, F. Lopez Arbeloa, M. J. Tapia et I. Lopez Arbeloa, *J. Phys. Chem.*, **1993**, (97), 4704-4707

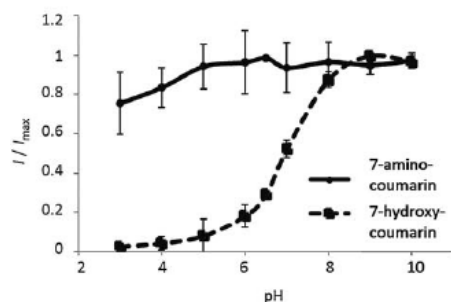


Figure I.6 - Influence du pH sur la fluorescence de la 7-amino et de la 7-hydroxycoumarine. Illustration issue de la publication [16].

D'une manière générale, pour ces composés, plus l'amine est encombrée, plus le maximum d'émission est déplacé vers le rouge (Fig. I.7). Dans l'eau, le TICT induit également une baisse de rendement quantique. Pour limiter la dépendance des propriétés spectrales de la coumarine vis-à-vis du milieu, il faut envisager des dérivés plus "rigides" comme ceux obtenus par introduction d'un motif julolidine²².

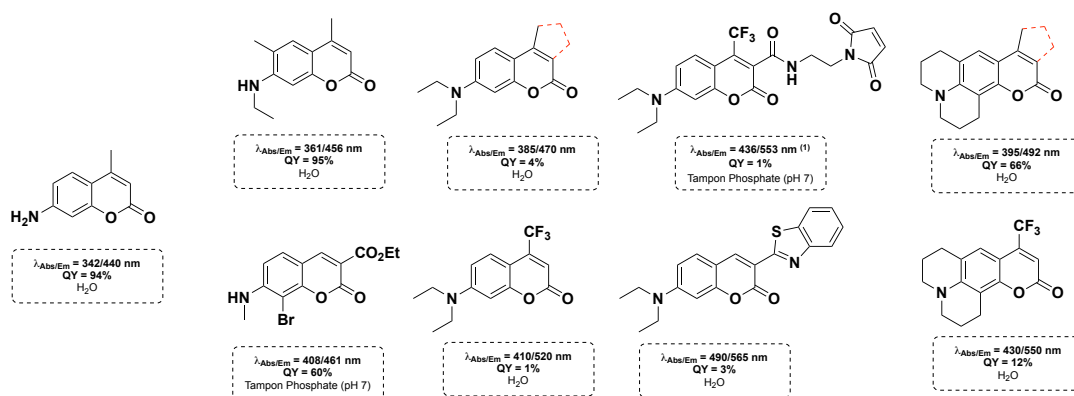


Figure I.7 - Fluorophores à cœur 7-aminocoumarine : influence de la substitution de l'azote et des autres positions clés de la coumarine sur les maxima d'absorption / émission et sur le rendement quantique en milieu aqueux (eau ou tampon). ⁽¹⁾ Les valeurs sont celles de la coumarine une fois greffée à une protéine via un résidu cystéine car le maléimide éteint la fluorescence par PeT.

En remplaçant le motif carbonyle de la lactone par une imine, les 2-iminocoumarines sont obtenues²³. Ces composés ont également fait l'objet de nombreuses études et possèdent généralement des comportements photophysiques similaires aux coumarines parentes. Ils peuvent présenter un léger décalage bathochrome de leurs maxima d'absorption / émission de 5 à 10 nm²⁴.

Le passage par l'imine peut être une voie d'obtention des coumarines correspondantes car le motif est sensible à l'hydrolyse (acide).

²² R. W. Yip, Y. X. Wen et A. G. Szabo, *J. Phys. Chem.*, **1993**, (97), 10458-10462.

²³ Pour quelques exemples récents, voir : a) S. B. Chemate et N. Sekar, *J. Fluoresc.*, **2015**, (25), 1615-1628 ; b) K. Khemakhem, M. Soulie, R. Brousses, H. Ammar, S. Abid et S. Fery-Forgues, *Chem. - Eur. J.*, **2015**, (21), 7927-7937 ; c) M. K. Węćławski, T. T. Meiling, A. Leniak, P. J. Cywiński et D. T. Gryko, *Org. Lett.*, **2015**, (17), 4252-4255.

²⁴ S. Debieu et A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 10348-10361.

L'utilité des 2-iminocoumarines en chimie des fluorophores organiques a été récemment démontrée par les groupes de R. Ziessel²⁵ et P.-Y. Renard lors de la synthèse de nouveaux complexes borates fortement fluorescents qui résultent de la chélation d'un motif $-BF_2$ par l'imine et un substituant hétéroaryle en position 3 (BZM = 2-benzimidazolyle ou BT = 2-benzothiazolyle) de la coumarine²⁶. Ces nouvelles molécules fluorescentes à structure fortement rigidifiée ont été nommées "Boricos" (pour "boron(III) iminocoumarins") ; elles ont notamment été utilisées pour le marquage de protéines (BSA) et pour la synthèse de précurseurs d'agents d'imagerie bimodaux PET/SPECT fluorescence.

D'autres groupes ont mis à profit cette imine réactive pour la substituer par un motif capable d'éteindre la fluorescence du cœur *2H*-chromène. Par exemple, l'introduction d'un motif DNBS ("2,4-dinitrobenzenesulfonyl", "quencher" par PeT oxydatif) permet d'obtenir une sonde fluorogénique de type "Off-On" pour la détection des thiols biologiques (Fig. I.8)²⁷. L'introduction d'un ligand azoté de type (éthylamino) dipicolylamine par réaction d'échange d'imine a également été envisagée par le groupe de T. Nagano pour concevoir une sonde fluorogénique de type ratiométrique, qui a été utilisée avec succès pour imager le zinc neuronal (ions $Zn(II)$)²⁸.

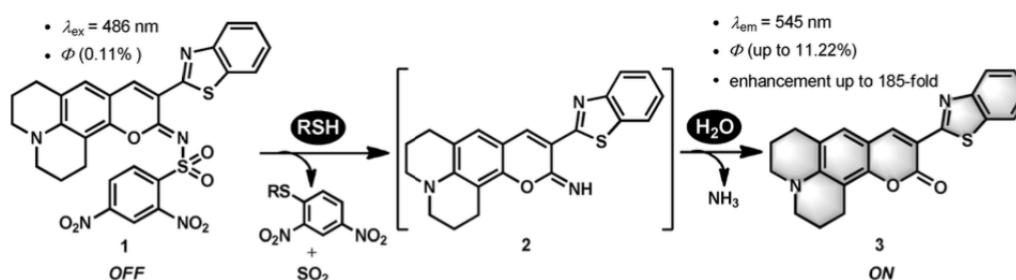


Figure I.8 - Schéma de détection fluorogénique "Off-On" de thiols biologiques fondée sur la déprotection du motif DNBS-imine d'une 7-N,N-dialkylamino-2-iminocoumarine (réaction S_NAr de type addition-élimination) et son hydrolyse en coumarine. Illustration issue de la publication [27b].

En tant que sondes fluorescentes, les coumarines peuvent être utilisées comme réactif de marquage des biomolécules / biopolymères (e.g., les protéines). Le plus souvent, ceci est réalisé *via* l'introduction en position 3 ou 4 d'une fonction acide carboxylique facilement convertible en ester activé réactif vis-à-vis des amines primaires des résidus lysine des protéines²⁹. Il est également possible d'envisager l'introduction d'un motif maléimide (ou d'un disulfure activé) pour le marquage sélectif des thiols des résidus cystéine (Fig. I.9B-1)³⁰.

La position 3 offre également l'opportunité d'associer de façon covalente la coumarine à un autre fluorophore "complémentaire" du point de vue spectral (recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur), par exemple de type xanthène, pour obtenir une sonde FRET (Fig. I.9A)³¹.

²⁵ Le groupe est maintenant dirigé par le Dr. G. Ulrich (laboratoire COMBO, Université de Strasbourg).

²⁶ a) D. Frath, A. Poirel, G. Ulrich, A. De Nicola et R. Ziessel, *Chem. Comm.*, **2013**, (49), 4908-4910 ; b) B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 166-182.

²⁷ a) D. Kand, P. S. Mandal, A. Datar et P. Talukdar, *Dyes Pigm.*, **2014**, (106), 25-31 ; b) Y.-L. Yang, F.-M. Zhang, Y.-W. Wang, B.-X. Zhang, R. Fang, J.-G. Fang et Y. Peng, *Chem. - Asian J.*, **2015**, (10), 422-426.

²⁸ K. Komatsu, Y. Urano, H. Kojima et T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, (129), 13447-13454.

²⁹ Pour une revue sur le sujet, voir : M. S. T. Goncalves, *Chem. Rev.*, **2009**, (109), 190-212.

³⁰ Pour un exemple, voir : J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe et W. Rettig, *J. Heterocycl. Chem.*, **2000**, (37), 1447-1455.

³¹ Pour un exemple, voir : L. He, X. Yang, Y. Liu et L. Weiying, *Anal. Methods*, **2016**, (8), 8022-8027.

L'un des principaux avantages de ces constructions, comme mentionné dans le chapitre d'introduction de cette thèse, est leur grand (pseudo) déplacement de Stokes comparé à celui des fluorophores unitaires (plusieurs centaines de nm contre quelques dizaines de nm).

Enfin, du fait notamment de la présence d'un centre fluorogénique (aniline ou phénol) jouant le rôle d'interrupteur de fluorescence, si celui-ci est substitué de façon à minimiser son effet donneur (voir le rendre attracteur), les coumarines sont très largement utilisées dans la conception des sondes fluorogéniques de type "Off-On" réactives vis-à-vis d'analytes d'intérêt, comme illustré par les paragraphes suivants. Les coumarines sont aussi utilisées pour la détection des ions biologiques³², des cations métalliques³³ mais aussi pour estimer le pH d'un milieu³⁴ (voir Fig. I.9B-2-4 pour des exemples de structures). La plupart de ces stratégies de détection ne sont pas dépendantes de la nature du cœur fluorescent contrairement à certaines approches développées pour des métaux spécifiques³⁵ et mettant en jeu la formation *in situ* du cœur coumarine *via* une réaction de cyclisation / lactonisation déclenchée par l'analyte (Fig. I.10)³⁵.

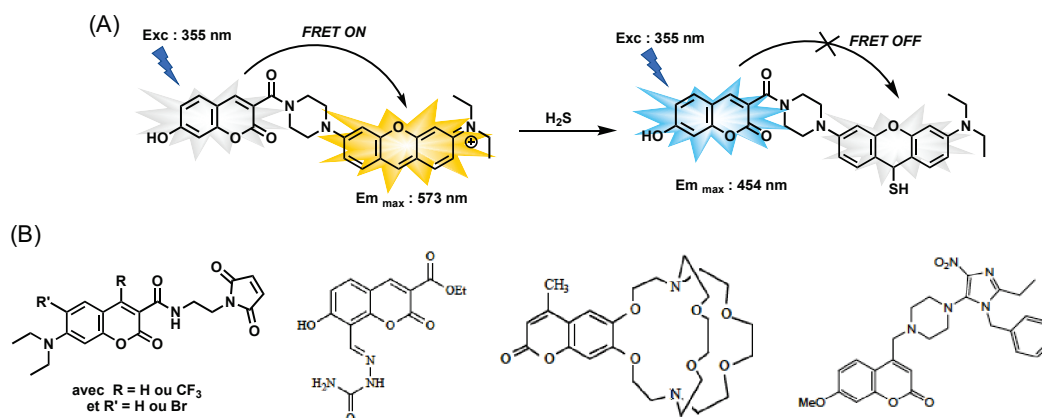


Figure I.9 - (A) Sonde FRET pour la détection du sulfure d'hydrogène basée sur la désactivation chimique de l'accepteur pyronine. (B) Sondes basées sur le motif coumarine : (de gauche à droite) pour le marquage fluorescent des résidus cystéine d'une protéine via la réaction des thiols avec le motif maléimide ; pour la détection du cation Zn(II)³⁶ ; pour la détection du cation K⁺³⁷ ; pour mesurer les variations de pH dans les gammes 2.5-5.5 et 10-12³⁸. Illustrations B-2 à B-4 issues des références [36], [32] et [34].

³² Pour une revue sur le sujet, voir : H. E. Katerinopoulos, *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, (10), 3835-3852.

³³ Pour une revue sur le sujet, voir : Y. Song, Z. Chen et H. Li, *Curr. Org. Chem.*, **2012**, (16), 2690-2707.

³⁴ Pour un chapitre de livre, voir : H. Li, L. Cai et Z. Chen, *Coumarin-derived fluorescent chemosensors*, *Advances in Chemical Sensors*, 1ère édition, InTech, **2012**.

³⁵ a) Q. Wu et E. V. Anslyn, *J. Mater. Chem.*, **2005**, (15), 2815-2819 ; b) W. Jiang et W. Wang, *Chem. Comm.*, **2009**, 3913-3915 ; c) J. H. Do, H. N. Kim, J. Yoon, J. S. Kim et H.-J. Kim, *Org. Lett.*, **2010**, (12), 932-934.

³⁶ Z. Su, K. Chen, Y. Guo, H. Qi, X.-F. Yang et M. Zhao, *J. Fluoresc.*, **2010**, (20), 851-856.

³⁷ K. Golchini, M. Mackovic-Basic, S. A. Gharib, D. Masilamani, M. E. Lucas et I. Kurtz, *Am. J. Physiol.*, **1990**, (258), F438-F443.

³⁸ N. i. Saleh, Y. A. Al-Soud et W. M. Nau, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2008**, (71), 818-822.

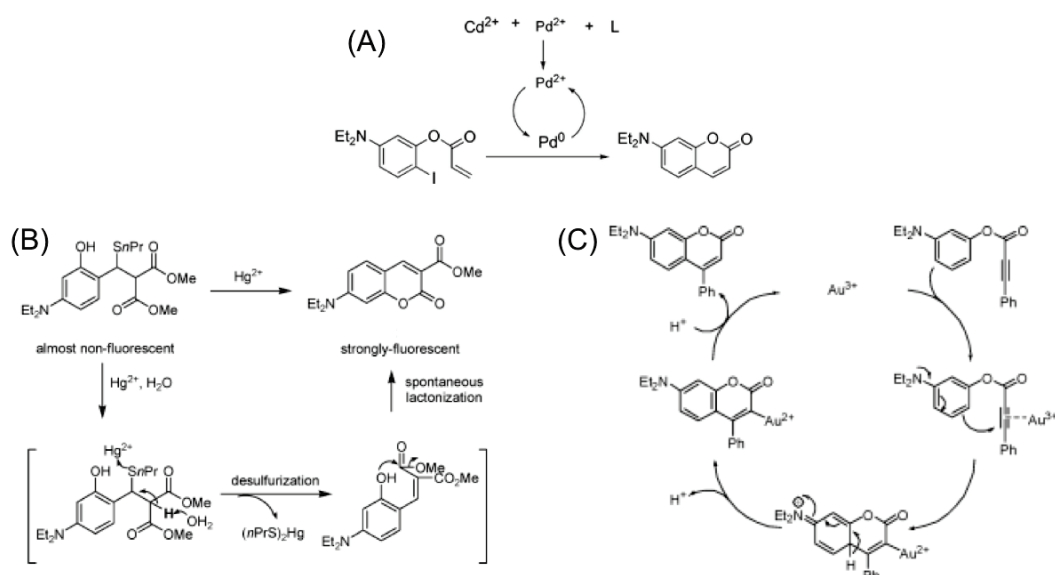


Figure I.10 - Formation in situ du cœur coumarine pour la détection de métaux : (A) Détection des métaux lourds ^{35a}. (B) Détection du cation $Hg(II)$ par réaction de désulfurisation ^{35b}. (C) Détection du cation $Au(III)$ ^{35c}. Illustrations issues des références [35a-c].

I.1.2. Libération de la position 7 : Effet "Push-Pull"

La présence d'un groupement électro-donneur de type aniline ou phénol en position 7 des coumarines étant primordiale pour obtenir des espèces fortement fluorescentes (*vide supra*), de nombreuses sondes fluorogéniques commerciales¹¹ (Tableau I.1) sont fondées sur la protection de celui-ci par un groupe "quencher" réactif vis-à-vis de l'analyte à détecter. Cette stratégie est (en théorie) facile à mettre en œuvre pour la détection d'un large éventail d'activités enzymatiques car la synthèse des pro-fluorophores repose sur des réactions simples d'amidification, d'estérification ou d'éthérification⁸. Cependant, les résultats ne sont pas toujours totalement satisfaisants par rapport à certaines caractéristiques comme l'extinction de fluorescence de la sonde obtenue (qui dans certains cas, n'est pas de 100%) et / ou sa stabilité en milieu biologique ou en tampon aqueux (sensibilité à l'hydrolyse). Ces problèmes sont inhérents à ce type de sondes comme déjà exposé en introduction générale.

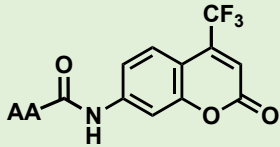
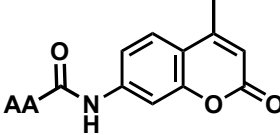
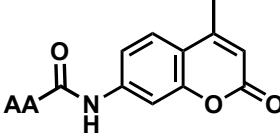
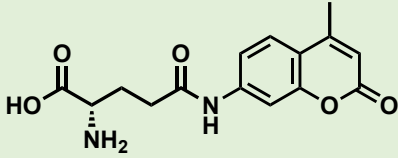
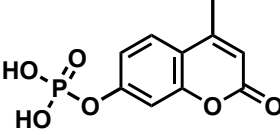
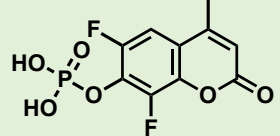
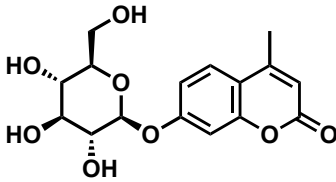
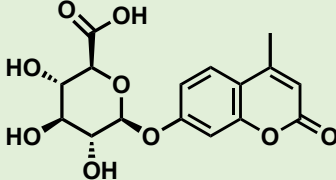
Pro-fluorophore	Nom abrégé et Numéro CAS	Enzyme détectée
	Ac-Leu-Glu-Thr-Asp-AFC 210345-02-1	Caspase-8
	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC 210345-03-2	Caspase-9
	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC 169332-61-0	Caspase-3
	GammaGlu-AMC 72669-53-5	γ -glutamyltransférase
	MUP 3368-04-5	Phosphatases
	DiFMUP 214491-43-7	Phosphatases acides
	MUD 18997-57-4	β -glucosidase
	MUG 881005-91-0	Glucuronidase

Tableau I.1 - Liste non exhaustive de pro-fluorophores (on parle aussi souvent de substrats fluorogéniques d'enzymes) commerciaux à cœur coumarinique, possédant un centre fluorogénique en position 7.

Pour les 7-hydroxycoumarines, il est intéressant de souligner que la valeur du pKa du phénol libéré influence directement sur la sensibilité de la détection³⁹. Ainsi, la 4-(trifluorométhyl)-7-éthoxycoumarine permet de détecter une activité de type cytochrome P-450 plus efficacement que la 7-éthoxycoumarine⁴⁰.

³⁹ Toute méthode d'analyse basée sur une réponse qualitative se doit de définir le seuil à partir duquel le test est déclaré positif. Ce même test mesurant une valeur en dessous de ce seuil, même non nul, sera déclaré négatif.

⁴⁰ J. G. DeLuca, G. R. Dysart, D. Rasnick et M. O. Bradley, *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, (37), 1731-1739.

Ceci s'explique par le fait que la 4-(trifluorométhyl)-7-hydroxycoumarine libérée par la réaction enzymatique a un pKa plus faible (et donc un QY plus élevé) que son analogue non fluoré. Ainsi, l'intensité de la réponse fluorogénique "Off-On" est plus élevée et le rapport signal / bruit s'en trouve amélioré. Ce qui est intéressant avec ce type de composés, c'est qu'un large éventail de groupes protecteurs, capables d'annuler l'effet "push-pull" (Fig. I.11) et réactifs vis-à-vis d'analytes non-enzymatiques (métaux, thiols et autres nucléophiles d'intérêt, ROS et RNS)^{8,41}, peut également être envisagé toujours en utilisant un squelette simple à synthétiser (*via* des réactions de Perkin, Pechmann ou Knoevenagel)⁴².

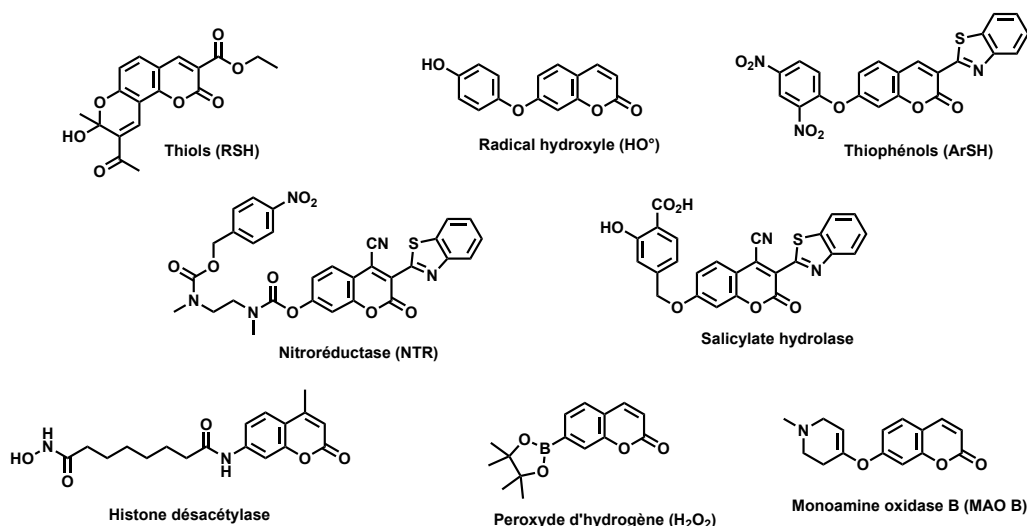


Figure I.11 - Quelques exemples de pro-fluorophores et leurs analytes ciblés, illustrant la variabilité des groupes protecteurs pouvant être introduits en position 7-NH₂ / 7-OH afin d'éteindre la fluorescence des coumarines. Les exemples sont tirés des références [8] et [41].

Notons que ce type de processus de protection-déprotection peut également servir de déclencheur pour la libération d'un autre composé d'intérêt préalablement introduit en position 3. Dans ce cas, la coumarine joue le rôle de bras espaceur auto-immolable fluorogénique (Fig. I.12)⁴³. Le groupe de H. Xie utilise ce déclenchement de la position 7 pour concevoir une sonde fluorogénique suicide permettant le marquage fluorescent des β -lactamases. En effet, la déprotection du phénol, catalysée par l'enzyme, induit une réaction domino conduisant à l'élimination d'un atome de fluor du motif difluorométhyle et à la formation d'un accepteur de Michael qui va réagir avec des résidus nucléophiles de la protéine (Fig. I.13)⁴⁴.

⁴¹ a) W. Lin, L. Long et W. Tan, *Chem. Comm.*, **2010**, (46), 1503-1505 ; b) S.-T. Huang, C.-J. Teng, Y.-H. Lee, J.-Y. Wu, K.-L. Wang et C.-M. Lin, *Anal. Chem.*, **2010**, (82), 7329-7334 ; c) H.-C. Huang, K.-L. Wang, S.-T. Huang, H.-Y. Lin et C.-M. Lin, *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, (26), 3511-3516 ; d) R. K. Singh, T. Mandal, N. Balasubramanian, G. Cook et D. K. Srivastava, *Anal. Biochem.*, **2011**, (408), 309-315 ; e) H. T. Baytekin, B. Baytekin et B. A. Grzybowski, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, (51), 3596-3600 ; f) S. Long, L. Chen, Y. Xiang, M. Song, Y. Zheng et Q. Zhu, *Chem. Comm.*, **2012**, (48), 7164-7166 ; g) L. Long, L. Zhou, L. Wang, S. Meng, A. Gong, F. Du et C. Zhang, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, (11), 8214-8220.

⁴² Pour des revues sur la synthèse des coumarines, voir : a) S. M. Sethna et N. M. Shah, *Chem. Rev.*, **1945**, (36), 1-62 ; b) A. Y. Fedorov, A. V. Nyuchev et I. P. Beletskaya, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2012**, (48), 166-178.

⁴³ R. Weinstein, E. Segal, R. Satchi-Fainaro et D. Shabat, *Chem. Comm.*, **2010**, (46), 553-555.

⁴⁴ a) W. Mao, L. Xia, Y. Wang et H. Xie, *Chem. - Asian J.*, **2016**, (11), 3493-3497 ; pour la publication princeps, voir : b) K. D. Janda, L.-C. Lo, C.-H. L. Lo, M.-M. Sim, R. Wang, C.-H. Wong et R. A. Lerner, *Science*, **1997**, (275), 945-948

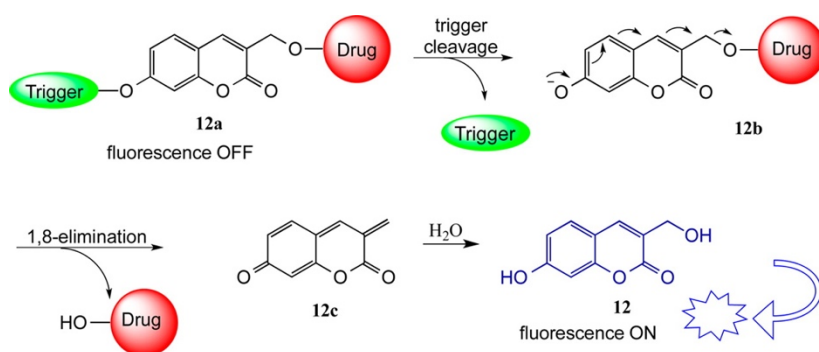


Figure I.12 - Mécanisme de libération d'un principe actif via l'utilisation d'un bras espaceur auto-immolable fluorogénique de type 7-hydroxycoumarine. Illustration issue de la référence [43].

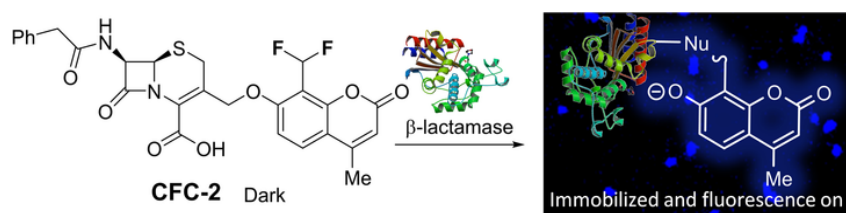


Figure I.13 - Sonde fluorogénique suicide pour le marquage fluorescent des β -lactamases, dérivée d'une 7-hydroxycoumarine. Illustration issue de la référence [44].

I.1.3. Réaction de Pinner ou lactonisation : élément clé pour la réaction domino formant le cœur coumarine

La réaction de Pinner est classiquement connue pour former un sel d'imidoester à partir d'un nitrile et d'un alcool en milieu acide⁴⁵. Sa version intramoléculaire mettant en jeu un phénol substitué en *ortho* par un motif cinnamonitrile est une méthode efficace de formation du cœur coumarine (Fig. I.14). Le groupement hydroxyle phénolique qui deviendra la position 1 de la 2*H*-chromèn-2-one constitue ainsi un second site (alternatif ou complémentaire du centre fluorogénique 7-NH₂/ 7-OH) pour la construction de sondes fluorogéniques "Off-On".

L'obtention de ce type de cœur par cyclisation photo-induite (*via* un processus d'isomérisation *cis* / *trans* d'une double liaison C=C) d'acide *ortho*-hydroxycinnamique est connue depuis les années 1980⁴⁶, il a cependant fallu attendre les années 2000 pour voir apparaître une stratégie alternative applicable à la détection d'analytes d'intérêt⁴⁷. Elle est fondée sur la protection temporaire du phénol (par un motif réactif vis-à-vis de l'analyte ciblé) qui une fois libre, pourra réagir avec un groupement cyano ou ester selon une réaction d'addition(-élimination) nucléophile intramoléculaire.

⁴⁵ a) A. Pinner et F. Klein, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1878**, (11), 1475-1487 ; b) A. Pinner et F. Klein, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1878**, (11), 4-11 ; c) A. Pinner et F. Klein, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1878**, (11), 764-767 ; d) A. Pinner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1883**, (16), 1643-1655 ; e) R. Roger et D. G. Neilson, *Chem. Rev.*, **1961**, (61), 179-211.

⁴⁶ A. D. Turner, S. V. Pizzo, G. Rozakis et N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, (110), 244-250.

⁴⁷ T.-H. Kim et T. M. Swager, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2003**, (42), 4803-4806.

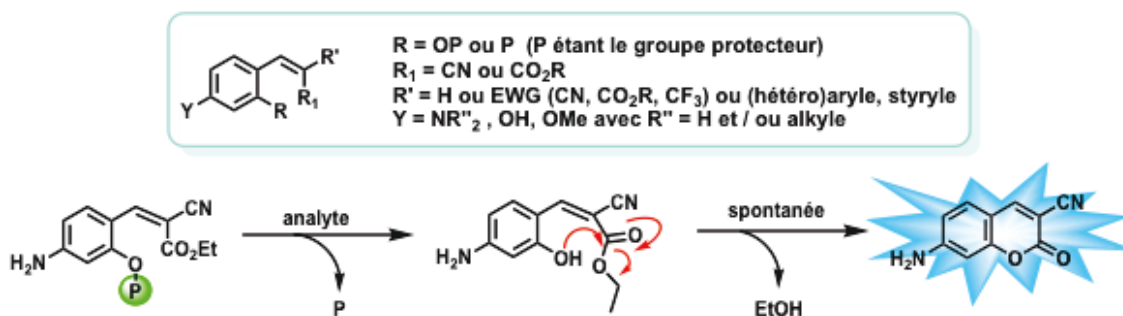


Figure I.14 - (haut) Structure générale d'une sonde fluorogénique "Off-On" dont le mécanisme d'activation repose sur la réaction de Pinner conduisant à la formation d'une coumarine substituée en position 7. (bas) Mécanisme de la réaction de Pinner intramoléculaire conduisant à la formation d'une 7-amino-3-cyanocoumarine fluorescente.

Depuis quelques années, et malgré l'absence de sondes commerciales fondées sur ce mécanisme d'activation, de nombreux travaux ont été publiés à la fois pour élargir le panel d'analytes potentiellement détectables (Fig. I.15)⁴⁸ mais aussi pour former *in situ* des cœurs coumariniques émettant dans le rouge et donc envisager des applications dans des matrices biologiques complexes (Fig. I.16)⁴⁹. Le principal avantage de ces sondes par rapport à celles plus conventionnelles mettant en jeu la protection temporaire du centre fluorogénique en position 7 (voir Tableau I.1) est lié à l'absence de fluorescence résiduelle avant réaction avec l'analyte apportant donc une amélioration significative du rapport signal / bruit. Ainsi, l'utilisation de tels systèmes fluorogéniques peut permettre de maximiser la résolution spatiale, paramètre d'importance lors de la conduite d'expériences de bioimagerie⁵⁰. En revanche, en fonction de la nature du motif utilisé pour masquer le phénol et des substituants éventuellement présents sur le précurseur cinnamone nitrile / cinnamate d'alkyle, la sonde peut être sensible à l'hydrolyse non-spécifique. Ce comportement non désiré sera directement lié à la valeur du pKa du phénol et au caractère électrophile de son groupe protecteur.

⁴⁸ Pour les principaux exemples publiés, voir : a) T.-I. Kim, M. S. Jeong, S. J. Chung et Y. Kim, *Chem. - Eur. J.*, **2010**, (16), 5297-5300 ; b) T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi et Y. Kim, *Chem. Comm.*, **2011**, (47), 9825-9827 ; c) I. Kim, D. Kim, S. Sambasivan et K. H. Ahn, *Asian J. Org. Chem.*, **2012**, (1), 60-64 ; d) J. Park et Y. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, (23), 2332-2335 ; e) P. Hou, S. Chen, H. Wang, J. Wang, K. Voitchovsky et X. Song, *Chem. Comm.*, **2014**, (50), 320-322 ; f) J. Kim, J. Park, H. Lee, Y. Choi et Y. Kim, *Chem. Comm.*, **2014**, (50), 9353-9356 ; g) J. Zhou, Y. Li, J. Shen, Q. Li, R. Wang, Y. Xu et X. Qian, *RSC Adv.*, **2014**, (4), 51589-51592 ; h) Y. Han, C. Yang, K. Wu, Y. Chen, B. Zhou et M. Xia, *RSC Adv.*, **2015**, (5), 16723-16726 ; i) P. K. Mishra, T. Saha et P. Talukdar, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 7430-7436 ; j) J. Zhang, Y. Li et W. Guo, *Anal. Methods*, **2015**, (7), 4885-4888 ; k) H. Zhang, Y. Xie, P. Wang, G. Chen, R. Liu, Y.-W. Lam, Y. Hu, Q. Zhu et H. Sun, *Talanta*, **2015**, (135), 149-154 ; l) Y. Chen, B. Chen, D. Luo, Y. Cai, Y. Wei et Y. Han, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, (57), 1192-1195 ; m) Y. Chen, M. Zhang, Y. Han et J. Wei, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 8380-8383 ; n) Z. Hu, J. Hu, H. Wang, Q. Zhang, M. Zhao, C. Brommesson, Y. Tian, H. Gao, X. Zhang et K. Uvdal, *Anal. Chim. Acta*, **2016**, (933), 189-195 ; o) J. Zhang, Y. Li, J. Zhao et W. Guo, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2016**, (237), 67-74

⁴⁹ a) D. Kim, S. Sambasivan, H. Nam, K. Hean Kim, J. Yong Kim, T. Joo, K.-H. Lee, K.-T. Kim et K. Han Ahn, *Chem. Comm.*, **2012**, (48), 6833-6835 ; b) X. Liu, D. Yang, W. Chen, L. Yang, F. Qi et X. Song, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2016**, (234), 27-33 ; c) F. Qi, X. Liu, L. Yang, L. Yang, W. Chen et X. Song, *Tetrahedron*, **2016**, (72), 6909-6913 ; d) W. Chen, X. Yue, W. Li, Y. Hao, L. Zhang, L. Zhu, J. Sheng et X. Song, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2017**, (245), 702-710.

⁵⁰ J. Chan, S. C. Dodani et C. J. Chang, *Nat. Chem.*, **2012**, (4), 973-984.

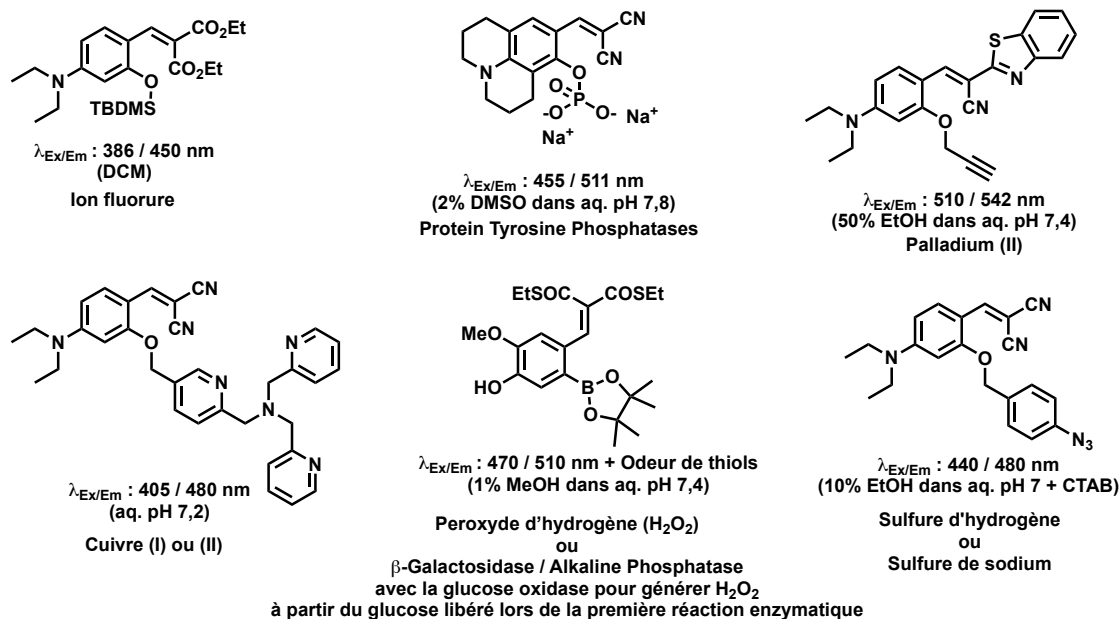


Figure I.15 - Exemples de sondes fluorogéniques "Off-On" dont le mécanisme d'activation repose sur la formation *in situ* d'un cœur 7-NR₂ / 7-OH (2-imino)coumarine et leurs analytes ciblés. (CTAB = bromure de cetyltriméthylammonium). Les exemples sont issus des références (de gauche à droite) [47], [48a], [48m], [48n], [51a] et [48j].

Le groupe de S. T. Phillips a mis au point un prolongement original de ces travaux pour lequel le précurseur (siège de la réaction de cyclisation) est capable de libérer un analyte qui amplifie ou confirme la réponse fluorogénique initialement obtenue⁵¹. Ils ont ainsi élaboré des matériaux intelligents pour la détection de quantité infimes de thiols (Fig. I.17). En rencontrant le thiol à détecter, le matériau devient le siège d'une réaction de lactonisation qui libère un autre thiol (molécules d'éthanethiol) qui va pouvoir à son tour réagir sur le matériau libérant d'autres thiols... En appliquant un stimulus local, on obtient donc une réponse globale du système. Ce processus d'auto-amplification du signal est largement inspiré du principe naturel de la thigmonastie : mouvement global d'un organe de végétal suite à un stimulus tactile localisé.

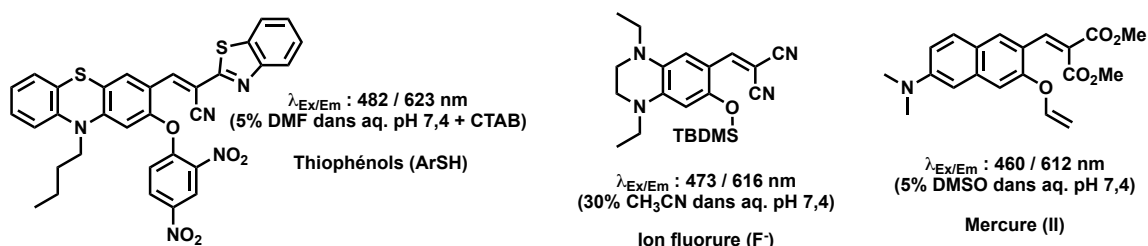


Figure I.16 - Application de la réaction de Pinner intramoléculaire (ou de lactonisation) pour former des cœurs coumarine émettant à de plus grandes longueurs d'ondes et leurs analytes ciblés. Exemples issus des références [49d], [48e] et [48c].

⁵¹ a) H. Mohapatra et S. T. Phillips, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, (51), 11145-11148 ; b) A. D. Brooks, H. Mohapatra et S. T. Phillips, *J. Org. Chem.*, **2015**, (80), 10437-10445 ; c) H. Mohapatra, H. Kim et S. T. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, (137), 12498-12501.

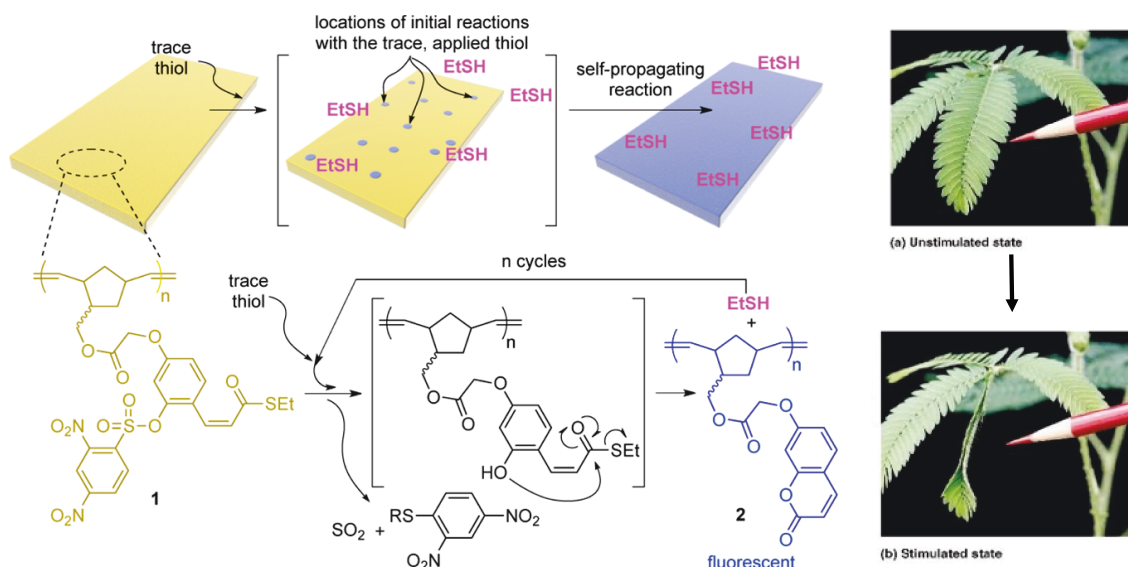


Figure I.17 - Utilisation combinée de la réaction de Pinner intramoléculaire et d'un processus d'auto-amplification moléculaire pour concevoir un matériau intelligent capable de détecter des traces d'éthanethiol (approche inspirée de la nature : la thigmonastie du *Mimosa pudica*). Illustration issue de la publication [51c].

I.1.4. Enzymes détectées / Substrats et intérêt en biologie

Du point de vue de la réactivité chimique, les enzymes peuvent être considérées comme des catalyseurs hautement spécifiques d'une réaction donnée. La diversité du vivant offre alors toute une gamme de fonctionnalités à ces enzymes qui sont particulièrement étudiées / utilisées dans le contexte des biotechnologies⁵². Elles sont donc des outils de choix pour le développement de méthodes de synthèse "verte". Dans cette sous-partie, les enzymes utilisées au cours de ces travaux de thèse seront présentées ainsi que l'intérêt de les détecter d'une part d'un point de vue méthodologique pour la validation des mécanismes de déclenchement des sondes les ciblant et d'autre part d'un point de vue biomédical.

L'objectif de la thèse est d'obtenir des sondes "dual-analytes" (une réponse uniquement déclenchée en présence de deux analytes) basées sur des mécanismes de formation *in situ* de fluorophores organiques, il est donc logique, du moins dans un premier temps pour les étapes de validation, de travailler avec des enzymes facilement manipulables, robustes (stables en présence d'un certain pourcentage de solvant organique dans le tampon aqueux de réaction), tolérantes à une certaine variabilité structurale de leurs substrats naturels (pour éviter la non-reconnaissance de la sonde), bon marché et facilement accessibles.

⁵² Pour un ouvrage sur les utilisations des enzymes, voir : a) H.-C. Yang, W.-K. Yeh et J. R. McCarthy, *Enzyme Technologies: Pluripotent Players in Discovering Therapeutic Agents*, John Wiley & Sons, 1ère édition, 2014. Pour une revue sur les sondes optiques intelligentes activables enzymatiquement, voir : b) C. R. Drake, D. C. Miller et E. F. Jones, *Curr. Org. Synth.*, 2011, (8), 498-520.

La PGA (Penicillin G-acylase ou penicillin amidase)⁵³ est une enzyme de la famille des hydrolases catalysant l'hydrolyse des liens phénylacétamide. Elle répond à la majorité des critères énoncés plus haut. Elle est peu chère (PGA de *Escherichia coli*, 1000 unités = 100 euros)⁵⁴, son substrat est facilement accessible (simple réaction d'amidification avec le chlorure de phénylacétyle, PhAcCl) et stable une fois introduit sur la fonction amine d'un fluorophore ou d'un bras espaceur auto-immolable.

Il est aussi intéressant de préciser que cette enzyme est également disponible immobilisée sur un support polymérique et ce afin d'accroître sa tolérance aux solvants organiques (e.g., tampon phosphate avec 10% acétone ou 20% méthanol), ce qui a notamment permis d'utiliser le motif PhAc comme groupe protecteur enzymo-labile en chimie organique⁵⁵ mais aussi pour des applications industrielles. Outre son utilité première dans la synthèse d'antibiotiques β -lactame pour la prévention et le traitement d'infections bactériennes, elle peut aussi être utilisée (après administration) pour activer des prodrogues d'agents cytotoxiques dans le contexte de la chimiothérapie anti-cancéreuse^{52a}. La robustesse du couple PGA / phénylacétamide en fait un déclencheur biochimique de choix pour valider des bras espaceurs auto-immolables⁵⁶ et par extension des dendrimères / polymères auto-immolables (Fig. I.18)⁵⁷.

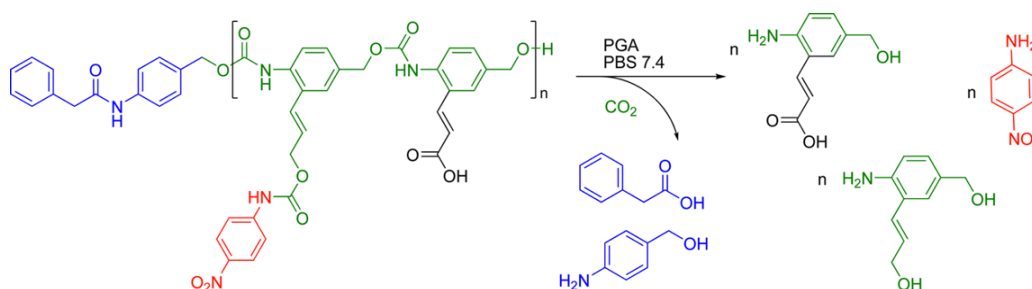


Figure I.18 - Polymère auto-immolable sensible à la PGA via l'hydrolyse d'un lien amide du motif PhAc-PABA (en bleu). Illustration issue de la référence [57].

⁵³ R. Virden, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1990**, (8), 189-218.

⁵⁴ Voir le site internet de la société Iris Biotech GmbH, <https://www.iris-biotech.de/ez50150> (consulté le 27/04/17).

⁵⁵ Pour une revue sur les groupes protecteurs enzymo-labiles, voir : D. Kadereit et H. Waldmann, *Chem. Rev.*, **2001**, (101), 3367-3396.

⁵⁶ a) S. Gnaïm et D. Shabat, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, (47), 2970-2984 ; b) A. Alouane, R. Labruere, T. Le Saux, F. Schmidt et L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, (54), 7492-7509.

⁵⁷ M. E. Roth, O. Green, S. Gnaïm et D. Shabat, *Chem. Rev.*, **2016**, (116), 1309-1352.

La PLE⁵⁸ (Pig Liver Esterase ou carboxylesterase (estérase de foie de cochon)) est une enzyme de la famille des hydrolases catalysant l'hydrolyse des liens ester. Comme la PGA, elle est facilement accessible et bon marché (1000 unités = 125 euros)⁵⁹. Son utilisation en synthèse organique pour les résolutions cinétiques d'alcools ou d'acides aminés ou pour la désymétrisation de structures pro-chirales est courante⁶⁰. Son substrat générique (acétate) se retrouve dans la structure de nombreuses prodrogues (Fig. I.19)⁶¹ et / ou de pro-fluorophores⁶² (par exemple, le diacétate de fluorescéine (N°_{CAS} : 596-09-8) qui est utilisé comme un des standards de viabilité cellulaire). Le groupement acétyle (Ac et son homologue acétoxyméthyle AM) est également connu pour faciliter le passage membranaire des composés polaires dont les fonctions alcool et / ou les groupements ionisés à pH physiologique (typiquement, acide carboxylique et phénol) seront transformés en esters d'acide acétique plus facilement internalisables et dégradables par la cellule.

Concernant des enzymes plus pertinentes sur un plan biologique / biomédical, et connues comme biomarqueurs avérés de maladies, la LAP (Leucine AminoPeptidase)⁶³ nous est apparue comme une cible intéressante.

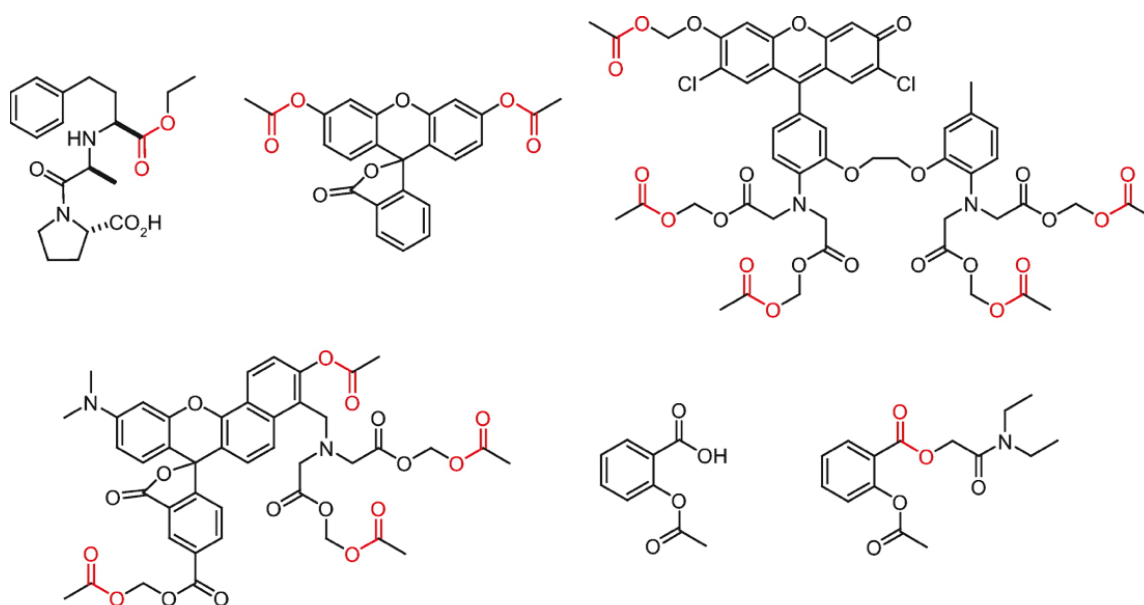


Figure I.19 - Quelques exemples de prodrogues et de pro-fluorophores contenant un ou plusieurs esters d'Ac ou d'AM : (de gauche à droite) énalapril, diacétate de fluorescéine, Fluo-3 AM, C-SNARF-1-calcein AM, aspirine et ester de N,N-diéthylglycolamide d'aspirine. Illustration issue de la référence [61].

⁵⁸ E. Bruesehaber, D. Boettcher et U. T. Bornscheuer, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, (17), 7878-7883.

⁵⁹ Voir le site internet de la société Iris Biotech GmbH, <https://www.iris-biotech.de/ez50070> (consulté le 27/04/17).

⁶⁰ P. Dominguez de Maria, C. A. Garcia-Burgos, G. Bargeman et R. W. van Gemert, *Synthesis*, **2007**, 1439-1452.

⁶¹ L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, (3), 203-206.

⁶² K. R. Tallman et K. E. Beatty, *ChemBioChem*, **2015**, (16), 70-75.

⁶³ M. Matsui, J. H. Fowler et L. L. Walling, *Biol. Chem.*, **2006**, (387), 1535-1544.

En effet, elle pourrait avoir un rôle dans la malignité du cancer des ovaires, de l'endomètre⁶⁴ et du foie⁶⁵. Elle pourrait intervenir dans certaines résistances aux chimiothérapies anticancéreuses notamment dans le cadre d'un traitement au cisplatine⁶⁶. Elle serait également une cible potentielle dans le traitement de la malaria⁶⁷ et son niveau anormalement bas a été identifié comme un marqueur de mort prénatale⁶⁸. Elle est facile d'accès et peu onéreuse⁶⁹. Son substrat, l'amide de la L-leucine est simple du point de vue structural (pour des exemples de sondes, voir Fig. I.20). Comme la PGA, elle permet de valider les concepts d'activation de sondes à protéases⁷⁰. Mais les sondes à LAP montrent une meilleure solubilité à pH physiologique du fait de la présence d'une amine primaire protonée à cette gamme de pH. Le choix entre ces deux couples enzyme / substrat apparaît alors comme un choix entre facilité d'accès ou solubilité optimale des sondes. Précisons que le motif leucine de la LAP est moins spécifique que ne l'est le motif phénylacétamide pour la PGA, mais il peut être utilisé pour greffer un autre substrat (sur sa fonction amine primaire) pour obtenir une sonde "dual-analytes" fonctionnant selon un mode séquentiel. Un exemple est le concept de sonde pré-pro-fluorescente activée par le couple β -Gal / LAP développé par le groupe de J. Hasserodt⁷¹.

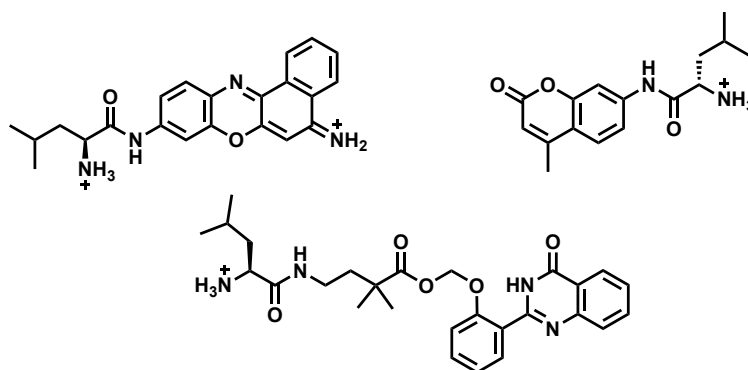


Figure I.20 - Quelques exemples de sondes fluorogéniques "Off-On" pour la détection de la LAP : (de gauche à droite) sonde dérivée du "Nile Blue" (sel de TFA)⁶⁶ ; pro-fluorophore dérivé de la 7-amino-4-méthylcoumarine et pro-fluorophore à bras espaceur auto-immolable et dérivé de la HPQ^{70a,72}.

⁶⁴ S. Mizutani, K. Shibata, F. Kikkawa, A. Hattori, M. Tsujimoto, M. Ishii et H. Kobayashi, *Expert Opin. Ther. Targ.*, **2007**, (11), 453-461.

⁶⁵ X. He, L. Li, Y. Fang, W. Shi, X. Li et H. Ma, *Chem. Sci.*, **2017**, (8), 3479-3483.

⁶⁶ Q. Gong, W. Shi, L. Li et H. Ma, *Chem. Sci.*, **2016**, (7), 788-792.

⁶⁷ S. Rout et R. K. Mahapatra, *Biomed. Pharmacother.*, **2016**, (82), 192-201.

⁶⁸ C. Tian, Z. Huang et Z. Wen, *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **2016**, (135), 255-258.

⁶⁹ Voir le site internet de la société Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/5006?lang=fr®ion=FR> (consulté le 27/04/17).

⁷⁰ Pour des exemples de pro-fluorophores activés par la LAP, voir : a) X.-b. Zhang, M. Waibel et J. Hasserodt, *Chem. - Eur. J.*, **2010**, (16), 792-795 ; b) O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon et J. Hasserodt, *Chem. Comm.*, **2012**, (48), 6253-6255 ; c) M. Prost, L. Canaple, J. Samarut et J. Hasserodt, *ChemBioChem*, **2014**, (15), 1413-1417.

⁷¹ M. Prost et J. Hasserodt, *Chem. Comm.*, **2014**, (50), 14896-14899.

⁷² La HPQ et ses dérivés constituent une famille de fluorophores précipitants (phénomène d'AIE combiné au processus d'ESIPT, cf. introduction générale).

La β -Gal (β -galactosidase) est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des β -galactosides en oses simples. L'un de ses substrats naturels est le lactose⁷³ qu'elle transforme en galactose et glucose unitaire. Elle est principalement utilisée comme rapporteur enzymatique en biologie moléculaire, dans les immunoessais et plus globalement dans un large éventail d'applications bio-analytiques qui requièrent une détection chromogénique / fluorogénique sensible et facile à mettre en œuvre. A titre d'exemple, on peut citer le système blanc-bleu ("blue-white screen", test de bonne incorporation d'un plasmide en génie génétique par l'expression du gène *LacZ* codant la β -Gal qui métabolise le X-Gal faisant apparaître une couleur bleue) présenté Fig. I.21B⁷⁴. Cette enzyme apparaît aussi comme un des marqueurs⁷⁵ de la sénescence cellulaire (arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule)⁷⁶. D'autres applications émergentes comme additif alimentaire pour les personnes intolérantes au lactose sont également envisagées⁷⁷. La galactosidase utilisée a été achetée chez Sigma-Aldrich⁷⁸.

Les nitroréductases (NTRs) constituent une classe d'enzymes capables de réduire les composés nitroaromatiques (par exemple, la nitrofurazone utilisée comme antibiotique, ou le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) utilisé comme explosif)⁷⁹ et sont donc des biocatalyseurs de choix pour la mise au point de procédés de dépollution industrielle. Elles catalysent le transfert d'électrons pour successivement générer des dérivés nitroso, hydroxylamine et parfois amine. Elles possèdent un groupe prosthétique de type FMN et utilisent un cofacteur nicotinamide (NADH ou NADPH).

⁷³ A. I. Guce, N. E. Clark, E. N. Salgado, D. R. Ivanen, A. A. Kulminskaya, H. Brumer, III et S. C. Garman, *J. Biol. Chem.*, **2010**, (285), 3625-3632.

⁷⁴ a) D. H. Juers, B. W. Matthews et R. E. Huber, *Protein Sci.*, **2012**, (21), 1792-1807 ; b) S. Padmanabhan, S. Banerjee et N. Mandi, Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives, *Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and Biology*, InTech, **2011**.

⁷⁵ B. Y. Lee, J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio et E. S. Hwang, *Aging Cell*, **2006**, (5), 187-195.

⁷⁶ V. Gire, *Med. Sci.*, **2005**, (21), 491-497.

⁷⁷ Q. Husain, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2010**, (30), 41-62.

⁷⁸ Voir le site internet de la société Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g5635?lang=fr®ion=FR> (consulté le 27/04/17).

⁷⁹ M. D. Roldan, E. Perez-Reinado, F. Castillo et C. Moreno-Vivian, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, (32), 474-500.

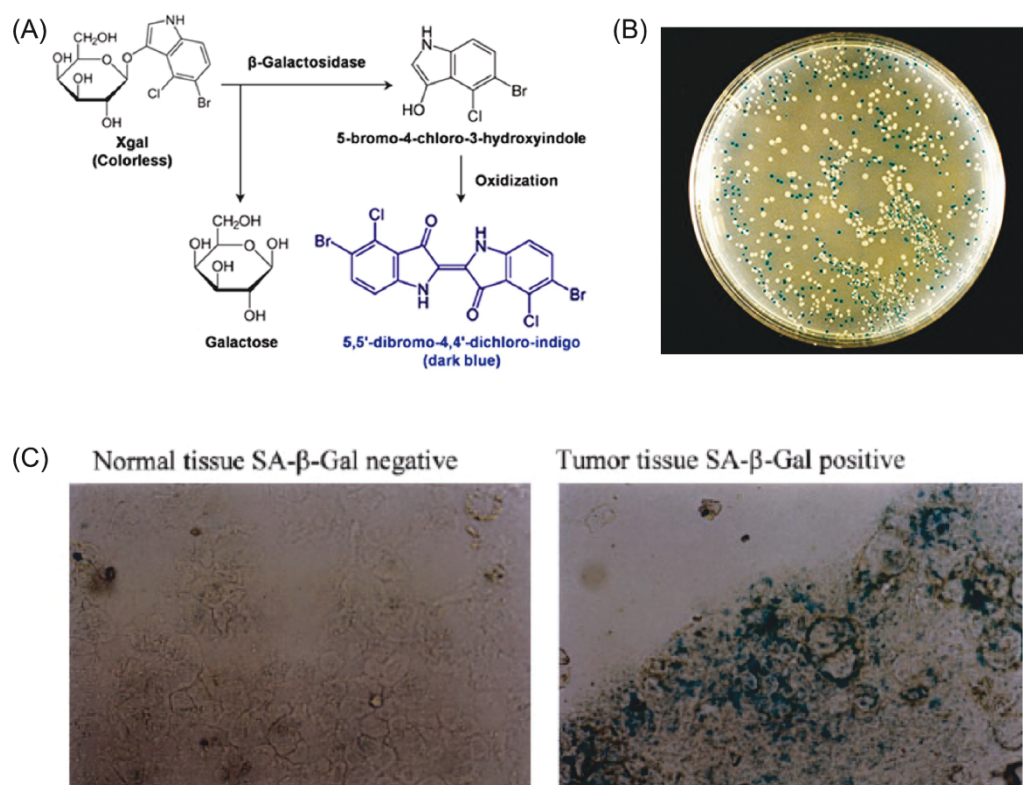


Figure 1.21 - (A) Mécanisme de détection de la β -Gal au moyen du X-Gal⁸⁰. (B) Image d'un "blue-white screen" (issue du site internet de la compagnie Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>). (C) Mise en évidence de la sénescence cellulaire à l'aide du X-Gal au sein d'un tissu tumoral⁸¹. Illustrations issues des références [80] et [81].

La production de ce type d'enzymes par certaines bactéries⁸² en fait une cible pour le développement d'agents d'imagerie pour l'étude des infections bactériennes chez l'humain⁸³. Par ailleurs, leur présence avérée dans les zones hypoxiques cancéreuses⁸⁴ ont conduit les scientifiques à réaliser de nombreux travaux dont la finalité est de les détecter / imager⁸⁵ (Fig. 1.22 pour un exemple) et / ou d'utiliser ces enzymes comme activateurs d'agents cytotoxiques⁸⁶ et cela malgré l'échec récent du TH-302 (Evofosfamide, N° CAS : 918633-87-1, Fig. 1.23) dans une phase 3 d'un essai clinique⁸⁷ (note : toujours en essais pour d'autres indications). Nos essais sont réalisés avec de la NTR d'*E.coli* et du NADH achetés chez Sigma-Aldrich⁸⁸.

⁸⁰ X. Cai, L. Li, A. Krumholz, Z. Guo, T. N. Erpelding, C. Zhang, Y. Zhang, Y. Xia et L. V. Wang, *PLoS One*, **2012**, (7), e43999.

⁸¹ R. H. te Poele, A. L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings et S. P. Joel, *Cancer Res.*, **2002**, (62), 1876-1883.

⁸² R. H. F. Wong, T. Kwong, K.-H. Yau et H. Y. Au-Yeung, *Chem. Comm.*, **2015**, (51), 4440-4442.

⁸³ B. Mills, K. Dhaliwal et M. Bradley, *Clin. Transl. Imaging*, **2016**, (4), 163-174.

⁸⁴ R. B. P. Elmes, *Chem. Comm.*, **2016**, (52), 8935-8956.

⁸⁵ Pour des revues sur le sujet, voir : a) S. Apte, F. T. Chin et E. E. Graves, *Curr. Org. Synth.*, **2011**, (8), 593-603 ;

b) Y. Zeng, J. Ma, S. Zhang et D. Wu, *Curr. Med. Chem.*, **2016**, (23), 1775-1800 ; c) J.-n. Liu, W. Bu et J. Shi, *Chem. Rev.*, **2017**, (117), 6160-6224

⁸⁶ a) R. M. West et R. Ismail, *WO 2005/118839 A1*, **2005** ; b) E. Nakata, Y. Yukimachi, H. Kariyazono, S. Im, C. Abe, Y. Uto, H. Maezawa, T. Hashimoto, Y. Okamoto et H. Hori, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, (17), 6952-6958 ; c) T. Guo, L. Cui, J. Shen, W. Zhu, Y. Xu et X. Qian, *Chem. Comm.*, **2013**, (49), 10820-10822 ; d) Y. Shi, S. Zhang et X. Zhang, *Analyst*, **2013**, (138), 1952-1955 ; e) Z. Li, X. He, Z. Wang, R. Yang, W. Shi et H. Ma, *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, (63), 112-116.

⁸⁷ J. Levin, <http://www.fiercebiotech.com/biotech/threshold-pharmaceuticals-announces-its-two-phase-3-studies-evaluating-evofosfamide-did-not> (consulté le 10/08/2017).

⁸⁸ Voir le site internet de la société Sigma-Aldrich : a) <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n9284?lang=fr®ion=FR> ; b) <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/43420?lang=fr®ion=FR>.

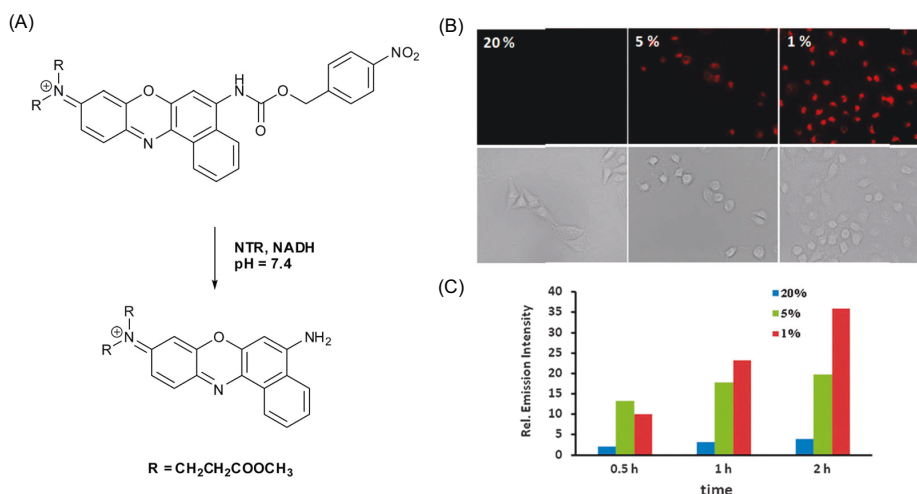


Figure 1.22 - Sonde fluorogénique "Off-On" pour la détection d'une activité NTR dont le mécanisme d'activation est basé sur la libération d'un dérivé benzophénoxazine (BPO)^{86c}. (A) Principe d'activation de la sonde en présence de NTR. (B) Image de fluorescence de cellules incubées avec cette sonde sous différentes conditions d'hypoxie / normoxie. (C) Graphique représentant la variation de fluorescence en fonction du temps et suivant le taux d'oxygène des cellules. Illustrations issues de la référence [86c].

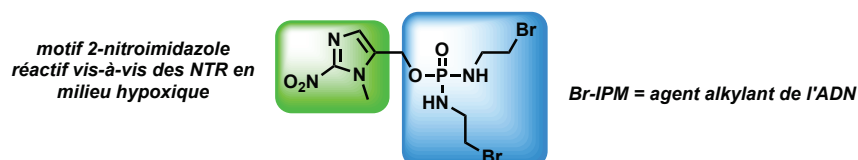


Figure 1.23 - Structure de l'Evofofosfamide : prodrogue de la palifosfamide bromée (Br-IPM) développée dans le cadre des thérapies ciblées pour la libération d'agents cytotoxiques en milieu hypoxique contre les tumeurs solides^[89].

⁸⁹ L. J. O'Connor, C. Cazares-Korner, J. Saha, C. N. G. Evans, M. R. L. Stratford, E. M. Hammond et S. J. Conway, *Org. Chem. Front.*, **2015**, (2), 1026-1029.

Les sulfatases sont des enzymes présentes dans de nombreux organismes vivants⁹⁰ mais dont l'ensemble des fonctions ne sont pas totalement clarifiées. Cependant, un déficit de ces enzymes serait à l'origine des maladies de surcharge lysosomale ("lysosomal storage disorders")⁹¹, alors que les stéroïdes sulfatases humaines (STS) sont des cibles potentielles pour le diagnostic et le traitement des cancers hormonodépendants⁹². Le groupe de C. R. Bertozzi a également publié quelques travaux⁹³ concernant des pro-fluorophores sensibles aux sulfatases et utilisés pour la détection des mycobactéries responsables de la tuberculose (Fig. I.24C). Pour nos études, la sulfatase envisagée fut celle extraite de l'escargot de Bourgogne "*Helix pomatia*-Type H1" commerciale et disponible chez Sigma-Aldrich⁹⁴.

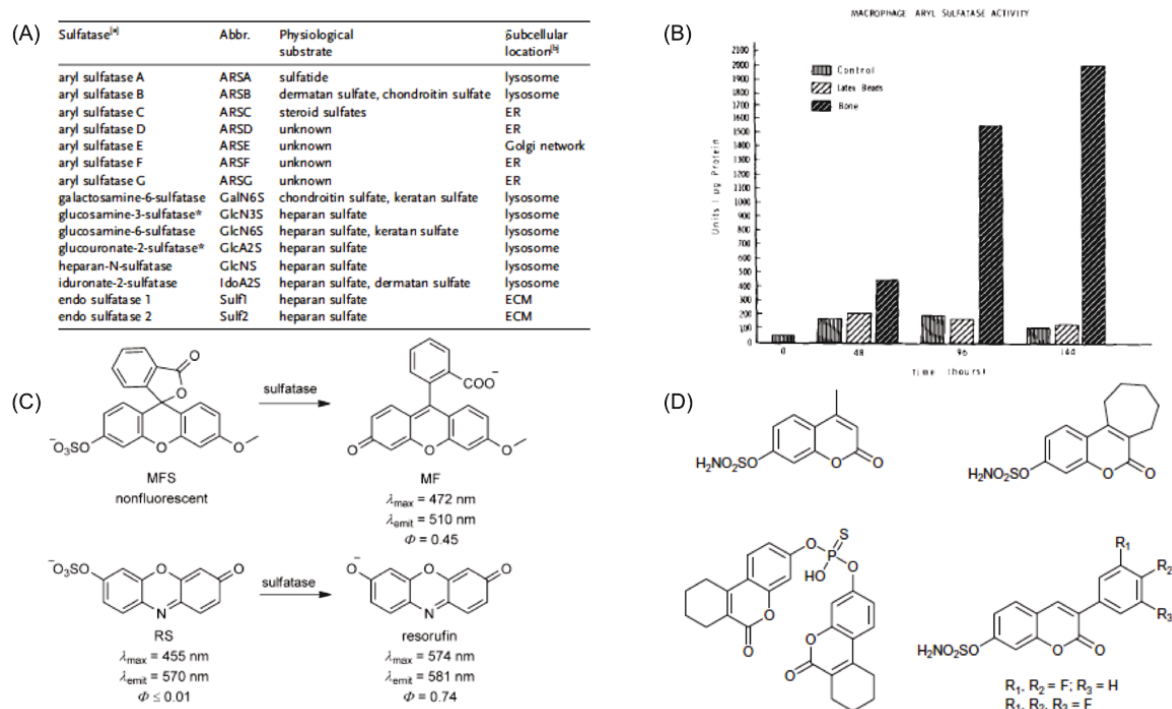


Figure I.24 - (A) Substrats et localisation de différentes sulfatases humaines⁹⁰. (B) Accroissement de l'activité spécifique des aryles sulfatases au sein des macrophages au contact de cellules osseuses⁹⁵. (C) Sondes fluorogéniques "Off-On" réactives vis-à-vis des sulfatases développées par le groupe de C. R. Bertozzi pour détecter des mycobactéries^{93c}. (D) Quelques inhibiteurs de sulfatases stéroïdiennes (STS) développés pour le traitement des cancers hormono-dépendants⁹⁶. Illustrations issues des références [90], [95], [93] et [96].

⁹⁰ a) S. R. Hanson, M. D. Best et C.-H. Wong, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, (43), 5736-5763 ; b) M. J. Reed, A. Purohit, L. W. L. Woo, S. P. Newman et B. V. L. Potter, *Endocr. Rev.*, **2005**, (26), 171-202 ; c) M. Sardiello, I. Annunziata, G. Roma et A. Ballabio, *Hum. Mol. Genet.*, **2005**, (14), 3203-3217.

⁹¹ C. S. Bond, P. R. Clements, S. J. Ashby, C. A. Collyer, S. J. Harrop, J. J. Hopwood et J. M. Guss, *Structure*, **1997**, (5), 277-289.

⁹² a) G. S. Chetrite, J. Cortes-Prieto, J. C. Philippe, F. Wright et J. R. Pasqualini, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2000**, (72), 23-27 ; b) L. Secky, M. Svoboda, L. Klameth, E. Bajna, G. Hamilton, R. Zeillinger, W. Jaeger et T. Thalhammer, *J. Drug Deliv.*, **2013**, 957605.

⁹³ a) J. S. Rush, K. E. Beatty et C. R. Bertozzi, *ChemBioChem*, **2010**, (11), 2096-2099 ; b) K. E. Beatty, M. Williams, B. L. Carlson, B. M. Swarts, R. M. Warren, P. D. van Helden et C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, (110), 12911-12916 ; c) E. L. Smith, C. R. Bertozzi et K. E. Beatty, *ChemBioChem*, **2014**, (15), 1101-1105.

⁹⁴ Voir le site internet de la société Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s9626?lang=fr®ion=FR> (consulté le 27/04/17).

⁹⁵ J. P. Gies et C. K. Dorey, *Calcif. Tissue Int.*, **1981**, (33), 181-184.

⁹⁶ K. Jagiello, A. Sosnowska, S. Kar, S. Demkowicz, M. Dasko, J. Leszczynski, J. Rachon et T. Puzyn, *Struct. Chem.*, **2017**, (28), 1017-1032.

I.2. Sondes duales pour une détection multi-enzymatique

I.2.1. Travaux préliminaires : Sonde "mono-analyte" pour la détection d'une activité NTR

Avant de débiter la synthèse de précurseurs "cagés" activables par deux enzymes distinctes, nous avons souhaité valider la formation *in situ* du cœur 7-hydroxy-2-iminocoumarine à partir d'un dérivé dihydroxy-cinnamonitrile non usuel et en mettant en œuvre une activation enzymatique non explorée jusqu'alors sur ce type de structure. La NTR extraite d'*Escherichia coli*, de par sa capacité à réduire un substrat simple (éther *para*-nitrobenzylique jouant le rôle de groupe protecteur de phénol), a été choisie comme stimulus enzymatique. Comme cette enzyme utilise un cofacteur (NADH ou NADPH), il est intéressant d'étudier la possible interférence de ce dernier sur la réaction de cyclisation de Pinner. Par ailleurs cette sonde pouvait avoir un réel potentiel pour détecter une activité NTR au sein de bactéries, cette application potentielle s'inscrivant dans le cadre d'une collaboration déjà existante entre notre équipe et le département R&D Microbiologie de la société bioMérieux. De façon plus globale, la finalité de ce partenariat est la mise au point de nouveaux substrats fluorogéniques pour la détection d'enzymes microbiennes⁹⁷, plus performants que ceux existants, notamment, l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, conjointement développé par le groupe de A. L. James et bioMérieux)⁹⁸. Le détail de la synthèse ainsi que les caractérisations par RMN, HRMS, spectrométrie d'absorption infrarouge et UV-visible de cette première sonde (**SD019**) sont disponibles dans la publication (*vide infra*, composé 4 de l'article) car il s'agit d'un des intermédiaires de synthèse des sondes duales étudiées dans cet article (voir I.2.2). La validation *in vitro* a été concluante comme le montrent les mesures de fluorescence (Fig. I.25). En effet, le maximum d'émission à 458 nm est atteint au bout de 20 min (1200 sec) après avoir introduit l'enzyme et le niveau de fluorescence obtenu sans enzyme est négligeable sur toute la durée d'incubation, ce qui confirme la stabilité de la sonde dans les conditions testées. Si l'on compare les spectres d'émission de la sonde avant et après incubation avec NTR / NADH, on constate que l'intensité de la réponse est 15 à 16 fois supérieure à celle mesurée sans activation enzymatique.

Suite à ce premier résultat positif, nous avons alors envisagé la conception de sondes duales pour la détection de deux activités enzymatiques : hydrolase (PGA ou PLE) et réductase (NTR). Le principe de ces sondes "Off-On" repose sur la combinaison des deux mécanismes d'activation discutés précédemment (libération du phénol fluorogénique en position 7 et du phénol en position 2 pour réaliser la réaction de Pinner intramoléculaire) qui devront se produire simultanément ou de façon séquentielle pour conduire à un signal de fluorescence détectable, confirmant la présence des deux enzymes dans le milieu.

⁹⁷ Pour des revues sur le sujet, voir : a) S. Oregna, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry et D. H. Pincus, *J. Microbiol. Methods*, **2009**, (79), 139-155 ; b) L. Varadi, J. L. Luo, D. E. Hibbs, J. D. Perry, R. J. Anderson, S. Oregna et P. W. Groundwater, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, sous presse, DOI: 10.1039/C1036CS00693K.

⁹⁸ a) A. L. James et D. Monget, *WO 200028073*, **2000** ; b) A. L. James, J. D. Perry, C. Jay, D. Monget, J. W. Rasburn et F. K. Gould, *Lett. Appl. Microbiol.*, **2001**, (33), 403-408.

La préparation de ces sondes et l'étude détaillée de leur activation enzymatique duale à l'aide de différentes méthodes (bio)analytiques complémentaires (mesures de fluorescence, analyses HPLC-MS et HPLC-fluorescence) ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Organic and Biomolecular Chemistry*²⁴ qui servira de support à la discussion.

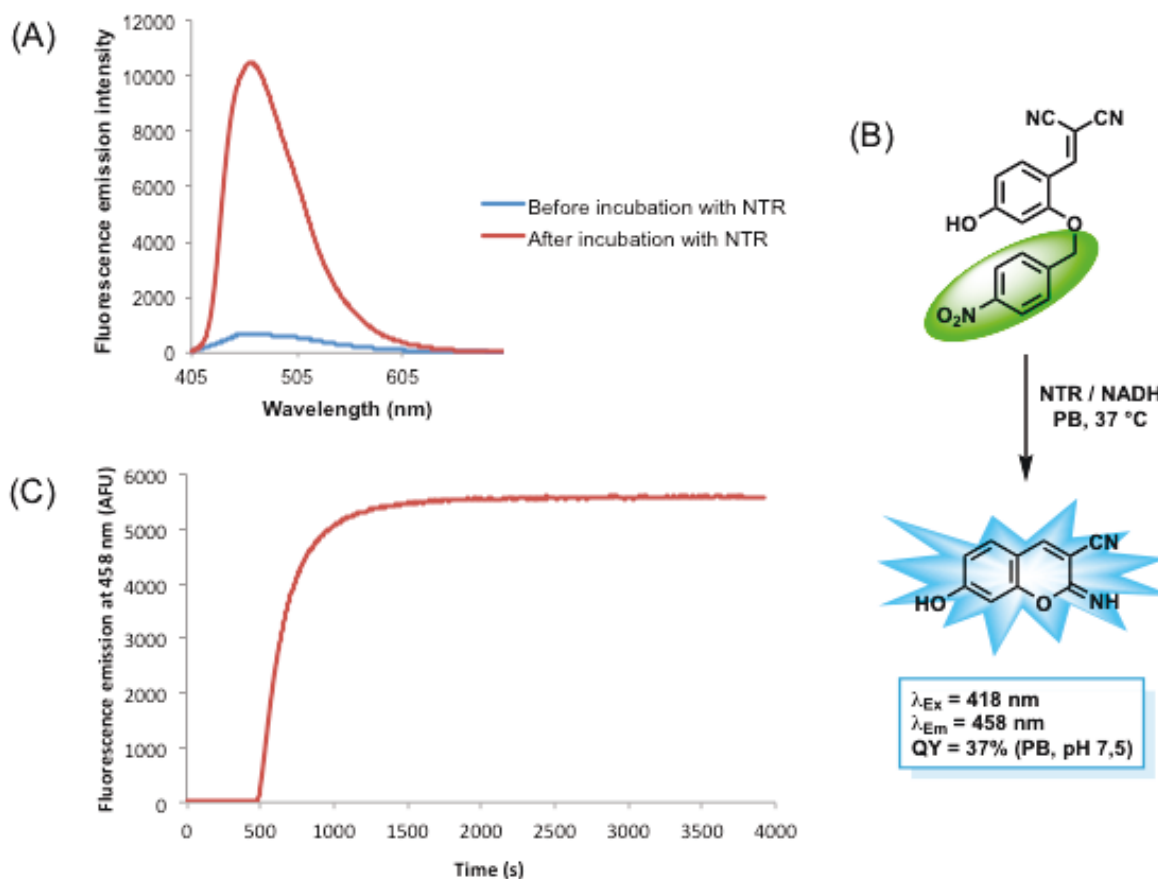


Figure 1.25 - Validation in vitro de la sonde sensible à la NTR (SD019) dont le mécanisme d'activation est basé sur la formation in situ de la 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarine. (A) Spectres d'émission de fluorescence (λ_{Ex} = 390 nm, fente 5 nm) de la sonde (1,0 μM) dans le tampon phosphate (PB, 100 mM, pH 7,5) en présence de NADH (50,0 μM) avant (ligne bleue) et après (ligne rouge) incubation avec la NTR (0,1 U). (B) Mécanisme de formation in situ de la 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarine déclenchée par la NTR, et ses caractéristiques spectrales déterminées dans le PB. (C) Evolution temporelle de l'émission de fluorescence à 458 nm (λ_{ex} = 418 nm, fente 5 nm) de la sonde (1,0 μM) dans le tampon phosphate, en présence de NTR d'*E. coli* (0,1 U, additionné après 500 s d'enregistrement) et de NADH (50,0 μM, présent initialement) à 37°C.

I.2.2. Article 1 : Dual enzyme-responsive "turn-on" fluorescence sensing systems based on in situ formation of 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 10348

Dual enzyme-responsive “turn-on” fluorescence sensing systems based on *in situ* formation of 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds†

Sylvain Debieu^a and Anthony Romieu^{*a,b}

A new strategy for the simultaneous fluorogenic detection of two distinct enzyme activities namely hydrolase (amidase or esterase) and reductase is described. This innovative biosensing method is based on the powerful “covalent-assembly” principle that involves *in situ* synthesis of a fluorophore from a non-fluorescent caged precursor and through domino reactions triggered by the two analytes of interest. To establish this approach, penicillin G acylase (PGA) (or pig liver esterase (PLE)) and nitroreductase (NTR) were chosen as model enzymes, and original bis-*O*-protected 2,4-dihydroxycinnamionitrile derivatives acting as dual-reactive probes readily convertible to highly fluorescent 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds upon reacting with the two selected enzymes were synthesised. The two phenolic groups available within the core structure of these probes play a pivotal role in generating iminocoumarin scaffold through an intramolecular cyclisation reaction (hydroxyl group in C-2 position) and in enhancing its push–pull character (hydroxyl group in C-4 position). Their orthogonal and temporary protection with two different enzyme-labile masking groups is the cornerstone in the design of this novel class of fluorogenic “turn-on” probes. Their evaluation using fluorescence-based *in vitro* assays and HPLC-fluorescence/–MS analyses have enabled us both to demonstrate the claimed activation mechanism (in particular the specific order in which the two enzymes react with the probe) and to highlight the potential utility of these advanced chemical tools in multi-analyte sensing applications.

Received 3rd August 2015,
Accepted 21st August 2015
DOI: 10.1039/c5ob01624j

www.rsc.org/obc

Introduction

Fluorescent probes for dual- or multi-analyte detection have recently emerged as valuable and powerful analytical tools for (bio)sensing and bioimaging applications.¹ Indeed, they have clear advantages over single-analyte responsive probes used either sequentially or simultaneously, particularly to improve the power of analytic assays (in terms of throughput, spatial/temporal resolution and quantitative response) but also facilitate their implementation in molecular-scale devices, through atom economy and high-density integration.² Among the host of useful and promising applications recently claimed for such fluorescent molecular logic gates, “smart” medical diagnostics relying on the simultaneous quantitative detection of several

analytes to one pathology is often highlighted.³ The design principle commonly adopted for constructing such fluorescent chemodosimeters/chemosensors is based on the incorporation of multiple reacting/binding sites within a unique photoactive molecular scaffold. That is able to generate different fluorescence output signals (distinct spectral responses *via* the same or different wavelength channels) upon its reaction with several distinct analytes. Molecular probes with a single reacting/binding site, capable of producing distinct optical outputs depending on the analyte being reacted, are also considered. Thus, numerous dual fluorogenic probes for sensing two species from among some metal cations, anions and/or neutral biorelevant molecules (*e.g.*, biothiols), through specific chemical reactions occurring either simultaneously or consecutively, have been reported during the last decade.¹ By contrast, little attention has been paid to reaction-based fluorescent probes enabling two different enzyme activities monitoring within the same sample or biological medium, whereas they are valuable tools to improve the diagnosis accuracy (avoiding false positives) and expedite the right treatment of diseases. Particularly noteworthy are two examples of FRET-based probe for simultaneous (or sequential) intracellular detection of β -D-glucosidase and phosphodiesterase I, and two

^aInstitut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21078 Dijon, France.
E-mail: anthony.romieu@u-bourgogne.fr; http://www.icmub.fr;

Fax: +33-3-80-39-61-17; Tel: +33-3-80-39-36-24

^bInstitut Universitaire de France, 103, boulevard Saint-Michel, 75005 Paris, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic procedures for Ac-PHBA and PhAc-PABA, experimental details of *in vitro* enzyme assays and all analytical data. See DOI: 10.1039/c5ob01624j

distinct proteases namely matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and caspase-3, respectively.⁴ This probe principle may find further applications in multi-enzyme analysis by changing the sensitive linkers and/or fluorophore pairs, but will remain limited to hydrolases detection. More recently, a brilliant concept for *in vivo* bioluminescence detection of H₂O₂ and caspase-8 (an apoptosis-related cysteine protease), two major contributors to oxidative stress and cell death in injury and disease, has been reported by Bertozzi, Chang and co-workers.⁵ *In situ* formation of D-luciferin from two caged precursors, each specifically activated by one of the two targeted analytes, and through the CBT-based “click” reaction,⁶ is the cornerstone of this dual-analyte imaging strategy. Interestingly, the recent availability of enzyme-responsive caged luciferins (*i.e.*, luciferin derivatives whose the 6-NH₂ or 6-OH is masked by an enzyme-labile moiety)^{7–10} should facilitate the further extension of this “self-assembly” bioluminogenic approach to simultaneous imaging of two relevant enzymes in living systems.

In this context, we are interested in devising a new fluorogenic platform engineered to respond only in the presence of two distinct enzymes and to generate an intense “turn-on” fluorescence signal as a result of domino reactions triggered by these two analytes. Indeed, it is now well established that reaction-based small-molecule fluorescent probes (also known as latent fluorophores, pro-fluorophores or fluorescent chemodosimeters) are powerful tools for detecting/imaging a myriad of analytes including enzymes, biomolecules, chemical pollutants, cations and anions.^{11,12} Among the various organic reaction-based strategies currently implemented in the field of molecular (bio)sensing, the “covalent assembly” approach¹³

using the analyte of interest to carry out the fluorophore synthesis *in situ* from non-fluorescent caged precursor(s), is a very promising way to readily obtain highly fluorimetric “turn-on” signal from zero background. Thus, this concept was successfully applied for the detection of various analytes including enzymes (monoamine oxidases (MAO A and B), penicillin G acylase (PGA), phosphatases), cations/anions (Cu(II), Hg(II), MeHg(I), F⁻ and NO₂⁻), sarin mimics, H₂S, NO and peroxy-nitrite, through the formation of pyrrolo-coumarin, pyrazino-benz[e]indole, 7-*N,N*-dialkylaminocoumarin, 2-arylbenzotriazole, pyronin B, benzo[*c*]cinnoline and resorufin fluorescent scaffolds.^{13–15} Further implementation of this strategy to fluorogenic bimolecular reactions producing red-emitting cyanine dyes, was recently reported for illuminating G-quadruplex DNA structures¹⁶ and protein CRABP II.¹⁷ It is also worth mentioning that the more traditional strategy based on protection–deprotection of the key functional group of a fluorophore (typically, a phenol or an aniline moiety)¹² was recently used by Prost and Hasserodt to develop the appealing “double gating” concept.¹⁸ The activation by successive cleavage of a pre-pro-fluorophore with two distinct enzymes namely β-D-galactosidase and leucine aminopeptidase leads to the release of a phenol-based fluorophore.

From our side, we wished to apply the “covalent assembly” probe design principle to reach the same purpose. To this end, a fluorophore precursor bearing two distinct reactive sites, one involved in the formation of the conjugated backbone and one for enhancing the push–pull character, masked by two different enzyme-labile protecting groups, is needed (Fig. 1). The most convenient class of fluorophores to be used to rapidly provide a proof-of-concept is undoubtedly the 7-amino/

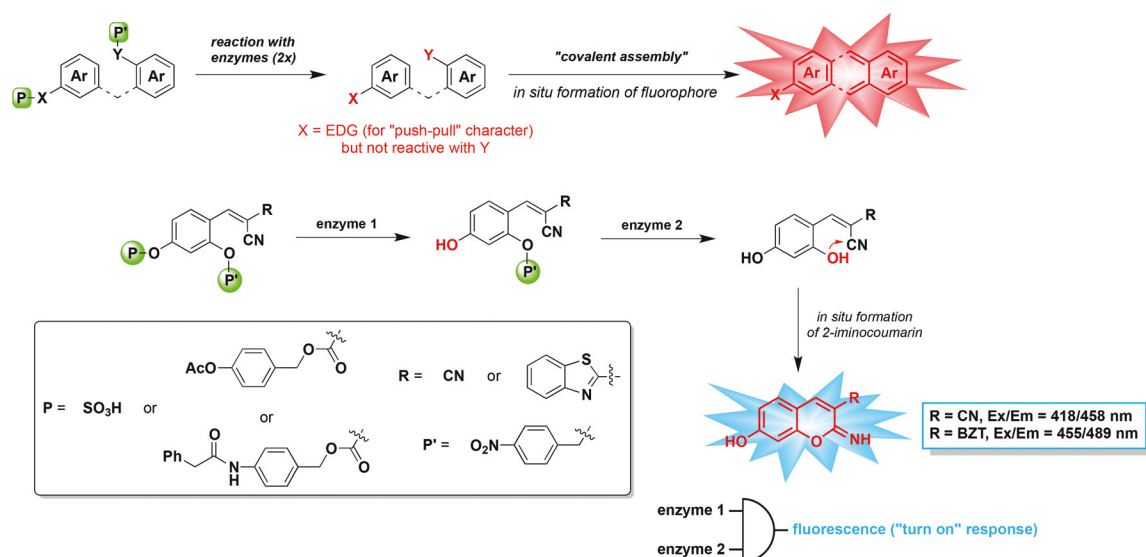


Fig. 1 Dual-enzyme sensing strategy explored in this work: (top) “covalent assembly” principle applied to the simultaneous detection of two distinct enzymes (X = NH or O, EDG = electron-donating group); (bottom) *in situ* synthesis of 3-substituted-7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds from a non-fluorescent caged precursor and through domino reactions triggered by the two different enzymes (failed attempt: probe for sulfatase-NTR, R = CN, P = SO₃H and P' = *para*-nitrobenzyl; probes for PLE-NTR, R = BzT or CN, P = Ac-PHBoxycarbonyl and P' = *para*-nitrobenzyl; probe for PGA-NTR, R = CN, P = PhAc-PABoxycarbonyl and P' = *para*-nitrobenzyl). BzT = 2-benzothiazolyl, NTR = nitroreductase, PLE = pig liver esterase and PGA = penicillin G acylase.

7-hydroxy-(2-imino)coumarins family.¹⁹ Indeed, non-fluorescent precursors readily convertible into (2-imino)coumarins through a specific cyclisation reaction triggered by a reactive analyte are already well known.^{14b,c,e-g,i-k,m,o-r} Furthermore, since 7-amino-/7-hydroxy-(2-imino)coumarins are known to be fluorogenic dyes (7-NH₂/7-OH moiety acting as a fluorescence “OFF–ON” switch based on its protection–deprotection), one would assume that further functionalization of the (2-imino)-coumarin precursor with an aniline or a phenol moiety masked by a trigger recognition unit reactive toward a second distinct analyte could easily lead to reaction-based probes acting as “AND” fluorogenic logic gates (Fig. 1).^{3,20}

In this paper, we report the practical implementation of this innovative dual-sensing strategy using hydrolase (PGA or pig liver esterase (PLE)) and nitroreductase (NTR) as enzyme pair model. This had led to the preparation of three dual-reactive probes whose the activation mechanism was studied in detail through *in vitro* fluorescence assays and HPLC-fluorescence/-MS analyses, particularly to demonstrate *in situ* formation of blue-emitting 2-iminocoumarin scaffolds mediated by combination of the two enzymes.

Results and discussion

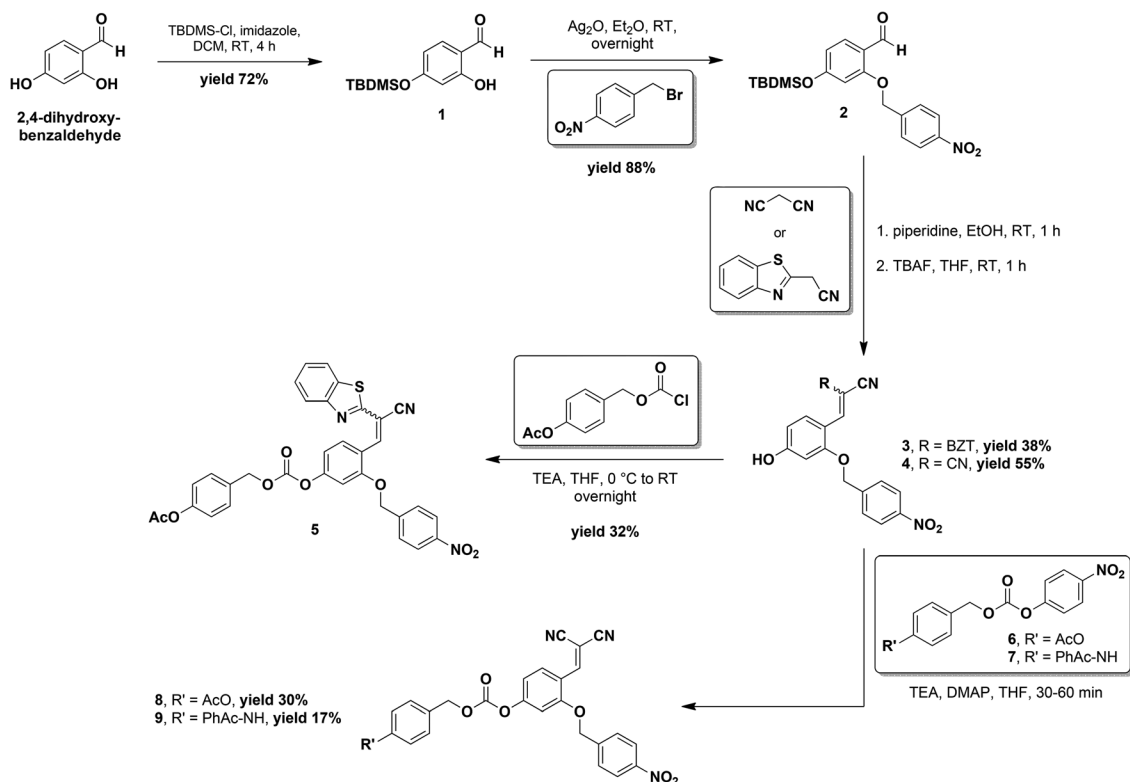
General considerations for the design of dual-enzyme fluorogenic “turn-on” probes – selection of structural units

As suggested above, we have decided to focus on the design of molecular probes capable of generating a fluorescent dye belonging to the family of 3-substituted-7-hydroxy-2-imino-coumarins, upon dual-enzymatic activation. Indeed, 7-hydroxy-coumarin derivatives are often more fluorescent than their 7-amino counterparts, particularly at physiological pH, and the facile functionalization of their C-3 position with an electron-withdrawing group (typically, a cyano group) or an heteroaryl substituent (e.g., 2-benzothiazolyl or 2-benzimidazolyl moiety) is an asset to red-shift their absorption/emission maxima, and to facilitate fluorescence detection in complex biological media.^{21,22} Furthermore, bis-*O*-protected 2,4-dihydroxycinnamionitrile derivatives should be easily synthesised from cheap commercial starting materials (*i.e.*, 2,4-dihydroxybenzaldehyde and malonitrile or benzothiazole-2-acetonitrile) and through a Knoevenagel-type condensation reaction. Consequently, the two fluorophores namely 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-2-iminocoumarin²³ and 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarin^{24,25} have been selected as fluorescent reporters for this study (Fig. 1). For *in vitro* validations performed under simulated physiological conditions (*i.e.*, PB, pH 7.5), the significant hydrophobic character of the claimed coumarin precursor is a potential issue. So, we had initially planned to design fluorogenic “turn-on” probes reactive toward both NTR and a sulfatase. Indeed, this latter class of hydrolytic enzymes is known to catalyse the hydrolysis of sulfate esters whose the inherent hydrophilicity is beneficial for the overall aqueous solubility of the probes.²⁶ Unfortunately, our preliminary works have revealed that dual NTR-sulfatase fluorogenic “turn-

on” probes are completely unstable in aqueous solution and a rapid hydrolysis of their aryl sulfate ester moiety occurred. Alternatively, we have chosen to work with (i) PGA (also known as penicillin amidase) a commercially available and widely used biocatalyst in the enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics, since it allows for the deprotection of phenylacetyl-protected amines,²⁷ and (ii) pig liver esterase (PLE), known to catalyse the hydrolysis of acetate esters and commonly used for kinetics resolution and asymmetric synthesis in organic chemistry,²⁸ in place of sulfatasases. However, the use of these two model enzymes directly impacts the structural requirements of reaction-based probes. Indeed, to transfer the amide bond-breaking event to a phenol release, the use of a self-immolative spacer is required.²⁹ *para*-Aminobenzyl alcohol (PABA) was chosen because it has been successfully used to conjugate peptide substrates to masked fluorophores, to obtain valuable fluorogenic reagents for protease assays and/or *in vivo* molecular imaging applications.³⁰ Thus, *para*-(phenylacetamido)benzyl moiety was selected as the PGA-labile phenol protecting group. To enhance the overall stability of the phenol-based probes bearing an esterase-sensitive moiety, it is also recommended to introduce a self-immolative spacer (typically, *para*-hydroxybenzyl alcohol (PHBA)) between the acetyl and phenol moieties. Consequently, *para*-(acetoxy)benzyl (Ac-PHBA) was selected as the PLE-labile phenol protecting group.^{8,31} In both cases, the bio-labile moiety will be introduced onto the phenol *via* a carbonate linkage because preliminary etherification-based synthetic strategies failed to give the desired protected phenol derivatives. Finally, we have regarded the masking of the second phenol function by the *para*-nitrobenzyl moiety, which is a commonly used caging group that targets reductase activity for sensor and prodrug development.^{10,32} At this stage, it is also important to point out the preferred phenolic position for introducing each enzyme-labile trigger-spacer combined unit: 2-OH for *para*-nitrobenzyl and 4-OH for *para*-(phenylacetamido)benzyl and *para*-(acetoxy)benzyl, arising from our preliminary synthetic attempts and shortcomings encountered (Fig. 1).

Synthesis of bis-*O*-protected 2,4-dihydroxycinnamionitrile derivatives

The three dual-enzyme fluorogenic “turn-on” probes were synthesised in four steps (Scheme 1). First, the 4-OH group of 2,4-dihydroxybenzaldehyde was selectively protected as silyl ether using standard conditions. The resulting TBDMS ether **1** was next reacted with an excess of *para*-nitrobenzyl bromide (5 equiv.) under mild “Kuhn methylation” conditions (*i.e.*, the use of Ag₂O as electrophilic catalyst and base),³³ to readily introduce the NTR-labile protecting group into the 2-OH position, without premature deprotection of the 4-OH group. The full-protected benzaldehyde derivative **2** was condensed with either benzothiazole-2-acetonitrile or malonitrile in EtOH and in the presence of a catalytic amount of piperidine, to give the Knoevenagel adducts which were desilylated by treatment with TBAF in THF. The corresponding phenols **3** and **4** were obtained in satisfying yields (38% and 55% for the two steps,



Scheme 1 Synthesis of dual-enzyme fluorogenic “turn-on” probes **5**, **8** and **9**. Please note: molecule corresponding to chloroformate derivative of Ac-PHBA is not numbered because not isolated and directly used without purification.

respectively). Pre-activation of Ac-PHBA was achieved by treatment with diphosgene in dry DCM in presence of TEA. The resulting crude chloroformate was reacted with **3** to provide the targeted dual PLE-NTR fluorogenic “turn-on” probe **5** in 32% yield. Interestingly, this benzothiazolyl-based probe **5** was obtained as a mixture of *E/Z* isomers (56 : 44 and 85 : 15 determined by HPLC and NMR respectively; difference in this ratio value was explained by the lower solubility of less polar isomer in RP-HPLC eluents and different UV-vis absorption properties between two isomers (both wavelength maximum and molar extinction coefficient)). This synthetic methodology was also applied to PhAc-PABA but failed (due to the premature degradation of PhAc-PABA throughout its activation with diphosgene). No further attempts were made to obtain PGA-NTR benzothiazolyl-based probe because we suspected that its high hydrophobic character would be prohibitive for applications in aqueous buffers. For the dicyano probe **8** and **9**, diphosgene was first reacted with phenol **4** and benzyl alcohol Ac-PHBA/PhAc-PABA was next introduced (particularly to avoid degradation of PhAc-PABA) but the desired products were recovered in poor yields (11% and 9% respectively). These results were unsatisfactory, so pre-activation of Ac-PHBA/PhAc-PABA with *para*-nitrophenyl chloroformate in dry THF in the presence of TEA was investigated. The resulting *para*-nitrophenyl carbonate derivatives **6**³⁴ and **7**³⁵ were purified and reacted with **4** to provide the two targeted dual fluorogenic “turn-on” probes **8** and **9** with improved 30% and 17% yields respectively. All

spectroscopic data (see Experimental section and ESI†), especially IR, NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structures assigned. Their purity was checked by RP-HPLC and found to be in the range 94–96%. It was not feasible to perform further RP-HPLC purification (typically, the method best suited to increase this percentage purity to 100%) due to hydrophobicity and moderate stability of **5**, **8** and **9** in aqueous acidic mobile phases.

Photophysical characterization and dual-enzymatic activation of fluorogenic “turn-on” probes – fluorescence-based assays

UV-vis absorption spectra of compounds **5**, **8** and **9** were recorded in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.5, simulated physiological conditions).³⁶ They exhibited a broad absorption spectrum covering virtually the entire UV spectral range (250–450 nm), and characterized by a maximum centered at 372–383 nm depending on the nature of C-3 substituent (see Fig. S1†). This spectral pattern is in part due to the formation of aggregates promoted by the hydrophobic character of these cinnamonitrile derivatives. This aggregation behaviour prevented us from obtaining linear relationships between absorbance and concentration required to determine molar extinction coefficients of these absorbing species. As expected, these three probes, without exception, were not fluorescent under simulated physiological conditions and their emission spectrum exhibits a zero-baseline remaining constant over time (see Fig. S4–S6†).

Concerning the dual-enzymatic activation of **5**, **8** and **9**, fluorescence-based *in vitro* assays were performed with commercial enzymes (recombinant NTR from *E. coli* used with co-factor NADH, recombinant PGA from *Alcaligenes faecalis* and esterase from porcine liver). We were mindful that fluorescence of NADH (Abs./Em. maxima = 340/470 nm)³⁷ may cause interference with enzyme-induced fluorogenic signal but the excitation channel selected for the probes (455 nm for **5** and 418 nm for **8** and **9**) is far enough away from absorption maximum of co-factor to prevent its photonic excitation and subsequent emission. For each pro-fluorophore, different scenarios were tested under simulated physiological conditions (PB, pH 7.5, 37 °C). Concerning benzothiazolyl-based probe **5**, fluorescence emission time-course measurements were achieved with the following enzyme addition procedures: (i) NTR/NADH (20 min) then PLE, (ii) PLE (10 min) then NTR/NADH, (iii) NTR/NADH and PLE simultaneously, and without enzyme (Fig. 2A). We also checked that co-factor alone did not trigger phenol deprotection resulting in fluorogenic response, by carrying out some assays that involved pre-incubation of probe with NADH before adding enzymes. A rapid and gradual increase of blue-green fluorescence intensity at 489 nm (Ex. 455 nm) fully consistent with *in situ* formation of 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-2-iminocoumarin was observed when **5** is pre-incubated with PLE before adding NADH and NTR. It was somewhat disappointing to note that probe's activation was much less effective with two other incubation protocols. These results suggested that this full-protected 2,4-dihydroxycinnamitrile derivative may be a poor substrate of NTR or act as an effective competitive inhibitor of this enzyme, and is reactive toward this reductase only once its 4-OH phenol group is free. Curiously, a slight increase in fluorescence was observed when the probe is pre-incubated only with NTR/NADH. The presence of a minute amount of free 4-OH 2,4-dihydroxycinnamitrile derivative **3** in the sample (reminder: purity 96%) or its minor formation in PB at pH 7.5 was suspected to explain this premature fluorescent activation by a single enzyme. However, the lack of fluorescence increase observed for the control reaction involving incubation of **5** with buffer alone, illustrates one of the major benefits of the dual-reactive fluorogenic probes compared to pro-fluorophores activated through a single (bio)chemical event. Even though the overall stability of such fluorogenic platforms may not necessarily be remarkable under physiological conditions, the probability of obtaining false positive fluorescence signals is lower because this would require the non-specific hydrolysis of their two enzyme-responsive caging/quenching groups. Better results were obtained with cyano-based probes **8** and **9**. Time-dependant fluorescence analyses were performed under the same conditions than those described above, except for the excitation/emission wavelength channel (Ex./Em. 418/458 nm), which was tuned for an optimal detection of 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarin (Fig. 2B and C). Furthermore, for the 4-*O*-(*para*-(phenylacetamido)benzyloxycarbonyl) derivative **9**, PGA was used instead of PLE. In both cases, a strong blue fluorescence activation monitoring the formation of 7-hydroxy-

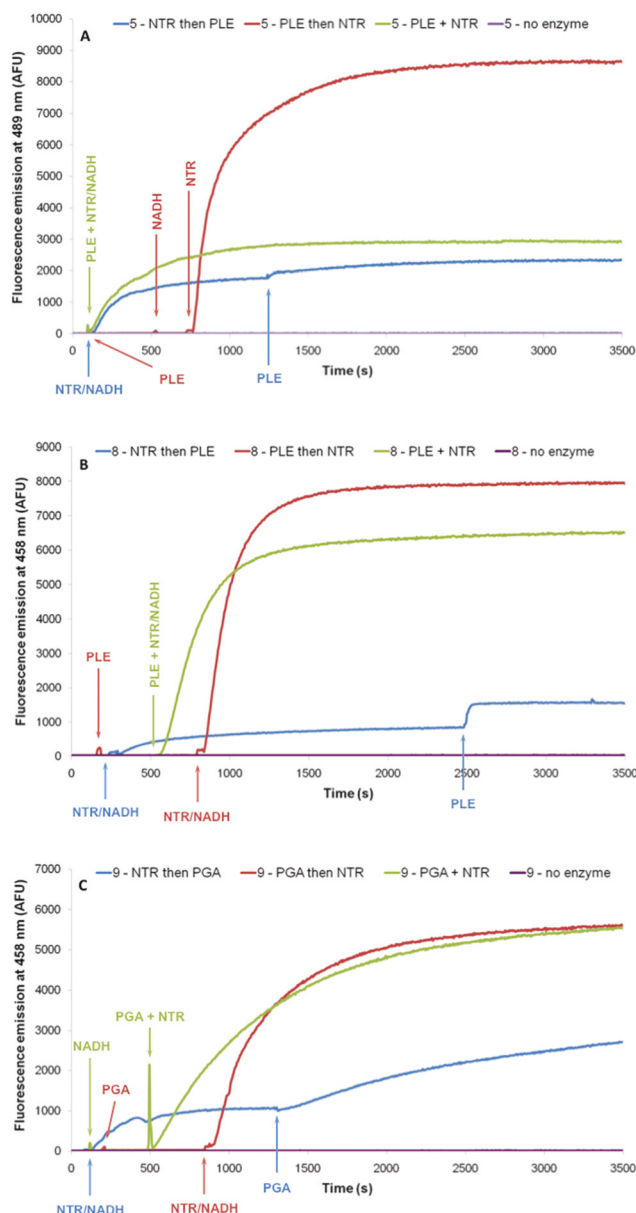


Fig. 2 Time-dependant changes in the blue/green fluorescence intensity of fluorogenic "turn-on" probes **5**, **8** and **9** (concentration: 1.0 μ M) in the presence of two distinct enzymes in PB at 37 °C (see ESI† for more details about sequential and simultaneous incubation protocols with NTR (0.1 U)/NADH (45 μ M), PLE (1 U) and PGA (1 U)). (A) Ex./Em. 455/489 nm; (B) and (C) Ex./Em. 418/458 nm. For each probe, a further kinetic curve (purple trace) was recorded under the same conditions but without enzymes and co-factor.

2-iminocoumarin scaffold was observed when **8** and **9** were incubated with both enzymes simultaneously or better according the sequential mode: pre-incubation with hydrolase (10 min) followed by addition of NTR/NADH. Only the sequential assay involving pre-incubation of the probes with NTR led to poor fluorescence activation. Interestingly, further addition of compound **4** (a good fluorogenic substrate of NTR) into this latter enzymatic reaction mixture did not led to a dramatic

change in fluorescence signal (see Fig. S7†). These results support the hypothesis that compounds **5** and **8** are effective at blocking the activity of this reductase. However, a deeper understanding of this inhibition mechanism requires further enzyme kinetics and molecular docking experiments that will soon be carried out and reported in due course.

To confirm that the resulting fluorescence emission was due to 7-hydroxy-2-iminocoumarin dye formed *in situ*, all enzymatic reaction mixtures were directly analysed by RP-HPLC coupled with fluorescence detection using aqueous triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB, 50 mM, pH 7.5) and CH₃CN as eluents (see Fig. 3 and S9† for illustrative examples of RP-HPLC elution profiles and Fig. S8† for negative controls with starting non-fluorescent probes). The use of a neutral aqueous mobile phase is required to ensure phenol deprotonation of newly formed 7-hydroxy-2-iminocoumarins and maximize their fluorescence properties and thus their detection. Furthermore, the facile synthesis of authentic samples of 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-2-iminocoumarin,²³ 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxycoumarin,²³ 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarin and 3-cyano-7-hydroxycoumarin,^{24,25} has enabled us to have reference compounds for such liquid chromatographic analyses. Thus, the identification of peaks was done by comparison of retention times with those of standards. In the case of benzothiazolyl-based probe **5**, the formation of both 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-2-iminocoumarin and

3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxycoumarin was confirmed (Table 1, entries 1 and 2). The side-formation of coumarin through the non-enzymatic hydrolysis of the imine moiety occurred during the enzymatic reaction and HPLC analysis. This is not a problem for the claimed dual-enzyme sensing scheme because this also a strongly emissive species (Table 1, entries 1 and 2). For bis-cyano-based probes **8** and **9**, unambiguous identification of 3-cyano-7-hydroxy-(2-imino)coumarins was also done but a further minor broad split peak was observed on the RP-HPLC elution profiles, which may assigned to 3-carbamoyl-7-hydroxy-(2-imino)coumarins (Fig. S9† and Table 1, entries 3–5). Indeed, the nitrile moiety introduced onto the C-3 position of coumarins, is prone to facile hydrolysis.²⁴ The non-enzymatic conversion of 2-iminocoumarin derivative into the corresponding coumarin is particularly beneficial because the relative fluorescence quantum yield of this latter product was found to be significantly higher than that of its parent imine (Table 1, entries 3 and 4).

Dual-enzymatic activation of fluorogenic “turn-on” probes – mechanism study through RP-HPLC-MS analyses

To confirm the sensing process claimed in Fig. 1, HPLC-MS analyses of the enzymatic hydrolysis mixtures were performed. To carry out mass detection through the “full-scan” detection mode (more practical and convenient but less sensitive than the single-ion monitoring (SIM) mode), enzyme reactions were

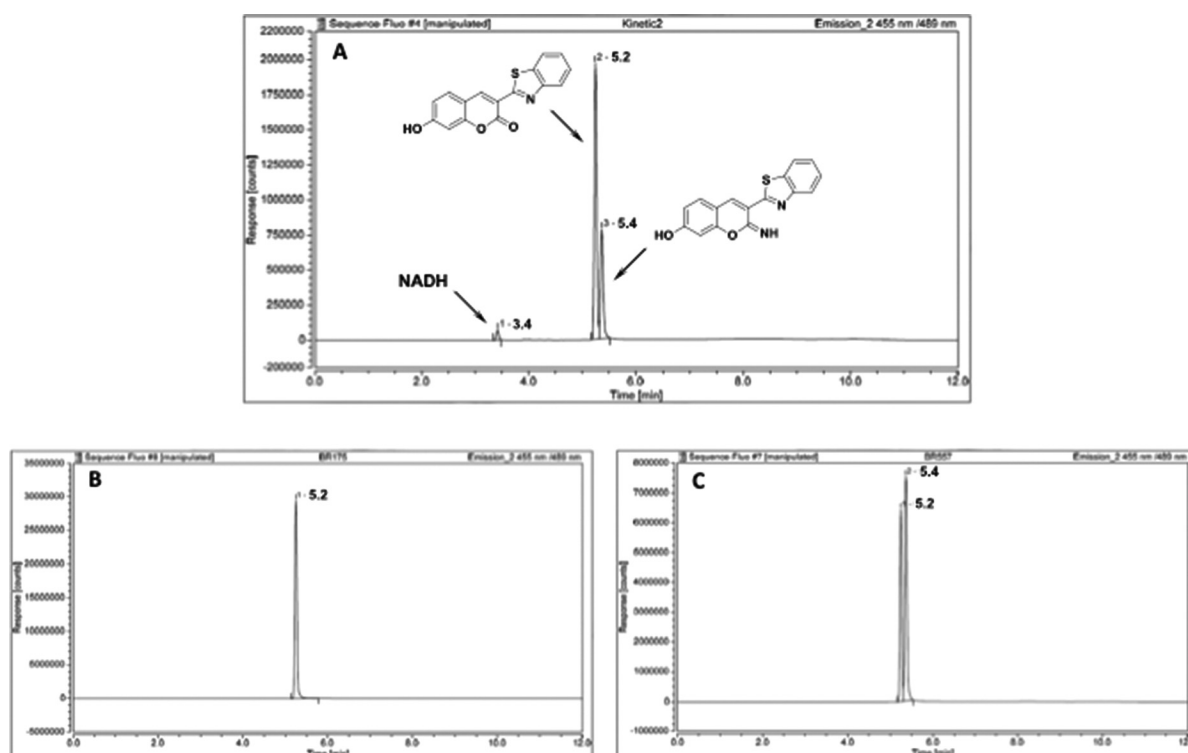
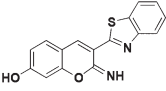
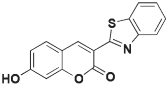
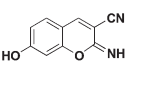
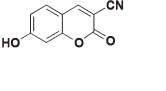
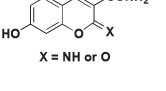
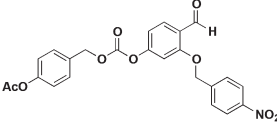
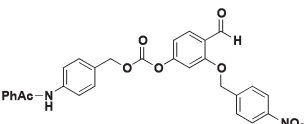
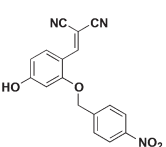
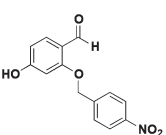


Fig. 3 RP-HPLC elution profiles (fluorescence detection, system E) of enzymatic reaction mixture of benzothiazolyl-based probe **5** with PLE (10 min of pre-incubation) and NTR/NADH (A) and authentic samples of 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxycoumarin (B) and 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-2-iminocoumarin (C). Please note: partial hydrolysis of imine moiety was occurred during HPLC analysis and incubation in PB. NADH ($t_R = 3.4$ min) can be properly detected at a different wavelength channel (Ex./Em. 350/460 nm).

Table 1 RP-HPLC retention times, LR-MS data and/or spectral properties of compounds formed through the dual-enzyme activation of probes **5**, **8** and **9**

Compound	RP-HPLC-fluorescence t_R^a (min)	RP-HPLC-MS t_R^b (min)	Molecular ion detected	Molecular ion calcd	Abs./Em. (nm)	Φ_F (%)
	5.4	—	—	—	446/493 ^c	43 ^c
	5.2	—	—	—	431/488 ^d	57 ^d
	3.9	3.7	187.5 [M + H] ⁺	187.2 [M + H] ⁺	418/458 ^e	37 ^f
	4.1	5.9	186.4 [M - H] ⁻	186.1 [M - H] ⁻	409/452 ^e	85 ^f
	3.6	4.3 (X = NH) 5.5 (X = O)	203.2 [M - H] ⁻ 204.4 [M - H] ⁻	203.2 [M - H] ⁻ 204.2 [M - H] ⁻	—	—
	—	8.2	510.1 [M - H + FA] ⁻	510.4 [M - H + FA] ⁻	—	—
	—	8.3	584.9 [M - H + FA] ⁻	585.5 [M - H + FA] ⁻	—	—
	—	7.7	320.3 [M - H] ⁻	320.3 [M - H] ⁻	—	—
	—	7.0	272.3 [M - H] ⁻	272.2 [M - H] ⁻	—	—

^a System D. ^b System C. ^c See ref. 45. ^d See ref. 21. ^e Determined in PB at 25 °C. ^f Determined in PB at 25 °C using quinine sulfate ($\Phi_F = 60\%$ in 0.05 M H₂SO₄) as a standard.

performed at a higher concentration than this previously used for fluorescence-based assays (85 μ M against 1.0 μ M). It was not possible to get reproducible results with the benzothiazolyl-based probe **5** due to its poor solubility in PB at this concentration. Consequently, such mechanistic study was focused only on less hydrophobic bis-cyano-based probes **8** and **9** (Fig. 4 and S10–S12[†]). The first valuable information disclosed by these HPLC-MS analyses concerned the stability of the probes in the reaction buffer. Indeed, as shown in Fig. 4B and

S10,[†] following incubation at pH 7.5 without enzymes, probes **8** and **9** were partly degraded to a single product identified as the corresponding benzaldehyde derivative (Table 1, entries 6 and 7). Under these mild conditions, retro-Knoevenagel reaction is able to occur but curiously, such side-reaction was never reported in publications describing *O*-protected 2-hydroxycinnamionitrile derivatives as effective reaction-based fluorescent probes.³⁸ This does not challenge detection mechanisms based on *in situ* formation of 2-iminocoumarins

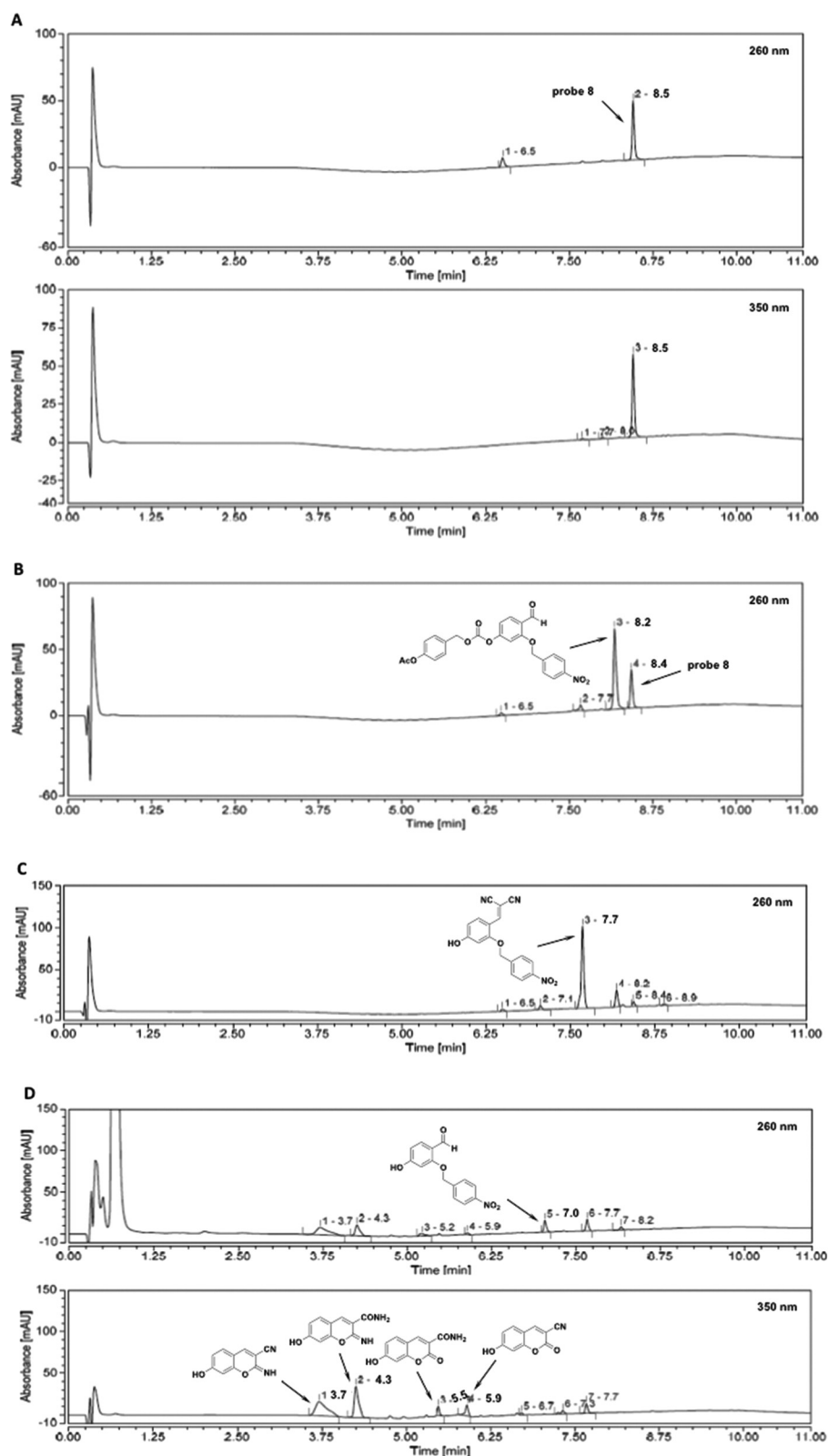


Fig. 4 RP-HPLC elution profiles (UV-vis and MS detection, system C) of cyano-based probe **8**: (A) before incubation in PB; (B) after 10 min of incubation in PB at 37 °C (retro-Knoevenagel product was not detected at 350 nm); (C) and (D) after dual-enzymatic activation at 37 °C (sequential protocol, see ESI† for experimental details): (C) after 30 min of incubation with PLE (0.55 U) (compound **4** was not detected at 350 nm); (D) after 80 min of incubation with PLE (0.55 U) alone and further 40 min with NTR/NADH (0.6 U/0.58 mM). See Fig. S7† for all ESI mass spectra. See Fig. S8 and S9† for all RP-HPLC elution profiles related to dual-enzymatic activation of probe **8** (sequential “NTR/NADH then PLE” and simultaneous incubation protocols) and probe **9** (sequential “PGA then NTR/NADH” and “NTR/NADH then PGA” and simultaneous incubation protocols).

because the formed benzaldehyde-type derivative remains non-fluorescent, but it is important to bear in mind that this may prevent quantitative determination of targeted analyte through the decrease of the “active” probe concentration. In the future, this should be addressed in studies focused on the use of benzylidenemalonitrile-based probes as chemodosimeters. Gratifyingly, no trace of free 2-OH and/or 4-OH 2,4-dihydroxycinnamionitrile derivatives that might lead to 7-hydroxy-(2-imino)coumarins without enzymatic action were detected in these blank samples. This was a bit in contrast with conclusions drawn from fluorescent measurements related to enzyme assays involving pre-incubation with NTR/NADH followed by addition of hydrolase (*vide supra*), but explained by the differences in probe’s concentration used in both assays (85 μM against 1.0 μM). The preferential reaction of probes with hydrolase against NTR was clearly demonstrated through the detection of 2,4-dihydroxycinnamionitrile derivative having free 4-OH and 2-OH always masked as *para*-nitrobenzyl ether (Fig. 4C and Table 1, entry 8). A similar trend was observed with the retro-Knoevenagel products as evidenced by the detection of 2-*O*-(*para*-nitrobenzyl)-2,4-dihydroxybenzaldehyde (Fig. 4D and Table 1, entry 9). The intermediate was next deprotected onto their 2-OH position under the action of NTR/NADH, to undergo rapid spontaneous cyclisation leading to 7-hydroxy-(2-imino)coumarins bearing either the cyano or carbamoyl group as C-3 substituent (Fig. 4D and Table 1, entries 3–5). We were therefore able to demonstrate that *in situ* synthesis of the fluorophore scaffold is really triggered by two distinct enzyme activities through a sequential mode of action.

Conclusions

For the first time, we have demonstrated that the “covalent-assembly” probe design principle could be successfully applied for the simultaneous fluorogenic detection of two different enzyme activities namely hydrolase and reductase. The double activation of these reactive probes through hydrolysis of amide (or ester) bond and nitro-reduction, followed by domino 1,6-elimination/cyclisation reactions, was efficient at generating strongly fluorescent 7-hydroxy-(2-imino)coumarins. These sophisticated biosensing systems act as AND-type molecular logic gates because fluorescence signal production occurred only in the presence of both analytes. To rapidly apply this promising concept to molecular imaging of disease-biomarkers pairs for diagnostic purposes, extension of the “doubly-triggered covalent assembly” approach to longer wavelength fluorophores (*e.g.*, pyronin B or far-red cyanine dyes³⁹) is currently in progress in our lab. Furthermore, the dual-reactive 7-hydroxy-(2-imino)coumarin precursors of this work can be easily modified to rapidly obtain “dual-lock” structures combining two distinct reactive/quenching groups sensitive to the same analyte. Indeed, this is the preferred approach for designing reaction-based fluorescent probes with unprecedented performances, especially those related to the

effective discrimination between molecules exhibiting similar chemical reactivity (*e.g.*, biothiols).^{40,41}

Experimental section

General

Unless otherwise noted, all commercially available reagents and solvents were used without further purification. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. The spots were directly visualised or through illumination with UV lamp ($\lambda = 254/365$ nm) and/or staining with a phosphomolybdic acid solution (4.8 wt% in EtOH). Column chromatography purifications were performed on silica gel (63–200 μm) from Sigma-Aldrich (technical grade). All solvents were dried by standard procedures [DCM: distillation from CaH_2 ; absolute EtOH: storage over anhydrous Na_2SO_4 ; THF: distillation from sodium benzophenone diketyl; and TEA: storage over anhydrous Na_2SO_4]. Anhydrous DMF was purchased from Carlo Erba, and stored over 4 Å molecular sieves. Peptide synthesis grade DIEA was provided by Iris Biotech GmbH. The HPLC-gradient grade acetonitrile (CH_3CN) was obtained from Carlo Erba. Formic acid (FA, grade “eluent additive for LC-MS”) was provided by Sigma-Aldrich. Phosphate buffer (100 mM, pH 7.5) and aq. mobile-phases for HPLC were prepared using water purified with a PURELAB Ultra system from ELGA (purified to 18.2 $\text{M}\Omega$ cm). PLE (esterase from porcine liver, E3019, 27 U mg^{-1} of lyophilized enzyme), NTR (from *E. coli*, N9284, 0.1 $\text{U }\mu\text{g}^{-1}$, lyophilized enzyme + buffer resuspended in ultra-pure water) and NADH were purchased from Sigma-Aldrich and stored at -20 °C. Recombinant PGA (from *Alcaligenes faecalis*) was provided by Universität Hohenheim (0.63 U mg^{-1} of lyophilized enzyme). Triethylammonium bicarbonate (TEAB, 1.0 M) buffer was prepared from distilled TEA and CO_2 gas. 3-(2-Benzothiazolyl)-7-hydroxycoumarin, 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-2-iminocoumarin, 3-cyano-7-hydroxycoumarin, 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarin were prepared according to literature procedures.^{23–25} See ESI† for the synthesis of Ac-PHBA and PhAc-PABA.

Instrument and methods

^1H - and ^{13}C -NMR spectra of compounds 1–9 were recorded either on a Bruker Avance 300 or on a Bruker Avance 500 spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non-deuterated solvent signal.⁴² J values are expressed in Hz. IR spectra were recorded with a Bruker Alpha FT-IR spectrometer equipped with a universal ATR sampling accessory. The bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimeters (cm^{-1}). HPLC-MS analyses were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump + autosampler) equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS) and a MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer (LRMS analyses through ESI). HPLC-fluorescence analyses were performed with the same instrument coupled to a RS fluorescence detector (Thermo-Dionex, FLD 3400-RS). High-resolution mass spectra

(HRMS) were recorded on a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. UV-visible spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Hellma, 100-QS, 45 × 12.5 × 12.5 mm, pathlength 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra and kinetics) were performed with an HORIBA Jobin Yvon Fluorolog spectrophotometer (software FluoEssence) with a standard fluorometer cell (Labbox, LB Q, 10 mm). Emission spectra were recorded under the same conditions after excitation at the corresponding wavelength (shutter: Auto Open, excitation slit = 5 nm and emission slit = 5 nm). All fluorescence spectra were corrected.

Fluorescence quantum yields of 3-cyano-7-hydroxycoumarin and 3-cyano-7-hydroxy-2-iminocoumarin were measured at 25 °C by a relative method using quinine sulfate ($\Phi_F = 60\%$ in 0.05 M H₂SO₄) as a standard (for the corresponding Abs/Ex/Em spectra, see Fig. S2 and S3†).⁴³ 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 value is used: 1.333 for aq. H₂SO₄ and 1.337 for PB.

High-performance liquid chromatography separations

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments (HPLC-MS or HPLC-fluorescence): *System A*: RP-HPLC-MS (Phenomenex Kinetex C₁₈ column, 2.6 μm, 2.1 × 50 mm) with CH₃CN (+0.1% FA) and 0.1% aq. FA (pH 3.2) as eluents [linear gradient from 5% to 100% (5 min) of CH₃CN followed by isocratic at 100% (1.5 min)] at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. UV-visible detection was achieved at 220, 260, 300 and 360 nm (+ diode array detection in the range 220–500 nm). ESI-MS detection in the positive/negative mode (“full scan”, 150–1500 a.m.u., data type: centroid, needle voltage: 3.0 kV, detector voltage: 1100 V, probe temperature: 350 °C, cone voltage: 75 V and scan time: 1 s). *System B*: system A with 100–700 a.m.u for “full scan” mass detection. *System C*: system A with the following gradient [0% CH₃CN (2 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (6 min) of CH₃CN followed by isocratic at 100% (1 min)]. UV-visible detection was achieved at 220, 260, 350 and 418 nm (+ diode array detection in the range 220–500 nm). *System D*: RP-HPLC-fluorescence (Phenomenex Kinetex C₁₈ column, 2.6 μm, 2.1 × 50 mm) with CH₃CN and aq. TEAB (50 mM, pH 7.5) as eluents [0% CH₃CN (1 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (5 min) of CH₃CN followed by isocratic at 100%] at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Fluorescence detection was achieved at 45 °C at the following Ex./Em. channels: 350/460 nm and 418/458 nm (sensitivity: 1, PMT 1, filter wheel: auto). *System E*:

system D with the following Ex./Em. channels for fluorescence detection: 350/460 nm, 431/488 nm and 455/489 nm.

4-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-hydroxybenzaldehyde (1).⁴⁴ Under Ar atmosphere, to a stirred solution of TBDMS-Cl (2.20 g, 14.4 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (40 mL) was added imidazole (1.15 g, 15.8 mmol, 1.1 equiv.). After 5 min of stirring, 2,4-dihydroxybenzaldehyde (2 g, 14.4 mmol, 1 equiv.) was added and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 4 h. Thereafter, the reaction mixture was washed with deionised water and brine, dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by chromatography on a silica gel column (PE-EtOAc, step gradient from 100 to 95 : 5, v/v) to give the desired silyl ether **1** as colourless oil (2.62 g, yield 72%). R_f 0.61 (PE-EtOAc, 98 : 2, v/v); δ_H (300 MHz, CDCl₃) 11.33 (s, 1 H), 9.72 (s, 1 H), 7.40 (d, J 8.7, 1 H), 6.46 (dd, J 8.7, J 2.4, 1 H), 6.38 (d, J 2.4, 1 H), 0.98 (s, 9 H), 0.25 (s, 6 H).

4-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-((4-nitrobenzyl)oxy)-benzaldehyde (2). To a stirred solution of phenol **1** (1 g, 3.96 mmol, 1 equiv.) in Et₂O (17 mL) were sequentially added 4-nitrobenzyl bromide (4.28 g, 19.8 mmol, 5 equiv.) and Ag₂O (3.6 g, 15.8 mmol, 4 equiv.) at RT. The resulting reaction mixture was stirred overnight. Thereafter, the crude was directly purified by chromatography on a silica gel column (eluent: PE-EtOAc, step gradient from 100 to 90.7 : 0.3, v/v to completely remove the large excess of 4-nitrobenzyl bromide and after a step gradient from 95 : 5 to 85 : 15, v/v) to afford the desired product **2** as white solid (1.35 g, yield 88%). R_f 0.78 (DCM); ν_{max} (neat)/cm⁻¹ 2952, 2927, 2855, 1683, 1593, 1340, 1256; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 10.38 (s, 1 H), 8.28 (d, J 9.0, 2 H), 7.79 (d, J 8.7, 1 H), 7.63 (d, J 8.7, 2 H), 6.53 (dd, J 9.3, J 2.1, 1 H), 6.39 (d, J 2.4, 1 H), 5.24 (s, 2 H), 0.96 (s, 9 H), 0.21 (s, 6 H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 187.9, 163.0, 161.8, 147.7, 143.4, 131.0, 127.5, 124.0, 119.6, 113.5, 104.5, 69.0, 25.5, 18.3, -4.3; HPLC (system A): t_R = 6.2 min, purity = 100% (at 260 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 227, 272 and 306; LRMS (ESI+): m/z 388.3 [M + H]⁺ (100) and 641.1 [M + H + CH₃CN]⁺ (80), calcd for C₂₀H₂₅NO₅Si 387.1.

2-(Benzothiazol-2-yl)-3-(4-hydroxy-2-((4-nitrobenzyl)oxy)-phenyl)acrylonitrile (3). Benzaldehyde **2** (360 mg, 0.93 mmol, 1 equiv.) and benzothiazole-2-acetonitrile (162 mg, 0.93 mmol, 1 equiv.) were dissolved in absolute EtOH (46 mL). After, 1 drop of piperidine was added and the reaction mixture was stirred at RT for 2 h. Thereafter, volatiles were removed under vacuum and the resulting residue was dissolved in THF (10 mL). The mixture was cooled to 0 °C with an ice-water bath. Then TBAF (1.0 M in THF, 1 mL) was added and the mixture was left to warm at RT for 40 min. Thereafter, the reaction mixture was quenched by adding glacial acetic acid (0.5 mL) and solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by chromatography on a silica gel column (eluent: EtOAc-MeOH-TEA, step gradient from 8 : 2 : 0 to 8 : 1.9 : 0.1, v/v). The product was taken with EtOAc, then acidified with two drops of glacial acetic acid and washed with deionised water in order to remove TEA, the organic layer dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and

concentrated to obtain the desired product **3** as orange solid (150 mg, yield 38%, mixture of *E* and *Z* isomers). R_f 0.27 (DCM–EtOAc, 9.5 : 0.5, v/v); $\nu_{\max}(\text{neat})/\text{cm}^{-1}$ 3358, 2925, 2216, 1620, 1579, 1522, 1367, 1345, 1299; δ_{H} (300 MHz, DMSO- d_6) 10.70 (bs, 1 H, OH), 8.56 (s, 1 H), 8.32 (d, J 7.8, 2 H), 8.21 (d, J 8.1, 1 H), 8.13 (d, J 7.2, 1 H), 8.02 (d, J 7.5, 1 H), 7.78 (d, J 7.8, 2 H), 7.56–7.47 (m, 2 H), 6.64 (m, 2 H), 5.44 (s, 2 H); δ_{C} (75 MHz, DMSO- d_6) 177.4, 164.5, 160.0, 153.6, 147.7, 144.8, 141.7, 134.3, 130.3, 128.6, 127.5, 126.3, 124.3, 123.3, 122.9, 117.5, 113.1, 110.0, 101.3, 100.6, 69.4; HPLC (system B): t_{R} = 5.8 min, purity = 100% (at 260 nm); λ_{\max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 221, 262 and 395; LRMS (ESI $^-$): m/z 428.1 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (100), calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ 429.1.

2-(4-Hydroxy-2-((4-nitrobenzyl)oxy)benzylidene)-malononitrile (4). Benzaldehyde **2** (1 g, 2.58 mmol, 1 equiv.) and malonitrile (180 mg, 2.84 mmol, 1.05 equiv.) were dissolved in absolute EtOH (130 mL). After, 1 drop of piperidine was added and the reaction mixture was stirred at RT for 1 h. thereafter, volatiles were removed under vacuum and the resulting residue was dissolved in THF (26 mL). The mixture was cooled to 0 °C with an ice-water bath. Then TBAF (1.0 M in THF, 2.85 mL) was added and the mixture was left to warm at RT for 50 min. Thereafter, the reaction mixture was quenched by adding glacial acetic acid (0.4 mL) and solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in DCM and washed with aq. 1.0 M HCl (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by trituration in MeOH and filtration to obtain the desired product **4** as orange solid (460 mg, yield 55%). R_f 0.5 (DCM–EtOAc, 9 : 1, v/v); $\nu_{\max}(\text{neat})/\text{cm}^{-1}$ 3335, 2221, 1605, 1561, 1513, 1354, 1329, 1289; δ_{H} (300 MHz, DMSO- d_6) 11.10 (bs, 1 H, OH), 8.31 (s, 1 H), 8.28 (d, J 8.7, 2 H), 8.05 (d, J 9.0, 1 H), 7.77 (d, J 8.7, 2 H), 6.62 (dd, J 8.7, J 2.1, 1 H), 6.57 (d, J 2.1, 1 H), 5.40 (s, 2 H); δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 166.6, 160.6, 153.9, 147.7, 144.27, 131.0, 120.9, 124.1, 116.0, 115.0, 112.6, 110.4, 101.0, 74.9, 69.4; HPLC (system B): t_{R} = 5.0 min, purity = 99% (at 260 nm); λ_{\max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 258 and 382; LRMS (ESI $^-$): m/z 320.1 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (100) and 641.1 $[\text{2M} - \text{H}]^-$ (70), calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$ 321.0; HRMS (ESI $^+$): m/z 344.06339 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}^+$ 344.06418; HRMS (ESI $^-$): m/z 320.06622 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4^-$ 320.06713.

Dual PLE-NTR fluorogenic “turn-on” probe (5). Under Ar atmosphere, Ac-PHBA (60 mg, 0.36 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DCM (3.6 mL). Diphosgene (60 μL , 0.504 mmol, 1.4 equiv.) was then added and the resulting reaction mixture was cooled to 0 °C with an ice bath. Then DIEA (63 μL , 0.36 mmol, 1 equiv.) was added and the mixture was stirred again at 0 °C. Thereafter, the mixture was left to warm up to RT and stirred for a further 30 min. DCM was removed under vacuum. At the same time, a solution of phenol **3** (50 mg, 0.12 mmol, 0.33 equiv.) in dry THF (3 mL) was prepared and cooled to 0 °C under an Ar atmosphere. The previously prepared chloroformate derivative and TEA (47 μL , 0.35 mmol, 1 equiv.) were sequentially added and the reaction mixture was

stirred at RT overnight. Thereafter, volatiles were removed under vacuum and the resulting residue was re-dissolved in DCM. The solution was filtrated to remove TEA-HCl and the filtrate was evaporated to dryness. The residue was purified by chromatography on a silica gel column (eluent: heptane–EtOAc, step gradient from 100 to 70 : 30, v/v) to afford the fluorogenic “turn-on” probe **5** as yellow solid (23 mg, yield 32%, mixture of *E* and *Z* isomers). R_f 0.10 (DCM); $\nu_{\max}(\text{neat})/\text{cm}^{-1}$ 1754, 1595, 1523, 1433, 1375, 1258; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.63 (s, 1 H), 8.38 (d, J 8.7, 1 H), 8.29 (d, J 8.7, 2 H), 8.08 (d, J 8.7, 1 H), 7.90 (d, J 7.2, 1 H), 7.64 (d, J 8.7, 2 H), 7.57–7.36 (m, 4 H), 7.14 (d, J 8.4, 2 H), 7.01 (dd, J 8.7, J 2.1, 1 H), 6.90 (d, J 2.1, 1 H), 5.29 (s, 2 H), 5.27 (s, 2 H), 2.32 (s, 3 H); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 169.5, 157.0, 154.8, 154.3, 151.2, 143.7, 142.8, 140.2, 134.8, 132.0, 131.8, 130.0, 127.6, 127.0, 126.8, 126.6, 126.2, 124.0, 123.8, 122.0, 121.7, 119.9, 114.6, 114.0, 110.8, 105.9, 70.1, 69.7, 21.1; The complexity of the spectra (mixture of *E* and *Z* isomers, slow relaxation rate of some protons) for this compound makes a complete assignment impossible particularly for minor isomer. HPLC (system A): t_{R} = 5.9 and 6.2 min, purity = 94%; λ_{\max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 222 and 346 (weak, broad absorption band) for more polar isomer, 221, 364 and 372 for less polar isomer; LRMS (more polar isomer, ESI $^+$): m/z 622.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100) and 429.3 $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4]^+$ (35, loss of Ac-PHBoxycarbonyl moiety was occurred during the ionisation process); LRMS (more polar, isomer, ESI $^-$): m/z 428.3 $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4]^-$ (100, loss of Ac-PHBoxycarbonyl moiety was occurred during the ionisation process); LRMS (less polar isomer, ESI $^+$): m/z 622.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100) and 660.7 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (25); LRMS (less polar isomer, ESI $^-$): m/z 428.3 $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4]^-$ (100, loss of Ac-PHBoxycarbonyl moiety was occurred during the ionisation process), calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 621.1; HRMS (ESI $^+$): m/z 622.12739 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}^+$ 622.12786 and 644.10859 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8\text{SNa}^+$ 644.10981.

Dual PLE-NTR fluorogenic “turn-on” probe (8)

*Preparation of para-nitrophenyl para-acetoxybenzyl carbonate.*³⁴ Ac-PHBA (200 mg, 1.20 mmol, 1 equiv.), TEA (0.325 mL, 2.41 mmol, 2 equiv.) were dissolved in dry THF. *para*-Nitrophenyl chloroformate (485 mg, 2.41 mmol, 2 equiv.) was added, and the resulting reaction mixture was stirred under Ar atmosphere for 90 min. Thereafter, EtOAc (50 mL) was added and the organic medium was washed with aq. 1.0 M HCl (3 \times 10 mL), aq. saturated NaHCO_3 (3 \times 15 mL) and dried over anhydrous MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the resulting crude product was purified by chromatography on a silica gel column (eluent: DCM–EtOAc–TEA 50 : 10 : 1.5, v/v/v). The activated carbonate **6** was obtained as white solid (228 mg, yield 57%). δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.30 (d, J 9.3, 2 H), 7.48 (d, J 8.7, 2 H), 7.40 (d, J 9, 2 H), 7.16 (d, J 8.7, 2 H), 5.30 (s, 2 H), 2.33 (s, 3 H).

Phenol protection. Under Ar atmosphere, a solution of activated carbonate **6** (377 mg, 1.14 mmol, 3 equiv.) in dry THF (4.2 mL) was added to phenol **4** (122 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.). Then TEA (153 μL , 1.14 mmol, 3 equiv.) and DMAP (catalytic amount) were sequentially added. The resulting reaction

mixture was stirred at RT for 1 h. Thereafter, solvent was removed under vacuum and the resulting residue was taken with DCM and washed with aq. 0.1 M K_2CO_3 (2 × 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a silica gel column (eluent: heptane–EtOAc, step gradient from 100 to 70:30, v/v) to give the desired fluorogenic “turn-on” probe as light yellow solid (60 mg, yield 30%). R_f 0.30 (DCM); ν_{max} (neat)/ cm^{-1} 2956, 2924, 2228, 1762, 1604, 1589, 1518, 1435, 1357, 1245; δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 8.31–8.26 (m, 3 H), 8.20 (s, 1 H), 7.57 (d, J 8.7, 2 H), 7.45 (d, J 8.7, 2 H), 7.14 (d, J 8.7, 2 H), 6.53 (dd, J 9.0, J 2.4, 1 H), 6.93 (d, J 2.4, 1 H), 5.26–5.24 (2s, 4 H), 2.31 (s, 3 H); δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) 169.3, 158.4, 156.8, 152.5, 152.2, 151.2, 148.2, 141.7, 131.7, 130.3, 130.1, 128.2, 124.3, 122.1, 118.2, 114.8, 114.0, 112.7, 105.9, 82.3, 70.3, 70.1, 21.1; HPLC (system A): t_R = 5.7 min, purity = 94% (at 260 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 296 and 356; LRMS (ESI–): m/z 512.3 $[M - H]^-$ (10) and 320.2 $[M - C_{10}H_9O_4]^-$ (100, loss of PhAc-PABoxycarbonyl moiety was occurred during the ionisation process), calcd for $C_{27}H_{19}N_3O_8$ 513.1; HRMS (ESI+): m/z 536.10566 $[M + Na]^+$, calcd for $C_{27}H_{19}N_3O_8Na^+$ 536.10644.

Dual PGA-NTR fluorogenic “turn-on” probe (9)

*Preparation of para-nitrophenyl para-(phenylacetamido)benzyl carbonate.*³⁵ PhAc-PABA (200 mg, 0.829 mmol, 1 equiv.), TEA (0.223 mL, 1.66 mmol, 2 equiv.) and DMAP (catalytic amount) were dissolved in dry THF. *para*-Nitrophenyl chloroformate (334 mg, 1.66 mmol, 2 equiv.) was added and the resulting reaction mixture was stirred under an Ar atmosphere for 30 min. Thereafter, EtOAc (50 mL) was added and the organic medium was washed with aq. 1.0 M HCl (3 × 10 mL), aq. saturated $NaHCO_3$ (3 × 15 mL) and dried over anhydrous $MgSO_4$. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting crude product was purified by chromatography on a silica gel column (eluent: DCM–EtOAc–TEA 50:10:1.5, v/v/v). The activated carbonate 7 was obtained as white solid (194 mg, yield 58%). δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 8.26 (d, J 9.3, 2 H), 7.50–7.34 (m, 11 H), 7.12 (s, 1 H, NH), 5.22 (s, 2 H), 3.76 (s, 2 H).

Phenol protection. Under an Ar atmosphere, a solution of activated carbonate 7 (194 mg, 0.48 mmol, 1.2 equiv.) in dry THF (4 mL) was added to phenol 4 (128 mg, 0.398 mmol). Then TEA (54 μ L, 0.40 mmol, 1 equiv.) and DMAP (catalytic amount) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at RT for 1 h. Thereafter, solvent was removed under vacuum and the resulting residue was taken with DCM and washed with aq. 0.1 M K_2CO_3 (2 × 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was firstly purified by chromatography on a silica gel column (eluent: heptane–EtOAc, step gradient from 100 to 70:30, v/v) and then by crystallization in pre-cooled (0 °C) mixture EtOH–acetone (8:2, v/v) to obtain the desired fluorogenic “turn-on” probe as a yellow solid (40 mg, yield 17%). R_f 0.84 (DCM–EtOAc, 9:1, v/v); ν_{max} (neat)/ cm^{-1} 3289, 3064, 2229, 1767, 1657, 1605, 1521, 1361, 1229; δ_H (300 MHz, $DMSO-d_6$) 10.25 (s, 1 H), 8.55 (s,

1 H), 8.28 (d, J 8.4, 2 H), 8.07 (d, J 8.7, 1 H), 7.80 (d, J 8.7, 2 H), 7.64 (d, J 8.7, 2 H), 7.41–7.12 (m, 9 H), 5.42 (s, 2 H), 5.22 (s, 2 H), 2.65 (s, 2 H); δ_C (75 MHz, $DMSO-d_6$) 169.7, 158.8, 156.6, 155.5, 152.4, 147.8, 143.9, 140.1, 136.4, 130.6, 129.9, 129.7, 129.6, 129.2, 128.8, 127.0, 124.1, 119.5, 118.8, 115.2, 114.7, 113.7, 107.8, 82.7, 70.7, 79.9, 43.8; HPLC (system A): t_R = 5.7 min, purity = 94% (at 260 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 231, 295 and 356; LRMS (ESI–): m/z 320.1 $[M - C_{16}H_{14}NO_3]^-$ (100, loss of PhAc-PABoxycarbonyl moiety was occurred during the ionisation process); LRMS (ESI+): m/z 589.2 $[M + H]^+$ (100), calcd for $C_{33}H_{24}N_4O_7$ 588.1; HRMS (ESI+): m/z 589.17148 $[M + H]^+$, calcd for $C_{33}H_{25}N_4O_7^+$ 589.17178 and 611.15320 $[M + Na]^+$, calcd for $C_{33}H_{24}N_4O_7Na^+$ 611.15372.

***In vitro* activation of fluorogenic “turn-on” probes 5, 8 and 9 by hydrolase (PGA or PLE) and reductase (NTR) – Fluorescence assays and HPLC-MS analyses.** See ESI† for Experimental details.

Abbreviations

Ac-PHB	<i>para</i> -Acetoxybenzyl
BZT	2-Benzothiazolyl
calcd	Calculated
CBT	2-Cyanobenzothiazole
CRABPII	Protein reengineering of cellular retinoic acid binding protein II
DCM	Dichloromethane
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridine
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethyl ether
FA	Formic acid
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
HPLC	High-pressure liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
NADH	Nicotinamide adenine nucleotide (reduced form)
PE	Petroleum ether (bp 40–60 °C)
PhAc-PAB	<i>para</i> -Phenylacetamidobenzyl
RT	Room temperature
TBAF	Tetrabutylammonium fluoride
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl chloride
TEA	Triethylamine
THF	Tetrahydrofuran
UV-vis	Ultraviolet-visible

Acknowledgements

Financial support from Institut Universitaire de France (IUF) and the Burgundy region (“FABER” programme, PARI Action 6, SSTIC 6 “Imagerie, instrumentation, chimie et applications biomédicales”), especially for the Ph. D. grant of S. D., is greatly acknowledged. The authors thank the “Plateforme d’Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l’Université

de Bourgogne" (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) for the access to HORIBA Jobin Yvon Fluorolog spectrofluorimeter, Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer, Bruker Avance III 300 and 500 spectrometers and Bruker Alpha FT-IR spectrometer. The authors also thank Marie-José Penouilh (IE, University of Burgundy, ICMUB-WPCM) and Dr Fanny Picquet (IE, ICMUB-WPCM) for recording the HRMS spectra, and Benoît Roubinet (Ph. D. student, University of Rouen, laboratory COBRA UMR CNRS 6014) for the synthesis of 3-(2-benzothiazolyl)-7-hydroxy-(2-imino)coumarins used as references in this work.

Notes and references

- For a comprehensive recent review, see: L. Yu, S. Wang, K. Huang, Z. Liu, F. Gao and W. Zeng, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 4679.
- (a) K. Chen, Q. Shu and M. Schmittel, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 136; (b) J. Wu, B. Kwon, W. Liu, E. V. Anslyn, P. Wang and J. S. Kim, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 7893.
- A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1294.
- (a) Y. Li, H. Wang, J. Li, J. Zheng, X. Xu and R. Yang, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 1268; (b) S.-Y. Li, L. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu and X.-Z. Zhang, *Chem. Commun.*, 2015, DOI: 10.1039/C5CC04962H, in press.
- G. C. Van de Bittner, C. R. Bertozzi and C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 1783.
- Y. Yuan and G. Liang, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 865.
- M. A. Paley and J. A. Prescher, *MedChemComm*, 2014, **5**, 255.
- W. Daily, E. Hawkins, D. Klaubert, J. Liu, P. Meisenheimer, M. Scurria, J. W. Shultz, J. Unch, K. V. Wood, W. Zhou, M. P. Valley and J. J. Cali, Promega Corporation, USA, Luminogenic and fluorogenic compounds and methods to detect molecules or conditions, *WO Pat.*, 2006130551, 2006.
- (a) W. Zhou, C. Andrews, J. Liu, J. W. Shultz, M. P. Valley, J. J. Cali, E. M. Hawkins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit and K. V. Wood, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 714; (b) W. Zhou, D. Leippe, S. Duellman, M. Sobol, J. Vidugiriene, M. O'Brien, J. W. Shultz, J. J. Kimball, C. DiBernardo, L. Moothart, L. Bernad, J. Cali, D. H. Klaubert and P. Meisenheimer, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 670; (c) W. B. Porterfield, K. A. Jones, D. C. McCutcheon and J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 8656.
- R. H. F. Wong, T. Kwong, K.-H. Yau and H. Y. Au-Yeung, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 4440.
- For reviews, see: (a) X. Chen, M. Sun and H. Ma, *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 477; (b) M. Eun Jun, B. Roy and K. Han Ahn, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7583; (c) J. Chan, S. C. Dodani and C. J. Chang, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 973; (d) W. Shi and H. Ma, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 8732; (e) J. B. Grimm, L. M. Heckman and L. D. Lavis, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2013, **113**, 1; (f) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng and F. Li, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 192; (g) X. Li, X. Gao, W. Shi and H. Ma, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 590.
- Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin and J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 5003.
- (a) Y.-M. Shen, L.-L. Song, X.-H. Qian and Y.-J. Yang, *Chin. Chem. Lett.*, 2013, **24**, 7; (b) Z. Lei and Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6594; (c) L. Song, Z. Lei, B. Zhang, Z. Xu, Z. Li and Y. Yang, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 7597; (d) Z. Zhang, B. Zhang, X. Qian, Z. Li, Z. Xu and Y. Yang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 11919; (e) Y. Shen, Q. Zhang, X. Qian and Y. Yang, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 1274.
- (a) G. Clavé, A. Bernardin, M. Massonneau, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 6229; (b) W. Jiang and W. Wang, *Chem. Commun.*, 2009, 3913; (c) T.-I. Kim, M. S. Jeong, S. J. Chung and Y. Kim, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 5297; (d) Y. Yang, S. K. Seidlits, M. M. Adams, V. M. Lynch, C. E. Schmidt, E. V. Anslyn and J. B. Shear, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13114; (e) T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi and Y. Kim, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9825; (f) I. Kim, D. Kim, S. Sambasivan and K. H. Ahn, *Asian J. Org. Chem.*, 2012, **1**, 60; (g) Y. Peng, Y.-M. Dong, M. Dong and Y.-W. Wang, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 9072; (h) Q. Zhang, Z. Zhu, Y. Zheng, J. Cheng, N. Zhang, Y.-T. Long, J. Zheng, X. Qian and Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18479; (i) J. Park and Y. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 2332; (j) P. Hou, S. Chen, H. Wang, J. Wang, K. Voitchovsky and X. Song, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 320; (k) J. Kim, J. Park, H. Lee, Y. Choi and Y. Kim, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 9353; (l) J. Zhou, Y. Luo, Q. Li, J. Shen, R. Wang, Y. Xu and X. Qian, *New J. Chem.*, 2014, **38**, 2770; (m) J. Zhou, Y. Li, J. Shen, Q. Li, R. Wang, Y. Xu and X. Qian, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 51589; (n) M. Gupta, A. Balamurugan and H.-I. Lee, *Sens. Actuators, B*, 2015, **211**, 531; (o) Y. Han, C. Yang, K. Wu, Y. Chen, B. Zhou and M. Xia, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 16723; (p) P. K. Mishra, T. Saha and P. Talukdar, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 7430; (q) H. Zhang, Y. Xie, P. Wang, G. Chen, R. Liu, Y.-W. Lam, Y. Hu, Q. Zhu and H. Sun, *Talanta*, 2015, **135**, 149; (r) J. Zhang, Y. Li and W. Guo, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 4885.
- (a) E. Pershagen, J. Nordholm and K. E. Borbas, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 9832; (b) E. Pershagen and K. E. Borbas, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 1787.
- K. Meguellati, G. Koripelly and S. Ladame, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 2738.
- I. Yapici, K. S. S. Lee, T. Berbasova, M. Nosrati, X. Jia, C. Vasileiou, W. Wang, E. M. Santos, J. H. Geiger and B. Borhan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 1073.
- M. Prost and J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 14896.
- For reviews, see: (a) H. E. Katerinopoulos, *Curr. Pharm. Des.*, 2004, **10**, 3835; (b) H. Li, L. Cai and Z. Chen, in *Advances in Chemical Sensors*, ed. W. Wang, InTech, 2011, ch. 6, p. 121.
- (a) J. L. Klockow, K. S. Hettie, K. E. Secor, D. N. Barman and T. E. Glass, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 11446; (b) I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi and A. Ojida, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 2038.

- 21 B. Roubinet, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Dyes Pigm.*, 2014, **110**, 270.
- 22 B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2015, 166.
- 23 T. Deligeorgiev, T. Tsvetkova, D. Ivanova and I. Timtcheva, *Color. Technol.*, 2008, **124**, 195.
- 24 F. Fringuelli, O. Piermatti and F. Pizzo, *Synthesis*, 2003, 2331.
- 25 A. Rabahi, M. Makhoulfi-Chebli, S. M. Hamdi, A. M. S. Silva, D. Kheffache, B. Boutemeur-Kheddis and M. Hamdi, *J. Mol. Liq.*, 2014, **195**, 240.
- 26 For selected examples, see: (a) H.-J. Park, H.-W. Rhee and J.-I. Hong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 4939; (b) K. E. Beatty, M. Williams, B. L. Carlson, B. M. Swarts, R. M. Warren, P. D. van Helden and C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**, 12911; (c) E. L. Smith, C. R. Bertozzi and K. E. Beatty, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 1101; (d) C.-H. Tai, C.-P. Lu, S.-H. Wu and L.-C. Lo, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 6116.
- 27 Y. Yang, Y. Chen, H. Aloysius, D. Inoyama and L. Hu, in *Enzyme Technologies: Pluripotent Players in Discovering Therapeutic Agents*, ed. H.-C. Yang, W.-K. Yeh and J. R. McCarthy, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2014, ch. 5, p. 213.
- 28 P. Dominguez de Maria, C. A. Garcia-Burgos, G. Bargeman and R. W. van Gemert, *Synthesis*, 2007, 1439.
- 29 For reviews about self-immolative spacers, see: (a) S. Gnaïm and D. Shabat, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2970; (b) A. Alouane, R. Labruere, T. Le Saux, F. Schmidt and L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 7492.
- 30 For selected examples, see: (a) G. B. Jones, L. Xie, A. El-Shafey, C. F. Crasto, G. J. Bubley and A. V. D'Amico, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 3081; (b) G. B. Jones, C. F. Crasto, J. E. Mathews, L. Xie, M. O. Mitchell, A. El-Shafey, A. V. D'Amico and G. J. Bubley, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 418; (c) J.-A. Richard, L. Jean, A. Romieu, M. Massonneau, P. Noack-Fraissignes and P.-Y. Renard, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 4853; (d) J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 4175; (e) J.-A. Richard, Y. Meyer, V. Jolivel, M. Massonneau, R. Dumeunier, D. Vaudry, H. Vaudry, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1707; (f) J.-A. Richard, L. Jean, C. Schenkels, M. Massonneau, A. Romieu and P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2941; (g) Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 1777; (h) J. Sloniec, U. Resch-Genger and A. Hennig, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 14336; (i) M. A. Chowdhury, I. A. Moya, S. Bhilocha, C. C. McMillan, B. G. Vigliarolo, I. Zehbe and C. P. Phenix, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 6092; (j) E. Kisin-Finfer, S. Ferber, R. Blau, R. Satchi-Fainaro and D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 2453; (k) L. Vezenkov, N. S. Honson, N. S. Kumar, D. Bosc, S. Kovacic, T. G. Nguyen, T. A. Pfeifer and R. N. Young, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 3237.
- 31 A. Jacquemet, S. Rihn, G. Ulrich, P.-Y. Renard, A. Romieu and R. Ziessel, *Eur. J. Org. Chem.*, 2015, 1664.
- 32 For selected examples, see: (a) E. Nakata, Y. Yukimachi, H. Kariyazono, S. Im, C. Abe, Y. Uto, H. Maezawa, T. Hashimoto, Y. Okamoto and H. Hori, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 6952; (b) T. Guo, L. Cui, J. Shen, W. Zhu, Y. Xu and X. Qian, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 10820; (c) Y. Shi, S. Zhang and X. Zhang, *Analyst*, 2013, **138**, 1952; (d) Z. Li, X. He, Z. Wang, R. Yang, W. Shi and H. Ma, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **63**, 112; (e) J. Bae, L. E. McNamara, M. A. Nael, F. Mahdi, R. J. Doerksen, G. L. Bidwell, N. I. Hammer and S. Jo, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 12787.
- 33 S. Strych, G. Journot, R. P. Pemberton, S. C. Wang, D. J. Tantillo and D. Trauner, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 5079.
- 34 A. Mokhir, H. Hagen, P. Marzenell, E. Jentsch and M. Veldwijk, Ruprecht-Karls-Universitaet Heidelberg, Germany, Ferrocene-based compounds and their use as ROS regulating prodrugs, *WO Pat.*, 2012123076, 2012.
- 35 N. Pessah, M. Reznik, M. Shamis, F. Yantiri, H. Xin, K. Bowdish, N. Shomron, G. Ast and D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 1859.
- 36 These compounds are perfectly soluble in PB in the micromolar range but higher concentrated stock solutions (millimolar concentration) must be prepared in DMSO.
- 37 T. G. Scott, R. D. Spencer, N. J. Leonard and G. Weber, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 687.
- 38 See ref. 14b,c,e-g,i-k,m,o-r.
- 39 For a recent example of dual response NIR fluorescent probe for hydrogen polysulfides and superoxide anion detection, based on *in situ* formation of a cyanine dye, see: F. Yu, M. Gao, M. Li and L. Chen, *Biomaterials*, 2015, **63**, 93.
- 40 L.-Y. Niu, Y.-Z. Chen, H.-R. Zheng, L.-Z. Wu, C.-H. Tung and Q.-Z. Yang, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 6143.
- 41 (a) Y. Kim, S. V. Mulay, M. Choi, S. B. Yu, S. Jon and D. G. Churchill, *Chem. Sci.*, 2015, DOI: 10.1039/C5SC02090E, in press; (b) H. Sun, L. Yi, H. Zhang, C. Zhang and R. Liu, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 2029; (c) T. M. Tran, Y. Alan and T. E. Glass, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 7915; (d) F. Wang, L. Zhou, C. Zhao, R. Wang, Q. Fei, S. Luo, Z. Guo, H. Tian and W.-H. Zhu, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 2584; (e) C. Zhang, L. Wei, C. Wei, J. Zhang, R. Wang, Z. Xi and L. Yi, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 7505.
- 42 G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw and K. I. Goldberg, *Organometallics*, 2010, **29**, 2176.
- 43 A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 2213.
- 44 Ø. W. Akselsen, L. Skattebøl and T. V. Hansen, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 6339.
- 45 B. Roubinet, C. Massif, M. Moreau, F. Boschetti, G. Ulrich, R. Ziessel, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Chem. – Eur. J.*, 2015, DOI: 10.1002/chem.201502126, in press.

I.2.3. Points de discussion de l'article 1

Tout d'abord, il est important de préciser à nouveau que la stratégie de double activation revendiquée initialement, fonctionne pour les deux paires d'enzymes testées (PLE et NTR ; PGA et NTR) et ce de façon séquentielle : la sonde (**SD054**, **SD058** ou **SD059**) doit être incubée avec l'hydrolase afin de générer un dérivé 7-OH libre qui devient alors substrat de la NTR. En effet, cet enzyme rédox n'est pas capable de réagir avec les trois sondes **SD054**, **SD058** et **SD059** dont les deux phénols sont protégés. Les suivis HPLC-MS des cinétiques n'ont effectivement pas révélé la présence des composés décrit en Fig. I.26A qui seraient les résultats attendus de la seule action de la NTR.

Ensuite, l'apparition progressive d'une émission de fluorescence observée lorsque seul le couple NTR / NADH est introduit dans le milieu peut s'expliquer par la présence d'une quantité résiduelle de **SD019** (dernier intermédiaire de synthèse de ces sondes duales) au sein des composés testés (**SD054**, **SD058** et **SD059**). Cette contamination peut s'expliquer soit par de l'hydrolyse non spécifique des motifs carbonates en position 7 dans les solutions testées, soit en raison d'une purification imparfaite (même si les analyses RMN et HPLC-MS confirment des degrés de pureté supérieurs à 95%, les mesures de fluorescence sont tellement sensibles qu'elles peuvent mettre en évidence des quantités infimes de **SD019** dans l'échantillon une fois la NTR introduite). Si cette dernière hypothèse est la bonne, ce paramètre devra être pris en compte pour optimiser la voie de synthèse et / ou la technique de purification finale de la sonde duale afin de minimiser la présence de sonde "mono-analyte" dans le composé final.

La stabilité limitée des deux sondes en absence d'enzyme s'explique par une réaction de rétro-Knoevenagel conduisant à un dérivé benzaldéhyde qui toutefois n'est pas fluorescent (voir Fig. I.26B pour une proposition de mécanisme possible, inspiré des travaux du groupe de C. F. Bernasconi⁹⁹). A notre connaissance, cette réaction secondaire n'a jamais été observée / mentionnée dans les nombreuses publications qui décrivent les sondes fluorogéniques mettant en jeu la formation *in situ* d'une 2-iminocoumarine discutées précédemment (voir I.1.3). Ceci peut s'expliquer par le fait que dans tous ces cas, la position 4 du précurseur "cagé" est substituée par un groupe *N,N*-dialkylamino électro-donneur qui limite le caractère accepteur de Michael du motif acrylonitrile et donc sa possible réaction avec l'eau. Dans notre cas, cette position est substituée par un carbonate moins électro-donneur, ce qui renforce l'électrophilie de la position β de l'accepteur de Michael et donc l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau, point de départ du processus de rétro-condensation. Cette hypothèse peut être appuyée par quelques publications qui discutent de cette réaction sur des dérivés cinnamitriles^{99,100}.

⁹⁹ C. F. Bernasconi, A. Kanavarioti et R. B. Killion, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, (107), 3612-3620.

¹⁰⁰ a) T. Umeda et E. Hirai, *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, (29), 2753-2761 ; b) H. K. Oh, J. H. Yang, Y. H. Hwang, H. W. Lee et I. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, (23), 221-224 ; c) K. Ananthakumar, A. Sarathi, C. Gnanasekaran et A. Shunmugasundaram, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, **2003**, (42B), 1943-1949 ; d) H. K. Oh, I. K. Kim, H. W. Lee et I. Lee, *J. Org. Chem.*, **2004**, (69), 3806-3810 ; e) K. Rajasekaran, A. Sarathi et S. Ramalakshmi, *J. Chem. Sci.*, **2008**, (120), 475-480 ; f) L. He, X. Yang, Y. Liu et L. Weiyang, *Anal. Methods*, **2016**, (8), 8022-8027.

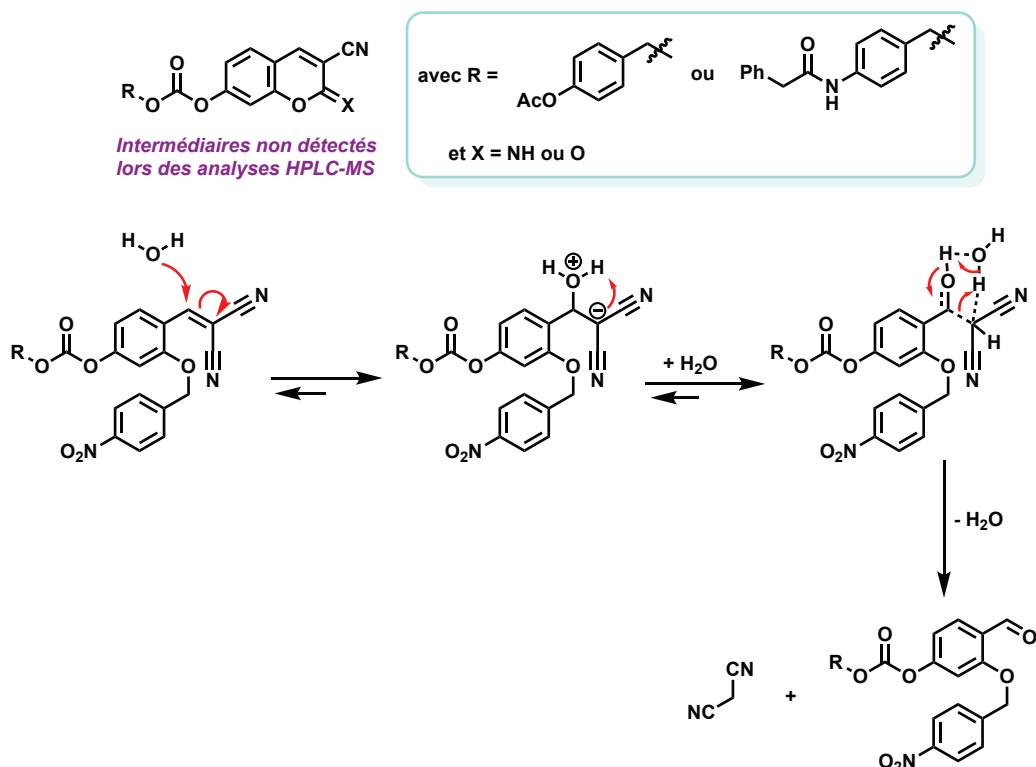


Figure 1.26 - (haut) Structure des produits non détectés lors des incubations enzymatiques conduisant à l'hypothèse que la NTR n'est pas capable d'agir sur les sondes protégées en position 4. (bas) Mécanisme proposé pour la réaction de rétro-Knoevenagel conduisant à la dégradation non-enzymatique des sondes SD058 et SD059.

I.2.4. Sonde pour la détection duale des activités β -Gal et NTR dans les bactéries

Après avoir validé le concept de double activation enzymatique avec des paires d'analytes modèles, nous avons souhaité évaluer le potentiel de ce système fluorogénique en microbiologie et plus précisément voir si le concept de formation *in situ* d'iminocoumarines fonctionnait dans un système biologique complexe (au sein de bactéries). Deux sondes (**SD094** et **SD098**) permettant en théorie la détection simultanée des activités β -Gal et NTR ont été conçues, synthétisées, validées *in vitro* avec les enzymes isolées puis transmises à notre partenaire industriel pour évaluation sur des souches bactériennes sélectionnées exprimant ces deux enzymes.

Concernant la préparation des deux sondes **SD094** et **SD098**, une voie de synthèse un peu différente de celle utilisée pour accéder aux sondes PLE / NTR et PGA / NTR a été envisagée (Fig. 1.27). Le même composé de départ est utilisé, à savoir le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde, la protection de sa position 4 a été directement réalisée au moyen d'une réaction d'éthérification avec le bromure de tétra-O-acétyl- α -D-galactose commercial (N° CAS : 3068-32-4) en conditions de catalyse par transfert de phase. Ensuite, en utilisant la même méthode que celle décrite dans la publication n°1, le motif *para*-nitrobenzyle a été introduit avant de réaliser la condensation de Knoevenagel avec le malonitrile (N° CAS : 109-77-3) ou le (2-benzothiazolyl)acétonitrile (N° CAS : 56278-50-3) dans des conditions standards.

La synthèse s'achève par la déprotection des groupements acétates à l'aide d'un traitement au méthanolate de sodium dans le méthanol. Les deux sondes **SD094** et **SD098** obtenues ont été purifiées par HPLC semi-préparative en phase inverse (rendements isolés non optimisés respectivement de 3% et 9%). Les faibles rendements sont dus à la fois à de la dégradation lors de l'étape de déprotection au MeONa, et à des pertes de matériel lors des purifications HPLC en phase inverse et de la lyophilisation qui a suivi. Leurs structures et leurs puretés ont été confirmées par des analyses RMN, ESI-MS et HPLC. Il est important de noter que **SD098** est un mélange de deux diastéréoisomères en raison de l'isomérisation géométrique E / Z de la double liaison du motif cinnamionitrile. Ces analyses ont également révélé un degré de pureté plus élevé que celui des sondes **SD054**, **SD058** et **SD059** et l'absence de produits mono-protégés qui aurait pu donner une réponse fluorogénique de type "Off-On" avec un seul des deux analytes. Les spectres d'absorption UV-visible (avec pour **SD094** : $\lambda_{Abs} = 275 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10\,100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et 368 nm ($\epsilon = 12\,550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et pour **SD098** : $\lambda_{Abs} = 370 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9\,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)) des deux sondes nouvellement conçues ont été enregistrés dans le tampon phosphate utilisé pour les réactions enzymatiques et l'absence d'une fluorescence résiduelle a également été vérifiée dans ces conditions.

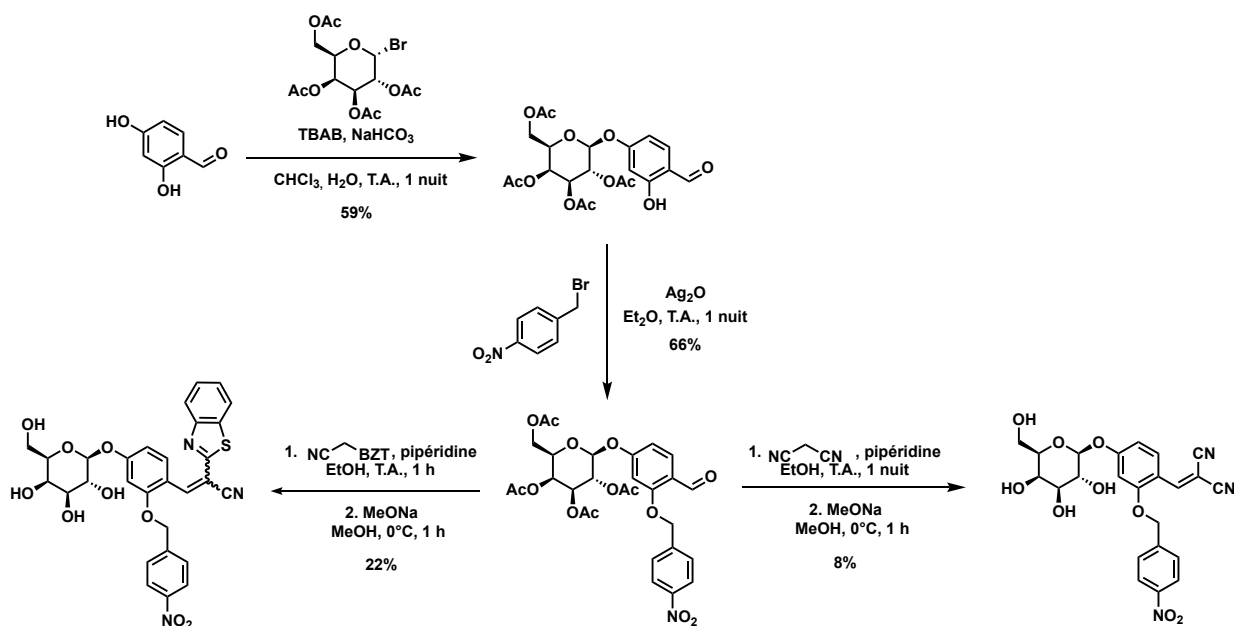


Figure I.27 - Schéma de synthèse des deux sondes duales ciblant les activités β -Gal et NTR (SD098 à gauche et SD094 à droite). (TBAB = bromure de tétrabutylammonium ; BZT = 2-benzothiazolyle).

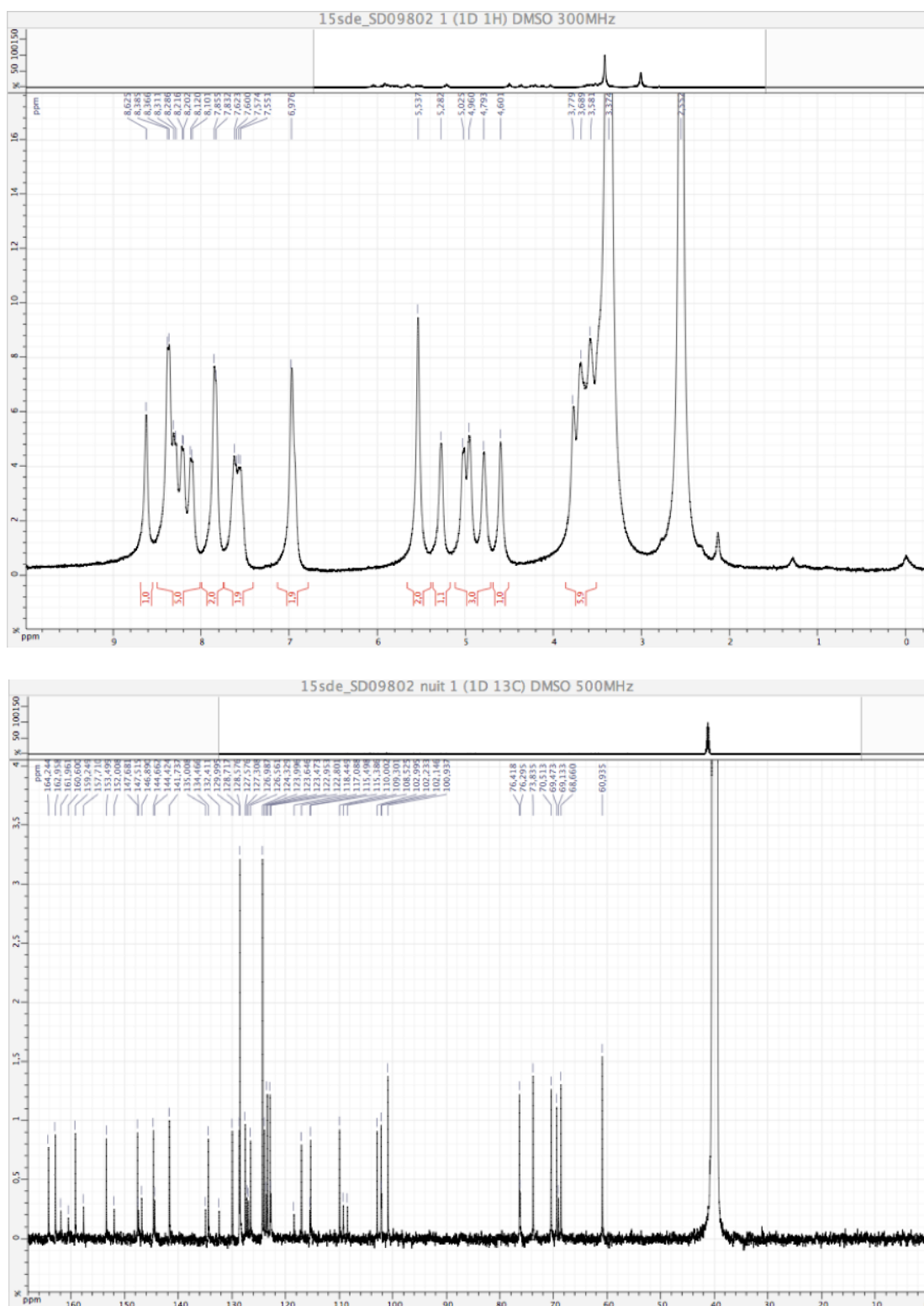


Figure I.28 - Spectres RMN ¹H (en haut, 300 MHz) et ¹³C (en bas, 125 MHz) de SD098 (DMSO-d₆, 25°C). Sur le spectre ¹³C, les deux diastéréoisomères sont visibles contrairement au spectre ¹H où seulement un élargissement des pics est observé.

L'activation duale de ces deux sondes a ensuite été conduite à l'aide des deux enzymes isolées suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans la publication n°1, en remplaçant PLE ou la PGA par la β -galactosidase (β -Gal). Les premiers enregistrements effectués sans agitation ont montré des accroissements de fluorescence non linéaires, mais l'utilisation d'une agitation par puce magnétique a permis d'obtenir des résultats plus satisfaisants et qui peuvent être présentés et discutés / interprétés (voir Fig. I.29). Ainsi, pour toutes les cinétiques réalisées, la présence des deux enzymes est indispensable pour obtenir un accroissement de la fluorescence à 458 nm pour **SD094** (ou 489 nm pour **SD098**). Cela semble confirmer que les réponses fluorogéniques obtenues en introduisant seulement la NTR lors des cinétiques réalisées pour la publication n°1 étaient bien dues à la présence de **SD019** résiduelle dans les sondes **SD054**, **SD058** et **SD059** testées. Concernant ces nouveaux résultats, 15 min après l'introduction de la seconde enzyme, la courbe atteint un palier qui ensuite décroît légèrement pour **SD098**. **SD094** présente des profils d'activation similaires aux sondes publiées, à savoir, une réponse satisfaisante pour les modes d'incubation simultanée et séquentielle (β -Gal puis NTR) mais plus médiocre pour une incubation séquentielle inverse (NTR puis β -Gal). Ce dernier résultat est tout de même encourageant car il souligne l'absence d'une inhibition totale de la NTR. Les cinétiques d'activation de **SD098** montrent de légères différences dans les profils obtenus. Ainsi la réponse fluorogénique faisant suite à l'introduction simultanée des deux enzymes est deux fois plus importante que celle résultant des incubations séquentielles. Des effets synergiques des deux enzymes sur l'équilibre entre les deux isomères géométriques de la sonde **SD098**, qui favoriseraient la forme Z (celle pour laquelle les fonctions phénol protégé et nitrile sont proches dans l'espace) et sa cyclisation une fois son phénol déprotégé, peuvent être mis en avant pour l'expliquer. Cependant, des travaux complémentaires seront nécessaires pour explorer / étayer cette hypothèse. Les réponses fluorogéniques obtenues lors des incubations séquentielles sont similaires et suggèrent que la sonde **SD098** n'agit pas comme un inhibiteur de la NTR. Les cinétiques conduites en l'absence d'enzyme ne révèlent aucune augmentation de la fluorescence, ce qui suggère là encore, l'effet bénéfique d'un double déclenchement pour limiter les faux positifs issus d'une possible hydrolyse non-spécifique de la sonde.

Pour la sonde **SD094**, les suivis HPLC-MS des bruts d'activation enzymatique montrent que ce pro-fluorophore peut s'hydrolyser selon une réaction de rétro-Knoevenagel qui semble en outre être accélérée / favorisée par les conditions de conditionnement / d'analyse de l'échantillon (présence de 0.1% d'acide formique dans la phase mobile aqueuse). De plus, le produit cyclisé (coumarine ou 2-iminocoumarine) portant le motif éther de galactose en position 7 n'a pu être mis en évidence confirmant que **SD094** n'est pas un substrat de la NTR. Les coumarines formées *in situ* et responsables du signal de fluorescence observé lors des mesures en mode cinétique, ont pu être détectées de manière significative après l'ajout de la β -Gal et comme attendu, leur formation implique le passage par l'intermédiaire **SD019**.

Les suivis par HPLC-MS des activations montrent pour **SD098** que la réaction de rétro-Knoevenagel n'a pas lieu et que la NTR peut agir au moins sur l'un des deux isomères géométriques. Il n'y a donc pas d'inhibition de cette enzyme rédox ce qui valide l'hypothèse émise précédemment pour interpréter la similitude observée entre les profils d'activation obtenus selon les deux modes d'incubation séquentielle). Les résultats obtenus avec le protocole d'incubation simultanée révèlent que l'action de la β -Gal est prédominante en termes de cinétique par rapport à celle de la NTR mais ne permettent pas de conclure quant à la plus grande efficacité de ces conditions pour former l'iminocoumarine. A ce stade, il n'est donc pas possible d'expliquer les différences d'intensité de fluorescence obtenues lors des cinétiques conduites selon les deux modes distincts d'incubation enzymatique. En outre, il faut garder à l'esprit que les concentrations en sonde utilisées pour les analyses de fluorescence et HPLC-MS sont différentes ($1,0 \mu\text{M}$ contre $80 \mu\text{M}$) ; l'influence de ces conditions sur l'activité enzymatique n'est pas connue surtout quand deux enzymes sont présentes dans un même milieu. L'influence des conditions d'illumination utilisées pour enregistrer l'émission de fluorescence au cours du temps ne sont pas non plus à négliger car elles pourraient influencer l'équilibre entre les formes Z et E de la sonde en solution et ainsi modifier la proportion en intermédiaire capable de cycliser ; cette excitation photonique, source potentielle d'interférences, n'est pas présente lors des cinétiques suivies par analyses HPLC-MS.

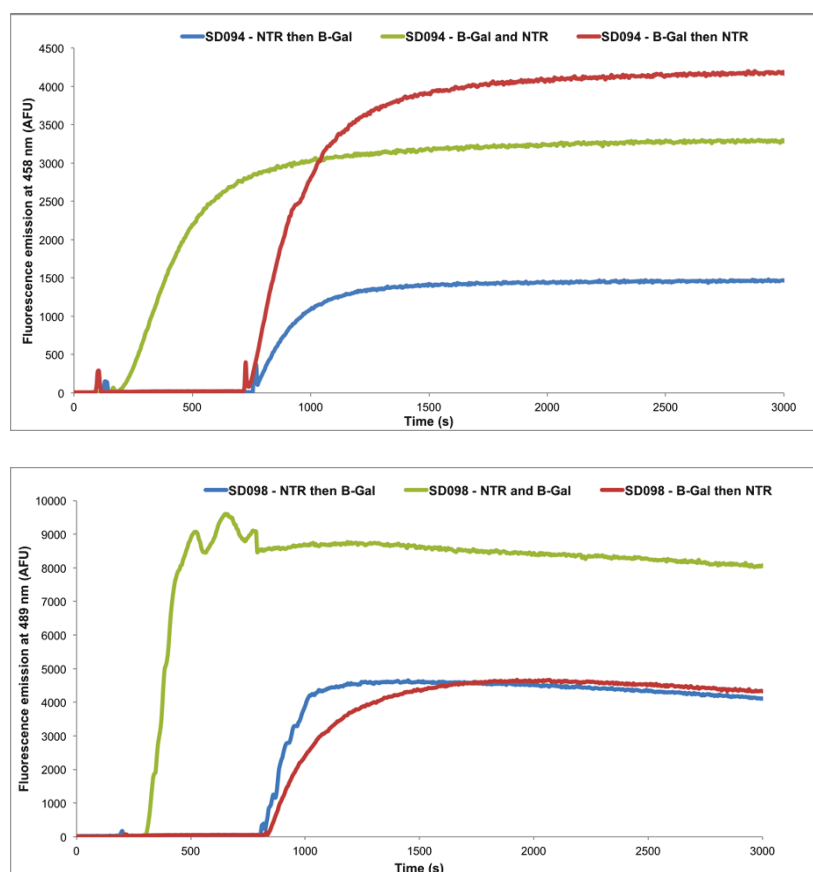


Figure I.29 - Cinétiques d'activation enzymatique duale des deux sondes SD094 (haut) et SD098 (bas). Evolution temporelle de l'émission de fluorescence à 458 nm ($\lambda_{ex} = 418 \text{ nm}$, fente 5 nm, SD094) et à 489 nm ($\lambda_{ex} = 446 \text{ nm}$, fente 5 nm, SD098) des sondes SD094 et SD098 (concentration : $1,0 \mu\text{M}$) dans le tampon phosphate, en présence de NTR d'*E. coli* ($0,1 \text{ U}$), de β -Gal (1 U) (les deux enzymes ajoutées simultanément ou de façon séquentielle : une des deux ajoutée entre 100 s et 300 s d'enregistrement, puis la seconde entre 700 s et 800 s) et de NADH ($50,0 \mu\text{M}$) à 37°C .

Nous avons ensuite transmis les sondes **SD094**, **SD098** et **SD019** au département R&D Microbiologie de bioMérieux pour des évaluations *in cellulo*. Concernant les deux sondes duales, les résultats obtenus avec les enzymes isolées sont en accord avec nos expériences : l'activation n'a lieu qu'en présence des deux enzymes NTR et β -Gal. Cependant un léger accroissement de fluorescence est observé lorsqu'une seule enzyme est présente dans le milieu et au-delà de 30 min d'incubation (Fig. I.30), mettant en évidence l'hydrolyse non-spécifique des motifs enzymo-labiles et montrant encore une fois l'intérêt de se servir d'une double protection dans un but d'optimisation du rapport signal / bruit. Par contre, les tests sur cellules se sont révélés décevants. Ainsi il n'a pas été possible d'évaluer **SD098** car cette sonde précipite dans le milieu TSB ("Tryptic Soy Broth", bouillon contenant des peptones de caséine et de soja). Concernant **SD094**, sur les sept souches d'*E. coli* testées, au bout de 20 h d'incubation, seules deux montrent un accroissement de la fluorescence mais qui reste peu significatif. La toxicité des deux sondes a été évaluée par mesure de densité optique à 660 nm (qui est directement corrélée à la croissance bactérienne). Par comparaison avec la référence (culture bactérienne qui n'est pas incubée avec la sonde), on observe une diminution de la croissance bactérienne, celle-ci n'est toutefois pas réhibitoire pour la conduite d'expériences mettant en jeu une mesure de fluorescence. Après l'échec des deux sondes duales, des tests ont également été effectués sur **SD019**. Une nouvelle fois, des résultats satisfaisants et en accord avec nos travaux (voir Fig. I.23) ont été obtenus avec les deux NTR d'*E. coli* purifiées (NfsA et NfsB) mais à l'inverse, les tests *in cellulo* n'ont pas permis de confirmer la formation *in situ* du fluorophore.

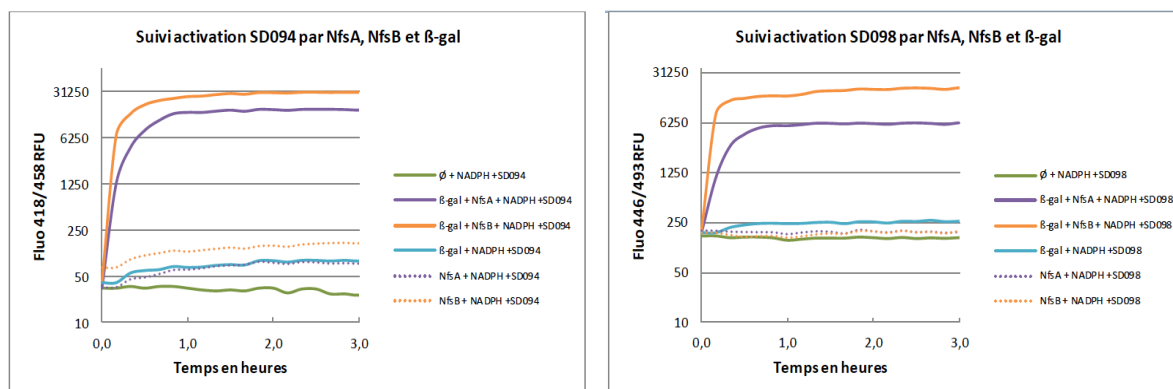


Figure I.30 - Cinétiques d'activation enzymatique des deux sondes SD094 (gauche) et SD098 (droite) réalisées par le département R&D Microbiologie de bioMérieux à l'aide des enzymes NfsA / NfsB (nitroréductases bactériennes) purifiées à partir d'une souche de *E. coli* et de β -Gal commerciale. Conditions opératoires : sonde (100 μ M) + NADPH (1,0 mM) + FMN (5,0 μ M) + enzyme (10 μ g/mL) dans tampon phosphate (50 mM, pH 7.5) à 35°C (volume final = 100 μ L). Figures issues des documents envoyés par la société bioMérieux et reproduites avec leur accord.

Ainsi, si l'échec de la sonde **SD098** est dû à un manque de solubilité de ce composé en conditions physiologiques (un solide jaune est observé au fond des puits), celui de la sonde **SD094** peut avoir de multiples explications comme une mauvaise pénétration cellulaire, une dégradation prématurée due à la réaction de rétro-Knoevenagel qui a déjà été observée avec les sondes de la publication n°1, ou bien alors une expression des deux enzymes dans des sous-compartiments cellulaires différents (en effet, si la sonde ne rencontre qu'un seul des deux analytes, sa conversion en fluorophore ne se produira jamais).

Notons que le précurseur de la sonde **SD094** qui possède un motif galactose peracétylé (voir Fig. I.27) pourrait avoir une pénétration cellulaire accrue. Cependant, cette modification structurale affecterait négativement la solubilité de la sonde et imposerait une étape de déprotection supplémentaire *in situ* prise en charge par les estérases cellulaires. Dans ce cas, ce pro-fluorophore serait activable par un jeu de trois activités enzymatiques différentes.

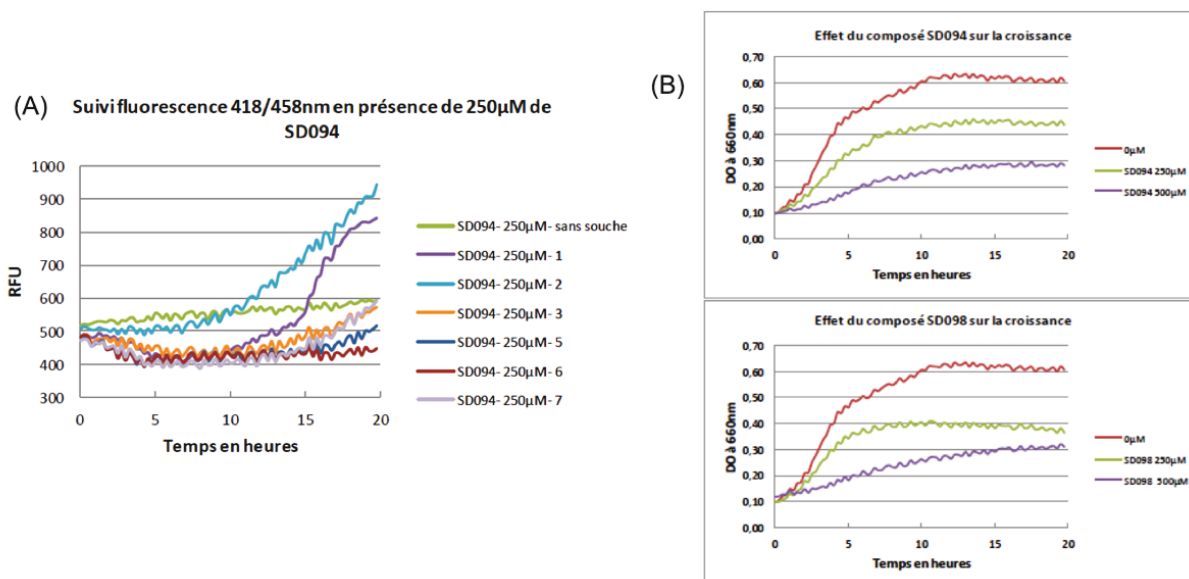


Figure I.31 - (A) Suivi de l'activation bactérienne (7 souches d'*E. coli*) de la sonde SD094 par mesure d'émission de fluorescence à 458 nm ($\lambda_{ex} = 418$ nm) ; (B) Effet des deux composés sur la croissance bactérienne mesurée par mesure de la densité optique à 660 nm (SD094 en haut et SD098 en bas). Figures issues des documents envoyés par la société bioMérieux et reproduites avec leur accord.

I.3. Difficultés rencontrées et améliorations possibles des sondes duales de première génération

I.3.1. Difficultés synthétiques

Au début de ce projet, la sonde ciblée devait être sensible à la paire d'enzymes modèle sulfatase / NTR dans le but d'obtenir une molécule soluble en milieu aqueux et à pH physiologique (du fait de la présence d'un groupement sulfate), et donc totalement compatible avec les conditions des réactions enzymatiques. La stratégie de synthèse était similaire à la préparation des sondes décrites dans la publication n°1 mais lors de l'introduction du motif sulfate sur le phénol (position 4) du précurseur cinnamitrile (dernière étape), celui-ci n'était pas stable et a subi une hydrolyse quantitative lors de l'étape de lyophilisation suivant la purification par HPLC semi-préparative en phase inverse. Ceci s'explique sans doute par la faible valeur de pKa du phénol et donc son aptitude à être un bon groupe nucléofuge une fois lié à un centre électrophile comme l'atome de soufre du motif sulfate. La réactivité particulière de ce phénol a également été constatée lors des tentatives (toutes infructueuses) d'alkylation avec des dérivés bromés de l'alcool PhAcPABA (**SD030**) en présence de diverses bases (Ag_2O , K_2CO_3 et NaH) et a déjà été mise en lumière par le travail du groupe de J. G. McCarron¹⁰¹. Ainsi, il a semblé indispensable d'introduire le motif enzymo-labile (choisi pour cette position) *via* un lien carbonate et non pas un lien éther benzylique. En effet, la chimie des carbonates met souvent en jeu des dérivés très réactifs (chloroformiates par exemple) pour réaliser des réactions d'acylation efficaces¹⁰².

De plus, suite au constat d'une possible inhibition de la NTR par **SD054**, **SD058** et **SD059**, la permutation des deux positions de déclenchement est apparue comme une solution rapidement vérifiable pour s'affranchir de cette complication pour la mise en place d'une sonde duale déclenchable quel que soit l'ordre de rencontre des deux enzymes.

Dans cette idée, le 2-hydroxy-4-(4-nitrobenzyloxy)benzaldéhyde a été synthétisé et a ensuite été soumis à divers essais d'alkylation de sa position 2-OH, soit avec le PhAcPABA en conditions de Mitsunobu, soit avec son dérivé mésyle ou bromé en présence de K_2CO_3 . Ceux-ci n'ont malheureusement pas abouti certainement du fait de la faible réactivité de ce phénol possédant un substituant formyl en *ortho*. Cette faible réactivité a également été observée lors des essais d'alkylation du 4-O-TBDMS-2-hydroxybenzaldéhyde avec le dérivé bromé du PhAcPABA, en présence de Ag_2O ou NaH comme base, qui là encore n'ont donné aucun résultat. Cela semble limiter le choix des liens éther envisageables pour cette position à des motifs benzyle portant un groupe fortement électro-attracteur en *ortho* ou *para* de la position de substitution.

¹⁰¹ N. Avlonitis, S. Chalmers, C. McDougall, M. N. Stanton-Humphreys, C. T. A. Brown, J. G. McCarron et S. J. Conway, *Mol. BioSyst.*, **2009**, (5), 450-457.

¹⁰² J. P. Parrish, R. N. Salvatore et K. W. Jung, *Tetrahedron*, **2000**, (56), 8207-8237.

Cette faible réactivité semble donc imposer le lien carbonate comme pour le cas du phénol en position 4 discuté précédemment. Ainsi les carbonates portant le motif réactif vis-à-vis de la PGA et de la PLE ont pu être introduits. Le sulfonate a pu lui aussi être greffé sur ce phénol. Malheureusement, ces groupements ne résistent pas aux conditions de Knoevenagel testées (soit avec le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) ou la pipéridine comme catalyseur basique).

Une solution possible à ce problème de synthèse serait d'utiliser comme matière première un dérivé 4-hydroxybenzaldéhyde halogéné en position 2, réaliser la condensation de Knoevenagel puis introduire le bras réactif au moyen d'une réaction de S_NAr si la réactivité de l'halogène est suffisante. Cela exige néanmoins de partir de composés plus onéreux que le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde.

Enfin, la limitation la plus rédhibitoire des sondes **SD054**, **SD058**, **SD059** et **SD094** est sans aucun doute leur stabilité médiocre dans certains milieux aqueux, liée à la réactivité de leur motif acrylonitrile vis-à-vis des molécules d'eau qui induisent un processus de rétro-Knoevenagel (voir I.2.3). Le dérivé benzaldéhyde formé n'étant pas fluorescent, cette réaction secondaire ne conduira pas à des faux-positifs. En revanche, la formation de l'iminocoumarine fluorescente n'étant plus possible même dans un milieu où sont présentes les deux enzymes ciblées, des faux-négatifs pourront être obtenus ; ceci pourrait expliquer l'absence de fluorescence observée pour les sept souches d'*E. coli* incubées avec la sonde **SD094**.

A ce stade, les solutions "chimiques" permettant de limiter/supprimer cette réaction de rétro-Knoevenagel n'ont pas été mises en œuvre, même si les résultats obtenus avec **SD098** peuvent donner des pistes de réflexion. La synthèse de précurseurs "cagés" capables de générer (toujours suite à l'action de deux enzymes) des cœurs fluorescents présentant des propriétés spectrales décalées vers le rouge (idéalement dans la gamme 550-650 nm) a été privilégiée car plus attractive pour obtenir des systèmes fluorogéniques utilisables *in cellulo* et / ou *in vivo*. Cependant, quelques arrangements seraient intéressants à explorer, dans un futur proche, pour améliorer les performances de ces sondes fluorogéniques duales de première génération. Ils sont brièvement présentés dans la partie qui suit.

I.3.2. Pistes possibles pour améliorer la stabilité, la solubilité et les propriétés spectrales

La première amélioration possible de ces sondes porte sur leur résistance à l'hydrolyse qui se produit *via* la réaction de rétro-Knoevenagel (*vide supra*). Cela peut sans doute être atteint en synthétisant le cœur cinnamitrile non pas à partir d'un dérivé benzaldéhyde mais à partir d'une acétophénone ou d'une benzophénone afin de rendre la double liaison C=C du motif acrylonitrile plus encombrée et donc moins accessible aux molécules d'eau (Fig. I.32A). Une seconde méthode basée sur l'introduction d'un substituant électro-donneur supplémentaire sur le cycle benzénique du cœur cinnamitrile (par exemple un méthoxyle en position 6), et ce afin d'enrichir en électrons la double liaison C=C du motif acrylonitrile (on notera que **SD019** est bien moins sensible à la rétro-Knoevenagel) constitue également une piste intéressante. La mise en place d'un lien carbamate (plus électro-donneur qu'un carbonate) en position 4 pourrait aussi avoir une influence sur la rétro-Knoevenagel (notons que l'espèce fluorescente libérée serait alors une 7-aminocoumarine). Enfin, supprimer le substituant nitrile qui se retrouve en position 3 de la coumarine formée *in situ*, pourrait également améliorer la stabilité de la sonde mais dans ce cas, les maxima d'absorption et d'émission du fluorophore subiront un déplacement hypsochrome.

La seconde amélioration concernera la solubilité des sondes en milieu aqueux car celle de **SD098** a été insuffisante pour réaliser des expériences en milieu de culture TSB pour des concentrations supérieures à 100 μ M. Pour cela, l'introduction des groupements hydrosolubilisants de type sulfonate (acide sulfonique totalement déprotoné à pH physiologique) sur le cycle benzénique (en position 5 par exemple) ou sur le cycle benzénique du substituant 2-benzothiazolyle peut être envisagée. Remplacer le substituant 2-benzothiazolyle par un motif 2-benzimidazolyle possédant sur son cycle benzénique un groupe CO₂H ou SO₃H ou N-substitué par un espaceur hydrophile pourrait également être intéressant. Cette stratégie a été récemment utilisée avec succès par B. Roubinet *et al.* pour améliorer la solubilité de diverses 3-hétéroaryl-7-hydroxycoumarines¹⁰³ (Fig. I.32B). Enfin, une autre approche, un peu moins ambitieuse car dépendante de la nature des enzymes ciblées par la sonde, consiste à tirer parti de la polarité de certains espaceurs auto-immolables (généralement à cœur pyridine)¹⁰⁴ et / ou des substrats enzymatiques (typiquement, un acide aminé ou un peptide) introduits sur les phénols du précurseur "cagé".

Afin de faciliter la détection d'analytes d'intérêt dans des matrices biologiques complexes, il est également intéressant de concevoir des précurseurs "cagés" qui pourront conduire à la formation *in situ* de coumarines dont les maxima d'absorption / émission seront décalés vers le rouge (cela est possible en travaillant sur les positions 6 et 7 des coumarines comme décrit en I.1.3 ou alors sur les positions 3 et 4 qui sont plus intéressantes dans notre cas, la position 7 devant être une position de déclenchement) ou non sensible aux variations de pH. Sans bouleverser totalement la structure de base de type dihydroxy-cinnamitrile et par analogie avec des coumarines déjà connues, on peut envisager l'introduction d'un groupement trifluorométhyle (-CF₃) ou cyano (-CN) en position 4^{11,13a,105}. Une extension de la conjugaison au niveau du motif acrylonitrile *via* l'introduction d'un bras styryle ou d'un résidu de type hémicyanine¹⁰⁶ ou tricyanofurane¹⁰⁷ (TCF) pourrait être une autre voie plus originale à explorer (Fig. I.32B). Cependant, dans ce cas, il est possible que le précurseur "cagé" soit déjà une espèce fluorescente et la cyclisation en coumarine conduirait alors à une molécule présentant d'autres maxima d'absorption / émission. Si tel est le cas, des sondes fluorescentes ratiométriques pourront être conçues.

Il est clair que la mise en œuvre effective de ces différentes améliorations nécessiteront un important travail de synthèse chimique. Il sera sans doute nécessaire d'imaginer des stratégies de synthèse beaucoup plus sophistiquées que celle utilisée pour la préparation des sondes **SD054**, **SD058**, **SD059**, **SD094** et **SD098** qui ont été elles-mêmes plus difficiles à synthétiser que les sondes "classiques" discutées dans les parties I.1.2 et I.1.3.

¹⁰³ B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 166-182.

¹⁰⁴ Pour des exemples, voir : a) R. Perry-Feigenbaum, P. S. Baran et D. Shabat, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, (7), 4825-4828 ; b) A. Alouane, R. Labruere, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt et L. Jullien, *Chem. - Asian J.*, **2014**, (9), 1334-1340.

¹⁰⁵ B. Roubinet, P.-Y. Renard et A. Romieu, *Dyes Pigm.*, **2014**, (110), 270-284.

¹⁰⁶ J. Liu, Y.-Q. Sun, Y. Huo, H. Zhang, L. Wang, P. Zhang, D. Song, Y. Shi et W. Guo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, (136), 574-577.

¹⁰⁷ M.-Y. Wu, K. Li, C.-Y. Li, J.-T. Hou et X.-Q. Yu, *Chem. Comm.*, **2014**, (50), 183-185.

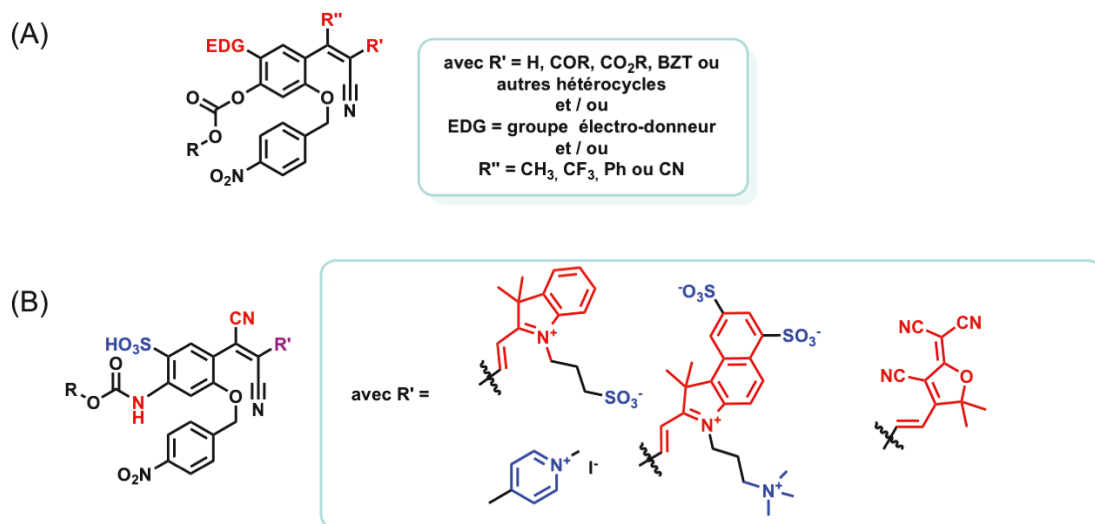


Figure I.32 - Résumé graphique des améliorations possibles à apporter aux précurseurs "cagés" de type dihydroxy-cinnamionitrile. (A) Pour la stabilité des sondes en milieu aqueux. (B) Pour l'hydrosolubilisation (modifications chimiques en bleu) et pour déplacer les propriétés spectrales vers le rouge (modifications chimiques en rouge) ; modifications chimiques notées en violet pour des motifs permettant à la fois une augmentation de la solubilité dans l'eau et un déplacement bathochrome des propriétés spectrales.

I.4. Perspectives issues des travaux sur les précurseurs cinnamionitriles

Pour conclure sur ce premier chapitre de résultats, nous présentons quelques perspectives inspirées de ces travaux et qui pourront être explorées à plus ou moins long terme.

La première concerne une approche alternative pour améliorer la stabilité des précurseurs "cagés" de type cinnamionitrile. Elle est fondée sur le remplacement du cœur benzénique par un naphthalène (voir les travaux déjà décrits dans la littérature et cités dans la partie I.1.3). Deux voies de synthèse permettant d'accéder (en théorie) à ces précurseurs "cagés" de 8-hydroxy-naphtho(imino)coumarine sont présentées Fig. I.33. Du fait du caractère hydrophobe augmenté de ces composés, il faudra sans doute optimiser la structure des motifs de déclenchement R₁ et R₂ afin de conférer à ces sondes une certaine solubilité en milieu aqueux.

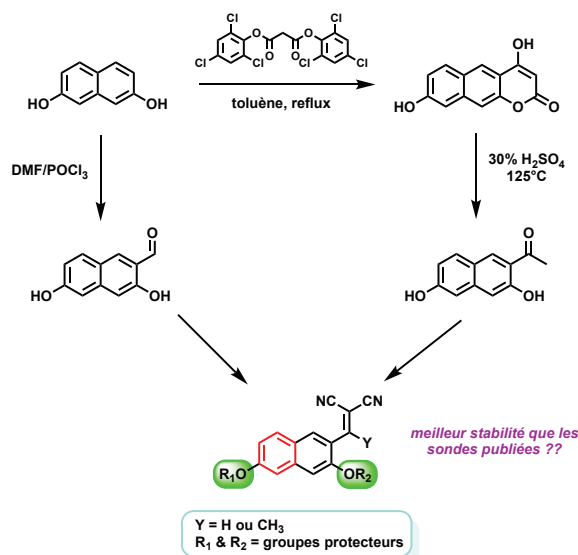


Figure I.33 - Voies de synthèse possibles pour la préparation de précurseurs "cagés" de 8-naphtho(imino)coumarines, pour des applications en détection "dual-analytes".

Une seconde perspective plus tournée vers les applications de ces systèmes fluorogéniques non usuels porte sur la détection simultanée d'une paire d'analytes d'intérêt dans le contexte du diagnostic médical. Par exemple, une détection simultanée du médiateur gazeux (ou gazotransmetteur) monoxyde d'azote (NO) et d'une enzyme rédox caractéristique des zones d'hypoxie (azo- ou nitroréductase) pourrait s'avérer intéressante de par le rôle clé joué par le NO dans ces zones pauvres en oxygène¹⁰⁸. Ainsi une sonde fluorogénique de type "Off-On" peut être élaborée en s'inspirant de la structure des précurseurs "cagés" de ce chapitre et dont l'activation conduirait à la formation d'un dérivé triazolo-coumarine dont les propriétés de fluorescence pourraient être intéressantes (Fig. I.34). Si la stabilité des précurseurs ne devrait pas en théorie poser de problème majeur (du fait de la présence de groupes électrodonneurs sur le cycle benzénique), le composé formé n'est pas décrit (même sans substituant -CN) et donc ses propriétés de fluorescence sont difficilement prévisibles. De plus, il n'est pas exclu que le dérivé 6,7-diamino-2-iminocoumarine intermédiairement formé suite à l'action de la réductase soit fluorescent. Ainsi, la réaction de cet intermédiaire avec le NO conduirait à une triazolo-coumarine dont les caractéristiques spectrales seraient différentes. Un schéma de détection séquentiel mettant en jeu deux canaux de détection différents de la fluorescence (mode ratiométrique) est sans doute le plus probable pour cette paire d'analytes. Ce marquage complémentaire des zones hypoxiques peut être intéressant dans le cas d'analyses où l'activité réductase est détectée en normoxie, certaines réductases n'étant pas sensibles aux variations du taux d'oxygène.

Enfin, la dernière perspective s'inscrit dans un contexte plus thérapeutique. En effet, les coumarines sont des synthons hétérocycliques très populaires en chimie médicinale, mais leur pouvoir pharmacologique élevé vis-à-vis de nombreuses cibles biologiques peut être un souci en termes de sélectivité (provoquant des effets secondaires non désirés). Pour contourner ce problème, la formation *in situ* du cœur coumarine pourrait être une solution innovante pour améliorer la sélectivité vis-à-vis de l'enzyme ciblée.

¹⁰⁸ M. Umbrello, A. Dyson, M. Feelisch et M. Singer, *Antiox. Red. Signal.*, **2013**, (19), 1690-1710.

Par exemple, le composé entouré en rouge dans la Fig. I.35 est connu pour inhiber la MAO-B¹⁰⁹. Ainsi, si l'on applique le concept de formation *in situ* du cœur coumarine, nous pouvons imaginer la structure d'un précurseur "cagé" de cet inhibiteur. Le motif protégeant le groupement hydroxyle impliqué dans la réaction de Pinner est choisi de façon à être sélectivement reconnu et transformé par la MAO-B¹¹⁰ qui induit alors la formation de son propre inhibiteur. Une extension possible de ce concept est d'utiliser un précurseur d'inhibiteur coumarinique fluorescent (il existe de nombreuses coumarines inhibitrices de l'activité MAO) "cagé" selon le même principe. Ainsi, des applications théranostiques précliniques (pour les maladies neurodégénératives) pourraient être envisagées.

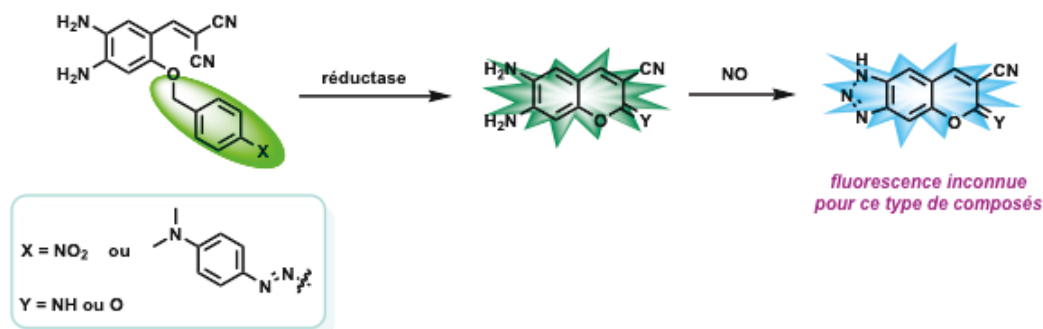


Figure I.34 - Sonde fluorogénique "Off-On" pour la détection séquentielle d'une réductase (NTR ou Azor) et du NO, selon un mode ratiométrique supposé, pour une visualisation des zones d'hypoxie.

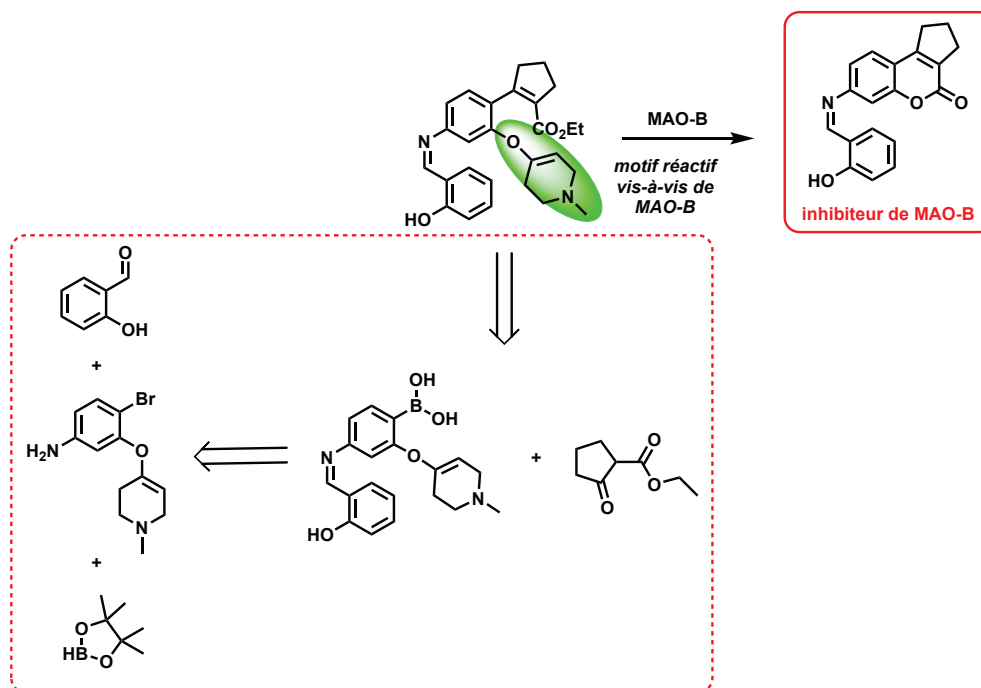


Figure I.35 - Principe de formation *in situ* d'un inhibiteur de MAO-B après activation enzymatique de son précurseur "cagé". Analyse rétro-synthétique du précurseur "cagé".

¹⁰⁹ M. Huang, S.-S. Xie, N. Jiang, J.-S. Lan, L.-Y. Kong et X.-B. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, (25), 508-513.

¹¹⁰ S. Long, L. Chen, Y. Xiang, M. Song, Y. Zheng et Q. Zhu, *Chem. Commun.*, **2012**, (48), 7164-7166.

Chapitre II

*Détection de peptidases et de
nitroréductases basée sur la
formation d'une pyronine*

Détection de peptidases et de nitroréductases basée sur la formation d'une pyronine

Ce chapitre abordera le second objectif de la thèse à savoir la formation *in situ* d'un cœur pyronine déclenchée par deux analytes distincts. Comme première application de cette méthode de détection fluorogénique non-usuelle, nous envisageons d'imager *in vivo* des zones d'inflammation aiguë en ciblant deux biomarqueurs majeurs du stress oxydant et de la mort cellulaire, à savoir le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la caspase-8. Dans un premier temps, la bibliographie portant sur l'activation de la fluorescence des fluorophores de la famille des xanthènes (à laquelle appartiennent les dérivés pyronine) et leurs propriétés spectrales, ainsi que l'état de l'art concernant la formation *in situ* du cœur pyronine seront présentés. Ensuite, une application de détection "mono-analyte" pour des protéases ou des nitroréductases sera détaillée ainsi que les premiers essais d'obtention de sondes duales. Enfin, les problèmes de synthèse et de déclenchement enzymatique afférents à ce type de sondes et leurs possibles améliorations seront exposés. Il est important de préciser que dans un souci de clarté, les résultats ne sont pas présentés dans l'ordre chronologique de leur obtention.

II.1. Etat de l'art

II.1.1. Xanthènes : historique et propriétés spectrales

Actuellement, parmi les nombreuses classes de fluorophores organiques disponibles (voir 0.1.2), la famille des xanthènes est sans doute la plus populaire, ce qui se traduit notamment par un usage massif des fluorescéines et des rhodamines. L'état de l'art développé ci-dessous sera non exhaustif étant donné le nombre considérable d'études portant sur cette famille de fluorophores.

Les xanthènes sont des colorants contenant un noyau xanthylum portant des groupes amino (substitués ou non) et / ou hydroxyle en position *mé*ta de l'atome d'oxygène intracyclique. La rigidité structurale de ces chromophores en fait souvent de bons émetteurs de fluorescence dans le visible. Les paragraphes portant sur l'historique, la nomenclature et la méthode générale de synthèse sont tirés principalement de deux revues écrites par L. D. Lavis et P. Wright¹ qui recensent quelques travaux princeps.

¹ a) P. Wright, Xanthene Dyes, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, 2ème édition, 2014 ; b) L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, (86), 825-843.

En 1871, A. von Baeyer synthétisait la fluorescéine en condensant du résorcinol et de l'anhydride phtalique obtenant ainsi le premier xanthène synthétique. Il sera suivi en 1887 par M. Céresole qui obtiendra à Lyon la première rhodamine (la tétraméthylrhodamine (TAMRA)) montrant un décalage vers le rouge d'environ 50-60 nm de ses maxima d'absorption et d'émission par rapport à ceux des fluorescéines. Puis en 1889, de multiples brevets décriront l'obtention de la pyronine Y qui semble provenir plus particulièrement des travaux de F. Bender. Ces trois molécules forment les principales sous-classes au sein de la famille des xanthènes auxquelles on peut ajouter les rosamines.

Ainsi, une distinction de nomenclature apparaît entre les dérivés "diphénylméthane" (pyronines et succinéines) et les dérivés "triphénylméthane" portant un groupe COXH (avec X = O, NH, S, Se) sur le phényle substituant la position 9 (voir Fig. II.2 pour la numérotation des xanthènes, on parle également de phényle en *meso*). Le motif COXH peut donner lieu à la formation d'une lactone par attaque nucléophile intramoléculaire sur la double liaison C=C des positions 8a/b et 9, et donc à un équilibre entre la forme fluorescente et un composé de type spiranique non-fluorescent. Cette caractéristique unique est souvent mise à profit pour la conception de sondes fluorogéniques destinées à des applications en détection ou bioimagerie² ; elle a également des conséquences sur la photostabilité et la brillance de ces fluorophores. Cette sous-classe regroupe les fluorescéines (portant des -OH en position 3 et 6) et les rhodamines (analogues aminés des fluorescéines). Enfin la dernière sous-classe regroupe les 9-phényl-xanthènes ne possédant pas de substituant en position *ortho* sur le *meso*-phényle capable de lactoniser (ou alors possédant un groupement hydroxyméthyle, amino ou thiol), ce qui est le cas des rosamines et des fluorones.

Une méthode générale de synthèse s'applique à toute cette famille pour les composés symétriques (c'est-à-dire possédant des substituants identiques en position 3 et 6) et peut être "simplement" décrite comme le résultat de la condensation de deux phénols *méto*-substitués sur un carbonyle électrophile (aldéhyde, anhydride ou ester) qui portera le substituant de la position 9. Cette réaction est historiquement effectuée sous catalyse acide et à des températures généralement supérieures à 100°C^{1a,3} (Fig II.1A). Aujourd'hui, suivant le colorant que l'on souhaite préparer, d'autres méthodes de synthèse plus sophistiquées et / ou mettant en jeu des conditions moins drastiques sont possibles^{4,5}.

² Pour des revues sur le sujet : a) H. N. Kim, M. H. Lee, H. J. Kim, J. S. Kim et J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, (37), 1465-1472 ; b) X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim et J. Yoon, *Chem. Rev.*, **2012**, (112), 1910-1956.

³ a) W. Müller, *Just. Lieb. Annal. Chem.*, **1974**, 334-335 ; b) R. R. Sauers, S. N. Husain, A. P. Piechowski et G. R. Bird, *Dyes Pigm.*, **1987**, (8), 35-53.

⁴ Pour des exemples, voir : a) N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung et R. P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.*, **1999**, (47), 1179-1188 ; b) K. G. Upadhyaya, S. M. Menchen et W. Zhen, *US6221604B1*, **2001** ; c) A. Habi, D. Gravel, L. Villeneuve, J.-P. Forte, H. Su et M. Vaillancourt, *WO2002079183 A1*, **2002** ; d) S. Clunas, J. M. D. Strory, J. E. Rickard, D. Horsley, C. R. Harrington et C. M. Wischik, *WO2010067078A2*, **2010** ; e) T. Peng et D. Yang, *Org. Lett.*, **2010**, (12), 496-499 ; f) J. B. Grimm et L. D. Lavis, *Org. Lett.*, **2011**, (13), 6354-6357 ; g) S. Han et Y. Chen, *Dyes Pigm.*, **2013**, (96), 59-62 ; h) L. D. Lavis et R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, (9), 855-866 ; i) Z. Lei, X. Li, Y. Li, X. Luo, M. Zhou et Y. Yang, *J. Org. Chem.*, **2015**, (80), 11538-11543 ; j) S. J. Dwight et S. Levin, *Org. Lett.*, **2016**, (18), 5316-5319.

⁵ Y. Duan, M. Liu, W. Sun, M. Wang, S. Liu et Q. X. Li, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2009**, (6), 35-43.

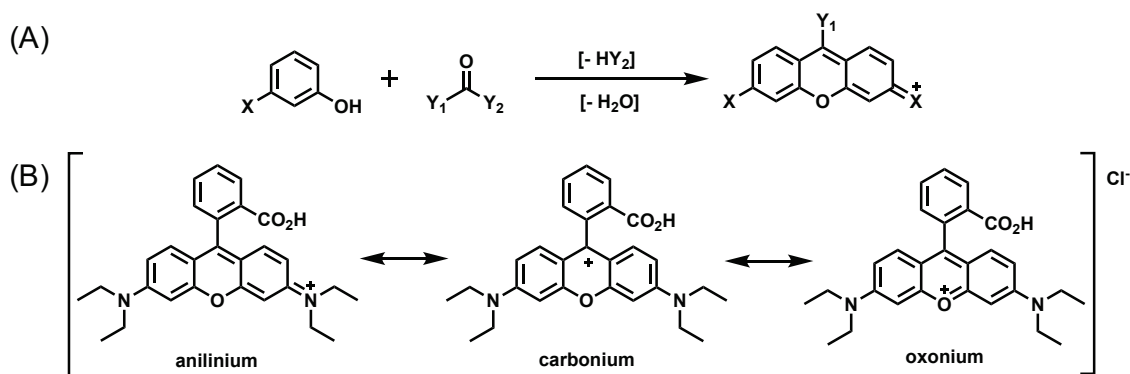


Figure II.1 - (A) Méthode de synthèse générale des xanthènes avec $X = NR_2$ ou OH et $Y_1C(O)Y_2 =$ aldéhyde, anhydride ou ester. (B) Formes de résonance du chlorure de rhodamine B.

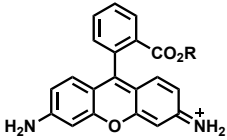
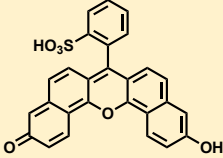
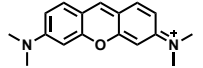
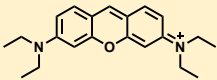
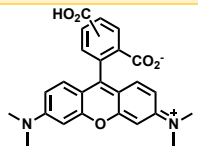
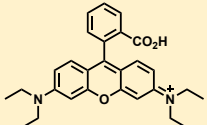
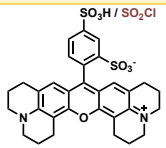
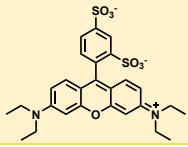
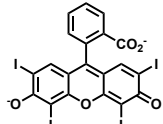
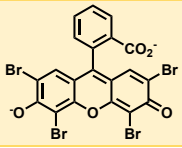
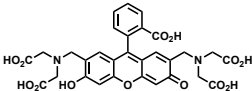
Du fait de leur utilisation répandue, de nombreux composés sont commerciaux (certains ne sont pas des fluorophores), quelques exemples avec leurs propriétés photophysiques sont présentés dans le Tableau II.1 ci-dessous.

Nom ^{référence} N° _{CAS} (contre-ion)	Structure	Propriétés photophysiques
Fluorescéine ⁶ 2321-07-5 (\emptyset)		$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 490 / 514 (tampon aqueux, pH 8,0) QY : 79% (EtOH)
Oregon Green 488 ⁷ 195136-58-4 (\emptyset)		$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 490 / 514 (tampon aqueux, pH 9,0) QY : 91% (H ₂ O)
Alexa Fluor[®] 488 ^{4a} 247144-99-6 (3 Li ⁺)		$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 494 / 517 (tampon aqueux, pH 7,0) QY : 92% (H ₂ O, pH 7,2)
Alexa Fluor[®] 594 ^{4a} 247145-86-4 (non défini)		$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 590 / 617 (tampon aqueux, pH 7,0) QY : 66% (H ₂ O, pH 7,2)
Rhodamine 6G ⁸ 989-38-8 (Cl ⁻)		$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 530 / 552 (EtOH) QY : 92% (H ₂ O)

⁶ X.-F. Zhang, J. Zhang et L. Liu, *J. Fluoresc.*, **2014**, (24), 819-826.

⁷ Pour consulter le rapport de N. Gustafsson intitulé "Experimental investigation of the Photophysics of Oregon Green 488 and its suitability to biological research applications", consulter le site internet : <http://www.ucl.ac.uk/~ucbpngu/MRes%20Work.html>.

⁸ a) : J. A. Titus, R. Haugland, S. O. Sharrow et D. M. Segal, *J. Immunol. Methods*, **1982**, (50), 193-204 ; b) A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, **2011**, (83), 2213-2228.

<p>Rhodamine 110 (R = H)⁹ 13558-31-1 (Cl⁻)</p> <p>Rhodamine 123 (R = Me)⁹ 62669-70-9 (Cl⁻)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 496 / 520 (H₂O) QY: 92% (1,0 N H₂SO₄)</p> <p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 502 / 525 (H₂O) QY: 90% (H₂O)</p>
<p>Vita Blue¹⁰ 122079-36-1 (Ø)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 609 / 665 (tampon aqueux, pH 9,5) QY: 15% (tampon aqueux, pH 9,5)</p>
<p>Pyronine Y^{1a} 92-32-0 (Cl⁻)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 546 / 566 (H₂O, pH 6,8) QY : 22% (H₂O, pH 6,8)</p>
<p>Pyronine B^{1a} 2150-48-3 (FeCl₄⁻)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 552 / 572 (H₂O, pH 6,8) QY : 18% (H₂O, pH 6,8)</p>
<p>5(6)-Carboxytétraméthylrhodamine (5(6)-TAMRA)¹¹ 91809-66-4 (celui du 5) (Ø)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 543 / 570 (MeOH) QY: 70% (simulé)</p>
<p>Rhodamine B^{1a} 81-88-9 (Cl⁻)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 554 / 579 (H₂O) QY : 68% (EtOH)</p>
<p>Sulforhodamine 101 / Texas Red³ 60311-02-6 (Ø) / 82354-19-6 (Ø)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 586 / 605 (H₂O) QY: 95% (EtOH) / 35% (H₂O)</p>
<p>Sulforhodamine B¹² 3520-42-1(Na⁺)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 565 / 586 (H₂O) QY: 33% (H₂O)</p>
<p>Erythrosine B¹³ 16423-68-0 (2 Na⁺)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 527 / 550 (H₂O) QY: 2% (H₂O)</p>
<p>Eosine Y⁶ 17372-87-1 (2 Na⁺)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 516 / 540 (PBS) QY: 24% (PBS)</p>
<p>Calcéine⁶ 1461-15-0 (Ø)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 492 / 517 (PBS) QY: 75% (PBS)</p>

⁹ R. F. Kubin et A. N. Fletcher, *J. Lumin.*, **1983**, (27), 455-462.

¹⁰ L. G. Lee, G. M. Berry et C. H. Chen, *Cytometry*, **1989**, (10), 151-164.

¹¹ M. Savarese, A. Aliberti, I. De Santo, E. Battista, F. Causa, P. A. Netti et N. Rega, *J. Phys. Chem. A*, **2012**, (116), 7491-7497.

¹² S. N. Smith et R. P. Steer, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2001**, (139), 151-156.

¹³ R. Duchowicz, M. L. Ferrer et A. U. Acuna, *Photochem. Photobiol.*, **1998**, (68), 494-501.

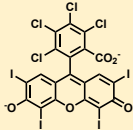
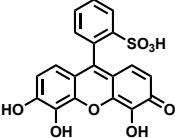
<p>Rose Bengale⁶ 632-69-9 (2 Na⁺)</p>		<p>$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 526 / 530 (PBS) QY: 2% (PBS)</p>
<p>Rouge de Pyrogallol¹⁴ 32638-88-3 (Ø)</p>		<p>λ_{Abs} (nm) : 550 (tampon aqueux, pH 9)</p>

Tableau I.1 - Quelques composés commerciaux ainsi que leurs propriétés photophysiques.

Les utilisations de certains de ces colorants comme additifs alimentaires et comme agents de contraste en imagerie de fluorescence ont conduit les chercheurs à réaliser quelques études de toxicité sur ces composés^{1a,15}. Pour ces applications, la couleur ou brillance intense de ces chromophores permet de les utiliser en quantité très faible limitant ainsi leur potentiel effet toxique, et comme indiqué en introduction, la fluorescéine est le seul fluorophore organique non-NIR approuvé par la FDA^{15b} pour des applications cliniques. La toxicité est aussi cruciale pour des utilisations dans d'autres domaines comme par exemple en océanographie avec l'étude des courants marins ou en cosmétique pour la conception de rouges à lèvres. Leurs couleurs intenses en font aussi des colorants de choix pour les encres ou pour la teinture des vêtements¹⁶.

Une autre application pour laquelle les xanthènes fluorescents occupent une place de choix, est le séquençage de l'ADN¹⁷, en particulier, les méthodes de Sanger et de séquençage par synthèse ("sequencing by synthesis", SBS) dont la mise en œuvre nécessite l'utilisation de nucléotides fluorescents. Pour une introduction aux techniques de fluorescence pour des applications en bioanalyse des acides nucléiques, le lecteur pourra se référer au chapitre 21 ("DNA technology") du livre *Principles of Fluorescence Spectroscopy* de J. R. Lakowicz¹⁸.

Tous les dérivés xanthène ne sont pas fluorescents, ils peuvent être utilisés en tant que simples colorants alimentaires, substrats chromogéniques (exemple du rouge de Pyrogallol, un produit de diagnostic *in vitro* pour la quantification de protéines urinaires), ou comme photosensibilisateur de type II (c'est le cas par exemple du rose Bengale) pour générer de l'oxygène singulet¹⁹. Dans ce cas, des applications en synthèse organique et en thérapie photodynamique (PDT) sont privilégiées.

¹⁴ a) N. Watanabe, S. Kamei, A. Ohkubo, M. Yamanaka, S. Ohsawa, K. Makino et K. Tokuda, *Clin Chem*, **1986**, (32), 1551-1554 ; b) T. Marshall, N. J. Abbott, P. Fox et K. M. Williams, *Electrophoresis*, **1995**, (16), 28-31.

¹⁵ a) R. D. Combes et R. B. Haveland-Smith, *Mutat. Res.*, **1982**, (98), 101-243 ; b) R. Alford, H. M. Simpson, J. Duberman, G. C. Hill, M. Ogawa, C. Regino, H. Kobayashi et P. L. Choyke, *Mol. Imaging*, **2009**, (8), 341-354 ; c) T. Mizutani, *J. Environ. Public Health*, **2009**, 953952.

¹⁶ C. J. Cooksey, *Biotech. Histochem.*, **2016**, (91), 71-76.

¹⁷ Pour des revues sur le sujet, voir : a) S. Kumar, Fluorescent dye nucleotide conjugates for DNA sequencing, *Modified Nucleotides, synthesis and applications*, Research Signpost, **2002** ; b) R. T. Ranasinghe et D. Klenerman, Fluorophore Conjugates for Single Molecule Work, *DNA Conjugates and Sensors*, RSC Publishing, 1ère édition, **2012** ; c) B. Roubinet, "Développement de nouveaux outils chimiques pour la conception d'un système de détection fluorogénique des réactions catalysées par les polymérases", Université de Rouen, **2015**.

¹⁸ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3ème édition, **2006**.

¹⁹ Pour des revues sur l'oxygène singulet et les réactions de photosensibilisation de type II, voir : a) A. Greer, *Acc. Chem. Res.*, **2006**, (39), 797-804 ; b) P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, (39), 3181-3209.

Mais en l'absence d'atomes lourds au sein de la structure (typiquement des halogènes) et grâce à la rigidité de cette dernière, une fluorescence intense est souvent observée pour ces molécules. Les propriétés spectrales de ces fluorophores seront discutées en détails dans les paragraphes qui suivent. Un schéma général présentant la numérotation et les principaux sites dont la modification chimique peut affecter les propriétés de fluorescence, peut être établi à partir des nombreux travaux de la littérature (Fig. II.2).

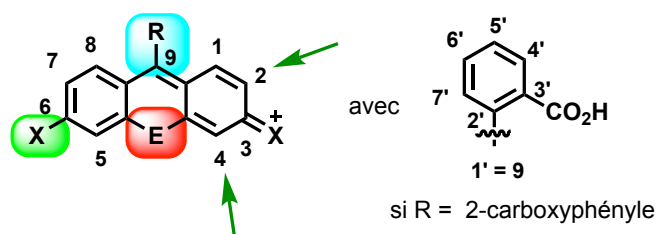


Figure II.2 - Schéma et numérotation des xanthènes (dans la littérature la notation prime peut être attribuée au noyau xanthylum) présentant les positions dont la modification chimique peut affecter la fluorescence : les positions 3 et 6 portant soit un groupement hydroxyle, soit une amine substituée ou non ; les positions 2, 4, 5, 7 pouvant porter des halogènes ou des groupements électro-donneurs, la position 9 qui peut être substituée de multiples façons, et enfin la position E (numérotation 10 dans certaines publications) qui est classiquement occupée par un atome d'oxygène mais qui peut être substituée par un autre chalcogène ou un autre hétéroatome (vide infra).

Pour les composés assimilés aux dérivés "diphénylméthane", avec $X = NR'_2$ et $R = H$ pour les pyronines ($X = OH$ pour les 6-hydroxyfluorones) ou $R = alkyl$ pour les succinéines, les valeurs des maxima d'absorbance et d'émission sont respectivement voisines de 550 nm et 570 nm (fluorescence jaune-orange) avec des rendements quantiques de fluorescence d'environ 20% dans l'eau. Les paramètres les plus influencés par le milieu sont le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence¹¹. Cette dépendance s'interprète souvent en mettant en avant l'existence de processus non-radiatifs exacerbés (existence d'un TICT ou d'ULM²⁰ ou plus probablement d'un état de charge séparée (CS)²¹) dans les solvants polaires qui sont connus pour favoriser les séparations de charge. La présence de chaînes alkyles sur les groupement amino des positions 3 et 6 va elle aussi influencer ces paramètres en augmentant les processus non-radiatifs (probablement par TICT)^{1a}.

Des études d'extinction de fluorescence par l'oxygène moléculaire²² ou réaction d'hydratation²³ de ce type de composés ainsi que leur interaction avec des biomolécules ou des organites cellulaires (glucose²⁴, albumine²⁵, membrane mitochondriale²⁶) ont été entreprises afin de mieux comprendre le comportement photophysique des pyronines en milieu physiologique pour des applications biologiques.

²⁰ ULM: "Umbrella-like motion"; a) Y. Onganer et E. L. Quitevis, *J. Phys. Chem.*, **1992**, (96), 7996-8001 ; b) B. Acemioğlu, M. Arik et Y. Onganer, *J. Lumin.*, **2002**, (97), 153-160.

²¹ R. P. Sabatini, M. F. Mark, D. J. Mark, M. W. Kryman, J. E. Hill, W. W. Brennessel, M. R. Detty, R. Eisenberg et D. W. McCamant, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2016**, (15), 1417-1432.

²² N. Celebi, M. Arik et Y. Onganer, *J. Lumin.*, **2007**, (126), 103-108.

²³ M. El Baraka, M. Deumié et P. Viallet, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1992**, (67), 75-90.

²⁴ A. A. Essawy et M. S. Attia, *Talanta*, **2013**, (107), 18-24.

²⁵ A. Salci et M. Toprak, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2017**, (35), 8-16.

²⁶ T. C. Tomov, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **1986**, (13), 29-38.

La pyronine Y (N°_{CAS} : 92-32-0, coloration de l'ARN) et l'Acridine Red (N°_{CAS} : 2465-29-4, teinture du cuir et coton) font partie des composés les plus employés de cette sous-classe de xanthène²⁷.

Les rhodamines et les fluorescéines sont les sous-classes de xanthènes les plus utilisées et les plus étudiées (notamment par le groupe de S. W. Hell²⁸, co-lauréat du prix Nobel de chimie 2014²⁹ pour le développement des techniques de microscopie optique à haute résolution). Pour ces deux familles, les deux fluorophores historiquement découverts en premier sont : la fluorescéine (N°_{CAS} : 2321-07-5), qui sous sa forme dianionique absorbe à 491 nm avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de $9.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et émet dans la région du bleu-vert avec un maximum centré à 510 nm et un rendement quantique de 86% ; et la TAMRA absorbant à 548 nm avec un ϵ de $7.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et émettant à 572 nm avec un rendement quantique de 41%³⁰.

	Acridine Red	Pyronin B	Pyronin B-dimer	Pyronin Y	Rhodamine B	Rhodamine 6G
Solvent: Water (pH 6.8)						
$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	528	552	552	546	554	526
$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	562	572	572	566	579	552
$\Delta\nu/\text{nm}$	34	20	20	20	25	26
Φ_f	0.51	0.18	0.20	0.22	0.23	0.69
τ_f/ns	4.18(79 %), 1.61	1.32(95 %), 4.27	1.30(98 %), 4.53	1.98	1.78	4.22
χ^2	1.05	1.06	1.06	1.14	1.32	1.09
$k_{\text{ic}}, 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.12	0.62	0.62	0.39	0.43	0.073
$k_{\text{r}}, 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.12	0.14	0.15	0.11	0.13	0.16
Solvent: EtOH						
$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	534	553	553	547	546	530
$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	562	574	574	569	572	553
$\Delta\nu/\text{nm}$	28	21	21	22	26	23
Φ_f	1.00	0.47	0.46	0.48	0.74	0.95
τ_f/ns	3.87	2.01	1.98	2.32	3.06	4.17
χ^2	1.10	1.08	1.06	1.07	1.12	1.01
$k_{\text{ic}}, 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.00	0.26	0.27	0.22	0.085	0.012
$k_{\text{r}}, 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.30	0.23	0.23	0.21	0.24	0.23

Tableau II.2 - Comparatif des caractéristiques spectrales de pyronines et rhodamines dans l'eau à pH 6,8 et dans l'éthanol avec $\Delta\nu$: déplacement de Stokes ; Φ_f : rendement quantique ; τ_f : durée de vie ; χ^2 : susceptibilité quadratique ; k_{ic} : la constante de vitesse pour la désexcitation non-radiative ; k_{r} : la constante de vitesse pour la désexcitation radiative. Illustration issue de la référence [27].

²⁷ X.-F. Zhang, J. Zhang et X. Lu, *J. Fluoresc.*, **2015**, (25), 1151-1158.

²⁸ a) M. Bossi et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, (45), 7462-7465 ; b) V. P. Boyarskiy et al., *Chem. - Eur. J.*, **2008**, (14), 1784-1792 ; c) V. N. Belov et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, (49), 3520-3523 ; d) S. W. Hell et al., *EP2253635 A1*, **2010** ; e) S. Hell et al., *WO2010124833 A1*, **2010** ; f) K. Kolmakov et al., *Chem. - Eur. J.*, **2010**, (16), 158-166 ; g) G. Y. Mitronova et al., *Chem. - Eur. J.*, **2010**, (16), 4477-4488 ; h) S. Hell et al., *US8580579B2*, **2013** ; i) K. Kolmakov et al., *Chem. - Eur. J.*, **2014**, (20), 146-157 ; j) A. N. Butkevich et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 3290-3294.

²⁹ L. Möckl, D. C. Lamb et C. Bräuchle, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, (53), 13972-13977 ; S. W. Hell, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, (54), 8054-8066.

³⁰ Les valeurs peuvent varier selon les sources, celles exposées dans ce texte proviennent du groupe de L. D. Lavis : J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig et L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, (8), 1303-1310.

Les rosamines (souvent nommées, par excès de simplification, rhodamines (cas de la sulforhodamine B par exemple)) présentent des propriétés spectrales similaires et ont aussi été largement étudiées³¹, notamment par le groupe de Y.-T. Chang pour des applications en bioimagerie sur cellules vivantes³².

La présence du groupement phényle, qui n'est pas conjugué avec le cœur xanthylium du fait de la libre rotation autour de la liaison C-C en position 9, n'affecte pas les valeurs des maxima d'excitation / émission²⁷ par comparaison aux dérivés pyronine "parents" mais la présence d'un groupe lactonisant induit une dépendance de la fluorescence vis-à-vis du milieu (par exemple à la polarité du solvant). Dans tous les cas, c'est la structure non-spiranique et zwitterionique (pour la rhodamine) et anionique (pour la fluoescéine) qui est fluorescente. La forme spiranique interrompant la conjugaison du cœur xanthylium (du fait de l'hybridation sp³ du carbone 9) éteint la fluorescence. Pour la fluoescéine, le mécanisme et les produits de photo-blanchiment sont inconnus même si le passage par un état triplet est suspecté. Pour les rhodamines, après irradiation, la présence de produits N-désalkylés voire de dérivés rhodol suggère un mécanisme impliquant le radical hydroxyle HO[•]³³. Concernant les rendements quantiques de ces molécules, quelques publications les ont recensés.^{6,9,34}

Les mécanismes de transfert d'énergie au sein de ces dérivés "triphénylméthane" et leur influence sur les rendements quantiques ainsi que sur les durées de vie de fluorescence ne sont pas parfaitement établis. Ils seraient fortement dépendants de la structure considérée. Il semblerait tout de même que le TICT prenne une part importante dans les mécanismes de désexcitation non-radiative au sein des rhodamines^{34,35}. Le groupe de L. D. Lavis privilégie ce mécanisme, qu'il met en évidence en faisant varier le type de substituant alkyle de l'atome d'azote des positions 3 et 6 et en comparant les rendements quantiques de fluorescence des composés obtenus. Le but de ces travaux était d'identifier le substituant optimal permettant d'obtenir les fluorophores les plus brillants. Ainsi, le motif azétidine a été sélectionné et son introduction au sein de structure d'anilines fluorescentes (dérivés de 7-aminocoumarine et 4-amino-1,8-naphtalimide) a permis d'augmenter de façon significative leurs rendements quantiques³⁶. Cela trouve une résonance avec les travaux sur les rosamines du groupe de K. Burgess³⁷ qui montrent l'influence du cycle pyrrolidine en positions 3 et 6 sur l'augmentation du rendement quantique de fluorescence. Ce cycle minimiserait le phénomène d'inversion de l'atome d'azote à l'état excité et donc diminuerait les processus de désexcitation non-radiative. Les auteurs notent également que le rendement quantique de fluorescence diminue avec la polarité du solvant (caractéristique des états TICT) pour les dérivés porteurs de cycles pipéridine contrairement aux analogues pyrrolidine. Ils précisent que de nombreuses rosamines ne sont pas sujettes à cette chute de rendement quantique de fluorescence en solvant polaire et donnent l'exemple de la tétraméthylrosamine qui possède un rendement quantique de 84% dans le méthanol.

³¹ Pour des exemples, voir : a) S. Iyoshi, M. Taki et Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.*, **2008**, (47), 3946-3948 ; b) G. A. Kraus, T. Guney, A. Kempema, J. M. Hyman et B. Parvin, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, (55), 1549-1551 ; c) S. H. Lim, L. Wu, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess et H. B. Lee, *PLoS One*, **2014**, (9), e82934 ; d) L.-P. Wu, M. Ficker, S. L. Mejlsoe, A. Hall, V. Paolucci, J. B. Christensen, P. N. Trohopoulos et S. M. Moghimi, *J. Control. Release*, **2017**, (246), 88-97.

³² Pour des exemples, voir : a) Y.-H. Ahn, J.-S. Lee et Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, (129), 4510-4511 ; b) Y.-T. Chang, Y.-H. Ahn, Y. K. Kim, B. Wagner, H. A. Carrinski, P. Clemons et S. Schreiber, *US20090227467 A1*, **2009** ; c) C.-N. Im, N.-Y. Kang, H.-H. Ha, X. Bi, J. J. Lee, S.-J. Park, S. Y. Lee, M. Vendrell, Y. K. Kim, J.-S. Lee, J. Li, Y.-H. Ahn, B. Feng, H.-H. Ng, S.-W. Yun et Y.-T. Chang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, (49), 7497-7500.

Dans une autre étude, le groupe de B. R. Peterson³⁸ montre que la substitution du CO₂H du *meso*-phényle par un méthyle induit un léger effet bathochrome sur les maxima d'absorption et d'émission d'environ 10 nm et une diminution du rendement quantique de fluorescence qui est de 30% dans le MeOH. Dans un autre travail³⁹, le groupe de D. Magde rapporte quelques valeurs de rendements quantiques de fluorescence pour la fluorescéine dianionique pour laquelle la polarité joue un rôle, mais les auteurs insistent sur l'importance des liaisons hydrogènes sur les processus non-radiatifs et le rôle du pKa de l'espèce considéré. Dans cette même étude, les auteurs relient la durée de vie de fluorescence à la nature du xanthène et montrent que si certains ne sont pas influencés par le solvant (c'est le cas pour les rhodamines 101 et 6G), d'autres comme la rhodamine B le sont.

L'étude de J. Karpiuk⁴⁰ montre aussi que la rhodamine 101 ne présente pas de baisse de rendement quantique de fluorescence dans l'éthanol, ce qui est attendu si on considère que le phénomène de TICT est empêché par les motifs julolidine (inversion de l'atome d'azote bloquée). Sur ce type de molécules, c'est la transition vers l'état triplet qui va être l'origine des processus non-radiatifs. Or les solvants polaires augmentent la stabilité du zwitterion, diminuant la transition vers l'état triplet et entraînent donc une moindre inhibition de la fluorescence. Ainsi de nombreux xanthènes ne semblent pas posséder ce transfert de charge intramoléculaire de torsion, à moins que ce mécanisme ne soit pas le seul^{11,21,41} à mettre en avant pour interpréter les processus non-radiatifs mis en jeu.

D'autres théories qui peuvent inclure le TICT (comme le transfert de charge biradicalaire (BCT)⁴²) ou ne pas l'inclure (ULM ou CS¹¹) sont alors mises en avant pour expliquer les processus photophysiques à l'œuvre au sein des structures xanthène étudiées. Ce type de considération pour la brillance et le photo-blanchiment sont à prendre en compte pour la microscopie super-résolutive car les intensités d'excitation appliquées sont plus importantes qu'en microscopie classique et peuvent mettre à mal les propriétés photophysiques des xanthènes pourtant supérieures à celles d'autres familles de fluorophores (coumarines et cyanines par exemple).

En dépit d'une bonne stabilité (physico)chimique et des valeurs de brillance élevées notamment en milieu aqueux, un nombre limité de ces xanthènes "conventionnels" présentent des maxima d'excitation / émission au-delà de 650 nm. Ceci constitue un frein à leur utilisation dans des milieux biologiques complexes, en particulier pour des applications en imagerie moléculaire *in vivo*. Afin de surmonter cette difficulté majeure, deux stratégies ont été explorées pour obtenir des dérivés xanthène possédant des caractéristiques photophysiques dans la gamme spectrale du rouge lointain ou du proche-IR.

³³ a) Q. Zheng et L. D. Lavis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, (39), 32-38 ; b) N. Kuznetsova, O. Kaliya et E. Luk'yanets, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **1995**, (2619), 161-165 ; c) C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler et C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.*, **1998**, (70), 2651-2659.

³⁴ M. Vogel, W. Rettig, R. Sens et K. H. Drexhage, *Chem. Phys. Lett.*, **1988**, (147), 452-460.

³⁵ a) T. Lopez Arbeloa, F. Lopez Arbeloa, P. Hernandez Bartolome et I. Lopez Arbeloa, *Chem. Phys.*, **1992**, (160), 123-130 ; b) T. L. Chang et H. C. Cheung, *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, (173), 343-348.

³⁶ J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet et L. D. Lavis, *Nat. Methods*, **2015**, (12), 244-250.

³⁷ L. Wu et K. Burgess, *J. Org. Chem.*, **2008**, (73), 8711-8718.

³⁸ L. F. Mottram, S. Forbes, B. D. Ackley et B. R. Peterson, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, (8), 2156-2165.

³⁹ D. Magde, G. E. Rojas et P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, (70), 737-744.

⁴⁰ J. Karpiuk, Z. R. Grabowski et F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem.*, **1994**, (98), 3247-3256.

⁴¹ F. Lopez Arbeloa, T. Lopez Arbeloa, M. J. Tapia Estevez et I. Lopez Arbeloa, *J. Phys. Chem.*, **1991**, (95), 2203-2208.

⁴² M. Vogel, W. Rettig, R. Sens et K. H. Drexhage, *Chem. Phys. Lett.*, **1988**, (147), 461-465.

La première consiste à étendre la conjugaison du système π (comme cela est couramment réalisé avec les benzocoumarines⁴³ ou les cyanines⁴⁴) pour induire un déplacement bathochrome significatif des maxima d'absorption / émission. En 1990, un brevet⁴⁵ est déposé par le groupe de R. P. Haugland (fondateur de la société Molecular Probes aujourd'hui propriété du groupe Thermo-Fisher Scientific) suivi en 1991 par une publication⁴⁶ qui ouvre la voie à la famille des seminaphthorhodafluors (SNARF, famille de rhodols et fluoescéines à conjugaison étendue, Fig. II.4). Une extension de la conjugaison des rhodamines a également été explorée par ce même groupe et ces travaux sont décrits dans deux brevets et une publication⁴⁷ qui rassemblent un nombre conséquent de composés dont certains sont actuellement commercialisés sous le nom "Alexa Fluor[®] dyes" (10 composés allant de l'Alexa Fluor[®] 488 à l'Alexa Fluor[®] 633 mais qui ne permettent pas de couvrir la fenêtre thérapeutique 650-900 nm).

La même stratégie est reprise par le groupe de K. Burgess pour obtenir des rosamines bromées présentant un effet bathochrome des maxima d'absorption et d'émission d'environ 40 nm par rapport aux composés parents⁴⁸. Ce résultat se confirme également à la lumière des travaux du groupe de S. W. Hell⁴⁹ (Fig. II.5A). Ainsi, au cours du temps, différents travaux ont vu le jour, visant à améliorer les synthèses⁵⁰ et permettre des fonctionnalisations (notamment pour optimiser les propriétés physico-chimiques)⁵¹ requises pour des applications spécifiques comme la détection de divers analytes (e.g., sondes fluorogéniques pour la détection du cation Hg(II) ou du NO, Fig. II.5.B) et la mise au point d'agents de contraste fluorescents pour des utilisations en imagerie moléculaire *in vivo*.

⁴³ Pour une revue, voir : M. Tasiar, D. Kim, S. Singha, M. Krzeszewski, K. H. Ahn et D. T. Gryko, *J. Mater. Chem. C*, **2015**, (3), 1421-1446.

⁴⁴ B. Ballou, L. A. Ernst et A. S. Waggoner, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, (12), 795-805.

⁴⁵ R. P. Haugland et J. Whitaker, *US4945171A*, **1990**.

⁴⁶ J. E. Whitaker, R. P. Haugland et F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.*, **1991**, (194), 330-344.

⁴⁷ a) F. Mao, W.-Y. Leung et R. P. Haugland, *WO9915517 A1*, **1999** ; b) Z. Diwu, J. Liu, R. P. Haugland et K. R. Gee, *WO2002012195 A1*, **2002** ; c) J. Liu, Z. Diwu, W.-Y. Leung, Y. Lu, B. Patch et R. P. Haugland, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, (44), 4355-4359.

⁴⁸ G.-S. Jiao, J. C. Castro, L. H. Thoresen et K. Burgess, *Org. Lett.*, **2003**, (5), 3675-3677.

⁴⁹ V. N. Belov, M. L. Bossi, J. Foelling, V. P. Boyarskiy et S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.*, **2009**, (15), 10762-10776.

⁵⁰ a) E. David, J. Lejeune, S. Pellet-Rostaing, J. Schulz, M. Lemaire, J. Chauvin et A. Deronzier, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, (49), 1860-1864 ; b) C. Richter, N. P. Ernsting et R. Mahrwald, *Synthesis*, **2016**, (48), 1217-1225.

⁵¹ Pour des exemples, voir : a) K. J. Buckler et R. D. Vaughan-Jones, *Pflugers Arch.*, **1990**, (417), 234-239 ; b) M. Sibrian-Vazquez, J. O. Escobedo, M. Lowry et R. M. Strongin, *Pure Appl. Chem.*, **2012**, (84), 2443-2456 ; c) Y.-J. Gong, X.-B. Zhang, G.-J. Mao, L. Su, H.-M. Meng, W. Tan, S. Feng et G. Zhang, *Chem. Sci.*, **2016**, (7), 2275-2285 ; d) Y. Zhao, Y. Ren, H. Li, T. Han, H. Chen et W. Guo, *Dyes Pigm.*, **2016**, (132), 255-261 ; e) L. Wang, C. W. Barth, M. Sibrian-Vazquez, J. O. Escobedo, M. Lowry, J. Muschler, H. Li, S. L. Gibbs et R. M. Strongin, *ACS Omega*, **2017**, (2), 154-163.

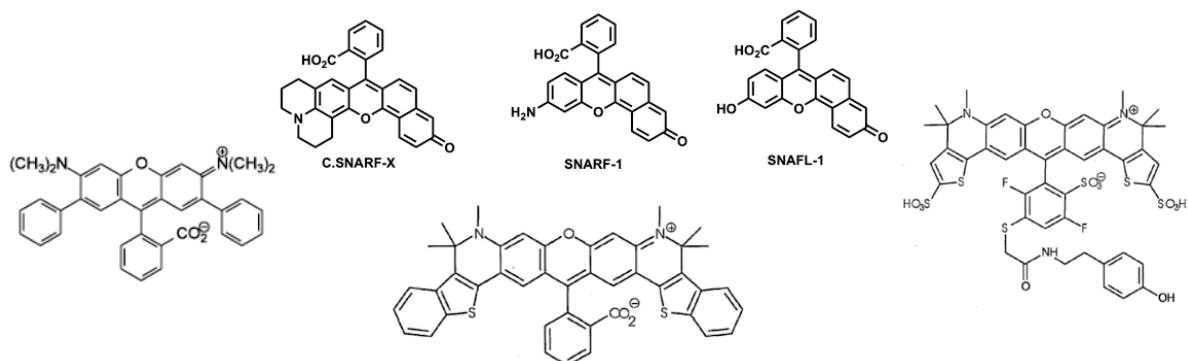


Figure II.3 - Exemples de xanthènes à conjugaison étendue, explorés par le groupe de R. P. Haugland, afin d'obtenir des fluorophores émettant dans le rouge lointain ou le proche-IR. Illustrations issues de la référence [47].

D'autres stratégies plus récentes reposent sur la fusion du cycle xanthène avec une seconde unité xanthène⁵², un motif aminobenzofurane⁵³ ou plus fréquemment une 7-*N,N*-dialkylaminocoumarine comme publié, de façon indépendante, par les groupes de P. Wang⁵⁴ et de N. Sekar⁵⁵ (Fig. II.5C). Ce dernier groupe a également synthétisé des architectures encore plus complexes en greffant l'unité coumarine⁵⁶ ou une / deux unité(s) rhodamine⁵⁷ sur la position 3/6 d'une rhodamine non-symétrique (Fig. II.5D).

Dans tous les cas, des maxima d'absorption / émission situés dans la fenêtre thérapeutique sont obtenus mais il est difficile d'appréhender le comportement de ces composés en milieu biologique car leur caractère très hydrophobe n'autorise pour le moment que des mesures spectrales en solvant organique. Des améliorations sont donc attendues pour augmenter leur solubilité en milieu aqueux. La méthodologie mise en œuvre pour les "Alexa Fluor® dyes", qui repose sur la sulfonation régiosélective de certaines positions du cœur xanthène et de groupements méthyle pseudo-benzyliques constitue une piste intéressante à explorer mais devra sans doute être combinée à d'autres stratégies (voir 0.3.3).

⁵² S. Kamino, M. Murakami, M. Tanioka, Y. Shirasaki, K. Watanabe, J. Horigome, Y. Ooyama et S. Enomoto, *Org. Lett.*, **2014**, (16), 258-261.

⁵³ G. Niu, W. Liu, J. Wu, B. Zhou, J. Chen, H. Zhang, J. Ge, Y. Wang, H. Xu et P. Wang, *J. Org. Chem.*, **2015**, (80), 3170-3175.

⁵⁴ a) J. Chen, W. Liu, B. Zhou, G. Niu, H. Zhang, J. Wu, Y. Wang, W. Ju et P. Wang, *J. Org. Chem.*, **2013**, (78), 6121-6130 ; b) Q. Li, W. Liu, J. Wu, B. Zhou, G. Niu, H. Zhang, J. Ge et P. Wang, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2016**, (164), 8-14 ; c) G. Niu, W. Liu, B. Zhou, H. Xiao, H. Zhang, J. Wu, J. Ge et P. Wang, *J. Org. Chem.*, **2016**, (81), 7393-7399.

⁵⁵ a) S. Kothavale, A. G. Jadhav et N. Sekar, *Dyes Pigm.*, **2017**, (137), 329-341 ; b) M. R. Shreykar et N. Sekar, *ChemistrySelect*, **2017**, (2), 1464-1478.

⁵⁶ S. Kothavale et N. Sekar, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 105387-105397.

⁵⁷ S. Kothavale et N. Sekar, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 100271-100280.

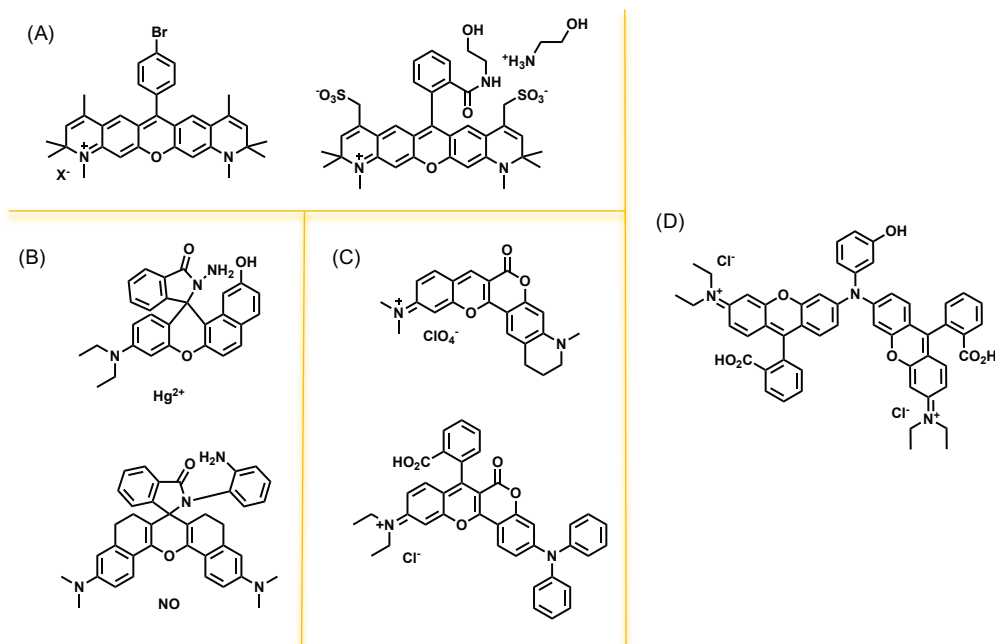


Figure II.4 - Autres exemples de xanthènes à conjugaison étendue. (A) Rhodamines / rosamines développées par d'autres groupes académiques et reposant sur une stratégie similaire à celle de Molecular Probes^{48,49}. (B) Exemple de sondes fluorogéniques construites à partir de xanthènes à conjugaison étendue^{51c,d}. (C) Exemples d'hybrides xanthène-coumarine^{54c,55a}. (D) Exemple d'une rhodamine substituée sur l'un de ses atomes d'azote par une seconde unité rhodamine⁵⁷.

La seconde stratégie repose sur la substitution de l'atome d'oxygène du cœur xanthène par un atome de carbone disubstitué ou plus fréquemment par un hétéroatome. Le principal avantage de cette approche par rapport à la précédente est de conserver une taille de molécule (et donc un caractère hydrophobe) raisonnable. Les premiers travaux dans ce sens sont l'œuvre du groupe de K. H. Drexhage qui s'est intéressé à la caractérisation photophysique des carbopyronines (les auteurs ont également synthétisé des carborhodamines) dans un brevet publié en 2000⁵⁸ puis dans un article paru en 2001 dans *Spectrochimica Acta Part A*⁵⁹. De façon intéressante, des maxima d'émission de fluorescence dans la gamme des 600-680nm sont observés. Notons que ce type de composés ainsi que leur aptitude à émettre de la fluorescence avaient été observés dès 1963 par le groupe de C. C. Barker⁶⁰ mais que ces résultats étaient restés à l'état de curiosité de laboratoire.

⁵⁸ K.-H. Drexhage, J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos et A. Zilles, *WO2000064986 A1*, **2000**.

⁵⁹ J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, N. U. Kemnitzer, A. Zilles et K. H. Drexhage, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2001**, (57A), 2271-2283.

⁶⁰ C. Aaron et C. C. Barker, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 2655-2662.

A partir du milieu des années 2000, le groupe de M. R. Detty s'intéresse aux rhodamines soufrées et séléniées dans le but de développer de nouveaux photosensibilisateurs de type II pour des applications en PDT⁶¹. Puis en 2008, le groupe de Y. Xiao publie une communication décrivant la première pyronine silylée (nommée 2,7-*N,N,N',N'*-tétraméthyl-9-diméthyl-10-hydro-9-silaanthracène (TMDHS) et analogue de la pyronine Y) absorbant / émettant à 634 / 660 nm dans l'eau (QY = 18%)⁶². Ce travail novateur est très important car il a inspiré plusieurs groupes de recherche académique, notamment ceux de S. W. Hell⁶³ et T. Nagano, qui ont par la suite développé de nombreux dérivés hétéroxanthène et démontré leur potentiel dans des applications de bioimagerie. La majorité des composés développés au cours des sept dernières années⁶⁴ sont présentés Fig. II.6 (qui est issue de la revue récemment publiée par le groupe de K. Hanaoka^{64aj} ; notons que les xanthènes Te=O et Se n'apparaissent pas sur cette figure). Ce que l'on peut noter, c'est que les rendements quantiques de fluorescence sont toujours inférieurs à ceux des rhodamines parentes et n'excèdent pas 20% pour les molécules absorbant / émettant au-delà de 700 nm. La baisse du rendement quantique de fluorescence est classiquement observée avec les fluorophores organiques lorsque l'on se décale significativement vers le rouge lointain ou le proche-IR. Cependant, dans le cas présent, elle est aussi exacerbée par la présence d'un atome lourd au sein de la structure qui favorise le phénomène de croisement inter-système que nous avons déjà détaillé dans l'introduction générale de ce manuscrit. Cependant, ces valeurs restent tout à fait satisfaisantes et compatibles avec des applications en bioimagerie comme en témoignent les nombreux travaux déjà publiés.

Cette approche semble particulièrement pertinente pour appliquer le concept de synthèse *in situ* à des pyronines / rhodamines absorbant / émettant dans la fenêtre thérapeutique. En effet, il sera possible de conserver les réactions de déclenchement préalablement optimisées lors des expériences de synthèse *in situ* de cœurs xanthène qui fluorescent dans le visible (voir II.4.2).

⁶¹ M. R. Detty, P. N. Prasad, D. J. Donnelly, T. Ohulchanskyy, S. L. Gibson et R. Hilf, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, (12), 2537-2544.

⁶² M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao et Y. Xu, *Chem. Comm.*, **2008**, 1780-1782.

⁶³ K. Kolmakov, V. N. Belov, C. A. Wurm, B. Harke, M. Leutenegger, C. Eggeling et S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 3593-3610.

⁶⁴ a) T. Egawa *et al.*, *Chem. Comm.*, **2011**, (47), 4162-4164 ; b) Y. Koide *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, (6), 600-608 ; c) Y. Koide *et al.*, *Chem. Comm.*, **2012**, (48), 3091-3093 ; d) Y. Koide *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, (134), 5029-5031 ; e) T. Wang *et al.*, *Chem. Comm.*, **2012**, (48), 8781-8783 ; f) J. B. Grimm *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, (8), 1303-1310 ; g) J. Fernandez-Lodeiro *et al.*, *Dyes Pigm.*, **2014**, (110), 28-48 ; h) J. E. Hill *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, (57), 8622-8634 ; i) E. Kim *et al.*, *Chem. Comm.*, **2014**, (50), 4504-4507 ; j) M. W. Kryman *et al.*, *Organometallics*, **2014**, (33), 2628-2640 ; k) S. T. Manjare *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, (47), 2985-2998 ; l) T. Pastierik *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2014**, (79), 3374-3382 ; m) P. Shieh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2014**, (111), 5456-5461 ; n) S.-N. Uno *et al.*, *Nat. Chem.*, **2014**, (6), 681-689 ; o) B. Wang *et al.*, *Chem. Comm.*, **2014**, (50), 14374-14377 ; p) X. Chai *et al.*, *Chem. - Eur. J.*, **2015**, (21), 16754-16758 ; q) D. S. Conceicao *et al.*, *Tetrahedron*, **2015**, (71), 967-976 ; r) P. Horvath *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2015**, (80), 1299-1311 ; s) K. Kolmakov *et al.*, *Chem. - Eur. J.*, **2015**, (21), 13344-13356 ; t) Y. Kushida *et al.*, *Analyst*, **2015**, (140), 685-695 ; u) T. Myochin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, (137), 4759-4765 ; v) S. Panda *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, (300), 86-100 ; w) K. S. Davies *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, (24), 3908-3917 ; x) A. Fukazawa, *et al.*, *Chem. Comm.*, **2016**, (52), 1120-1123 ; y) J. B. Grimm *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 1723-1727 ; z) M. W. Kryman *et al.*, *Organometallics*, **2016**, (35), 1944-1955 ; aa) M. W. Kryman *et al.*, *Langmuir*, **2016**, (32), 1521-1532 ; ab) J. Liu *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, (8), 22953-22962 ; ac) Z. A. McIver *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, (24), 3918-3931 ; ad) H. Nie *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, **2016**, (4), 4826-4831 ; ae) H. Nie *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, (8), 8991-8997 ; af) X. Zhou *et al.*, *Chem. Comm.*, **2016**, (52), 12290-12293 ; ag) P. Zhou *et al.*, *ChemPhysChem*, **2016**, (17), 3139-3145 ; ah) A. N. Butkevich *et al.*, *Chem. - Eur. J.*, **2017**, sous presse, DOI: 10.1002/chem.201701216 ; ai) J. B. Grimm *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **2017**, sous presse, DOI: 10.1021/acscentsci.1027b00247 ; aj) T. Ikeno *et al.*, *Chem. - Asian J.*, **2017**, (12), 1435-1446 .

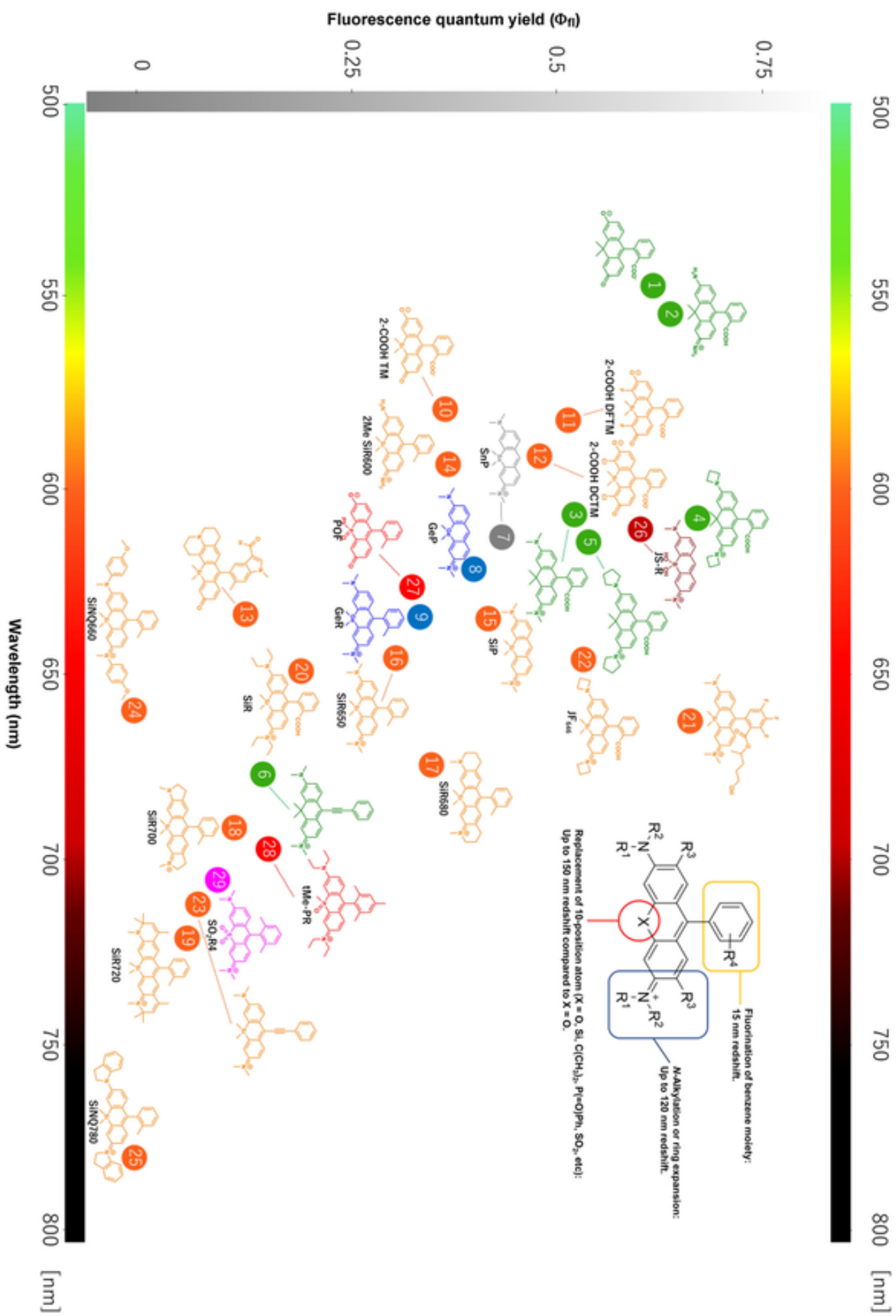


Figure II.5 - Représentation des différentes xanthenes O-substitués suivant leurs maxima d'absorption et leurs rendements quantiques de fluorescence. Le nombre indique précisément où se trouve le fluorophore sur le schéma. Les couleurs indiquent l'élément qui substitue l'oxygène pour le xanthène représenté ; ainsi, nous avons $C(CH_3)_2$ en vert ; $Si(CH_3)_2$ en orange ; $Ge(CH_3)_2$ en bleu ; $Sn(CH_3)_2$ en gris ; $B(OH)_2$ en marron ; $P(=O)Ph$ et $P(=O)CH_3$ en rouge ; SO_2 en rose. Illustration issue de la revue [64a].

II.1.2. Sondes fluorogéniques à cœur xanthène et méthodes conventionnelles de déclenchement

Si les fluorophores de type xanthène ont déjà fait leurs preuves en tant que réactifs de marquage covalent de biomolécules (principalement, les protéines et les acides nucléiques⁶⁵) et comme sonde pour le marquage non-covalent d'organites / organites cellulaires⁶⁶, la grande variabilité structurale offerte par ces molécules a permis d'envisager de nouvelles applications bioanalytiques qui mettent en jeu des sondes fluorogéniques de type "Off-On" ou ratiométriques, sensibles et / ou réactives vis-à-vis d'un large éventail d'analytes incluant notamment divers biomarqueurs de pathologies (enzymes par exemple) et des polluants chimiques.

Pour les convertir en chemosenseurs ou chemodosimètres fluorescents, les xanthènes peuvent être modifiés sur une ou plusieurs positions dans le but d'éteindre temporairement leur fluorescence, par exemple *via* la modulation des phénomènes d'ICT ou de PET (voir Fig. II.7-10 pour des exemples).

Parmi les principales modifications des pyronines, on peut mentionner les substitutions des groupements amino des positions 3 et 6 qui jouent souvent le rôle d'interrupteur de fluorescence, exploitant le même phénomène que celui déjà mis en oeuvre avec les sondes fluorogéniques à cœur 7-NH₂ / 7-OH coumarine, détaillées dans le chapitre I. Les ajouts de motifs réactifs vis-à-vis de l'analyte sur les positions 4 et 5 ou les substitutions de la position 9 sont aussi des manières courantes d'obtenir des pro-fluorophores.

En ce qui concerne les xanthènes porteurs d'un substituant aryle en position 9, des modifications chimiques sur le cycle aromatique lui-même ou sur le motif spiro-lactonisant (dans le cas des rhodamines et des fluorescéines) sont souvent envisagées pour moduler les propriétés de fluorescence et permettre la détection de l'analyte ciblé. Pour obtenir plus de détails sur les mécanismes d'activation et avoir une idée plus précise des applications de ces sondes fluorogéniques en (bio)détection, de nombreuses revues très complètes sont disponibles. On peut citer celle de M. Beija *et al.*⁶⁷ sur les rhodamines, celles de L. D. Lavis⁶⁸ et de H. Zheng *et al.*⁶⁹ sur les rhodamines / fluorescéines, celle de H. Moon *et al.*⁷⁰ qui concerne les réactions d'ouverture des dérivés hydrazide / hydroxamate cycliques de rhodamines, celle de X. Chen *et al.*^{2b} sur l'ouverture du spiro-lactame des xanthènes et celle de W. Shi *et al.*⁷¹ sur les sondes fluorogéniques à système π -conjugué modulable.

La revue de R. Zhang *et al.*⁷² est également à mentionner car elle met l'accent sur les sondes ratiométriques fondées sur des mécanismes de transfert d'énergie (FRET ou TBET (transfert d'énergie à travers les liaisons)) entre molécules fluorescentes dont l'un des partenaires est une rhodamine. En effet, les propriétés spectrales des xanthènes en font généralement de bons accepteurs pour ce type de constructions.

⁶⁵ Pour une revue sur le sujet, voir : M. S. T. Goncalves, *Chem. Rev.*, **2009**, (109), 190-212.

⁶⁶ Pour des revues sur le sujet, voir : a) W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang et L. Yuan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 13658-13699 ; b) S. Zhu, S. Yao, F. Wu, L. Jiang, K.-L. Wong, J. Zhou et K. Wang, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, (15), 5764-5771.

⁶⁷ M. Beija, C. A. M. Afonso et J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, (38), 2410-2433.

⁶⁸ L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, (86), 825-843.

⁶⁹ H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian et X.-J. Zhang, *Chem. Comm.*, **2013**, (49), 429-447.

⁷⁰ H. Moon, J. Park et J. Tae, *Chem. Rec.*, **2016**, (16), 124-140.

⁷¹ W. Shi et H. Ma, *Chem. Comm.*, **2012**, (48), 8732-8744.

⁷² R. Zhang, F. Yan, Y. Huang, D. Kong, Q. Ye, J. Xu et L. Chen, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 50732-50760.

Ainsi, les combinaisons fluorescéine-rhodamine, fluorophore-xanthène⁷³ ou xanthène-quencher font partie des couples les plus utilisés pour la conception de sondes FRET.

Quelques exemples de sondes dont le mécanisme d'activation est basé sur l'oxydation (induite par l'analyte ciblé) d'un motif dihydroxanthène^{68,74}, conduisant ainsi à la réaromatisation du système et à l'apparition du signal de fluorescence, sont également à signaler. Enfin, un autre exemple remarquable est la sonde FIAsh-EDT-2 du groupe de R. Tsien pour le marquage des protéines⁷⁵.

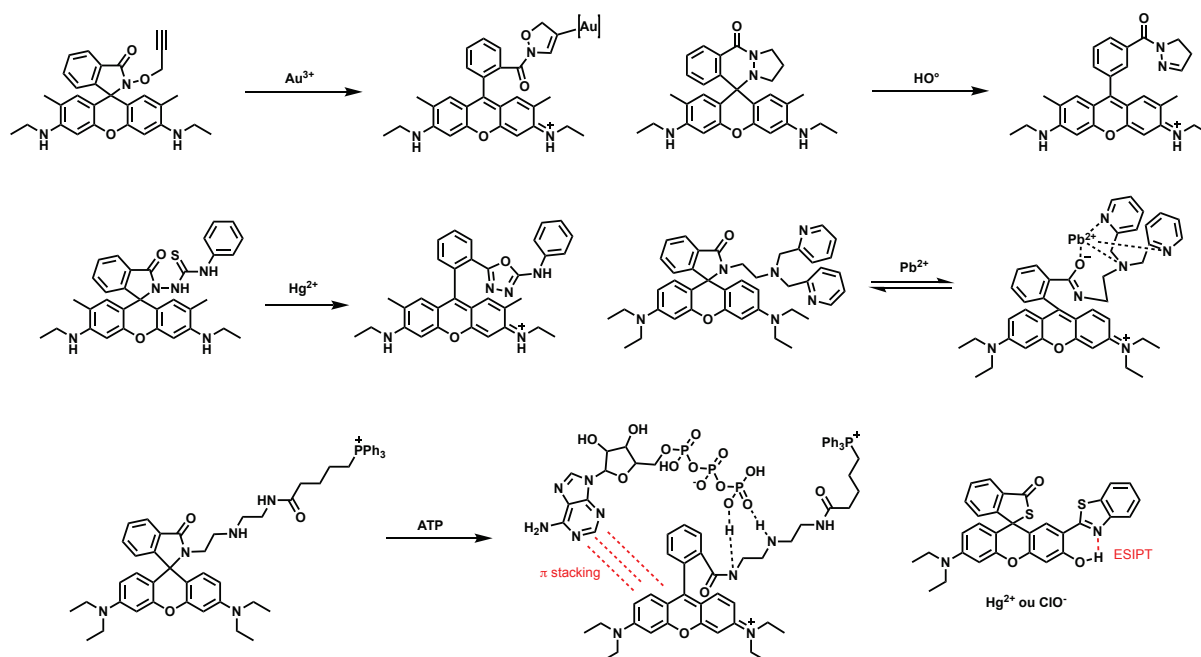


Figure II.6 - Exemples de sondes fluorogéniques basées sur un cœur rhodamine et dont l'activation met en jeu une réaction d'ouverture d'un cycle de type spirolactame. (haut à gauche) Détection du cation Au(III)⁷⁶ ; (haut à droite) Détection du radical hydroxyle HO⁷⁷ ; (milieu à gauche) Détection du cation Hg(II)⁷⁸ ; (milieu à droite) Détection du cation Pb(II)⁷⁹ ; (bas à gauche) Détection de l'ATP⁸⁰ ; (bas à droite) Sonde ratiométrique pour la détection du cation Hg(II); cette sonde est aussi capable de détecter l'anion ClO⁻⁸¹.

⁷³ Le fluorophore (donneur) complémentaire du xanthène peut être un dérivé de coumarine, de 1,8-naphthalimide ou autre.

⁷⁴ a) J. E. Whitaker, P. L. Moore, R. P. Haugland et R. P. Haugland, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1991**, (175), 387-393 ; b) C. S. Chen et K. R. Gee, *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, (28), 1266-1278 ; c) W. Lin, L. Long, B. Chen, W. Tan et W. Gao, *Chem. Comm.*, **2010**, (46), 1311-1313.

⁷⁵ Pour la publication princeps, voir : a) B. A. Griffin, S. R. Adams et R. Y. Tsien, *Science*, **1998**, (281), 269-272 et pour une review recensant des fluorophores possédant un groupement arsenic, voir : b) N. Soh, *Sensors*, **2008**, (8), 1004-1024.

⁷⁶ Y.-K. Yang, S. Lee et J. Tae, *Org. Lett.*, **2009**, (11), 5610-5613.

⁷⁷ M. Kim, S.-K. Ko, H. Kim, I. Shin et J. Tae, *Chem. Comm.*, **2013**, (49), 7959-7961.

⁷⁸ S.-K. Ko, Y.-K. Yang, J. Tae et I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, (128), 14150-14155.

⁷⁹ J. Y. Kwon, Y. J. Jang, Y. J. Lee, K. M. Kim, M. S. Seo, W. Nam et J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, (127), 10107-10111.

⁸⁰ K.-Y. Tan, C.-Y. Li, Y.-F. Li, J. Fei, B. Yang, Y.-J. Fu et F. Li, *Anal. Chem.*, **2017**, (89), 1749-1756.

⁸¹ A. Manna, D. Sarkar, S. Goswami, C. K. Quah et H.-K. Fun, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 57417-57423.

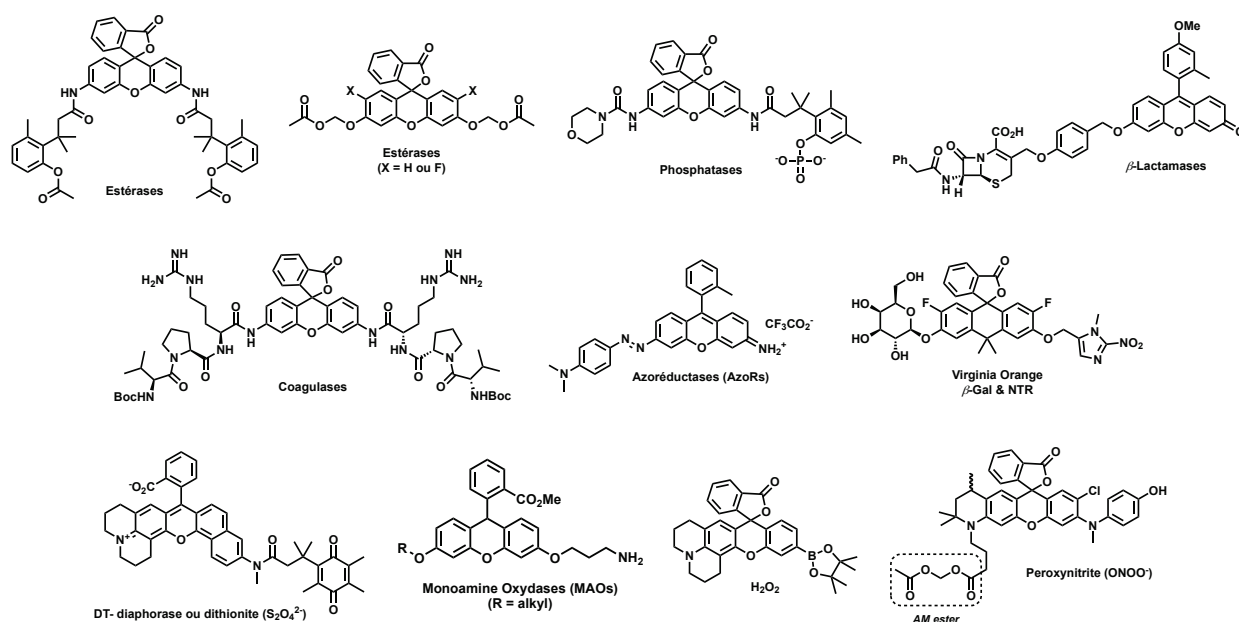


Figure II.7 - Exemples de sondes fluorogéniques dont l'activation met en jeu la déprotection des groupements amino ou hydroxyle situés en position(s) 3 et / ou 6 du xanthène. (haut à gauche) Sonde à estérases⁸² ; (haut, deuxième en partant de la gauche) Sonde à estérase⁸³ ; (haut, troisième en partant de la gauche) Sonde à phosphatases⁸⁴ ; (haut à droite) Sonde à β-lactamases⁸⁵ ; (milieu à gauche) Sonde décrite pour mesurer l'activité des coagulases⁸⁶ ; (milieu au centre) Sonde à AzoRs⁸⁷ ; (milieu à droite) Sonde duale pour la détection simultanée des activités β-Gal et NTR⁸⁸ ; (bas à gauche) Sonde à DT-diaphorase dérivée d'un xanthène qui n'est pas sensible à la réduction par le co-facteur de cette enzyme (NADH)⁸⁹ ; (bas, deuxième en partant de la gauche) Sonde à MAO⁹⁰ ; (bas, troisième en partant de la gauche) Sonde à H₂O₂⁹¹ ; (bas à droite) Sonde à peroxy-nitrite⁹².

⁸² S. S. Chandran, K. A. Dickson et R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, (127), 1652-1653.

⁸³ L. D. Lavis, T.-Y. Chao et R. T. Raines, *Chem. Sci.*, **2011**, (2), 521-530.

⁸⁴ M. N. Levine et R. T. Raines, *Anal. Biochem.*, **2011**, (418), 247-252.

⁸⁵ Y. Chen, Y. Xianyu, J. Wu, W. Zheng, J. Rao et X. Jiang, *Anal. Chem.*, **2016**, (88), 5605-5609.

⁸⁶ A. Sinclair, M. Fielder et A. Le Gresley, *WO2014013272 A1*, **2014**.

⁸⁷ N. Shin, K. Hanaoka, W. Piao, T. Miyakawa, T. Fujisawa, S. Takeuchi, S. Takahashi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, M. Tanokura, T. Nagano et Y. Urano, *ACS Chem. Biol.*, **2017**, (12), 558-563.

⁸⁸ J. B. Grimm, T. D. Gruber, G. Ortiz, T. A. Brown et L. D. Lavis, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, (27), 474-480.

⁸⁹ Q. A. Best, A. E. Johnson, B. Prasai, A. Rouillere et R. L. McCarley, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, (11), 231-240.

⁹⁰ X. Li, H. Zhang, Y. Xie, Y. Hu, H. Sun et Q. Zhu, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, (12), 2033-2036.

⁹¹ B. C. Dickinson, C. Huynh et C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, (132), 5906-5915.

⁹² T. Peng, X. Chen, L. Gao, T. Zhang, W. Wang, J. Shen et D. Yang, *Chem. Sci.*, **2016**, (7), 5407-5413.

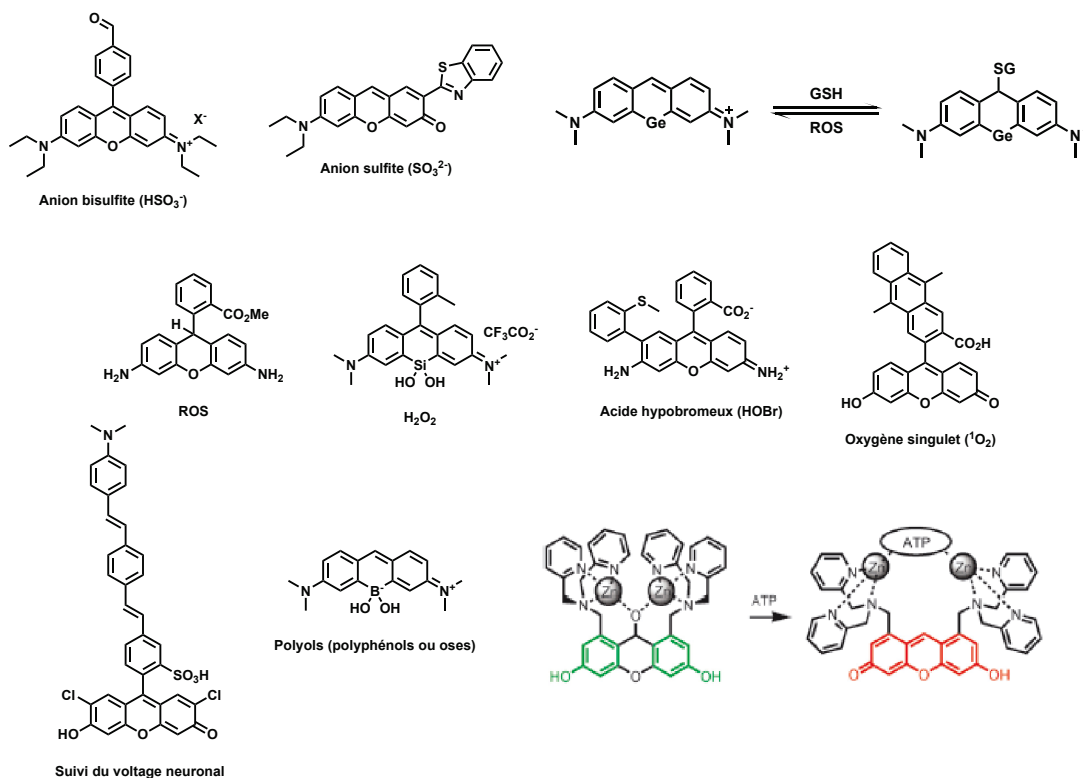


Figure II.8 - Exemples de sondes fluorogéniques à cœur xanthène, dont l'activation repose sur d'autres mécanismes que ceux développés précédemment. (haut à gauche) Sonde pour la détection de l'anion bisulfite⁹³ ; (haut au centre) Sonde ratiométrique pour la détection de l'anion sulfite⁹⁴ ; (haut à droite) Sonde rendant compte de l'état redox des cellules (équilibre ROS / glutathion)^{64ae} ; (milieu à gauche) Sonde sensible aux⁹⁵ ; (milieu, deuxième en partant de la gauche) Sonde à H₂O₂⁹⁶ ; (milieu, troisième en partant de la gauche) Sonde sensible à l'acide hypobromeux⁹⁷ ; (milieu à droite) Sonde pour la détection de l'oxygène singulet⁹⁸ ; (bas à gauche) Sonde permettant de suivre le potentiel d'action au sein des neurones et le potentiel électrochimique de membranes au sein d'un milieu biologique⁹⁹ ; (bas au centre) Sonde pour la détection des polyols¹⁰⁰ ; (bas à droite) Sonde pour la détection de l'ATP¹⁰¹ ; illustration issue de la revue [71].

⁹³ D. Zhang, W. Liu, K. Chen, J. Cheng, Y. Zhao et Y. Ye, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 103905-103909.

⁹⁴ L. Geng, X.-F. Yang, Y. Zhong, Z. Li et H. Li, *Dyes Pigm.*, **2015**, (120), 213-219.

⁹⁵ Y. Qin, M. Lu et X. Gong, *Cell Biol. Int.*, **2008**, (32), 224-228.

⁹⁶ X. Zhou, L. Lesiak, R. Lai, J. R. Beck, J. Zhao, C. G. Elowsky, H. Li et C. I. Stains, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, (56), 4197-4200.

⁹⁷ X. Liu, A. Zheng, D. Luan, X. Wang, F. Kong, L. Tong, K. Xu et B. Tang, *Anal. Chem.*, **2017**, (89), 1787-1792

⁹⁸ K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi et T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, (123), 2530-2536.

⁹⁹ E. W. Miller, J. Y. Lin, E. P. Frady, P. A. Steinbach, W. B. Kristan, Jr. et R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, (109), 2114-2119.

¹⁰⁰ N. Shimomura, Y. Egawa, R. Miki, T. Fujihara, Y. Ishimaru et T. Seki, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, (14), 10031-10036.

¹⁰¹ A. Ojida, I. Takashima, T. Kohira, H. Nonaka et I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, (130), 12095-12101.

II.1. Etat de l'art

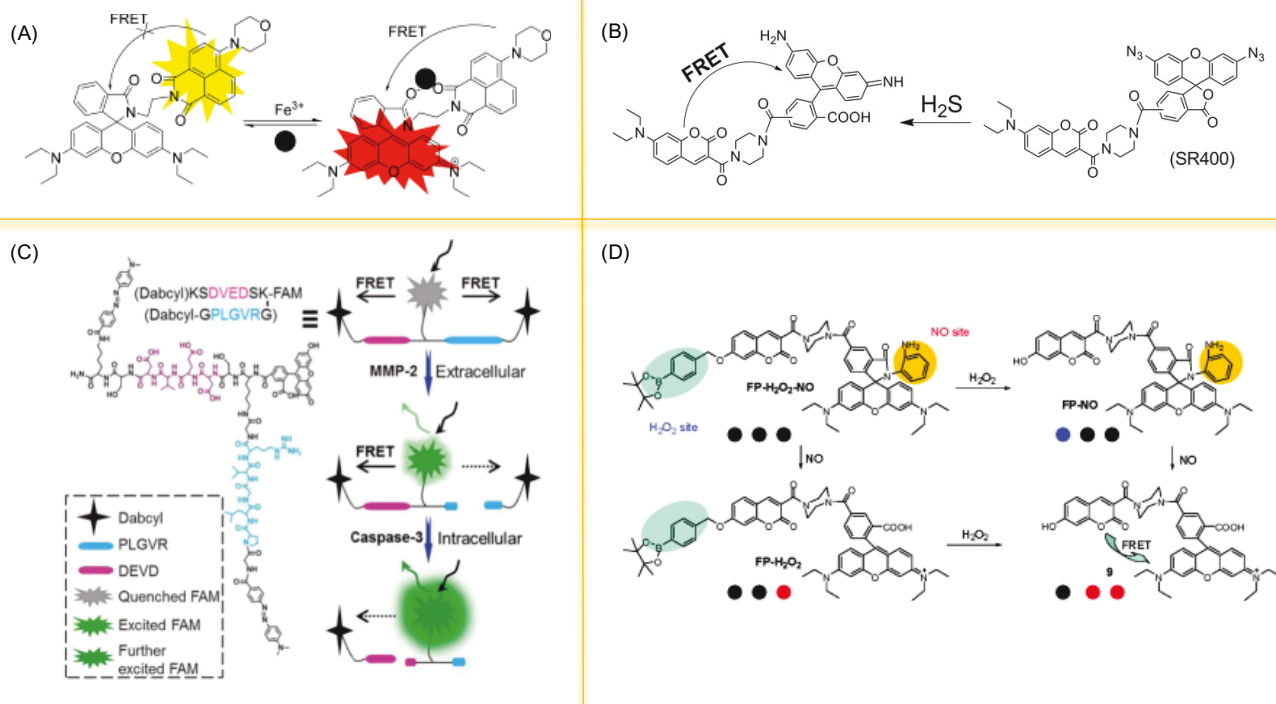


Figure II.9 - Exemples de sondes FRET possédant un fluorophore de type xanthène comme accepteur ou donneur. (A) Sonde pour la détection du cation Fe(III)¹⁰². (B) Sonde à thiols¹⁰³. (C) Sonde "dual-analytes" pour détecter la MMP-2 et la caspase-3¹⁰⁴. (D) Sonde "dual-analytes" permettant de détecter NO et H₂O₂ de façon indépendante et simultanée¹⁰⁵. Illustrations issues des références [102], [103], [104] et [105].

¹⁰² C. Wang, Y. Liu, J. Cheng, J. Song, Y. Zhao et Y. Ye, *J. Lumin.*, **2015**, (157), 143-148.

¹⁰³ L. Wei, L. Yi, F. Song, C. Wei, B.-f. Wang et Z. Xi, *Sci. Rep.*, **2014**, (4), 4521.

¹⁰⁴ S.-Y. Li, L.-H. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu et X.-Z. Zhang, *Chem. Comm.*, **2015**, (51), 14520-14523.

¹⁰⁵ L. Yuan, W. Lin, Y. Xie, B. Chen et S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, (134), 1305-1315.

II.1.3. Formation in situ du cœur pyronine

Comme nous venons de le voir ci-dessus, la plupart des sondes fluorogéniques à cœur xanthène sont obtenues par modification chimique du fluorophore déjà formé. Elles ne répondent donc pas à notre cahier des charges. Le point de départ de notre réflexion a été les travaux prospectifs et remarquables du groupe de Y. Yang publiés en 2014 dans le *Journal of The American Chemical Society*¹⁰⁶ pour la détection *in vitro* du gaz sarin (et de ses analogues) et dans *Analytical Methods*¹⁰⁷ pour la détection dans des cellules vivantes HeLa du cation mercure Hg(II). Ces travaux mettent en lumière le principe de formation d'un cœur fluorescent par création de liaisons covalentes *in situ* (Fig. II.11 et II.12). Le groupe de Y. Yang a introduit le terme de "covalent assembly principle"¹⁰⁸ ou "covalent assembly dye" pour décrire ce type de processus fluorogénique non conventionnel. A notre connaissance, ces deux publications sont les deux seuls exemples de formation d'un cœur xanthène à partir d'un précurseur acyclique non-fluorescent et selon une réaction domino déclenchée par l'analyte que l'on souhaite détecter.

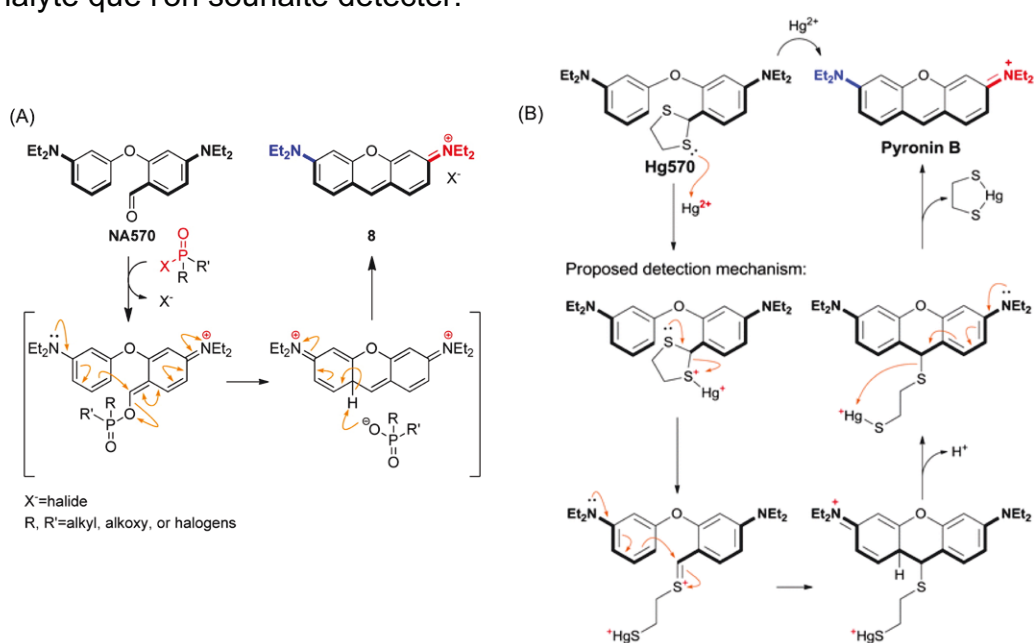


Figure II.10 - Mécanisme de formation in situ de la pyronine B proposé par le groupe de Y. Yang. (A) Sonde pour la détection in vitro du gaz sarin et ses analogues : la formation du cœur pyronine se fait par l'intermédiaire d'un carbonyle activé, en présence de l'analogue du gaz sarin (chlorure, bromure ou fluorure de phosphoryle) suivie d'une cyclisation-aromatisation avec départ de l'acide phosphorique (R = R' = OEt), phosphinique (R = R' = alkyle) ou dihalogénophosphoryle (R = R' = halogène). (B) Sonde pour la détection in cellulo du cation Hg(II) : le mécanisme s'apparente à une réaction de déprotection de dithiane suivi d'une attaque nucléophile par le cycle aromatique enrichi en électrons dû à l'effet donneur +M du groupement NEt₂, puis du départ d'un proton et du complexe de mercure pour obtenir le fluorophore. Illustrations issues des références [106] et [107].

¹⁰⁶ Z. Lei et Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, (136), 6594-6597.

¹⁰⁷ L. Song, Z. Lei, B. Zhang, Z. Xu, Z. Li et Y. Yang, *Anal. Meth.*, **2014**, (6), 7597-7600.

¹⁰⁸ Une revue (en chinois) sur le sujet : a) T. He, H. He, X. Luo, Y. Yang et Y. Yang, *Scient. Sin. Chim.*, **2017**, (47), 945-954 et un autre exemple récent : b) Z. Lei, Z. Zeng, X. Qian et Y. Yang, *Chin. Chem. Lett.*, **2017**, sous presse, doi: 10.1016/j.ccllet.2017.09.023.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces travaux. Ainsi, il semble que le carbonyle du précurseur **NA570** utilisé pour la détection du gaz sarin ne puisse pas donner lieu à une réaction de cyclisation spontanée du moins en milieu organique comme le chlorobenzène. L'atome de carbone (qui sera la future position 9 du cœur xanthène formé) doit être suffisamment déficient en électrons afin de subir l'attaque nucléophile intramoléculaire du cycle aromatique adjacent. Ce phényle est choisi de façon à pouvoir favoriser cette attaque nucléophile, ainsi le groupe électro-donneur NEt_2 en position *para* est parfaitement adapté pour ce type de réactions car il augmente la densité électronique du cycle benzénique (stratégie identique à ce qui est généralement mis en œuvre avec les réactions de Friedel-Crafts ou de Vilsmeier-Haack).

Concernant les travaux avec la sonde **Hg570**, un point important mérite d'être souligné. Lors de la déprotection du motif 1,3-dithiane par le cation Hg(II) , l'attaque nucléophile du phényle adjacent prévaut sur la réaction de l'eau. Ainsi, au lieu d'aboutir à un mécanisme classique qui conduit à l'hydrolyse du motif 1,3-dithiane en carbonyle, la formation d'un cycle stabilisé à six chaînons et le processus de ré-aromatisation constituent les forces motrices de la réaction. Un autre point est l'absence totale de fluorescence résiduelle des précurseurs de départ **NA570** et **Hg570** ; ceci met en lumière le bénéfice que l'on peut tirer en travaillant avec des sondes qui ne sont pas des fluorophores "cagés", notamment pour augmenter le rapport signal / bruit lors des tests de diagnostic *in vitro* ou des expériences de bioimagerie *in cellulo* ou *in vivo*.

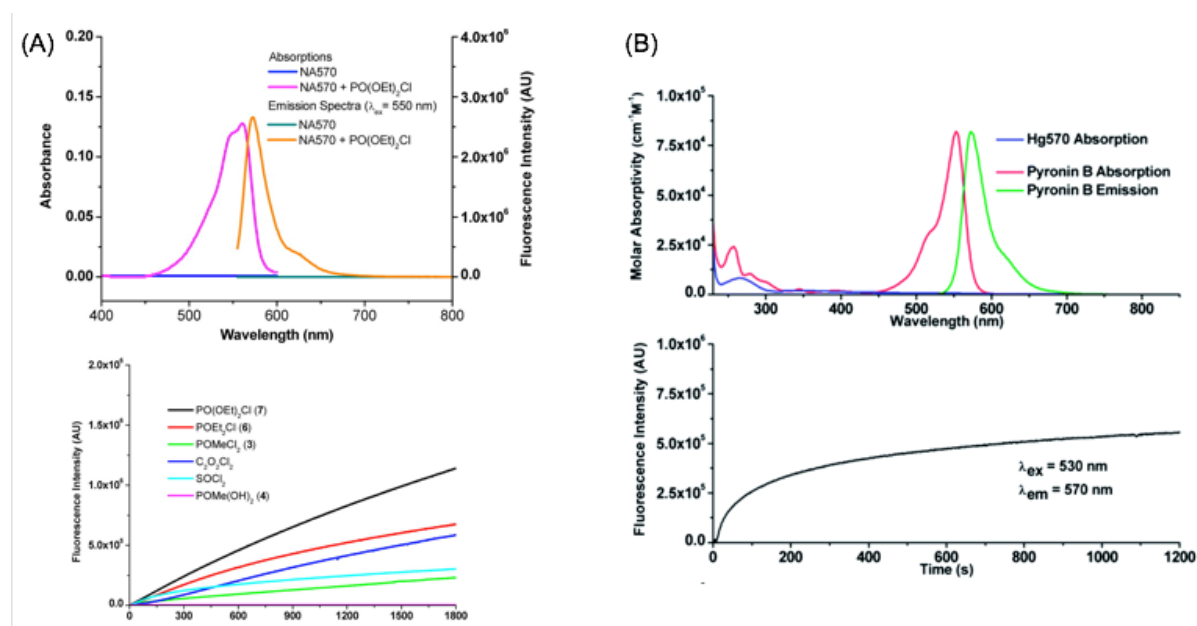


Figure II.11 - Propriétés spectrales des sondes et de la pyronine B formée. (A) (haut) Spectres d'absorption / émission (excitation à 550 nm) de la sonde NA570 (bleu et vert respectivement) et de la pyronine B (respectivement, rose et orange) enregistrés dans le chlorobenzène ; (bas) Suivi de la cinétique de formation de la pyronine B à partir de NA570 (50 μM) et de divers analogues (1 équiv.) du gaz sarin dans le chlorobenzène (excitation à 563 nm et émission enregistrée à 573 nm). (B) (haut) Spectres d'absorption de la sonde Hg570 (bleu) et spectres d'absorption / émission (excitation à 530 nm) de la pyronine B (respectivement, rose et vert) enregistrés dans le tampon HEPES + 5% DMSO (10 mM, pH = 7,4) ; (bas) Suivi de la cinétique de formation de la pyronine B à partir de Hg570 après addition de 0,5 équivalent de Hg(II) dans une solution à 10 μM de sonde dans le tampon HEPES + 5% DMSO (10 mM, pH = 7,4). Illustrations issues des références [106] et [107].

A partir de ces deux publications, plusieurs hypothèses en faveur de la stratégie que nous souhaitons explorer, ont pu être formulées. Premièrement, si le groupement amino du cycle benzénique impliqué dans la réaction de cyclisation est engagé dans une liaison amide ou carbamate, son caractère électro-donneur sera fortement réduit et la formation du cœur xanthène ne pourra avoir lieu. Cela peut permettre de conceptualiser une sonde fluorescente activable qui mettra en jeu (en première étape) un processus de déprotection d'aniline (voire de phénol) induit par l'analyte à détecter, et agissant comme un déclencheur pour le processus domino à l'origine de la formation du cœur pyronine. Cependant, le motif xanthène sera absent de la structure du pro-fluorophore et sera remplacé par un motif éther de diaryle portant un atome de carbone électrophile sur l'une des positions *ortho* par rapport au lien éther.

De cette hypothèse, on peut revendiquer un premier avantage de notre stratégie à savoir qu'elle devrait être facilement applicable à un large éventail d'analytes, en modifiant uniquement la nature du motif utilisé pour masquer l'aniline (ou le phénol) du précurseur de type éther de diaryle. A l'inverse, la stratégie mise en œuvre pour la sonde **Hg570**, et fondée sur l'activation du carbonyle / dithiane, ne peut être appliquée qu'à la détection des cations métalliques présentant un caractère acide de Lewis marqué.

Une seconde hypothèse concerne la cinétique de formation du cœur xanthène qui devrait être fortement dépendante des conditions utilisées pour le déclenchement de la sonde. Ainsi, la nature du solvant ou du milieu aqueux, la présence d'additifs, de sels ou d'analytes interférents, la température et la concentration en analyte à détecter pourront influencer ce processus de déclenchement non-usuel de fluorescence. Même si les deux processus d'activation décrits par le groupe de Y. Yang présentent des cinétiques tout à fait satisfaisantes (environ 15 minutes de suivi et une réponse qualitative obtenue en moins de deux minutes), cela peut être radicalement différent suivant l'analyte considéré et la nature de la matrice à analyser. En termes de cinétique d'activation, on peut aussi prévoir des vitesses de réaction différentes suivant la nature du substituant (et ses effets électroniques) situé en *para* du carbonyle voire sur d'autres positions du cycle benzénique (ce dernier aspect ne sera pas abordé dans ce manuscrit mais il convient de le garder à l'esprit pour de futures investigations notamment pour la conception de sondes duales).

Afin de valider ces hypothèses, nous avons envisagé la conception des premières sondes fluorogéniques permettant la détection d'une activité enzymatique de type peptidase (PGA ou LAP) *via* la formation *in situ* d'une pyronine non-symétrique. La préparation de ces sondes et l'étude détaillée de leur activation enzymatique à l'aide de différentes méthodes analytiques complémentaires (mesures de fluorescence, analyses HPLC-MS et HPLC-fluorescence) ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Organic and Biomolecular Chemistry*¹⁰⁹ qui servira de support à la discussion (sondes **SD209** et **SD304**, qui correspondent aux molécules 4 et 5 de l'article).

¹⁰⁹ S. Debieu et A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, (15), 2575-2584.

II.2. Détection d'une activité enzymatique basée sur la formation d'une pyronine

II.2.1. Article 2 : In situ formation of pyronin dyes for fluorescence protease sensing



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 2575

Received 15th February 2017,
Accepted 28th February 2017

DOI: 10.1039/c7ob00370f

rsc.li/obc

In situ formation of pyronin dyes for fluorescence protease sensing†

Sylvain Debieu^a and Anthony Romieu^{*a,b}

We report a reaction-based strategy for the fluorogenic detection of protease activity. Based on the “covalent-assembly” probe design principle recently put forward by the Yang group for detection of Sarin related threats (*J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6594–6597), we have designed two unusual non-fluorescent caged precursors (mixed bis-aryl ethers) which are readily converted into a fluorescent unsymmetrical pyronin dye through a domino cyclisation–aromatisation reaction triggered by penicillin G acylase (PGA) or leucine aminopeptidase (LAP). Fluorescence-based *in vitro* assays and HPLC–fluorescence/–MS analyses support the claimed activation mechanism whose the further implementation to “smart” imaging agents for the study of protease function *in vivo* is expected.

Introduction

During the past decade, reaction-based small-molecule fluorescent probes (also known as fluorescent chemodosimeters, latent or pro-fluorophores) have been widely adopted as valuable (bio)analytical tools for the detection and/or imaging of various (bio)analytes including enzymes, biomolecules, polluting chemicals, cations and anions, in complex biological systems or environmental matrices.¹ The majority of these chemodosimeters are rationally constructed through the reversible protection of a key functional group of an organic-based fluorophore (typically, an amino or hydroxyl group of a coumarin or xanthene dye).² Despite its many successes, this approach may sometimes lead to unsatisfactory results in terms of selectivity and sensitivity toward the target analyte. This is the consequence of the poor stability of some pro-fluorophores in aq. biological media (some aniline- or phenol-based fluorophores are good leaving groups) and/or their high background fluorescence due to incomplete quenching of the masked fluorophore. In order to remedy these drawbacks, a novel class of reactive fluorescence “turn-on” probes based on the “covalent-assembly” principle has recently emerged. This approach is based on *in situ* formation of an organic-based fluorophore from a caged bifunctional precursor and through

effective (biocompatible) domino reactions, triggered by the target analyte.³ The analyte-mediated synthesis of blue-green emitting 7-*N,N*-dialkylamino/7-hydroxy (2-imino)coumarins is often preferred for *in vitro* (bio)sensing applications⁴ but was also implemented in photoaffinity labeling experiments.⁵ We have recently used this fluorogenic cyclisation reaction for designing dual-input fluorogenic probes (acting as AND molecular logic gates) dedicated to simultaneous detection of two distinct enzyme activities namely hydrolase and reductase.⁶ Furthermore, the Yang group has successfully applied the “covalent-assembly” principle to longer-wavelength fluorescent scaffolds including pyronin B (Fig. 1), phenanthridine, benzo [c]cinnoline and resorufin derivatives, for the detection of Sarin mimics,⁷ Hg(II) cation,⁸ MeHg(I) cation⁹ and reactive nitrogen species (RNS)¹⁰ respectively. However, the majority of these latter probes suffers from a lack of versatility (the chemical cascade is specific to the target analyte and its inherent reactivity and cannot be triggered by an other analyte) preventing (1) their use for sensing a wide range of analytes including enzymes and biomolecules, and (2) a possible further extension of the “covalent-assembly” approach to dual- or multi-analyte detection schemes.^{11,12} In order to respond to these challenges, we have decided to investigate *in situ* formation of pyronin dyes triggered by enzymatic events. Such xanthene-based fluorophores have been selected because their spectral features in the yellow-orange region will be valuable for effective biosensing in complex biological media. Furthermore, the upstream design of pyronin precursors where the two aniline moieties are orthogonally protected will open the way for the next construction of dual-input fluorogenic probes.¹³

In this paper, we report our progress toward the development of an unprecedented class of protease-sensing “smart” fluorescent probes whose the principle mechanism of activation

^aInstitut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21078 Dijon, France.
E-mail: anthony.romieu@u-bourgogne.fr; http://www.icmub.fr;

Fax: +33-3-80-39-61-17; Tel: +33-3-80-39-36-24

^bInstitut Universitaire de France, 103, boulevard Saint-Michel, 75005 Paris, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic procedures for benzaldehyde 1, experimental details of *in vitro* enzyme assays and all analytical data. See DOI: 10.1039/c7ob00370f

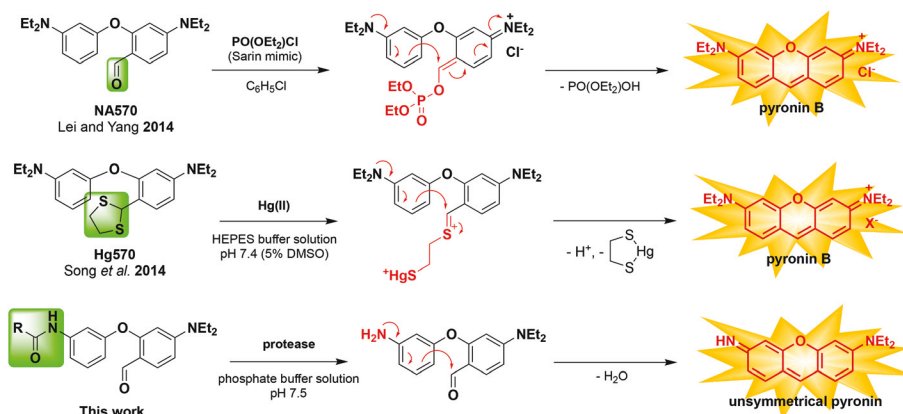


Fig. 1 Background information about the “covalent-assembly” principle applied to *in vitro* fluorogenic detection of organophosphorus nerve agents (Sarin mimics) and Hg(II) cation through *in situ* synthesis of pyronin B (X^- = anionic form of HEPES), and its extension to protease sensing explored in this work (unsymmetrical pyronin = 6-*N,N*-diethylamino-3*H*-xanthen-3-imine = compound 6).

is based on the pyronin assembly triggered by the enzyme itself (Fig. 1).

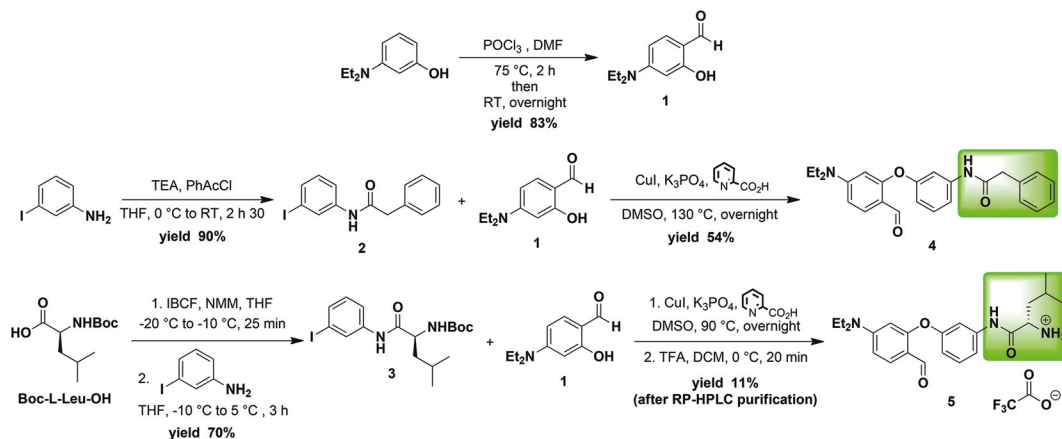
Results and discussion

To rapidly establish a proof-of-concept, we have chosen to work with two distinct hydrolases namely penicillin G acylase (PGA, also known as penicillin amidase) and leucine aminopeptidase (LAP from porcine kidney) that have two clear advantages: (1) structurally simple substrates (phenylacetamide and *L*-leucine amide moieties respectively) than can be easily installed on the pyronin precursor through amidification of its primary aniline and (2) a commercial availability at low or reasonable cost. PGA is widely used as biocatalyst in the synthesis of β -lactam antibiotics, since it allows for the deprotection of phenylacetyl-protected amines,¹⁴ and often regarded as a valuable model protease to perform *in vitro* validations of self-immolative molecular systems used as diagnostic probes, molecular amplifiers or drug delivery systems.¹⁵ LAP is a metallopeptidase widely studied¹⁶ as an attractive drug target in anti-cancer and anti-malaria chemotherapies.¹⁷ Furthermore, placental LAP (P-LAP) was recently identified as a relevant biomarker for predicting perinatal mortality¹⁸ (*e.g.*, serum P-LAP levels are extremely low among women with foetal death). Interestingly, some self-immolative fluorogenic reporters for LAP sensing in living cells have been recently developed by the Hasserodt group.¹⁹

Inspired by the nerve agent detection mechanism reported by Lei and Yang for probe NA570,⁷ we assumed that a quite similar bis-aryl ether derivative for which one of the *N,N*-diethylamino group is replaced by a *N*-acyl primary amino moiety, may act as a fully stable non-fluorescent pyronin precursor. since the selective enzymatic deprotection of its carboxamide group generates an intermediate that will spontaneously cyclise through intramolecular reaction between the unveiled electron-rich arene moiety and aldehyde to give, after aromati-

sation a fluorescent unsymmetrical pyronin dye (Fig. 1). Interestingly, the multiple sources of primary amines in the reaction medium (*i.e.*, lysine residues within the active site of protease, released *L*-leucine and/or primary aniline of intermediate) should lead to *in situ* formation of a more reactive imine/iminium intermediate²⁰ and favor the cyclisation process in this aq. environment.

The synthesis of the two protease-sensitive fluorogenic probes 4 and 5 was achieved in two or three steps as depicted in Scheme 1. First, 3-iodoaniline was *N*-acylated either with commercial phenylacetyl chloride (PhAc-Cl) or mixed anhydride from Boc-*L*-leucine and isobutyl chloroformate (IBCF), to give compounds 2 and 3 in good yields (90% and 70% respectively). The key step leading to unsymmetrical bis-aryl ether scaffold is an Ullman ether synthesis from phenol 1 and aryl iodide 2 or 3, performed under conditions previously optimized by the Buchwald group.²¹ The PGA-sensitive fluorogenic probe 4 was readily formed on heating reaction mixture at 130 °C for 12 h and isolated in a pure form by conventional flash-column chromatography on silica gel. Conversely, in the case of LAP-sensitive probe, this copper-catalysed coupling did not work properly (checking by periodic HPLC-MS monitoring) when the reaction mixture was heated at 90 °C. At higher temperatures, significant degradation of starting materials and targeted coupling product was observed. Finally, removal of the Boc group of crude coupling product was achieved under anhydrous acidic conditions (60% TFA in DCM) at 0 °C for 20 min. After removal of TFA under mild conditions (essential to avoid side-reactions leading to degradation and/or premature formation of pyronin derivatives), purification was achieved by semi-preparative RP-HPLC to give the TFA salt of LAP-sensitive fluorogenic probe 5 in a low but not optimized yield (11% overall yield for the last two steps). All spectroscopic data (see ESI†), especially IR, NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structures assigned. Their purity was checked by RP-HPLC and found to be 99% (4) and 93% (5) respectively. In addition to these syntheses, we have also



Scheme 1 Synthesis of protease-sensitive fluorescence "turn-on" probes **4** and **5** based on the "covalent-assembly" principle (Boc = *tert*-butyloxycarbonyl, IBCF = isobutyl chloroformate, NMM = *N*-methylmorpholine, PhAcCl = phenylacetyl chloride).

prepared an authentic sample of unsymmetrical pyronin **6** (6-*N,N*-diethylamino-3*H*-xanthen-3-imine, see Fig. 1 for the corresponding structure) which will be formed upon enzymatic activation of the two probes, and used as reference compound for the fluorescence-based *in vitro* assays and HPLC-fluorescence/MS analyses (*vide infra*). This unsymmetrical xanthen-based fluorophore has never been described in the literature but a recent publication from the Lin group about the synthesis of a 7-hydroxycoumarin-pyronin FRET dyad and its use as a ratiometric fluorescent probe for H₂S sensing,²² helped us to devise a synthesis of this unusual pyronin from 4-(*N,N*-diethylamino)salicylaldehyde and 3-aminophenol (see Experimental section).

All UV-visible and fluorescence measurements were conducted in phosphate buffer (PB, 100 mM, pH 7.6, simulated physiological conditions) containing less than 1% of CH₃CN as a co-solvent and the corresponding data are gathered in Table 1 (see Fig. S1–S3[†] for the corresponding spectral curves). The two protease-sensitive probes **4** and **5**, exhibits a strong electronic absorption in the UV-A range and are not fluorescent, especially in the expected emission range of pyronin **6** (500–600 nm), whatever the excitation wavelength used. To demonstrate the feasibility of proposed detection mechanism, we also investigated the photophysical properties of pyronin **6** in PB.

The UV-visible absorption spectrum of **6** displays a maximum at 527 nm ($\epsilon = 70\,350\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and the emission spectrum shows a peak maximum at 544 nm ($\Phi_F = 7\%$). Interestingly, a perfect matching between the absorption and

excitation spectra is observed (see Fig. S2[†]), supporting the lack of H-type aggregates under simulated physiological conditions. These photophysical studies show that the enzymatic cleavage of fluorogenic probes **4** and **5** and subsequent cyclisation-aromatization process would produce a strong green-yellow fluorescence signal centered at 545 nm.

Fluorescence-based *in vitro* assays were performed with commercial enzymes (PGA from *Escherichia coli* and LAP microsomal from porcine kidney) through time-course measurements (Fig. 2A and S4–S9[†]). The first tests were conducted on the LAP-sensitive probe **5** and had confirmed our starting hypothesis related to *in situ* pyronin formation triggered by protease. Indeed, a significant and gradual increase of green-yellow fluorescence intensity at 545 nm (Ex. 525 nm) was observed when **5** was incubated with LAP at 37 °C for 14 h. In contrast, without addition of LAP, probe **5** displayed minor fluorescence change under the same conditions (diminished by 17-fold compared to the fluorescence level reached with LAP). The slight instability of **5** at physiological pH may well stem from hydrolysis of its anilnamide bond, more reactive than an alkyl counterpart. This non-specific fluorescence signal could be completely suppressed by implementing a dual-reactable strategy.²⁴ In an attempt to accelerate the fluorogenic activation kinetics of probe **5**, two other aq. buffers at acidic and basic pH respectively (acetate buffer, 100 mM, pH 5.6 and borate buffer, 100 mM, pH 8.6) were assessed. In both cases, a lower fluorescence end-point value was obtained than that achieved in PB, suggesting the less efficiency of LAP at acidic pH and the ineffectiveness of cyclisation at basic pH. However, the shape of kinetic curve obtained at pH 5.6 has drawn our attention specifically. Indeed, a curved line was observed that can be interpreted as follows: over a period of time of *ca.* 2 h, the low slope of the curve was not constant and slowly/gradually increased, suggesting a less effective hydrolysis of **5** by the protease (LAP is known to be less efficient at this tested pH).²⁵ Thereafter, the slope was constant and the fastest kinetics was in agreement with the positive impact of acidic pH on cyclisation/aromatization domino process.

Table 1 Photophysical properties of the probes **4** and **5** and pyronin dye **6** in phosphate buffer (100 mM, pH 7.6) and at 25 °C

Cmpd	Abs. max (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Em. max (nm)	Φ_F^a (%)
4	264, 368	14 860, 16 040	— ^b	— ^b
5	250, 356	19 200, 39 800	— ^b	— ^b
6	527	70 350	544	7

^a Determined in PBS at 25 °C using rhodamine 6G ($\Phi_F = 92\%$ in water, Ex. 470 nm) as a standard.²³ ^b Non-fluorescent.

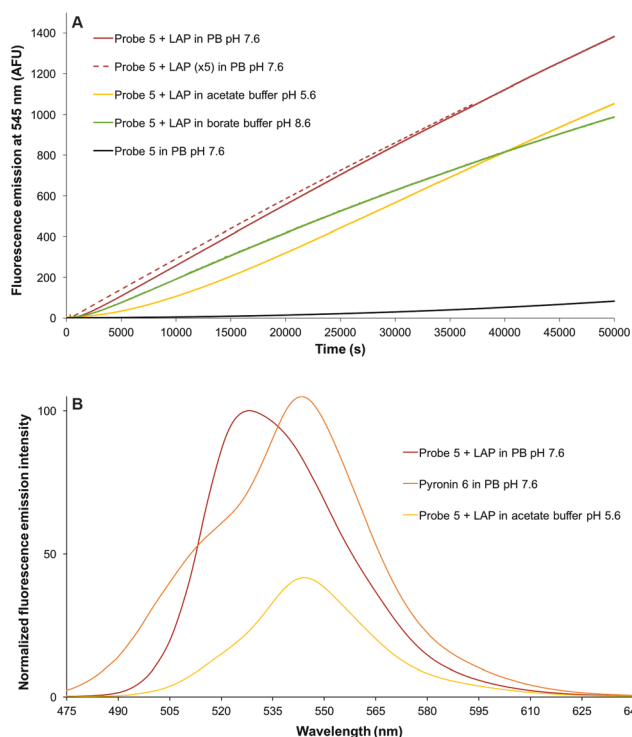


Fig. 2 (A) Time-dependant changes in the green-yellow fluorescence intensity (Ex./Em. 525/545 nm, bandwidth 5 nm) of fluorogenic probe 5 (concentration: 1.0 μM) in the presence of LAP (2×10^{-3} U solid lines and 10^{-2} U for dotted line) in aq. buffers at 37 $^{\circ}\text{C}$; (B) fluorescence emission spectra (Ex. 525 nm, bandwidth 5 nm) of selected enzymatic reaction mixtures after 24 h of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ and authentic sample of pyronin 6 at the same concentration (1.0 μM). Please note: blue-shifted emission curve obtained for reaction with LAP in PB at 37 $^{\circ}\text{C}$ was explained by the formation of 6-*N*-ethylamino-3*H*-xanthen-3-imine resulting from dealkylation of *in situ* generated pyronin 6.

Considering the more robustness of the PGA enzyme (compared to LAP) under these mild acidic conditions,²⁶ further tests on the PGA-sensitive probe 4 were then performed to validate this hypothesis (see Fig. S4, S5 and S9†). The results were clear, at acidic pH a better fluorogenic response was achieved which indicated a positive action of protons in the mechanism leading to the formation of the fluorescent pyronin core after enzymatic cleavage of the amide bond. However, a new interrogation had emerged concerning the lower levels of fluorescence reached upon enzymatic activation of the PGA-sensitive probe compared to LAP-sensitive probe. To clarify this point, additives found in the commercial sample of LAP (ammonium sulfate and magnesium chloride) were added to PB separately or together, and enzymatic kinetics with PGA were performed. These further analyses clearly highlighted the catalytic role of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the cyclisation reaction (probably as a source of ammonia to generate more reactive imine intermediate)²⁰ unlike MgCl_2 which seemed to have no impact. Such data could suggest a mechanism involving an imine formation (probably protonated at physiological pH) to favor the cyclisation process. Finally, blank experiments without enzyme were performed to ensure that $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or MgCl_2 did not

induced the generation of the pyronin dye, and so corroborate that protease is required to obtain a significant fluorescence response. To confirm that the resulting fluorescence emission observed during these time-course measurements was due to 6-*N,N*-diethylamino-3*H*-xanthen-3-imine dye formed *in situ* (and to clarify the reason for the blue-shifted shoulder observed in most fluorescence emission spectra recorded after enzymatic kinetics, see Fig. 2B), some enzymatic reaction mixtures were analysed by RP-HPLC coupled with fluorescence detection and synthesised pyronin 6 was used as reference. These chromatographic analyses have confirmed the formation of pyronin dye 6 and clearly revealed the presence of a second fluorescent species in the crude enzymatic reaction which needed to be identified (see Fig. 3 and S10–S12†). Finally, the specificity of the enzymatic cleavage was studied by

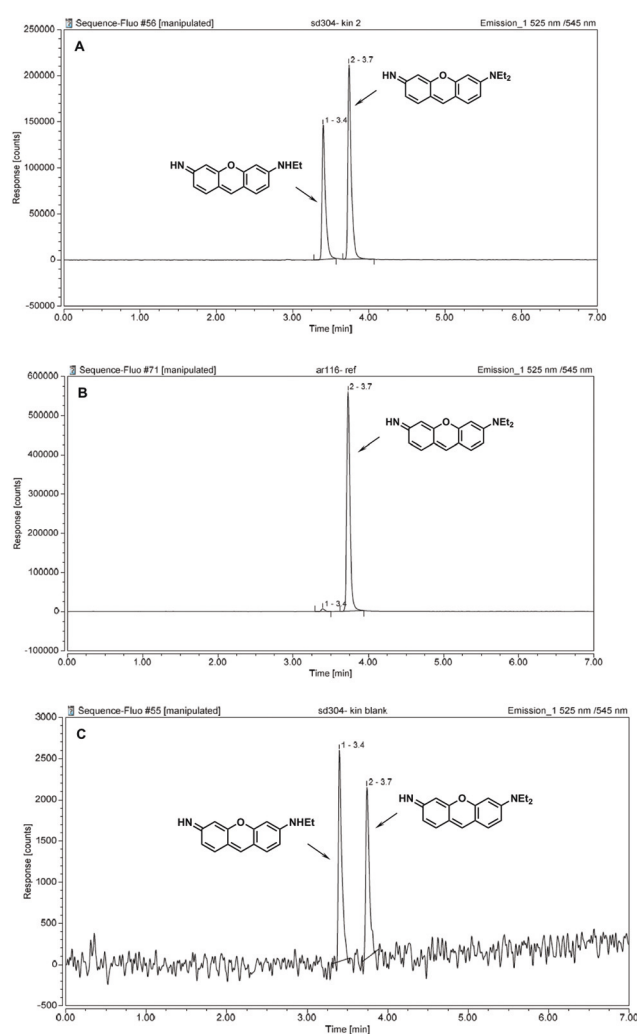


Fig. 3 RP-HPLC elution profiles (fluorescence detection, system H) of enzymatic reaction mixture of probe 5 with LAP (24 h of incubation in PB at 37 $^{\circ}\text{C}$) (A), authentic sample of pyronin 6 (B) and probe 5 without LAP (24 h of incubation in PB at 37 $^{\circ}\text{C}$) (C). Please note: for all analyses, concentration of injected solution: 1.0 μM and injection volume: 10 μL . Ratio between fluorescence signal detected for enzymatic reaction (A) and control without LAP (C) is ca. 100.

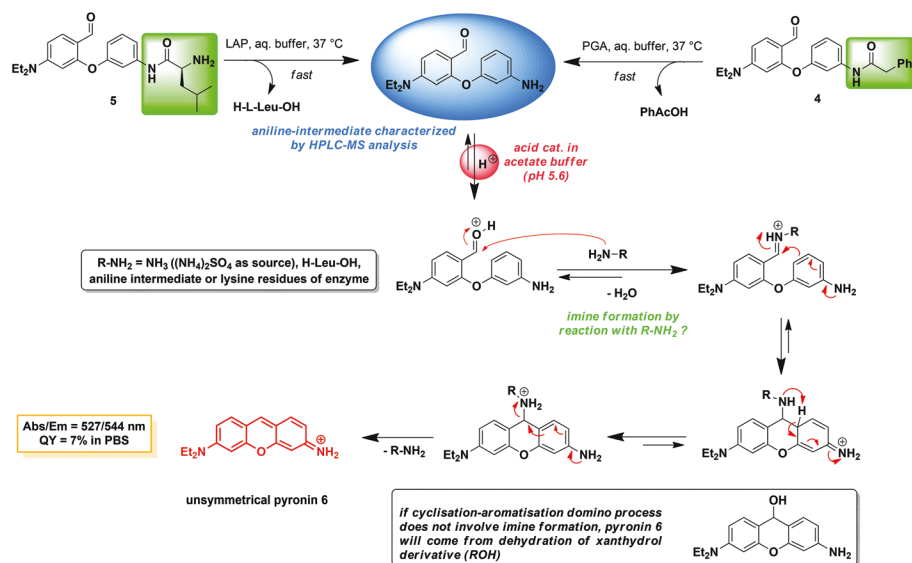


Fig. 4 Proposed detection mechanism of proteases via the “covalent-assembly” principle, supported by fluorescence-based *in vitro* assays and HPLC-fluorescence/-MS analyses performed with PGA-sensitive probe 4 and LAP-sensitive probe 5.

conducting two control reactions: incubation of PGA-sensitive probe 4 with LAP and incubation of LAP-sensitive probe 5 with PGA respectively. As expected, no significant increase of green-yellow fluorescence at 545 nm (Ex. 525 nm) was observed when 4 was incubated with LAP at 37 °C for 14 h (Fig. S13†), confirming that this latter protease is not able to cleave the phenyl-acetamide moiety. Conversely and quite surprisingly, PGA was able to readily activate the LAP fluorogenic substrate 5 because a time-dependant fluorescence response similar to that obtained with LAP was observed (Fig. S14†). Further work is currently in progress to gain insights about this novel reactivity of bacterial PGA, already reported for other acylamidases for which aryl amides such as acide *para*-nitroanilides (especially, Leu-pNA) are good substrates.²⁷

To achieve this and to gain a better understanding of the sensing mechanism, further enzymatic reactions were performed (at a higher concentration than this used for fluorescence-based assays, 80 μM against 1.0 μM) and periodically analysed by HPLC-MS (see Fig. S15–S17†). The first clarification provided by these analyses has concerned the unknown fluorescent species previously noted (*vide supra*). The peak assigned to this compound ($t_R = 3.4$ min) was identified as 6-*N*-ethylamino-3*H*-xanthen-3-imine (MS(ESI⁺): $m/z = 238.8$ [M + H]⁺, calcd for C₁₅H₁₅N₂O⁺ 239.1 and UV-vis: $\lambda_{max} = 510$ nm). Furthermore, its spectral features (absorption and fluorescence emission maxima) were changed (compared to *N,N*-diethyl pyronin 6) in a similar way than already reported for rhodamine dyes.²⁸ At this stage of the study, the rationale for this *N*-dealkylation process in aq. medium remains unknown. The second valuable information disclosed by the HPLC-MS analyses has concerned the visualisation ($t_R = 4.3$ min) and unambiguous identification of key intermediate namely 2-(3-aminophenoxy)-4-*N,N*-(diethylamino)benzaldehyde (MS(ESI⁺): $m/z = 285.4$ [M + H]⁺, calcd for C₁₇H₂₁N₂O₂⁺ 285.1 and UV: $\lambda_{max} =$

353 nm) which resulted from the enzymatic hydrolysis of the amide bond of probes 4 and 5. The cyclised xanthyrol derivative (ROH) has the same molecular weight but it was excluded because the chemical equilibrium with the corresponding pyronin 6 is dramatically favored under acidic conditions used for these RP-HPLC analyses (0.1% formic acid in water and CH₃CN, pH 3.0).²⁹ Also worthy of note is that no cyclic product *N*-acylated with the enzyme-labile moiety was detected, thus confirming the need of a protease-mediated cleavage event to trigger the cyclisation/aromatization domino process leading to *in situ* generation of fluorescent pyronin dye. All these results allowed us to propose the sensing mechanism depicted in Fig. 4 and that could explain the slow release of pyronin core, the pH effect and the positive impact of additive (NH₄)₂SO₄, leading to the significant fluorescence “turn-on” response of probes 4 and 5 to proteases.

Conclusions

For the first time, we have demonstrated that the “covalent-assembly” probe design principle could be successfully applied to protease sensing in the spectral range 500–600 nm, through *in situ* generation of unsymmetrical pyronin scaffold. This novel class of activatable fluorescent probes could be a valuable alternative to more conventional FRET-based (or self-quenched) probes and fluorogenic substrates derived from fluorescent anilines (typically pro-fluorophores derived from 7-aminocoumarin, rhodamine 110, cresyl violet and related benzophenoxazines, *etc.*)³⁰ even if the reaction rate of cyclisation/aromatization domino process should be increased. As previously achieved with the rhodamine-based fluorophores, the one-atom replacement of the bridging oxygen atom of caged pyronin precursors by a quaternary carbon³¹ or silicon

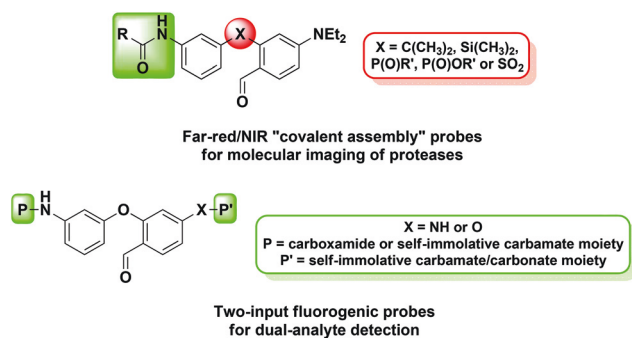


Fig. 5 Possible ways to apply the "covalent-assembly" principle to molecular imaging of proteases (top) and dual-analyte detection (bottom).

atom,^{32,33} a pentavalent phosphorus atom (alkyl(diaryl)phosphine oxide or phosphinate moiety)³⁴ or a sulfone group³⁵ should be an effective way to dramatically shift absorption/emission maxima of *in situ* generated pyronin dye from visible to far-red/NIR region (Fig. 5, top). This will facilitate *in vivo* molecular imaging of enzyme activity. Further extension of this promising concept to the construction of two-input fluorogenic probes suitable for dual-analyte detection, is currently in progress in our laboratory (Fig. 5, bottom). Indeed, the ability of a fluorescent probe to monitor simultaneously two or more biomarkers for one pathology is particularly attractive for improving medical diagnostics.^{12,36}

Experimental section†

For the preparation of starting benzaldehyde **1** and experimental details related to fluorescence-based *in vitro* assays and HPLC-fluorescence/-MS analyses, see ESI.†

General

Unless otherwise noted, all commercially available reagents and solvents were used without further purification. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. The spots were directly visualised or through illumination with UV lamp ($\lambda = 254/365$ nm) and/or staining with a phosphomolybdic acid solution (4.8 wt% in EtOH). Column chromatography purifications were performed manually on silica gel (63–200 μm) from sigma-Aldrich (technical grade) or using an automated flash chromatography purification system (Interchim puriFlash™ 430) with puriFlash™ columns (silica gel, 25 μm). THF and DCM (HPLC-grade) were dried over alumina cartridges using a solvent purification system PureSolv PS-MD-5 model from Innovative Technology. TEA was stored over anhydrous Na₂SO₄. Anhydrous DMSO and DMF were purchased from Carlo Erba, and stored over 3 Å molecular sieves. The HPLC-gradient grade acetonitrile (CH₃CN) was obtained from Carlo Erba. Formic acid (FA, grade "eluent additive for LC-MS") was provided by Sigma-Aldrich. Phosphate buffered saline (PBS, 100 mM + 150 mM NaCl, PH 7.5), phosphate buffer

(PB, 100 mM, pH 7.6), acetate buffer (NaOAc, 100 mM, pH 5.6), borate buffer (100 mM, pH 8.6) and aq. mobile-phases for HPLC were prepared using water purified with a PURELAB Ultra system from ELGA (purified to 18.2 M Ω cm). PGA (from *Escherichia coli*) was provided by Iris Biotech GmbH (EZ50150, 841 U mL⁻¹) and microsomal LAP (from porcine kidney) was supplied by Sigma-Aldrich (L5006, Type IV-S, ammonium sulfate suspension, 10–40 U per mg protein).

Instrument and methods

Lyophilisation steps were performed with an Christ Alpha 2–4 LD plus. Centrifugation steps were performed with a Thermo Scientific Espresso Personal Microcentrifuge instrument. ¹H-, ¹³C- and ¹⁹F-NMR spectra were recorded either on a Bruker Avance 300 or on a Bruker Avance 500 spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non-deuterated solvent signal.³⁷ *J* values are expressed in Hz. IR spectra were recorded with a Bruker Alpha FT-IR spectrometer equipped with an universal ATR sampling accessory or with a Bruker IR-FT Vector 22 spectrometer equipped with an ATR "Golden Gate" with diamond crystal. The bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimeters (cm⁻¹). Elemental analyses (C, H, N, S) were performed on a Thermo Scientific Flash EA 1112 instrument. Optical rotation was measured on a PerkinElmer Polarimeter Model 341 with the sodium D-line (589 nm) at 20 °C and [α]_D values are given in dm⁻¹ g⁻¹ cm³. HPLC-MS analyses were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump + auto-sampler) equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS) and a MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer (LRMS analyses through ESI). HPLC-fluorescence analyses were performed with the same instrument coupled to a RS fluorescence detector (Thermo-Dionex, FLD 3400-RS). High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an ESI source. UV-visible spectra were obtained on a Jasco V-630 Bio spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Hellma, 100-QS, 45 × 12.5 × 12.5 mm, pathlength 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra and kinetics) were performed with an Jasco FP-8500 spectrofluorometer (software Spectra Manager) with a standard fluorometer cell (Labbox, LB Q, 10 mm). Emission spectra were recorded under the same conditions after excitation at the corresponding wavelength (Ex/Em bandwidth = 5 nm, response = 1 s and PMT sensitivity = medium). All fluorescence spectra were corrected.

Fluorescence quantum yield of 6-*N,N*-diethylamino-3*H*-xanthen-3-imine (**6** (TFA salt) was measured in PBS at 25 °C by a relative method using rhodamine 6G ($\Phi_F = 92\%$ in H₂O) as a standard²³ (for the corresponding Abs/Ex/Em spectra, see Fig. S2†). 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 are used: 1.333 for H₂O and 1.337 for PBS.

Automated flash-column chromatography and high-performance liquid chromatography separations

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments (HPLC-MS or HPLC-fluorescence) and the purification steps respectively: *System A*: RP-HPLC (Phenomenex Kinetex C₁₈ column, 2.6 μm, 2.1 × 50 mm) with CH₃CN (+0.1% FA) and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2.7) as eluents [5% CH₃CN (0.1 min) followed by linear gradient from 5% to 100% (5 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. UV-visible detection was achieved at 220, 260, 320 and 540 nm (+ diode array detection in the range 220–700 nm). Low resolution ESI-MS detection in the positive/negative mode (full scan, 100–700 amu, data type: centroid, needle voltage: 3.0 kV, probe temperature: 350 °C, cone voltage: 75 V and scan time: 1 s). *System B*: System A with UV-visible detection at 220, 260, 500 and 550 nm (+ diode array detection in the range 220–800 nm). Low resolution ESI-MS detection in the positive/negative mode (full scan, 150–1500 amu). *System C*: semi-preparative RP-HPLC (Thermo BetaBasic-C₁₈ column, 5 μm, 150 × 30 mm) with CH₃CN and H₂O as eluents [40% CH₃CN (5 min), followed by a gradient of 40% to 55% CH₃CN (15 min), then 55% to 80% CH₃CN (35 min)] at a flow rate of 20.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 350 nm. *System D*: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Betabasic-C₁₈ column, 5 μm, 150 × 30 mm) with CH₃CN and H₂O as eluents [30% CH₃CN (5 min), followed by a gradient of 30% to 60% CH₃CN (20 min), then 60% to 95% CH₃CN (35 min)] at a flow rate of 20.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 350 nm. *System E*: semi-preparative RP-HPLC (SiliCycle siliaChrom C₁₈ column, 10 μm, 20 × 250 mm) with CH₃CN and aq. 0.1% TFA (pH 2.0) as eluents [0% CH₃CN (5 min), followed by a gradient of 0% to 15% CH₃CN (10 min), then 15% to 60% CH₃CN (60 min)] at a flow rate of 20.0 mL min⁻¹. Quadruple UV-vis detection was achieved at 280, 350, 425 and 530 nm. *System F*: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with CH₃CN and aq. 0.1% TFA (pH 2.0) as eluents [0% CH₃CN (5 min), followed by a gradient of 0% to 15% CH₃CN (10 min), then 15% to 75% CH₃CN (60 min)] at a flow rate of 4.0 mL min⁻¹. Quadruple UV-vis detection was achieved at 280, 350, 425 and 530 nm. *System G*: System A with triple UV-visible detection which was achieved at 260, 350 and 525 nm (+ diode array detection in the range 220–700 nm). *System H*: RP-HPLC-fluorescence (Phenomenex Kinetex C₁₈ column, 2.6 μm, 2.1 × 50 mm) with same eluents and gradient as System A. Fluorescence detection was achieved at 45 °C at the following Ex./Em. channels: 525/545 nm and 510/530 nm (sensitivity: 1, PMT 1, filter wheel: auto).

One chromatographic system was used for the purification on an automated flash chromatography purification system (Interchim puriFlash™ 430): *System I*: RP-C₁₈ cartridge

(SiliCycle siliaSep™ C₁₈, 40 g) with CH₃CN and aq. 0.1% TFA (pH 2.0) as eluents [0% CH₃CN (1.5 CV), followed by a gradient of 0% to 10% CH₃CN (2 CV), then 10% to 70% CH₃CN (10 CV)] at a flow rate of 26 mL min⁻¹. Triple UV-vis detection was achieved at 250, 500 and 550 nm.

3-(Phenylacetamide)iodobenzene (2). To a solution of phenylacetic acid (1.5 g, 11.0 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (10 mL) was added SOCl₂ (1.20 mL, 16.5 mmol, 1.5 equiv.) and dry DMF (84 μL, 1.1 mmol, 0.1 equiv.) and the resulting reaction mixture stirred at RT for 1 h. Thereafter, solvent was removed *in vacuo* to give PhAcCl which was kept under an Ar atmosphere and then slowly added to a mixture of 3-iodoaniline (2 g, 9.13 mmol, 0.8 equiv.) and TEA (1.53 mL, 11.0 mmol, 1 equiv.) in dry THF (35 mL) at 0 °C under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 2 h 30 between 0 °C and RT and then concentrated under reduced pressure. The residue was retaken in EtOAc, washed with deionised water, aq. 5% K₂CO₃ and brine and then dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and concentrated to afford the product 2 as brown solid (2.85 g, yield 90%). IR (ATR): ν = 3249, 3026, 2918, 1653, 1575, 1518, 1470, 1395, 1343, 1281, 1238, 1192, 1173, 1090, 1060, 1028, 994, 974, 881, 861, 768, 716 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.63 (s, 2 H, CH₂-PhAc), 7.10 (t, *J* = 8 Hz, 1 H, H-Ar), 7.23–7.34 (m, 5 H, H-PhAc), 7.40 (bd, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-Ar), 7.53 (bd, *J* = 8.1 Hz, 1 H, H-Ar), 8.13 (t, *J* = 1.8 Hz, 1 H, H-Ar), 10.26 (s, 1 H, NH) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 43.3, 94.5, 118.2, 126.6, 127.3, 128.3 (2 C), 129.1 (2 C), 130.8, 131.7, 135.6, 140.6, 169.3 ppm; HPLC (system A): *t*_R = 4.9 min (purity 93% at 260 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): *m/z* 338.0 [M + H]⁺ (60) and 379.0 [M + H + CH₃CN]⁺ (100), calcd for C₁₄H₁₃INO⁺ 338.0; LRMS (ESI-, recorded during RP-HPLC analysis): *m/z* 335.9 [M - H]⁻ (100) and 382.1 [M - H + FA]⁻ (25), calcd for C₁₄H₁₁INO⁻ 336.0.

Boc-L-leucine meta-iodophenylamide (3). To a stirred solution of Boc-L-leucine (1.5 g, 6.45 mmol, 1 equiv.) in dry THF (20 mL) at -20 °C, *N*-methylmorpholine (NMM, 715 μL, 6.45 mmol, 1 equiv.) and isobutyl chloroformate (840 μL, 6.45 mmol, 1 equiv.) were successively added. After an activation period of 25 min, 3-iodoaniline (1.835 g, 6.45 mmol, 1.3 equiv.) in dry THF (5 mL) was slowly added to the above solution. The reaction mixture was stirred for 3 h between -5 °C and 0 °C. Thereafter, the resulting solution was quenched by adding 10 mL of aq. saturated NaHCO₃ and then was extracted with DCM (3 × 50 mL). The organic layers were combined and washed with aq. 1 N HCl and brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and concentrated to afford the product 3 as white solid (1.946 g, yield 70%). IR (ATR): ν = 3284, 2957, 1663, 1586, 1526, 1472, 1416, 1391, 1365, 1289, 1244, 1160, 1047, 1023, 993, 877, 773 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.88 (m, 6 H, CH₃-Leu), 1.20–1.75 (m, 12 H, CH₃-Boc and CH₂-CH-Leu), 4.08 (m, 1 H, CH-NH-Leu), 7.09 (m, 2 H, H-Ar), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H-Ar), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, H-Ar), 8.11 (bs, 1 H, NH-Boc), 10.05 (s, 1 H, NH) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.5, 22.9, 24.3, 28.2 (3 C, CH₃-Boc), 40.4, 53.5, 78.0, 94.4, 118.4, 127.4, 130.7, 131.7, 140.4, 155.4, 172.0 ppm; HPLC (system A): *t*_R = 5.4 min (purity

99% at 260 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 433.1 $[M + H]^+$ (60) and 376.7 $[M - tBu + H]^+$ (100), calcd for $C_{17}H_{26}IN_2O_3^+$ 433.1; LRMS (ESI-, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 430.9 $[M - H]^-$ (70) and 476.9 $[M - H + FA]^-$ (45), calcd for $C_{17}H_{24}IN_2O_3^-$ 431.1.

PGA-sensitive probe (4). A mixture of benzaldehyde 1 (400 mg, 2.07 mmol, 1.2 equiv.), iodoaryl derivative 2 (582 mg, 1.73 mmol, 1 equiv.), finely ground K_3PO_4 (732 mg, 3.45 mmol, 2 equiv.), CuI (33 mg, 0.17 mmol, 0.1 equiv.) and picolinic acid (43 mg, 0.35 mmol, 0.2 equiv.) in dry DMSO (4.2 mL) was heated in a sealed tube at 130 °C overnight. The reaction was checked for completion by HPLC (system A) and quenched with 10 mL of deionized water. Then, the resulting mixture was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash-column chromatography over silica gel (cartridge 40 g) using an automated purification system (Interchim puriFlash™ 430), eluted with a linear gradient of EtOAc in DCM (from 0% to 40%) to get bis-aryl ether 4 as brown solid (380 mg, yield 54%). Please note: a second purification by semi-preparative HPLC (system C, $t_R = 28.0$ – 30.9 min) can afford a pale yellow solid after freeze-drying. IR (ATR): $\nu = 3289, 2971, 1664, 1590, 1522, 1484, 1436, 1406, 1393, 1353, 1262, 1196, 1149, 1097, 1076, 1001, 983, 869, 778, 719$ cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.04$ (t, $J = 7.0$ Hz, 6 H, CH_3 -Et), 3.34 (mask by H_2O signal) (q, $J = 7.0$ Hz, 4 H, CH_2 -Et), 3.61 (s, 2 H, CH_2 -PhAc), 6.11 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, H -Ar), 6.60 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 6.74 (dq, $J = 1.5$ Hz, $J = 2.1$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H -Ar), 7.22–7.40 (m, 8 H, H -Ar and H -PhAc), 7.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 9.89 (s, 1 H, H -formyl), 10.26 (s, 1 H, NH) ppm; ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12.2$ (2 C, CH_3 -Et), 43.3, 44.1 (2 C, CH_2 -Et), 100.6, 107.7, 108.2, 112.5, 113.8, 115.2, 126.5, 128.2 (2 C), 129.0 (2 C), 130.0, 130.1, 135.8, 140.7, 153.4, 157.6, 160.4, 169.2, 185.1 ppm; HPLC (system A): $t_R = 5.2$ min (purity 99% at 260 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 403.1 $[M + H]^+$ (100), calcd for $C_{25}H_{27}N_2O_3^+$ 403.2; LRMS (ESI-, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 400.8 $[M - H]^-$ (100) and 447.0 $[M - H + FA]^-$ (60), calcd for $C_{25}H_{25}N_2O_3^-$ 401.2; HRMS (ESI+): m/z 425.18194 $[M + Na]^+$, calcd for $C_{25}H_{26}N_2O_3Na^+$ 425.18356; UV-vis: λ_{max} (PBS)/nm 264 and 368 ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 14 860 and 16 040).

LAP-sensitive probe (5). A mixture of benzaldehyde 1 (76 mg, 0.39 mmol, 1.7 equiv.), iodoaryl derivative 3 (100 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.), finely ground K_3PO_4 (93 mg, 0.44 mmol, 1.9 equiv.), CuI (5 mg, 0.02 mmol, 0.1 equiv.) and picolinic acid (6 mg, 0.04 mmol, 0.2 equiv.) in dry DMSO (1 mL) was heated in a sealed tube at 90 °C overnight. The reaction was checked for completion by HPLC (system A) and quenched with 10 mL of deionised water. Then, the resulting mixture was extracted with DCM, washed with aq. 1 N HCl, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was retaken in DCM (400 μ L) and TFA (700 μ L, 40 equiv.) was added at 0 °C. The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 20 min, diluted in CH_3CN (5 mL) and evaporated under vacuum. The resulting oily

residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system D, $t_R = 18.0$ – 22.0 min). The TFA salt of desired LAP-sensitive probe 5 was recovered as white powder (13 mg, yield 11%). IR (ATR): $\nu = 2970, 1669, 1591, 1524, 1485, 1441, 1393, 1355, 1267, 1199, 1135, 1100, 977, 834, 798, 721$ cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.90$ (d, $J = 3.6$ Hz, 6 H, CH_3 -Leu), 1.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 6 H, CH_3 -Et), 1.63 (bd, 3 H, CH - CH_2 -Leu), 3.37 (mask by H_2O signal) (q, $J = 6.9$ Hz, 4 H, CH_2 -Et), 3.88 (bs, 1 H, CH - NH_2 -Leu), 6.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, H -Ar), 6.64 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 6.74 (m, 1 H, H -Ar), 7.34–7.40 (m, 3 H, H -Ar), 7.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 8.24 (bs, 2 H, NH_2 -Leu), 9.87 (s, 1 H, H -formyl), 10.60 (s, 1 H, NH) ppm; ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12.2$ (2 C, CH_3 -Et), 21.8, 22.6, 23.7, 39.5 (1C, masked by DMSO signal), 44.2 (2 C, CH_2 -Et), 51.8, 101.1, 108.0, 108.2, 113.4, 114.1, 115.3, 130.3, 130.4, 139.5, 153.4, 158.0, 160.0, 168.0, 185.2 ppm; ^{19}F NMR (470 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -73.7$ (s, 3 F, CF_3 -TFA); HPLC (system A): $t_R = 4.0$ min (purity 93% at 260 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 398.1 $[M + H]^+$ (100), calcd for $C_{23}H_{32}N_3O_3^+$ 398.2; LRMS (ESI-, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 395.9 $[M - H]^-$ (100) and 442.1 $[M + H - FA]^-$ (40), calcd for $C_{23}H_{30}N_3O_3^-$ 396.2; HRMS (ESI+): m/z 398.24329 $[M + H]^+$, calcd for $C_{23}H_{32}N_3O_3^+$ 398.24382 and 420.22500 $[M + Na]^+$, calcd for $C_{23}H_{31}N_3O_3Na^+$ 420.22576; Elemental anal.: Found C, 57.1; H, 6.5; N, 7.8. $C_{23}H_{31}N_3O_3$. 1.2 CF_3CO_2H requires C, 57.1; H, 6.1; N, 7.9%; UV-vis: λ_{max} (PBS)/nm 250 and 356 ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 19 200 and 39 800); $[\alpha]_D^{25} +39^\circ$ (c 0.2 in CH_3OH).

6-N,N-Diethylamino-3H-xanthen-3-imine (6). A mixture of benzaldehyde 1 (100 mg, 0.52 mmol, 1 equiv.) and 3-aminophenol (59 mg, 0.54 mmol, 1 equiv.) in TFA (3.35 mL) was heated under reflux for 24 h. The reaction was checked for completion by HPLC (system B). To favor dehydration process (leading to desired pyronin), methanesulfonic acid (MsOH, 0.5 mL) was added and the reaction mixture was stirred under reflux for further 6 h. Thereafter, the mixture was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a mixture of aq. 0.1% TFA and CH_3OH (1 : 1, v/v, 5 mL) and pre-purified by automated flash-column chromatography over reversed-phase C_{18} silica gel (system I). The product-containing fractions were lyophilised and the resulting amorphous powder was purified twice by semi-preparative RP-HPLC (system E, $t_R = 41.0$ – 51.0 min and system F, $t_R = 34.6$ – 37.2 min). The TFA salt of desired pyronin 6 was recovered as red amorphous powder (6 mg, yield 2%). Please note: despite two RP-HPLC purifications, the product remains contaminated with a minor amount of starting aldehyde (10%). IR (ATR): $\nu = 3334$ (broad), 3109 (broad), 2923, 2855, 2740, 1650 (broad), 1572 (broad), 1488, 1429, 1381, 1336, 1274, 1149, 1118, 1072, 1008, 967, 822, 796, 737, 703 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.32$ (t, $J = 7.0$ Hz, 6 H, CH_3 -Et), 3.70 (q, $J = 7.0$ Hz, 4 H, CH_2 -Et), 6.77 (bd, $J = 1.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 6.92 (bd, $J = 2.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 6.95 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 7.18 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 7.80 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, H -Ar), 8.55 (s, 1 H, H -Ar) ppm; ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD): $\delta = 12.9$ (2 C, CH_3 -Et), 47.0

(2 C, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Et}$), 97.3, 98.6, 115.5, 115.7, 116.0, 118.0, 134.8, 135.2, 147.6, 157.9, 159.8, 160.3, 162.1 ppm; ^{19}F NMR (470 MHz, CD_3OD): $\delta = -76.9$ (s, 3 F, $\text{CF}_3\text{-TFA}$); HPLC (system B): $t_{\text{R}} = 3.7$ min (purity 92% at 260 nm and 99% at 500 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 267.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100), calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}^+$ 267.1; Elemental anal.: Found C, 56.6; H, 5.7; N, 6.8. $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$. 1.33 $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ requires C, 56.5; H, 4.7; N, 6.7%. UV-vis: λ_{max} (PBS)/nm 527 ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 70 350); Fluorescence: λ_{max} (PBS)/nm 544 (Φ_{F} 7%).

Acknowledgements

Financial support from Institut Universitaire de France (IUF) and the Burgundy region ("FABER" programme, PARI Action 6, SSTIC 6 "Imagerie, instrumentation, chimie et applications biomédicales"), especially for the Ph. D. grant of S. D., are greatly acknowledged. The authors thank the "Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne" (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) for access to spectroscopy instrumentation. COBRA lab (UMR CNRS 6014) and Iris Biotech company are warmly thanked for the generous gift of some chemical reagents used in this work. The authors also thank Dr Jean-Alexandre Richard (ICES, A*STAR, Singapore) for relevant comments on this manuscript before publication, Dr David Monchaud (GATTACA research group, ICMUB, UMR CNRS 6302) for access to UV-vis and fluorescence spectro(photo)meters, Dr Jérôme Bayardon, Marie-José Penouilh and Marcel Soustelle (University of Burgundy, ICMUB, UMR CNRS 6302) for optical rotation measurements, HRMS measurements and elemental analysis respectively.

Notes and references

- (a) X. Chen, M. Sun and H. Ma, *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 477–489; (b) M. Eun Jun, B. Roy and K. Han Ahn, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7583–7601; (c) W. Shi and H. Ma, *Chem. Commun.*, 2011, **48**, 8732–8744; (d) J. Chan, S. C. Dodani and C. J. Chang, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 973–984; (e) J. B. Grimm, L. M. Heckman and L. D. Lavis, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2013, **113**, 1–34; (f) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng and F. Li, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 192–270; (g) X. Li, X. Gao, W. Shi and H. Ma, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 590–659.
- (a) M. Beija, C. A. M. Afonso and J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2410–2433; (b) H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian and X.-J. Zhang, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 429–447; (c) Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin and J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 5003–5015.
- For selected examples, see: (a) Y. Huang and J. M. Coull, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 3238–3239; (b) E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15833–15835; (c) K. Meguellati, G. Koripelly and S. Ladame, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 2738–2742.
- (a) Q. Wu and E. V. Anslyn, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 2815–2819; (b) W. Jiang and W. Wang, *Chem. Commun.*, 2009, 3913–3915; (c) J. H. Do, H. N. Kim, J. Yoon, J. S. Kim and H.-J. Kim, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 932–934; (d) T.-I. Kim, M. S. Jeong, S. J. Chung and Y. Kim, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 5297–5300; (e) T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi and Y. Kim, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9825–9827; (f) H. Mohapatra and S. T. Phillips, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 11145–11148; (g) D. Kim, S. Sambasivan, H. Nam, K. Hean Kim, J. Yong Kim, T. Joo, K.-H. Lee, K.-T. Kim and K. Han Ahn, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 6833–6835; (h) I. Kim, D. Kim, S. Sambasivan and K. H. Ahn, *Asian J. Org. Chem.*, 2012, **1**, 60–64; (i) J. Park and Y. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 2332–2335; (j) P. Hou, S. Chen, H. Wang, J. Wang, K. Voitchovsky and X. Song, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 320–322; (k) J. Kim, J. Park, H. Lee, Y. Choi and Y. Kim, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 9353–9356; (l) J. Zhou, Y. Li, J. Shen, Q. Li, R. Wang, Y. Xu and X. Qian, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 51589–51592; (m) A. D. Brooks, H. Mohapatra and S. T. Phillips, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 10437–10445; (n) H. Mohapatra, H. Kim and S. T. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 12498–12501; (o) Y. Han, C. Yang, K. Wu, Y. Chen, B. Zhou and M. Xia, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 16723–16726; (p) P. K. Mishra, T. Saha and P. Talukdar, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 7430–7436; (q) H. Zhang, Y. Xie, P. Wang, G. Chen, R. Liu, Y.-W. Lam, Y. Hu, Q. Zhu and H. Sun, *Talanta*, 2015, **135**, 149–154; (r) J. Zhang, Y. Li and W. Guo, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 4885–4888; (s) Y. Chen, B. Chen, D. Luo, Y. Cai, Y. Wei and Y. Han, *Tetrahedron Lett.*, 2016, **57**, 1192–1195; (t) Y. Chen, M. Zhang, Y. Han and J. Wei, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 8380–8383; (u) Z. Hu, J. Hu, H. Wang, Q. Zhang, M. Zhao, C. Brommesson, Y. Tian, H. Gao, X. Zhang and K. Uvdal, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **933**, 189–195; (v) X. Liu, D. Yang, W. Chen, L. Yang, F. Qi and X. Song, *Sens. Actuators, B*, 2016, **234**, 27–33; (w) F. Qi, X. Liu, L. Yang, L. Yang, W. Chen and X. Song, *Tetrahedron*, 2016, **72**, 6909–6913; (x) J. Zhang, Y. Li, J. Zhao and W. Guo, *Sens. Actuators, B*, 2016, **237**, 67–74.
- (a) T. Tomohiro, K. Kato, S. Masuda, H. Kishi and Y. Hatanaka, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 315–318; (b) S. Morimoto, T. Tomohiro, N. Maruyama and Y. Hatanaka, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1811–1813; (c) T. Tomohiro, S. Morimoto, T. Shima, J. Chiba and Y. Hatanaka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 13502–13505; (d) S. Masuda, T. Tomohiro, S. Yamaguchi, S. Morimoto and Y. Hatanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 1675–1678; (e) T. Suzuki, T. Okamura, T. Tomohiro, Y. Iwabuchi and N. Kanoh, *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26**, 389–395.
- S. Debieu and A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 10348–10361.
- Z. Lei and Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6594–6597.
- L. Song, Z. Lei, B. Zhang, Z. Xu, Z. Li and Y. Yang, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 7597–7600.
- Z. Zhang, B. Zhang, X. Qian, Z. Li, Z. Xu and Y. Yang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 11919–11924.
- (a) Y. Yang, S. K. Seidlits, M. M. Adams, V. M. Lynch, C. E. Schmidt, E. V. Anslyn and J. B. Shear, *J. Am. Chem.*

- Soc.*, 2010, **132**, 13114–13116; (b) Q. Zhang, Z. Zhu, Y. Zheng, J. Cheng, N. Zhang, Y.-T. Long, J. Zheng, X. Qian and Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18479–18482; (c) Q. Zhang, N. Zhang, Y.-T. Long, X. Qian and Y. Yang, *Bioconjugate Chem.*, 2016, **27**, 341–353.
- 11 For selected reviews, see: (a) M. Chhatwal, A. Kumar, V. Singh, R. D. Gupta and S. K. Awasthi, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **292**, 30–55; (b) L. Yu, S. Wang, K. Huang, Z. Liu, F. Gao and W. Zeng, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 4679–4706; (c) L. He, B. Dong, Y. Liu and W. Lin, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 6449–6461.
- 12 A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1294–1306.
- 13 J. B. Grimm, T. D. Gruber, G. Ortiz, T. A. Brown and L. D. Lavis, *Bioconjugate Chem.*, 2016, **27**, 474–480.
- 14 Y. Yang, Y. Chen, H. Aloysius, D. Inoyama and L. Hu, in *Enzyme Technologies: Pluripotent Players in Discovering Therapeutic Agents*, ed. H.-C. Yang, W.-K. Yeh and J. R. McCarthy, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2014, ch. 5, pp. 213–215.
- 15 (a) S. Gnaim and D. Shabat, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2970–2984; (b) A. Alouane, R. Labrière, T. Le Saux, F. Schmidt and L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 7492–7509; (c) M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim and D. Shabat, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 1309–1352.
- 16 M. Matsui, H. Fowler Jonathan and L. Walling Linda, *Biol. Chem.*, 2006, **387**, 1535–1544.
- 17 (a) S. Mizutani, K. Shibata, F. Kikkawa, A. Hattori, M. Tsujimoto, M. Ishii and H. Kobayashi, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2007, **11**, 453–461; (b) Q. Gong, W. Shi, L. Li and H. Ma, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 788–792; (c) S. Rout and R. K. Mahapatra, *Biomed. Pharmacother.*, 2016, **82**, 192–201.
- 18 C. Tian, Z. Huang and Z. Wen, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2016, **135**, 255–258.
- 19 For selected examples, see: (a) X.-b. Zhang, M. Waibel and J. Hasserodt, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 792–795; (b) O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon and J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 6253–6255; (c) M. Prost and J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 14896–14899; (d) M. Prost, L. Canaple, J. Samarut and J. Hasserodt, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 1413–1417.
- 20 G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 3rd edn, 2013, pp. 127–228.
- 21 D. Maiti and S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 17423–17429.
- 22 L. He, X. Yang, Y. Liu and L. Weiyang, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 8022–8027.
- 23 A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 2213–2228.
- 24 For selected examples, see: (a) C. Wei, R. Wang, C. Zhang, G. Xu, Y. Li, Q.-Z. Zhang, L.-Y. Li, L. Yi and Z. Xi, *Chem. – Asian. J.*, 2016, **11**, 1376–1381; (b) C. Zhang, L. Wei, C. Wei, J. Zhang, R. Wang, Z. Xi and L. Yi, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 7505–7508; (c) H. Zhang, C. Zhang, R. Liu, L. Yi and H. Sun, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 2029–2032; (d) S. K. Asthana, A. Kumar, Neeraj, Shweta and K. K. Upadhyay, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 3690–3694.
- 25 E. L. Smith and D. H. Spackman, *J. Biol. Chem.*, 1955, **212**, 271–299.
- 26 A. Erarslan and A. Güray, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1991, **51**, 181–195.
- 27 K. V. Lavrov, I. A. Zalunin, E. K. Kotlova and A. S. Yanenko, *Biochemistry*, 2010, **75**, 1006–1013.
- 28 J. B. Grimm and L. D. Lavis, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 6354–6357.
- 29 M. El Baraka, M. Deumié, P. Viallet and T. J. Lampidis, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1991, **56**, 295–311.
- 30 For selected reviews, see: (a) C.-H. Tung, *Biopolymers*, 2004, **76**, 391–403; (b) C. R. Drake, D. C. Miller and E. F. Jones, *Curr. Org. Synth.*, 2011, **8**, 498–520; (c) L. Chen, J. Li, L. Du and M. Li, *Med. Res. Rev.*, 2014, **34**, 1217–1241; (d) H.-Y. Hu, S. Gehrig, G. Reither, D. Subramanian, M. A. Mall, O. Plettenburg and C. Schultz, *Biotechnol. J.*, 2014, **9**, 266–281; (e) M. Garland, J. J. Yim and M. Bogyo, *Cell Chem. Biol.*, 2016, **23**, 122–136.
- 31 (a) K. Kolmakov, V. N. Belov, C. A. Wurm, B. Harke, M. Leutenegger, C. Eggeling and S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 3593–3610; (b) J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig and L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 1303–1310.
- 32 For a review, see: Y. Kushida, T. Nagano and K. Hanaoka, *Analyst*, 2015, **140**, 685–695.
- 33 (a) T. Pastierik, P. Šebej, J. Medalová, P. Štacko and P. Klán, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 3374–3382; (b) P. Horváth, P. Šebej, T. Šolomek and P. Klán, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 1299–1311.
- 34 (a) X. Chai, X. Cui, B. Wang, F. Yang, Y. Cai, Q. Wu and T. Wang, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 16754–16758; (b) X. Zhou, R. Lai, J. R. Beck, H. Li and C. I. Stains, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 12290–12293.
- 35 J. Liu, Y.-Q. Sun, H. Zhang, H. Shi, Y. Shi and W. Guo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 22953–22962.
- 36 For recent examples, see: (a) W. Pan, H. Yang, N. Li, L. Yang and B. Tang, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 6070–6073; (b) I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi and A. Ojida, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 2038–2044; (c) S.-Y. Li, L.-H. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu and X.-Z. Zhang, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 14520–14523; (d) Y. Wen, F. Xue, H. Lan, Z. Li, S. Xiao and T. Yi, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **91**, 115–121.
- 37 G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw and K. I. Goldberg, *Organometallics*, 2010, **29**, 2176–2179.

II.2.2. Travaux complémentaires - Détection d'une activité nitroréductase

Pour démontrer la versatilité de notre approche et par analogie avec nos travaux précédents sur la formation *in situ* des 7-hydroxy-2-iminocoumarines, nous avons envisagé la conception d'une sonde permettant la détection d'une activité NTR, qui pourrait par ailleurs trouver des applications dans le cadre de notre collaboration avec le département R&D Microbiologie de bioMérieux. En théorie, il suffit de remplacer la protection de type amide envisagée pour les sondes sensibles aux peptidases, par un carbamate de *para*-nitrobenzyle pour accéder à la sonde sensible à la NTR (Fig. II.13). Dans un premier temps, nous avons réalisé la synthèse du carbamate dérivé de la 3-iodoaniline mais celui-ci se dégrade dans les conditions de la réaction d'Ullmann utilisée pour la synthèse de l'éther de diaryle, conduisant à un brut réactionnel difficilement purifiable. Ainsi une autre stratégie de synthèse a été envisagée ; elle a consisté à réaliser le couplage d'Ullmann avec la 3-iodoaniline, sachant que les conditions utilisées ont été celles décrites par le groupe de S. L. Buchwald. Celles-ci permettent de réaliser la *O*-arylation de manière sélective et dans des conditions plus douces de chauffage. Le produit obtenu n'a pas été purifié (risque de cyclisation prématurée conduisant à un dérivé pyronine, notamment lors du traitement qui requiert une étape de neutralisation en milieu acide) et la protection de son aniline primaire en carbamate a été effectuée "one-pot". Ainsi, après retour à température ambiante du brut réactionnel, le chloroformiate de *para*-nitrobenzyle a été ajouté. La sonde **SD316** a été obtenue avec un rendement de 30% (non optimisé) sachant que la purification a consisté en une simple filtration sur silice après traitement aqueux.

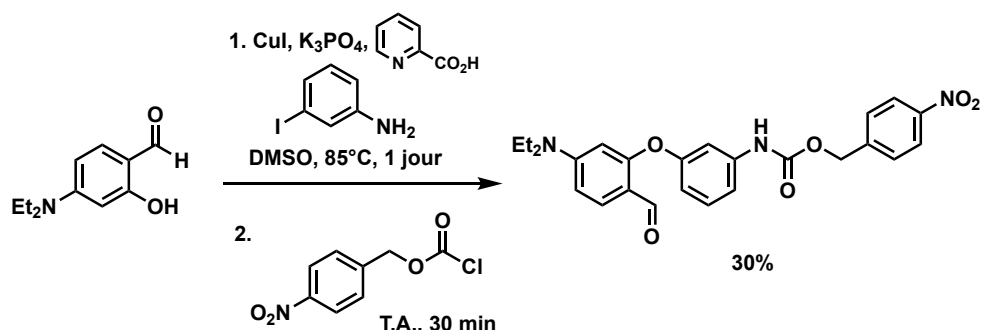


Figure II.12 - Synthèse "one-pot" de la sonde **SD316** permettant la détection de la NTR basée sur la formation d'une pyronine non-symétrique.

Sa structure et sa pureté ont été confirmées par des analyses RMN, ESI-MS et HPLC. La validation de son déclenchement *in vitro* par le biais d'incubations avec le couple NTR / NADH par mesures de fluorescence a ensuite été effectuée (Fig. II.14). En absence d'enzyme et comme attendu, **SD316** ne présente pas de fluorescence résiduelle dans le tampon phosphate (100 mM, pH 7,6). Curieusement, l'ajout de la NTR ne provoque pas d'augmentation d'émission de fluorescence à 520 nm (excitation à 495 nm) caractéristique de la pyronine dont la formation est attendue. L'absence de fluorescence s'explique sans doute par la présence dans le milieu d'un large excès de NADH (concentration finale de 50 μM contre 1 μM pour **SD316**) qui est connu pour réduire la double liaison $\text{C}=\text{C}$ des positions 8a/b et 9⁸⁹ de certaines rhodamines.

Ainsi, dans notre cas, la pyronine doit se former mais elle est immédiatement convertie en dihydropyronine non fluorescente. Pour confirmer cette hypothèse, l'ajout d'un large excès de persulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, concentration finale de $935 \mu\text{M}$) a été réalisé après une période d'incubation avec la NTR / NADH ; un accroissement significatif et régulier de l'émission de fluorescence à 520 nm est observé jusqu'à atteindre un palier au bout de 200 min ($3 \text{ h } 20$) avant de décroître régulièrement lors d'une incubation très prolongée avec l'excès d'oxydant. Le persulfate entraîne sans doute une suroxydation de la pyronine convertie alors en dérivé de type xanthone non fluorescent.

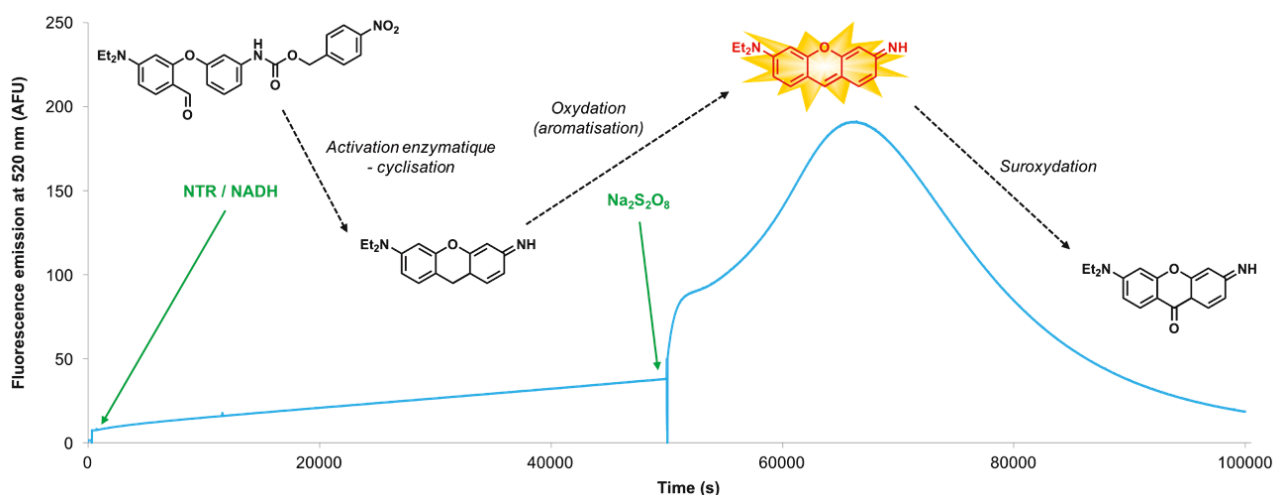


Figure II.13 - Validation *in vitro* de la sonde SD316 sensible à la NTR dont le mécanisme d'activation est basé sur la formation *in situ* de la pyronine. Evolution temporelle de l'émission de fluorescence à 520 nm ($\lambda_{\text{Ex}} = 495 \text{ nm}$, fente 5 nm) de la sonde ($1,1 \mu\text{M}$) dans le tampon phosphate ($\text{pH} = 7,4$) à 37°C , en présence de NTR ($0,1 \text{ U}$) et NADH ($50 \mu\text{M}$) jusqu'à 50000 s puis après ajout du persulfate de sodium ($930 \mu\text{M}$). Les molécules dessinées sont les espèces qui se forment et qui sont prédominantes aux différentes phases de la cinétique. Le mécanisme supposé de déclenchement de la fluorescence pour la sonde SD316 s'effectue via la formation d'une dihydropyronine suivie de son oxydation par l'anion persulfate. Cela est sans doute suivi d'une réaction de suroxydation en dérivé xanthone.

Cette expérience a mis en lumière la sensibilité du cœur pyronine vis-à-vis d'un réducteur rencontré en milieu biologique et interroge sur l'utilisation de la NTR comme enzyme modèle pour la validation de ce type de sondes. La formation *in situ* de rhodamines / rosamines semble être une bonne alternative pour la détection de ce type d'enzymes rédox (voir Fig. II.27B) considérant leur moindre sensibilité à la réduction. De plus, il paraît intéressant d'étudier les effets de différents oxydants (plus doux que l'anion persulfate) sur la dihydropyronine en milieu aqueux (nous pensons notamment à l'anion nitrite NO_2^- ou à l'anion periodate IO_4^-) afin de pouvoir accéder à des données intéressantes sur les propriétés rédox de la pyronine. A plus long terme, ces informations seront également utiles pour la mise au point des sondes nécessitant ou pas une étape de révélation de la fluorescence après réaction avec l'enzyme ciblée (voir II.4.3).

Ainsi, à la lumière de ces travaux, il apparaît clairement que la formation *in situ* d'une pyronine à partir d'un précurseur aldéhydique est fortement dépendante du milieu au sein duquel on souhaite mettre en oeuvre ce système de détection fluorogénique (pH, température, présence d'amines ou d'autres nucléophiles, présence d'oxydants ou de réducteurs, ...). Le second écueil n'est pas nouveau, il concerne l'hydrolyse non spécifique de la sonde, favorisée dans le cas où l'aniline de l'éther de diaryle est un trop bon groupe partant, et qui peut conduire à des faux-positifs. Pour éviter cela, on peut classiquement envisager une autre protection sur la seconde amine de la pyronine comme c'est le cas pour certains pro-fluorophores conventionnels à coeur xanthène (voir Fig. II.8).

De nouvelles voies de synthèse ainsi que de nouveaux précurseurs "cagés" compatibles, en théorie, avec la formation *in situ* de pyronines ont été envisagés parallèlement au développement des sondes duales et sont présentés dans la partie suivante.

II.3. Vers des sondes "dual-analytes" : premiers essais et problèmes rencontrés

II.3.1. Stratégie *N*-acylhémiaminal

Cette stratégie repose sur une idée proposée par A. Romieu dans une revue publiée en 2015 dans *Organic & Biomolecular Chemistry*¹¹⁰ pour réaliser de la détection "dual-analytes" via la formation *in situ* d'un cœur pyronine. Le principe de cette nouvelle génération de sondes fluorogéniques est présenté Fig. II.15. Le mécanisme repose sur la libération d'une imine réactive (déclenchée par un premier analyte) et sa réaction avec un cycle benzénique adjacent, enrichi en électrons par effet électro-donneur d'un groupement amino (ou éventuellement hydroxyle) préalablement déprotégé par réaction avec un second analyte. La dernière étape consiste en une aromatisation par élimination spontanée d'ammoniaque qui conduit à la pyronine fluorescente finale.

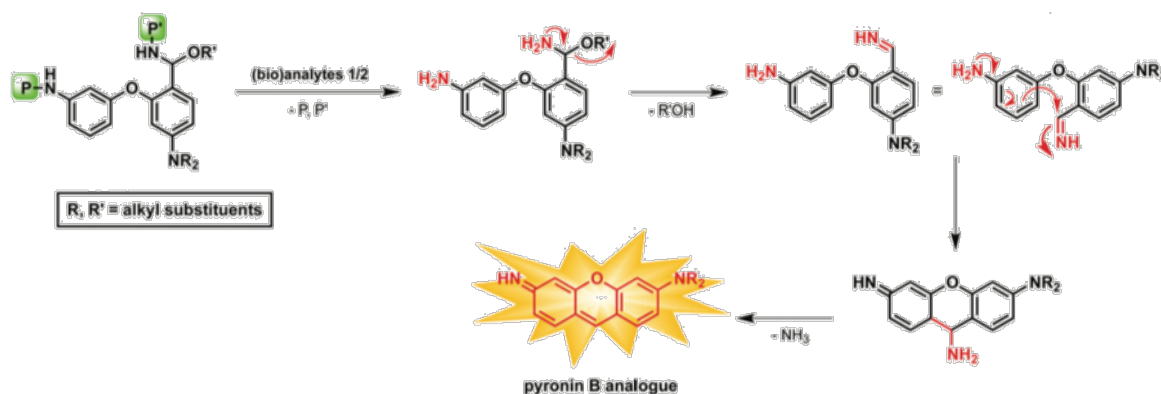


Figure II.14 - Stratégie proposée par A. Romieu pour la détection simultanée de deux analytes via la formation *in situ* d'une pyronine non-symétrique. Illustration issue de la revue [110].

En examinant attentivement la structure des sondes proposées par A. Romieu, il est clair que l'étape clé de leur synthèse est la formation de l'hémiaminal protégé sur son atome d'azote sous forme d'amide ou de carbamate (on parle alors de *N*-acylhémiaminal). La bibliographie concernant ce type de composés, révèle seulement deux méthodes de synthèse relativement versatiles. La première repose sur une réaction multicomposants (RMC) entre un nitrile, un agent nucléophile (généralement un alcool) et un chloroformiate (ou un chlorure d'acyle), catalysée par le réactif de Schwartz¹¹¹ et développée par le groupe de P. E. Floreancig. La seconde fait intervenir une réaction d'addition nucléophile d'un amide (ou un carbamate) sur un aldéhyde, catalysée par le tétraéthoxytitane (Ti(OEt)₄)¹¹² (Fig. II.16).

¹¹⁰ A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 1294-1306.

¹¹¹ a) S. Wan, M. E. Green, J.-H. Park et P. E. Floreancig, *Org. Lett.*, **2007**, (9), 5385-5388 ; b) R. A. Mosey et P. E. Floreancig, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, (10), 7980-7985.

¹¹² M. Li, B. Luo, Q. Liu, Y. Hu, A. Ganesan, P. Huang et S. Wen, *Org. Lett.*, **2014**, (16), 10-13.

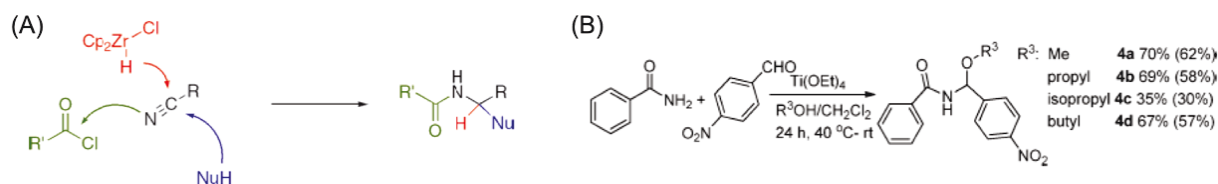


Figure II.15 - Stratégies de synthèse des N -acylhémiamines. (A) Utilisation du réactif de Schwartz pour catalyser une RMC conduisant à la formation d'un α -alkoxy carbamate. (B) Utilisation du tétraéthoxytane en présence d'un alcool primaire pour catalyser la réaction d'addition d'un amide (ou carbamate) sur un aldéhyde conduisant à un N -acylhémiamine. Illustrations issues des publications [111a] et [112].

La première sonde modèle "dual-analytes" envisagée a été une sonde NTR / PGA. Le choix de la NTR a été arrêté sur la base des dérivés nitroaryles commerciaux et donc qui n'exigeaient pas d'étapes de synthèse supplémentaires. La PGA a été choisie sur la base de la disponibilité commerciale du chlorure de phénylacétyle qui peut être directement engagé dans la RMC catalysée par le réactif de Schwartz. Ayant ces données en tête, un schéma rétrosynthétique a pu être proposé (Fig. II.17).

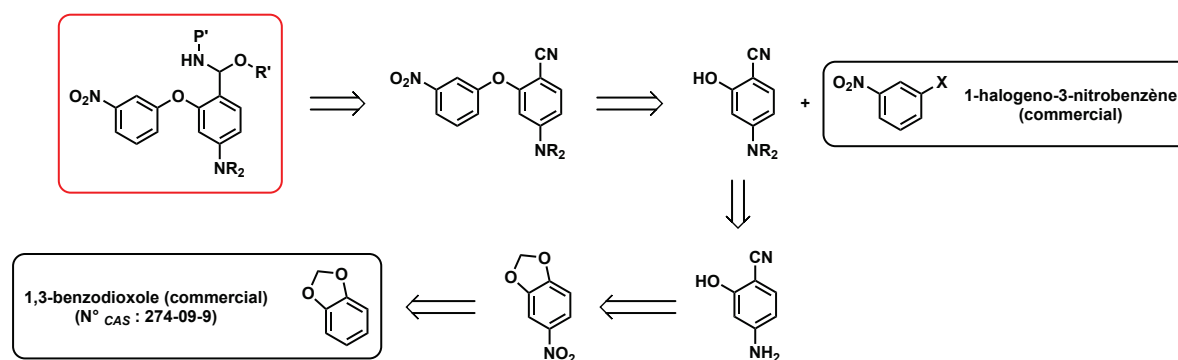


Figure II.16 - Schéma rétrosynthétique de la première sonde "dual-analytes" NTR / PGA ciblée.

En partant d'un composé commercial simple, le 1,3-benzodioxole et en s'appuyant sur des réactions déjà décrites dans la littérature¹¹³, le composé **SD126** a été obtenu avec un rendement satisfaisant (Fig. II.18). Par contre, les deux étapes suivantes ont été plus problématiques. Pour l'introduction du motif pyrrolidinyle (choisi car il a été montré que ce type de motif cyclique permettait d'améliorer les propriétés spectrales de certaines anilines fluorescentes sur lesquelles il était introduit, voir II.1.1), l'aniline réagit mal sur le 1,4-dibromobutane et les impuretés sont nombreuses. Concernant la formation du lien éther, c'est la faible réactivité du phénol combinée à la position *mé*ta de l'halogène par rapport au nitro qui nous ont contraints à adopter un chauffage à 150°C pour la réaction de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, pour finalement obtenir le produit désiré avec un rendement médiocre de 14%. Le groupement nitrile fortement électro-attracteur a eu un impact négatif à la fois sur la réactivité de l'aniline dans la réaction d'alkylation et sur celle du phénol lors de la synthèse de l'éther de diaryle (Fig. II.18).

¹¹³ a) Y. Imakura, K. Okimoto, T. Konishi, M. Hisazumi, J. Yamazaki, S. Kobayashi et S. Yamashita, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, (40), 1691-1696 ; b) E. Sasaki, H. Kojima, H. Nishimatsu, Y. Urano, K. Kikuchi, Y. Hirata et T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, (127), 3684-3685 ; c) X. Cai, C. Qian et H. Zhai, Curis Inc., *WO2008115719 A1*, **2008**.

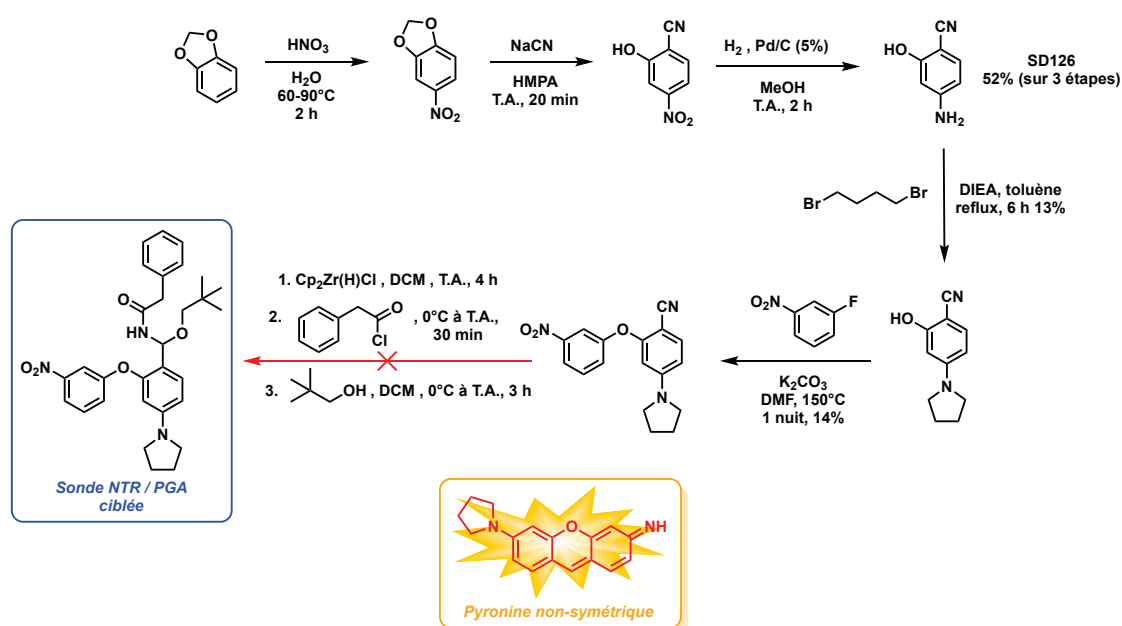


Figure II.17 - Schéma de synthèse pour obtenir une sonde "dual-analytes" NTR / PGA fondée sur la stratégie N-acylhémiamicinal. Structure de la pyronine non-symétrique formée par activation enzymatique de cette sonde.

Malheureusement, la dernière étape de synthèse n'a pas abouti. En effet, même si la formation d'hémiamicinals aromatiques possédant en position *para* un groupe électro-donneur de type méthoxyle a déjà été décrite, cela n'a jamais été le cas avec un groupe NR_2 (avec $\text{R} = \text{H}$ et / ou alkyle). La présence de ce substituant semble empêcher l'obtention d'un composé stable et isolable. Ceci peut s'expliquer par l'effet donneur d'électrons +M du groupe NR_2 qui favorise une réaction d'élimination 1,6 du groupement alkoxy (dans notre cas, dérivé de l'alcool néopentylique) qui s'apparente au processus d'auto-immolation des bras espaceurs de type PABA (voir 0.3.2).

Suite à ce résultat, nous avons pensé concevoir une sonde NTR / PGA qui se différencie de la précédente par la migration du site potentiellement activable par la NTR en *para* du N-acylhémiamicinal qui lui conserverait le motif PhAc (réactif vis-à-vis de la PGA). Cette présence d'un groupement électro-attracteur en position *para* du N-acylhémiamicinal évite alors le processus d'auto-immolation à l'origine de l'instabilité de la sonde. Ainsi, nous avons exploré la synthèse du composé modèle **SD203** (Fig. II.19). Elle a consisté à préparer un éther de diaryle déjà décrit dans la littérature¹¹⁴ et cela à partir de l'acide 2-chloro-4-nitrobenzoïque, puis de convertir la fonction acide carboxylique en aldéhyde *via* la réduction d'un amide de Weinreb (formé intermédiairement) par l'hydruide de diisobutylaluminium (DIBAL-H). Cela a permis de préparer le dérivé N-acylhémiamicinal selon la méthodologie décrite Fig. II.16B. Cependant, le composé **SD203** est difficilement utilisable pour la conception d'une sonde "dual-analytes" NTR / PGA car les conditions de déprotection du motif acétamide ne sont pas compatibles avec la stabilité du motif N-acylhémiamicinal. Cependant, si nous trouvons une enzyme capable d'hydrolyser cette acétamide (pourquoi pas la PGA ? Puisque nous avons mis en évidence au cours de nos travaux que cette enzyme était capable d'hydrolyser un lien L-leucinylamide, voir Article 2), on pourra valider la sonde **SD203** comme une sonde "triple-gated & dual-analyte".

¹¹⁴ J. Cui, J. Jin, Y.-H. Hsieh, H. Yang, B. Ke, K. Damera, P. C. Tai et B. Wang, *ChemMedChem*, **2013**, (8), 1384-1393.

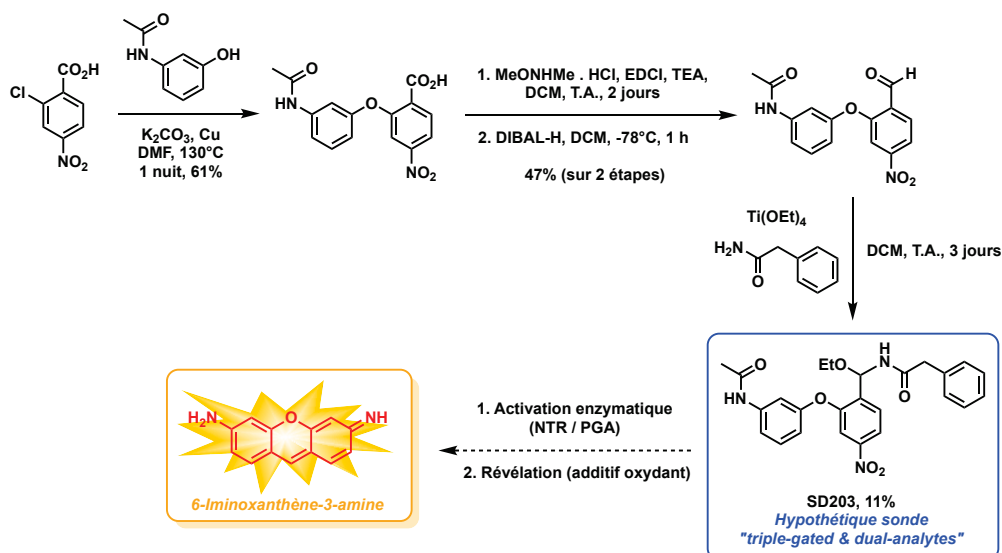


Figure II.18 - Schéma de synthèse permettant de valider la formation de *N*-acylhémiaminal dans le contexte d'un éther de diaryle et selon la méthodologie au $\text{Ti}(\text{OEt})_4$. Accès hypothétique à une sonde "triple-gated & dual-analytes" dont l'activation conduirait à la formation du coeur pyronine (6-iminoxanthène-3-amine).

Mais le point de difficulté interviendra lors de l'activation enzymatique de la sonde, en effet, si la réduction du groupement nitro par la NTR précède l'hydrolyse du lien phénylacétamide par la PGA, le processus d'auto-immolation pourrait à nouveau se produire pour conduire à un intermédiaire imine potentiellement convertible en pyronine. Ainsi, on observerait un signal de fluorescence même en présence d'une seule des deux enzymes, en l'occurrence, la NTR (faux positifs). Ce point ainsi que ceux évoqués brièvement ci-dessous rendent la stratégie *N*-acylhémiaminal difficilement viable. C'est pourquoi, elle a été abandonnée. En effet, sur ce type de composés, au regard de la position occupée par le groupement nitro et du test effectué sur les analogues "PABA-like" (voir II.3.2.), celui-ci n'est pas substrat des NTR. Enfin, s'ajoute la nécessité d'une étape de révélation par ajout d'un additif oxydant (comme vu en II.2.2.) lorsque du NADH est présent en excès dans le milieu.

II.3.2. Stratégie inspirée des bras espaceurs auto-immolables de type PABA ("PABA-like")

Les différents revers rencontrés avec la stratégie *N*-acylhémiaminal interrogent sur la possibilité de générer *in situ* le cœur xanthène d'une manière différente de celle que nous avons déjà publiée. Nous avons alors pensé à une stratégie inspirée du processus d'auto-immolation (selon un mécanisme d'élimination 1,6) des bras espaceurs de type PABA (voir 0.3.2). Le but étant, une fois l'aniline libérée (par l'un des deux analytes ciblés), de générer un intermédiaire de type "azaquinonemethide" capable de réagir avec le cycle aromatique adjacent enrichi en électrons par l'effet donneur +M du second groupement amino, démasqué par le second analyte ciblé. Une étape d'oxydation (spontanée ou assistée par un additif) sera alors nécessaire pour obtenir la pyronine fluorescente (Fig. II.20). Un autre avantage de cette approche est qu'elle peut permettre la conception d'agents thérapeutiques traçables (ou théranostiques) notamment pour la chimiothérapie cancéreuse car le processus d'auto-immolation pourra permettre la libération d'un agent cytotoxique en plus d'initier la formation du fluorophore. Dans la même veine, si le médicament cytotoxique est remplacé par une molécule fluorescente, la mise au point d'un schéma de détection à deux canaux d'émission différents ("dual readout") permettant le suivi respectif d'une ou des deux enzymes ciblées sera possible.

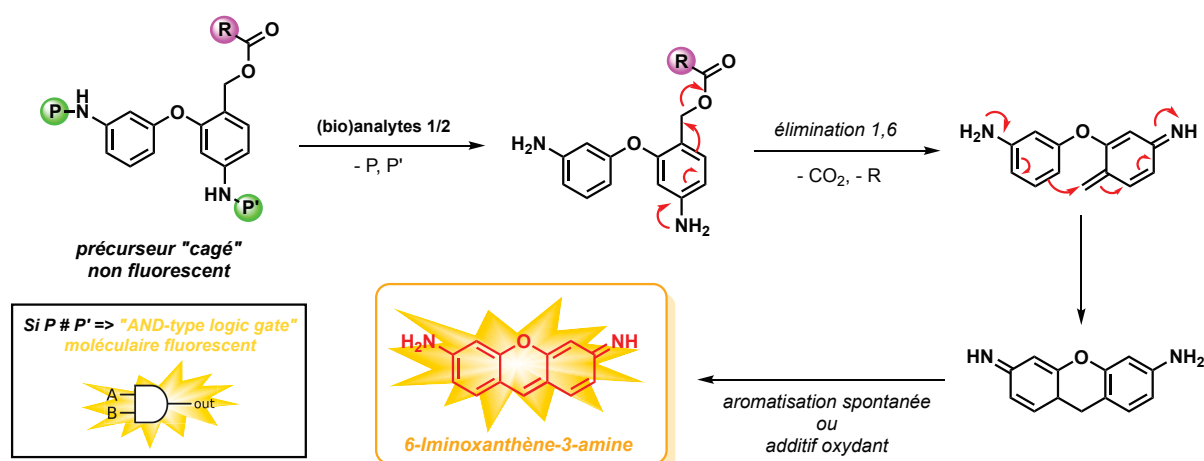


Figure II.19 - Schéma d'activation des sondes "dual-analytes" dont la formation du cœur pyronine (6-iminoxanthène-3-amine) repose sur une stratégie "PABA-like".

Afin d'obtenir rapidement une première preuve de principe, nous avons envisagé la conception d'une sonde simple au niveau de sa structure : il s'agit d'un système "dual-analytes" NTR / PGA pour lequel le groupement R est un motif hydrosolubilisant dans l'optique de faciliter les validations *in vitro* en tampon aqueux (voir Fig. II.21).

En ce qui concerne la synthèse de cette sonde, l'acide 2-chloro-4-nitrobenzoïque a été utilisé comme composé de départ et a été engagé dans un couplage d'Ullmann réalisé en présence de cuivre et de K₂CO₃.

Le produit de couplage a été converti en esters activés d'hydroxybenzotriazole (HOBT) par réaction avec le réactif de Castro (BOP), en présence de DIEA¹¹⁵ avant d'être réduit en alcool primaire par l'action de NaBH₄. Le dérivé alcool benzylique est obtenu avec un rendement global de 6% sur les trois étapes. La tentative pour obtenir la sonde initialement ciblée, en faisant réagir l'alcool avec du phosgène et l'acide 2-aminoéthane-1,1-disulfonique¹¹⁶ (sous forme de sel de tributylammonium en solution dans la NMP) n'a pas abouti et le dérivé chloré (non isolé) est formé quantitativement dans le milieu réactionnel. Dans le but de valoriser ce produit non désiré, nous avons alors pensé faire une réaction S_N2 avec une amine tertiaire de façon à introduire un motif hydrosolubilisant cationique et qui présente en outre l'avantage d'être un bon nucléofuge. Ainsi, un large excès de *N*-méthylmorpholine (NMM) a été introduit dans le mélange réactionnel et le composé **SD242** a été isolé avec un rendement de 20% après purification par HPLC semi-préparative et lyophilisation.

La sonde **SD242** a pu être testée *in vitro* avec les deux enzymes commerciales (NTR / NADH et PGA) selon des modes d'incubation séquentiel ou simultané. Malheureusement, dans tous les cas, aucun signal de fluorescence n'a pu être détecté. Des analyses HPLC-MS des bruts enzymatiques ont confirmé que la PGA était capable d'hydrolyser le lien phénylacétamide de **SD242** mais à l'inverse la NTR n'est pas capable de réduire le nitroaryle. A notre connaissance, il n'existe pas de sondes fluorogéniques pour la détection de la NTR, possédant un motif de déclenchement de type *para*-nitrobenzyle substitué sur son cycle benzénique par d'autres groupements ; ceci semble être en accord avec nos observations expérimentales.

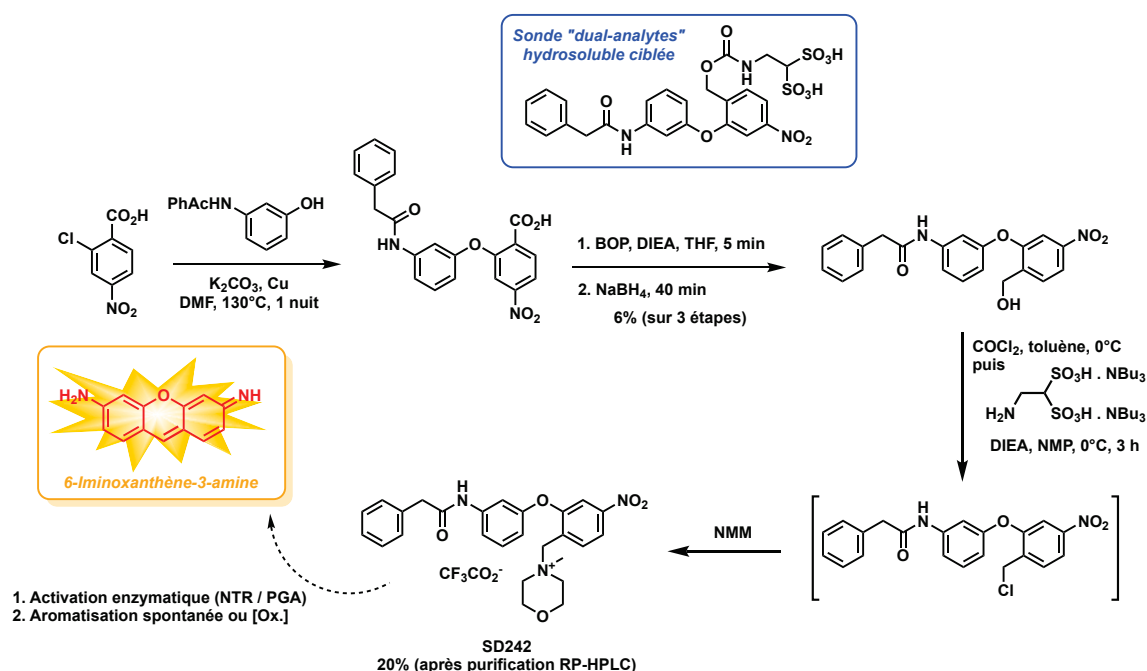


Figure II.20 - Structure et schéma de synthèse de la sonde "dual-analytes" NTR / PGA ciblée mais non obtenue. Sonde alternative SD242, fondée sur la stratégie "PABA-like".

¹¹⁵ a) B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin et C. Selve, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 1219-1222 ; b) J. Coste et J.-M. Campagne, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, (36), 4253-4256 ; c) J.-R. Dormoy, B. Castro, F. Rabanal et E. Giralt, Benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium Hexafluorophosphate, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, **2001**.

¹¹⁶ a) A. Romieu, D. Tavernier-Lohr, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire et P.-Y. Renard, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, (51), 3304-3308 ; b) A. Romieu, C. Massif, S. Rihh, G. Ulrich, R. Ziessel et P.-Y. Renard, *New J. Chem.*, **2013**, (37), 1016-1027.

En modifiant la nature des deux sites de déclenchement, des sondes "dual-analytes" ciblant d'autres paires d'enzymes pourraient certainement être obtenues ; cette approche vaudra sans doute la peine d'être explorée dans le futur pour des applications bien précises. En attendant, une sonde "mono-analyte" ciblant la PGA mais possédant deux sites de déclenchement a été conçue en adoptant une stratégie similaire (Fig. II.22) ; il y a effectivement un intérêt croissant pour les pro-fluorophores possédant plusieurs sites de déclenchement réactifs vis-à-vis du même analyte (voir 0.2.2). Ainsi, le groupement nitro de l'acide 2-chloro-4-nitrobenzoïque a été réduit avec un rendement quantitatif puis l'aniline formée a été acylée par traitement avec le chlorure de phénylacétyle dans les conditions de Schotten-Baumann (rendement de 51%). Le composé obtenu a été engagé dans la séquence couplage d'Ullmann / réduction du CO₂H pour obtenir le dérivé alcool benzylique **SD249** avec un rendement global de 15% sur les trois étapes. A ce stade, un seul essai visant à introduire un groupe nucléofuge hydrosolubilisant de type *N*-méthylmorpholinyle a été entrepris et a échoué. Cette synthèse doit être répétée pour obtenir la sonde désirée.

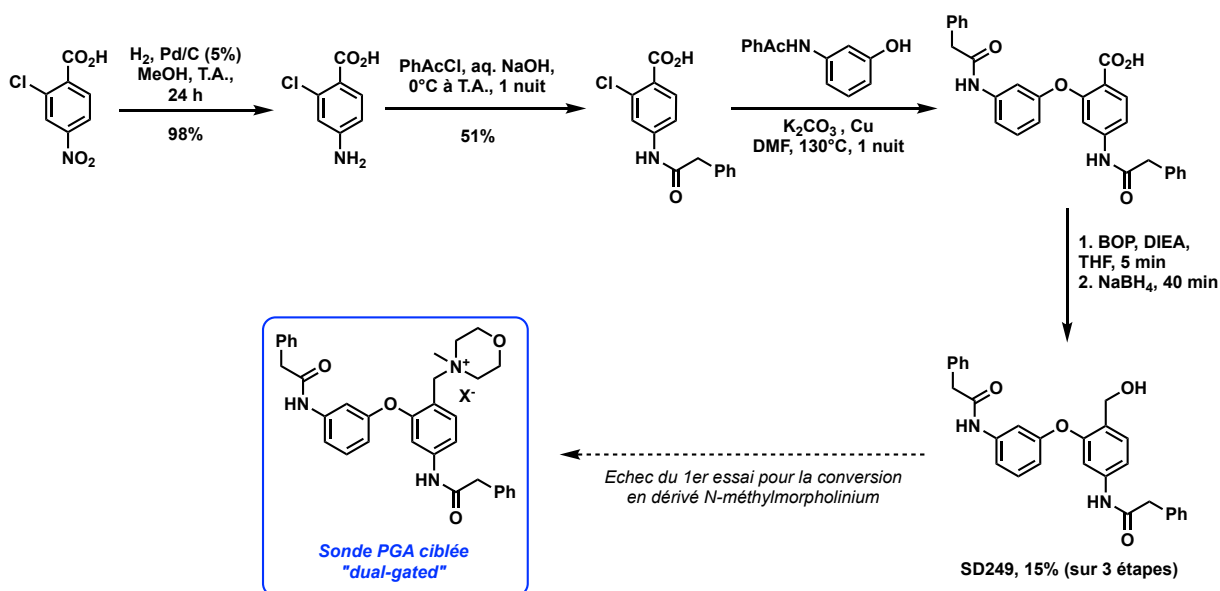


Figure II.21 - Schéma de synthèse pour accéder à une sonde "mono-analyte" PGA de type "dual-gated", fondée sur la stratégie "PABA-like".

Il est tout de même intéressant de préciser que même si tous ces travaux n'ont pas permis d'accéder à des sondes opérationnelles, les schémas de synthèse mis au point pourront être facilement modulés pour accéder à des éthers de diaryle fonctionnalisés avec un motif formyle et ainsi accéder à un large éventail de sondes similaires à celles décrites dans l'article 2 mais possédant des propriétés physico-chimiques et spectrales optimisées.

II.3.3. Piste pour une autre voie de synthèse des sondes à cœur éther de biaryle

Les synthèses décrites précédemment impliquent l'introduction des motifs de déclenchement lors des premières étapes et surtout avant l'étape critique de synthèse de l'éther de diaryle *via* le couplage d'Ullmann. Cette chronologie n'est pas nécessairement la panacée du fait des conditions dures requises pour cette réaction, dont l'efficacité est également très substrat-dépendante. Pour la conception de sondes fluorogéniques possédant des motifs de déclenchement plus fragiles (typiquement des dérivés carbonate ou carbamate), une stratégie différente peut être explorée en émettant l'hypothèse qu'un groupement méthyle en position *ortho* du pont éther de diaryle et en position *para* du motif de déclenchement (amide, carbonate ou carbamate) puisse être oxydé dans des conditions n'affectant pas l'intégrité de ces groupes protecteurs. L'exploration de cette voie (Fig. II.23) vient tout juste de débiter et cette fois, le couplage d'Ullmann (réalisé selon la méthode du groupe de S. L. Buchwald pour éviter la réaction de *N*-arylation) fonctionne parfaitement (rendement quasi-quantitatif) avec les substrats phénol et halogéno-aryle choisis. Suite à l'obtention de cet intermédiaire, un essai d'oxydation au DDQ (selon les méthodes décrites par le groupe de D.V. Mane en milieu aqueux acide¹¹⁷ et par le groupe de B. Lal dans le 1,4-dioxane¹¹⁸) a été réalisé. Si la cyclisation prématurée en pyronine en milieu aqueux acide pouvait être envisagée suite aux résultats d'activation des sondes publiés **SD209** et **SD304**, celle observée dans le 1,4-dioxane était loin d'être prévisible. Le rendement de 3% en pyronine isolée obtenu avec ces deux méthodes s'explique par le traitement aqueux basique utilisé, qui a sans doute dégradé la pyronine (par addition nucléophile de l'ion hydroxyde sur la position 9). A cela se sont ajoutées les pertes classiquement obtenues lors des étapes de purification par HPLC semi-préparative et lyophilisation. Cette stratégie devra être réexaminée et les conditions d'oxydation et de purification optimisées afin de pouvoir obtenir les sondes fonctionnalisées avec le motif formyle. Notons que l'accès à ces sondes pourrait aussi s'effectuer *via* une bromation sélective (au NBS par exemple) de la position benzylique, suivie d'une substitution pour introduire le groupe nucléofuge (dans le cas d'une sonde "PABA-like") ou d'une oxydation en carbonyle pour obtenir le même type de sondes que celles publiées précédemment.

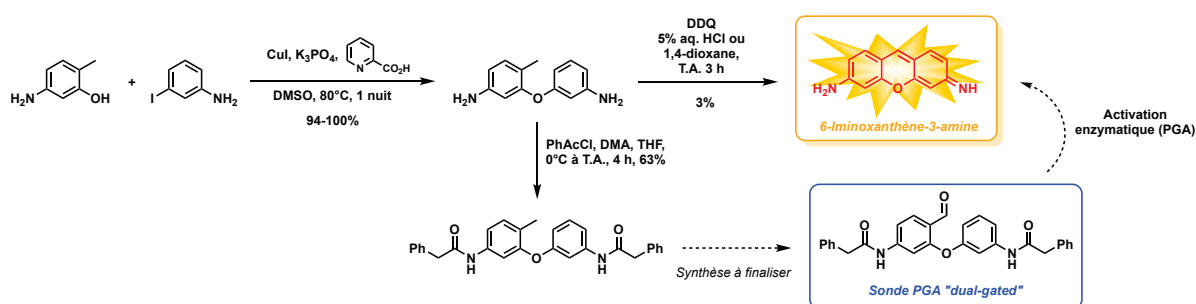


Figure II.22 - Nouvelle voie de synthèse envisagée pour accéder à une sonde "mono-analyte" PGA de type "dual-gated" et applicable aux autres stratégies suivant la ou les voie(s) d'oxydation possible(s).

¹¹⁷ M. S. Mane, R. S. Balaskar, S. N. Gavade, P. N. Pabrekar, M. S. Shingare et D. V. Mane, *Chin. Chem. Lett.*, **2011**, (22), 1039-1042.

¹¹⁸ B. Lal, R. M. Gidwani, J. Reden et N. J. De Souza, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, (25), 2901-2904.

II.3.4. Conclusion sur les stratégies mises en œuvre pour la synthèse *in situ* du cœur pyronine

Même si nous avons rencontré plusieurs échecs, ce travail nous a permis d'identifier deux voies prometteuses pour accéder à des sondes dont le mécanisme d'activation conduit à la formation d'un cœur pyronine fluorescent. Celle décrite en détails dans la publication et celle inspirée du mécanisme d'auto-immolation des bras espaceurs de la famille du PABA très populaires en chimie médicinale (voir 0.3.2).

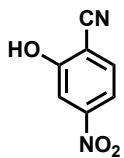
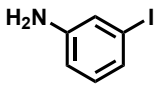
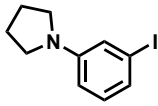
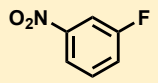
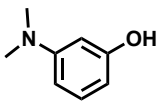
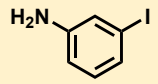
Nous pensons que la première approche devrait être transposable à un large éventail d'analytes possédant une réactivité chimique intrinsèque et bien identifiée ; elle semble en outre applicable à la formation *in situ* de dérivés xanthène substitués en position 9 par un aryle (typiquement, des rhodamines et des rhodols) même si des ajustements structuraux seront sans doute nécessaires pour disposer au sein des sondes d'un carbonyle suffisamment électrophile et réactif lors du processus de cyclisation.

Concernant la validation et la valorisation de la stratégie "PABA-like", on peut s'attendre à deux difficultés : (1) la réaction de l'intermédiaire "azaquinonemethide" avec le cycle benzénique adjacent, en compétition avec les réactions intermoléculaires impliquant des molécules d'eau ou d'autres nucléophiles présents dans le milieu biologique qui empêcherait la formation de la pyronine ; (2) la cinétique d'oxydation spontanée de l'intermédiaire dihydropyronine car si celle-ci est trop lente dans le milieu considéré, seules des applications ciblant des analytes à caractère oxydant pourront être considérées. Une exception concerne des tests *in vitro* pour lesquelles l'ajout d'un oxydant exogène agissant comme agent de révélation de la fluorescence est possible.

Notons également qu'en dépit de structures en apparence simple, la synthèse des précurseurs "cagés" n'est pas forcément aisée en raison des difficultés inhérentes à la préparation des éthers de diaryle mixtes et dérivés de benzène poly-substitués. Enfin, la transposition de notre stratégie récemment publiée dans *Organic & Biomolecular Chemistry*, à la détection *in cellulose* ou *in vivo* de protéases identifiées comme des biomarqueurs pertinents de certaines pathologies, ne sera pas immédiate et va sans doute nécessiter des optimisations structurales des précurseurs "cagés" pour améliorer les cinétiques d'activation (voir II.4.2) et ainsi éviter une diffusion trop importante de la pyronine formée qui l'éloignerait de la zone d'intérêt que l'on souhaite imager.

II.3.5. Complément d'information sur les problèmes de synthèse rencontrés

Dans ce paragraphe, les problèmes de synthèse rencontrés lors des réactions de couplage d'Ullmann mises en œuvre pour la synthèse des éthers de diaryle mixtes seront exposés. Lors de la synthèse conventionnelle des cœurs xanthène, la liaison C-O se forme en milieu acide suite à une réaction de déshydratation. Elle a lieu après la formation de la liaison C-C (la future position 9 qui constitue déjà un pont entre les deux cycles benzéniques). Elle est donc facilitée par la formation du cycle à 6 chaînons qui du point de vue thermodynamique constitue une force motrice pour la réaction. Or dans notre cas, la formation du lien carboné entre les deux cycles benzéniques constitue un évènement chimique clé pour la formation *in situ* de la pyronine et il joue donc un rôle majeur dans la réussite de notre approche de détection fluorogénique. Ce point influence directement la stratégie de synthèse des sondes envisagées, qui sera radicalement différente de celle généralement employée pour la synthèse des fluorophores de la famille des xanthènes. Ainsi, il a fallu explorer la chimie des éthers de diaryle mixtes¹¹⁹. Les nombreuses voies de synthèse imaginées et explorées au cours de nos travaux nous ont contraints à tester un large panel de conditions en fonction de la structure / réactivité des substrats impliqués. Les résultats sont résumés dans les cinq tableaux ci-dessous.

Substrat phénolique	Substrat portant l'halogène	Conditions*				Résultats et observations
		Base	Solvant	Temp.	Cat. / Lig.	
		K ₃ PO ₄	DMSO	80°C	CuI / Pic	Pas de réaction (2 jours), même à 120°C
		K ₂ CO ₃	DMF	90°C	-	Pas de réaction même à 100°C et 150°C
		K ₂ CO ₃	DMF	90°C	-	Pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	150°C	-	Pas de réaction
		Cs ₂ CO ₃	DMF	60°C	-	Le substrat phénolique** est triflaté (Tf ₂ O, TEA, DCM) avant le couplage, pas de réaction
		K ₃ PO ₄	DMSO	80°C	CuI / Pic	13% , à 120°C : pas d'influence du chauffage à T°C plus élevée

¹¹⁹ Pour des articles et des revues sur le sujet, voir : a) R. F. P. Comdom et M. L. D. Palacios, *Synth. Commun.*, **2003**, (33), 921-926 ; b) R. Frlan et D. Kikelj, *Synthesis*, **2006**, 2271-2285 ; c) A. Casitas et X. Ribas, Insights into the mechanism of modern Ullmann-Goldberg coupling reactions, *Copper-Mediated Cross-Coupling Reactions*, John Wiley & Sons, 1ère édition, **2014** ; d) C. Sambigiato, S. P. Marsden, A. J. Blacker et P. C. McGowan, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, (43), 3525-3550 ; e) Z. Huang et J.-P. Lumb, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 11543-11547.

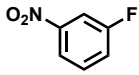
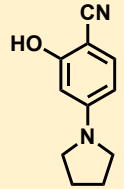
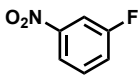
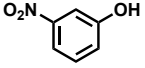
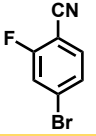
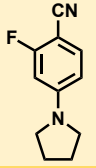
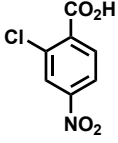
		K ₂ CO ₃	DMF	150°C	-	24% , à 80°C, 100°C et sous micro-ondes : pas de réaction, suivi HPLC-MS
		K ₃ PO ₄	DMSO	80°C	CuI / Pic	43% , réaction non quantitative, suivi HPLC-MS
		K ₂ CO ₃	DMF	150°C	-	14%

Tableau II.3 - Réactivité des ortho-cyanophénols dans le but de former un éther de diaryle.
*abréviations utilisées et valables pour tous les tableaux : Temp. = température de réaction ; Cat. = catalyseur ; Lig. = ligand ; Pic = acide picolinique. ** c'est le 2-cyano-5-nitrophénol qui est triflaté et qui subit la réaction de substitution. Protocole général : les solides sont introduits dans un tube scellé, mis sous argon avant introduction du solvant et des réactifs liquides, le tube est vissé et le tout est chauffé à la température indiquée pendant une nuit. Pour les quantités de réactifs, les équivalents sont les mêmes que pour les réactions publiées sauf mention du contraire, l'échantillon brut (dans l'acétonitrile) est filtré avant l'analyse HPLC-MS.

Ce premier tableau précise des éléments de réactivité du phénol portant un groupement nitrile en position *ortho*. Ainsi, la présence d'un groupement nitro fortement électro-attracteur en position *mé*ta semble empêcher toute réaction de couplage aux températures testées (entrées 1-4). En revanche, un groupement électro-donneur (amino ou pyrrolidinyle) sur cette même position permet d'obtenir les produits de couplage même si les rendements sont faibles et fortement dépendants de la méthode et de la nature du dérivé benzénique qui subit formellement l'attaque nucléophile (entrées 5-8).

Substrat phénolique	Substrat portant le groupe partant	Conditions				Résultats et observations
		Base	Solvant	Temp.	Cat. / Lig.	
		K ₂ CO ₃	MeCN	85°C	-	57%
		K ₂ CO ₃	MeCN	85°C	-	Pas de réaction, essai KF / Al ₂ O ₃ , éther-couronne 18-C-6, MeCN : pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	<10% et impur ; essai aux micro-ondes : dégradation
		EtONa	DMF	130°C	Cu	Pas de réaction
		-	DMA	180°C	Cu	Pas de réaction ; déprotonation en amont (EtONa, MeOH)

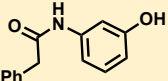
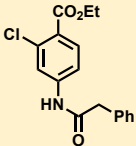
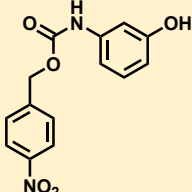
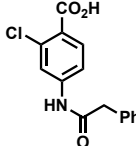
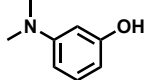
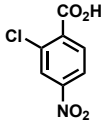
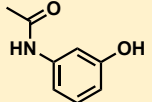
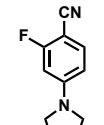
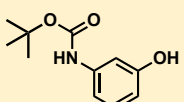
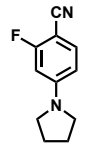
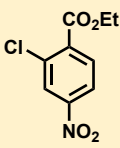
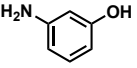
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Conversion médiocre chauffe à 160°C : dégradation
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	15% d'alcool après deux étapes supplémentaires (activation par le BOP et réduction au NaBH ₄)
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Déprotection du carbamate ; formation du produit possédant l'aniline libre mais très impur
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	61%
		K ₂ CO ₃	NMP	80°C	-	Pas de réaction à 140°C : <10%
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Produit déprotégé majoritaire détecté lors du suivi HPLC- MS ; DCM / TFA sur le brut de réaction : 45% en aniline libre
		K ₃ PO ₄	DMSO	130°C	CuI / Pic	Trop peu de produit détecté lors du suivi HPLC-MS

Tableau II.4 - Essais de couplage entre des phénols monosubstitués en position *mé*ta et des dérivés benzéniques tri-substitués présentant un halogène comme groupe partant en position *ortho* d'un groupement cyano, CO₂H ou CO₂Et.

Ce second tableau résume les essais de couplage entre des phénols monosubstitués en position *mé*ta et des dérivés benzéniques tri-substitués présentant un halogène comme groupe partant en position *ortho* d'un groupement cyano, CO₂H ou CO₂Et. Notons que le CO₂H est un groupement activateur dans les conditions du couplage (en présence d'une base, c'est la forme -CO₂⁻ qui prédomine) contrairement au cyano ou au motif ester éthylique, et qu'il peut jouer le rôle de ligand du cuivre. Excepté les réactions déjà décrites dans la littérature (entrées 1 et 10), peu de réactions fonctionnent correctement, les entrées 2-5 montrent l'influence négative du groupement nitro en position *mé*ta soit du phénol quel que soit le partenaire multi-substitué portant l'halogène sauf dans le cas où celui-ci porte un autre halogène en *mé*ta (entrée 1).

Les entrées 6 et 7 montrent l'influence de l'effet électronique du groupe en *ortho* de l'halogène qui s'additionne à l'effet négatif du nitro pour la ligne 13. Les entrées 6 et 9 nous indiquent qu'un chauffage à une température de 130°C conduit à un clivage prématuré du carbamate (*para*-nitrobenzyle ou *tert*-butyle) protégeant l'aniline primaire.

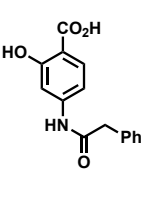
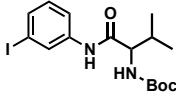
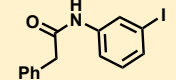
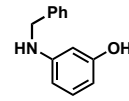
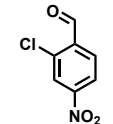
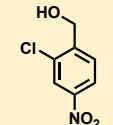
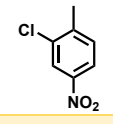
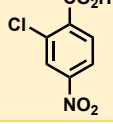
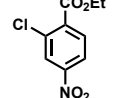
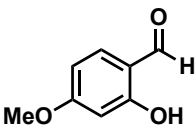
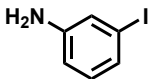
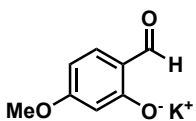
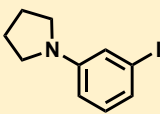
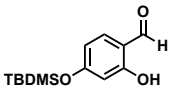
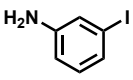
Substrat phénolique	Substrat portant le groupe partant	Conditions				Résultats et observations
		Base	Solvant	Temp.	Cat. / Lig.	
		K ₃ PO ₄	DMSO	90°C	CuI / Pic	Pas de réaction ; chauffe à 100-110-120°C : pas de réaction et clivage du Boc
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Pas de réaction
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Conversion HPLC non quantitative
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Réaction de trans-estérification majoritaire

Tableau II.5 - Essais pour étudier l'influence du degré d'oxydation du substituant carboné du 2-chloro-4-nitrotoluène sur le couplage C-O.

Ce troisième tableau rassemble d'autres essais de couplage qui permettent d'étudier l'influence du degré d'oxydation du substituant carboné du 2-chloro-4-nitrotoluène pour la substitution de l'atome de chlore par le phénol. Ainsi, seul l'acide carboxylique (sous forme de carboxylate lors de la réaction) donne un résultat satisfaisant et suggère que la coordination des espèces cationiques du cuivre (impliquées dans le mécanisme) par ce motif doit favoriser la réaction, alors que les effets électroniques donneur-attracteur des autres substituants semblent être relégués au second plan. Les deux premières entrées semblent suggérer une liaison hydrogène intramoléculaire entre le phénol et le carbonyle de l'acide limitant ainsi la réactivité du phénol.

Substrat phénolique	Substrat portant le groupe partant	Conditions				Résultats et observations
		Base	Solvant	Temp.	Cat. / Lig.	
		K ₃ PO ₄	DMSO	80°C	CuI / Pic	Pas de réaction ; chauffage à 130°C : OK, 28% après cyclisation TFA / H ₂ O
		K ₃ PO ₄	DMSO	130°C	CuI / Pic	Pas de réaction : réaction de Hammick ¹²⁰
		K ₃ PO ₄	DMSO	110°C	CuI / Pic	Réaction non quantitative, non améliorée par chauffage à 130°C
		K ₂ CO ₃	DMF	130°C	Cu	Réaction non quantitative, semble mieux que l'entrée 3
		K ₃ PO ₄	DMSO	110°C	CuI (2 éq)	Même profil que l'entrée 3
		K ₂ CO ₃	NMP	150°C	Cu (Cat. et 1 éq.)	Réaction non quantitative avec moins d'alcool consommé et peut-être de la dégradation du dérivé iodé ; la quantité de Cu n'a pas eu d'influence
		K ₃ PO ₄	DMSO	110°C	CuI / 8-quinolinol	Réaction non quantitative et moins sélective que l'entrée 3 et non améliorée par chauffage à 130°C (plus d'impuretés formées)
		K ₃ PO ₄	Toluène	110°C	CuI / Pic	Pas de réaction
				K ₃ PO ₄	DMSO	80°C
K ₃ PO ₄	DMSO			80°C	CuI / Pic	Pas de réaction

¹²⁰ Décarboxylation thermique de l'acide picolinique qui réagit sur l'aldéhyde (produit détecté en suivi HPLC-MS)

II. 3. Vers des sondes "dual-analytes" : premiers essais et problèmes rencontrés

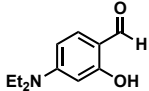
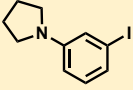
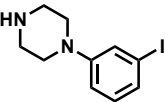
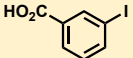
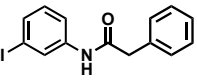
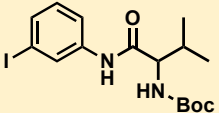
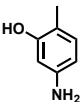
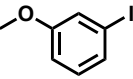
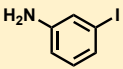
		K ₃ PO ₄	DMSO	85°C	CuI / Pic	OK, mais purification compliquée et obtention de la pyronine
		K ₃ PO ₄	DMSO	85°C	CuI / Pic	Réaction non totale : l'alcool finit par disparaître totalement à 130°C (possible dégradation) - obtention du produit cyclisé à 50% après traitement au BF ₃ .OEt
		K ₃ PO ₄	DMSO	130°C	CuI / Pic	Réaction donnant un brut réactionnel complexe : obtention du produit cyclisé à 5% après traitement au BF ₃ .OEt
		K ₃ PO ₄	DMSO	90°C	CuI / Pic	Pas assez de produit désiré
		K ₃ PO ₄	DMSO	130°C	CuI / Pic	54%
		K ₃ PO ₄	DMSO	90°C	CuI / Pic	Réaction non quantitative : 11% après déprotection et purification HPLC, dégradation à 130°C
		K ₃ PO ₄	DMSO	80°C	CuI / Pic	75%
		K ₃ PO ₄	DMSO	80°C	CuI / Pic	94-100%

Tableau II.6 - Essais de O-arylation effectués principalement sur les dérivés 2,4-dihydroxybenzaldéhyde et les deux essais reprenant des structures explorées par le groupe de S. L. Buchwald.

Ce dernier tableau résume les essais de réaction de O-arylation effectués principalement sur les dérivés de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde dont le groupement hydroxyle en position 4 est protégé. Les dérivés 4-OMe semblent réagir plus efficacement si la déprotonation du phénol est réalisée avant la réaction couplage et les conditions optimales sont K_2CO_3 / DMF / Cu / 130°C. Pour les dérivés possédant d'autres groupes protecteurs sur la position 4-OH, la réaction de couplage est plus problématique car les conditions utilisées provoquent par exemple le clivage prématuré de l'éther de TBDMS. Concernant le 4-(*N,N*-diéthylamino)salicylaldéhyde, la méthode K_3PO_4 / DMSO / CuI / acide picolinique semble efficace même si elle semble se limiter au dérivés iodés (d'après les publications, l'emploi d'un dérivé bromé requiert un chauffage plus important et donne de moins bons rendements). Enfin, les deux dernières entrées présentent la première étape de synthèse des sondes présentées dans la Fig. II.23 et pour lesquelles le couplage d'Ullmann précède l'étape d'oxydation requise pour introduire le groupe formyle. Par analogie avec les travaux du groupe de S. L. Buchwald¹²¹, les éthers de diaryle ciblés sont obtenus avec d'excellents rendements.

II.3.6. Complément d'information sur les problèmes de déclenchement des sondes

Concernant les sondes synthétisées et publiées, le souci le plus évident pour de futures études *in cellulo* est celui lié aux cinétiques de formation du cœur fluorescent qui devrait être rédhibitoire pour obtenir une bonne résolution spatio-temporelle dans le cadre de la détection et du suivi d'événements (biochimiques) au sein de la cellule. En effet, les cinétiques d'activation de nos sondes sont lentes ; pour obtenir une réponse significative, il faut compter 2 h 30 pour **SD304** et 3 h pour **SD209** (l'étape cinétiquement déterminante n'est pas l'activation enzymatique mais bien le processus intramoléculaire de cyclisation / aromatisation aboutissant à la formation de la pyronine), elles ne donneront donc surement pas d'informations pertinentes sur la localisation de l'analyte. Elles peuvent tout de même servir en tant que sondes qualitatives si elles sont internalisées par les cellules cibles.

Le second problème est directement lié au potentiel rédox de la molécule fluorescente formée, ainsi dans notre cas, le NADH (utilisé comme cofacteur de la NTR) est un réducteur suffisamment puissant pour convertir la pyronine formée en dérivé dihydro non-fluorescent. En milieu cellulaire, où l'équilibre rédox est très important pour la survie et pour l'activation ou non de certains processus cellulaires, il peut être intéressant d'étudier le devenir de ce type de sondes, mais ce point semble compromettre leur utilisation dans des applications exigeant une analyse quantitative. Ainsi, l'étude approfondie du comportements rédox de toutes les sondes basées sur ce modèle d'activation semble un passage obligé et pourrait aboutir à la conception des sondes "dual-analytes" (voir II.4.3) pour la détection simultanée d'une activité enzymatique et d'une ROS ou d'une paire de ROS.

¹²¹ a) D. Maiti et S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, (131), 17423-17429; b) D. Maiti et S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.*, **2010**, (75), 1791-1794.

II.4. Perspectives immédiates

II.4.1. Application du concept de formation *in situ* de pyronines à l'imagerie de fluorescence *in vivo*

Afin de démontrer la viabilité de notre approche dans un contexte biologique réel, nous envisageons à moyen terme d'appliquer le concept de synthèse *in situ* du cœur pyronine à des problématiques d'imagerie moléculaire *in vivo* (petit animal). En nous inspirant de travaux publiés par les groupes de C. R. Bertozzi et C. J. Chang d'une part et le groupe de E. A. Dubikovskaya d'autre part¹²², qui concernent le développement d'une nouvelle approche en imagerie de bioluminescence mettant en jeu la formation *in situ* d'une luciférine, à partir de précurseurs "cagés" exogènes activés par l'analyte (ou la paire d'analytes) que l'on souhaite détecter, nous envisageons une sonde "dual-analytes" permettant d'imager des zones d'inflammation aiguë, en ciblant deux biomarqueurs pertinents : H₂O₂ et une protéase de la famille des caspases (typiquement, la caspase-8).

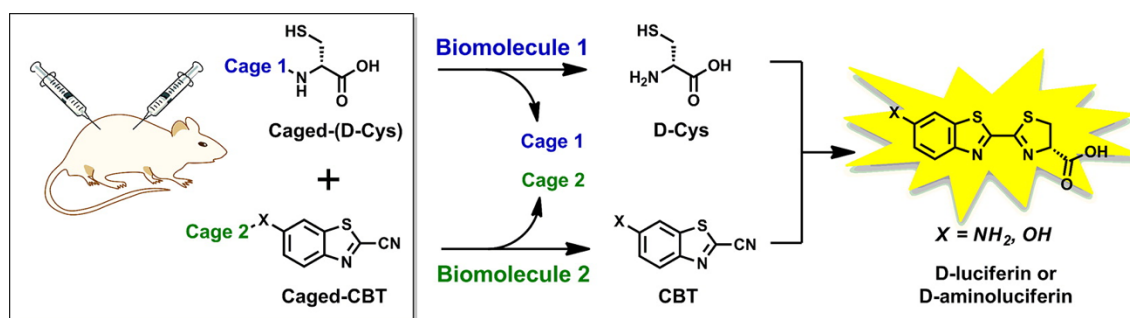


Figure II.23 - Principe de l'imagerie de bioluminescence *in vivo* mettant en jeu le principe de synthèse *in situ* d'une luciférine, déclenchée par la paire d'analytes que l'on souhaite détecter. Illustration issue de la référence [120a].

A partir de la structure de nos sondes "mono-analyte" **SD209** et **SD304**, et en utilisant les motifs de déclenchement classiquement utilisés pour réagir avec (et détecter) les analytes H₂O₂ et caspase-8, nous pouvons proposer un précurseur doublement "cagé" répondant au cahier des charges fixé (Fig. II.25). Il est important de préciser que nous sommes conscients que les propriétés spectrales de l'analogie de pyronine formé (à partir d'un précurseur "cagé" de type éther de diaryle) ne seront pas nécessairement optimales pour effectuer des expériences d'imagerie *in vivo* dans les meilleures conditions. C'est pourquoi, nous envisageons aussi la synthèse de précurseurs "cagés" pour lesquels l'atome d'oxygène central sera remplacé par un autre atome (voir II.4.2). Comme nous l'avons souligné au paragraphe II.1.1., cette approche permet une émission des xanthènes dans la fenêtre thérapeutique. Cependant, dans le paragraphe qui suit, nous allons uniquement développer la stratégie de synthèse envisagée pour accéder au précurseur de type éther de diaryle.

¹²² a) A. Godinat, H. M. Park, S. C. Miller, K. Cheng, D. Hanahan, L. E. Sanman, M. Bogoy, A. Yu, G. F. Nikitin, A. Stahl et E. A. Dubikovskaya, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, (8), 987-999 ; b) G. C. Van de Bittner, C. R. Bertozzi et C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, (135), 1783-1795.

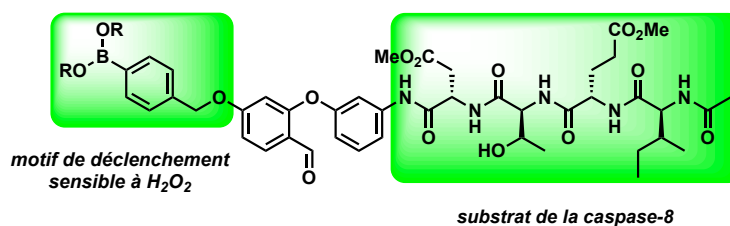


Figure II. 24 – Molécule envisagée comme Sonde "dual-analytes" permettant d'imager les zones d'inflammation aiguë via la formation in situ d'un xanthène déclenchée par la paire d'analytes H₂O₂ et caspase-8.

La stratégie la plus simple consiste à introduire un motif ester d'arylboronique (potentiellement auto-immolable après oxydation par H₂O₂ et conversion en motif *para*-hydroxybenzyle) sur une fonction phénol de l'éther de diaryle. Différencier les deux fonctions phénol du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde sera la piste à privilégier pour réaliser cet objectif (Fig. II.26A). Il serait également possible de l'introduire sur une fonction aniline primaire *via* un bras espaceur auto-immolable de type amide (par exemple, un "trimethyl lock"), et ce pour former une pyronine identique à celle détectée lors des activations enzymatiques de **SD209** et **SD304**, mais cela compliquerait la synthèse (Fig. II.26C). Si la stratégie qui vise à différencier chimiquement les deux groupements hydroxyle du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde échouait, l'utilisation du 4-bromo-2-hydroxybenzaldéhyde serait une alternative possible et dans ce cas, l'ester de boronate serait introduit *via* une réaction de couplage pallado-catalysée (Fig. II.26B).

Concernant le substrat de la caspase-8, nous avons choisi le térapeptide IETD (Ile-Glu-Thr-Asp pour L-isoleucine-L-acide glutamique-L-thréonine-L-acide aspartique) acétylé sur son extrémité *N*-terminale afin de le protéger d'une hydrolyse prématurée et non spécifique par des exoprotéases. La difficulté majeure inhérente à la préparation de ce petit peptide concerne le choix des groupements protecteurs des fonctions acides carboxyliques des chaînes latérales. En effet, les groupements doivent être stables au cours de la synthèse en phase solide et lors des étapes de couplage et de synthèse de l'éther de diaryle. Par ailleurs, ils ne doivent pas favoriser des réactions secondaires (comme la formation d'aspartimides lors de l'étape de déprotection du groupement Fmoc des acides aminés). Afin de simplifier ce choix et de favoriser la pénétration cellulaire de notre sonde, nous avons choisi de protéger la chaîne latérale des acides L-aspartique et L-glutamique sous forme d'esters méthyliques. En effet, il est bien connu que les sondes possédant des motifs ester d'alkyle sont facilement internalisées puis l'hydrolyse par des estérases permet de libérer les fonctions acides carboxylique indispensables pour la reconnaissance par la caspase. Le térapeptide a été synthétisé, avec l'aide de notre collègue le Dr. V. Goncalves, par synthèse automatisée sur support solide (en utilisant une résine de Wang), selon la stratégie Fmoc / tBu¹²³.

Il est important de préciser que les conditions utilisées pour la déprotection du groupe Fmoc ne sont pas standards (pipéridine tamponnée par ajout d'un acide faible, le HOBt) afin d'éviter la formation d'aspartimides¹²⁴ et / ou la transamidification des esters méthyliques par la pipéridine, base couramment utilisée pour réaliser cette opération.

¹²³ G. B. Fields et R. L. Noble, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1990**, (35), 161-214

¹²⁴ Pour des articles de référence concernant cette réaction secondaire en SPPS, voir : a) M. Mergler, F. Dick, B. Sax, P. Weiler et T. Vorherr, *J. Pept. Sci.*, **2003**, (9), 36-46 ; b) M. Mergler, F. Dick, B. Sax, C. Stähelin et T. Vorherr, *J. Pept. Sci.*, **2003**, (9), 518-526.

L'extrémité *N*-terminale a été acétylée par traitement avec un excès d'anhydride acétique en présence de pyridine. Le peptide est ensuite clivé de la résine et déprotégé (éther *tert*-butylique de la L-thréonine) par traitement au TFA, puis purifié par précipitation dans l'éther diéthylique, suivi d'une HPLC semi-préparative en phase inverse (rendement global après lyophilisation de 18%, voir la partie expérimentale pour plus d'informations). En fonction de sa compatibilité avec les conditions de la réaction de couplage d'Ullmann, soit l'amidification de l'aniline primaire par ce peptide précèdera l'étape de formation de l'éther de diaryle, soit elle sera effectuée en dernière étape comme cela avait été le cas avec la sonde **SD316** sensible à la NTR (voir Fig. II.13).

Ces différents points précisés, nous proposons plusieurs schémas rétrosynthétiques pour accéder à cette sonde "dual-analytes" (Fig. II.26). Des travaux sont actuellement en cours au laboratoire pour identifier la voie de synthèse la plus pertinente. Notons que si une procédure mettant en jeu une oxydation douce ou la bromation d'une position benzylique située en *para* d'une fonction amide peut être mise au point, elle peut aussi permettre d'accéder à ce type de sondes. Dans ce cas les motifs de déclenchement seront greffés sur l'éther de diaryle une fois le couplage d'Ullmann effectué et avant la modification du degré rédox de la position benzylique (future position 9 du cœur pyronine).

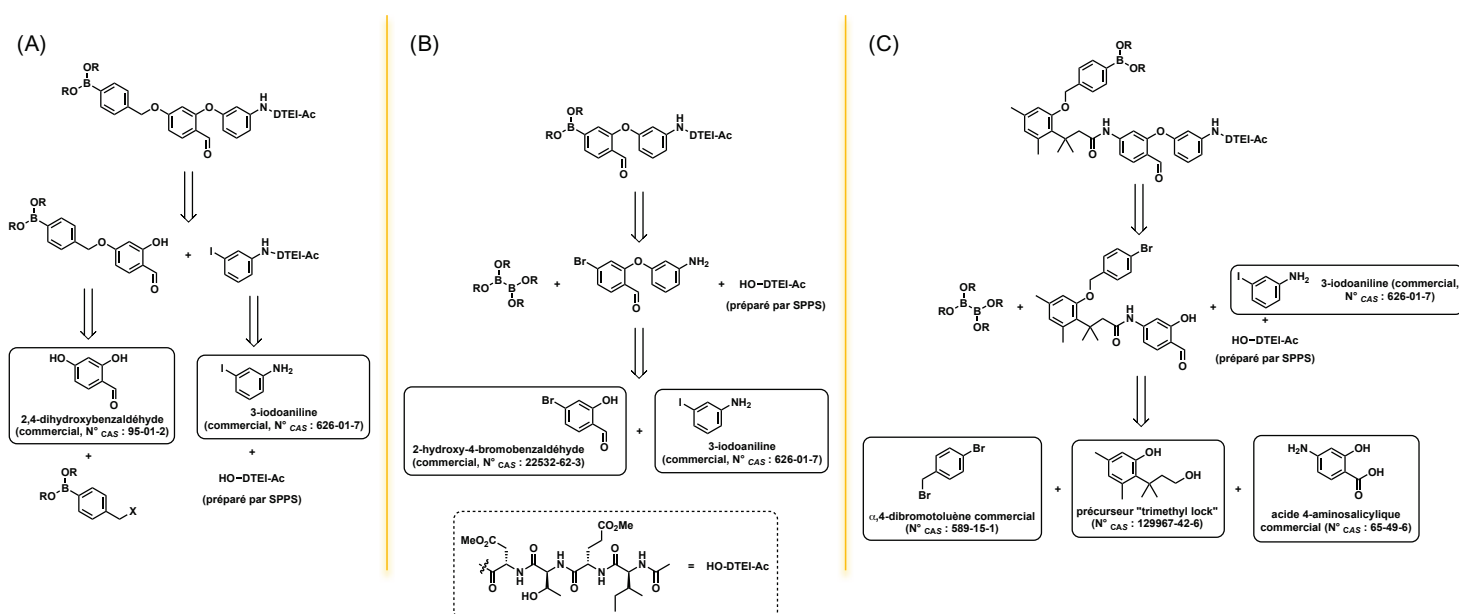


Figure II.25 - Rétrosynthèses possibles pour accéder à une sonde "dual-analytes" pour imager les zones d'inflammation aiguë en ciblant la paire d'analytes H_2O_2 et caspase-8. (A) Les deux motifs de déclenchement sont greffés avant le couplage d'Ullmann, la difficulté va résider dans la faible réactivité du dérivé 2-hydroxy-4-O-protégé-benzaldéhyde qui va sans doute nécessiter un chauffage à une température élevée ($> 100^\circ C$) avec une dégradation possible des réactifs et donc un faible rendement à prévoir. (B) Les deux motifs de déclenchement sont greffés après le couplage d'Ullmann, les inconnues restent la réactivité du 4-bromo-2-hydroxybenzaldéhyde et la compatibilité du brut réactionnel (milieu acide pouvant favoriser la cyclisation prématurée en pyronine). (C) Voie de synthèse incorporant le bras espaceur auto-immolable "trimethyl lock", ici aussi la réactivité du phénol en position 2 lors du couplage d'Ullmann peut poser des problèmes mais un chauffage supérieur à $100^\circ C$ ne devrait pas générer d'impuretés en grandes quantités.

II.4.2. Formation *in situ* de silicium- / sulfone-pyronines pour atteindre des caractéristiques spectrales dans le rouge lointain et le proche-IR

Comme nous l'avons vu plus haut, le cœur pyronine constitue une structure fluorescente particulièrement bien adaptée pour valider le concept de synthèse *in situ* de fluorophores déclenchée par une activité enzymatique. Cependant, les maxima d'absorption / émission excèdent rarement 600 nm, ce qui constitue un réel frein pour appliquer ce concept à des problématiques d'imagerie moléculaire dans le contexte *in vivo* (petit animal). En s'inspirant de travaux récents concernant la chimie des rhodamines, la substitution de l'atome d'oxygène central de nos précurseurs "cagés" par un hétéroatome de type silicium disubstitué^{64ai} (SiR₂) ou soufre dioxydé^{64ab} (sulfone, SO₂) permettra de décaler les maxima d'absorption / émission du fluorophore généré *in situ*, dans la fenêtre thérapeutique (650-900 nm) sans impacter les propriétés physicochimiques et le mécanisme d'activation de la sonde. Ainsi, la Fig. II.27 présente deux exemples de précurseurs "cagés" dont l'activation par un analyte conduira à la formation *in situ* de sulfone-pyronines ou sulfone-rhodamines.

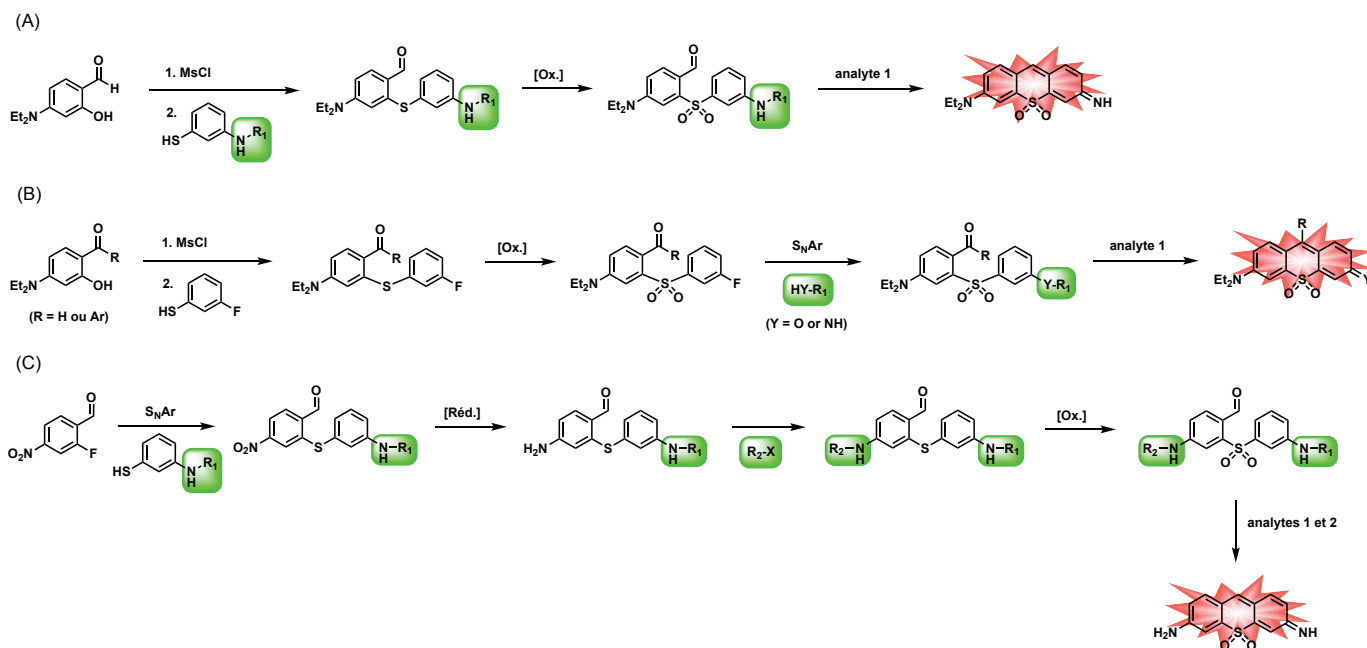
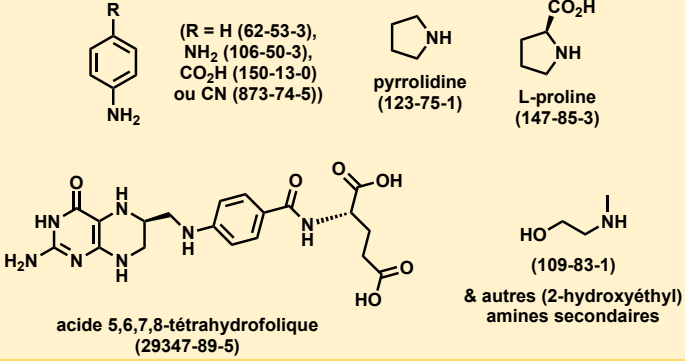
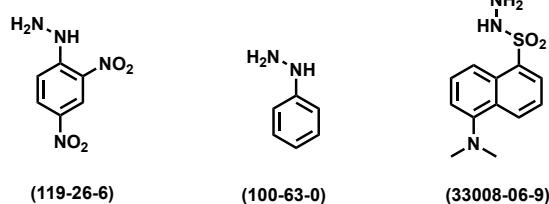
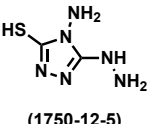


Figure II.26 - (A-B) Voies de synthèse possible d'un précurseur "cagé" dont l'activation "mono-analyte" conduit à la formation d'une sulfone-pyronine proche-IR. (C) Voie de synthèse possible pour accéder à une sonde "dual-analytes" dont l'activation conduira à la formation *in situ* d'une sulfone-pyronine proche-IR.

II.4.3. "Screening" d'additifs pour améliorer les cinétiques de cyclisation en pyronine

Comme démontré dans notre publication, l'activation fluorogénique des sondes **SD209** et **SD304** via la réaction de cyclisation peut être accélérée par la présence dans le tampon aqueux de certaines espèces chimiques ; dans ce cas, il s'agissait du sulfate d'ammonium qui est un additif présent dans les aliquots commerciaux de LAP et qui a été ajouté dans le tampon lors des essais conduits avec la PGA. L'hypothèse que nous avons formulée est que cet additif est une source d'ammoniaque qui peut réagir *in situ* avec le motif carbonyle de l'éther de diaryle pour le convertir en imine (ou iminium) plus réactive. Ainsi, les amines (primaires ou secondaires) semblent être de bons candidats pour favoriser la formation du cœur pyronine et un criblage des composés les plus efficaces pourrait avoir du sens. On peut aussi envisager l'ajout d'acides de Lewis (compatibles avec le milieu aqueux). D'autres réactifs déjà utilisés dans des travaux de bioconjugaison ou connus pour réagir efficacement sur les carbonyles sont également recensés dans le tableau II.6 ci-dessous.

Famille	Structures et N° _{CAS}	Utilisation(s)
Amines (biologiques)	 <p>(R = H (62-53-3), NH₂ (106-50-3), CO₂H (150-13-0) ou CN (873-74-5))</p> <p>pyrrolidine (123-75-1)</p> <p>L-proline (147-85-3)</p> <p>acide 5,6,7,8-tétrahydrofolique (29347-89-5)</p> <p>(109-83-1) & autres (2-hydroxyéthyl) amines secondaires</p>	Formation d'une base de Schiff ou d'une oxazolidine pour accélérer les additions nucléophiles sur le carbonyle
Hydrazines	 <p>(119-26-6)</p> <p>(100-63-0)</p> <p>(33008-06-9)</p>	Formation d'hydrazones ^{125,126}
Sels métalliques (pouvant aussi favoriser l'oxydation)	<p>NaAl(OH)₄ (1302-42-7)</p> <p>FeCl₃ (7705-08-0)</p> <p>FeCl₂ (7758-94-3)</p> <p>CuO (1317-38-0)</p> <p>Cu₂O (1317-39-1)</p>	Activateurs de carbonyle et oxydant de dihydro-rosamines
Purpald®	 <p>(1750-12-5)</p>	Utilisation pour détecter les aldéhydes par spectrométrie UV-vis ¹²⁶

¹²⁵ a) G. T. Hermanson, Functional Targets for Bioconjugation, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 3ème édition, 2013 ; b) G. T. Hermanson, The Reactions of Bioconjugation, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 3ème édition, 2013.

¹²⁶ M. J. Fernandes, "Methods for determining aldehydes in air", Université de Pretoria, 2001.

Triflates de Ln(III) et autres acides de Lewis	Yb(OTf) ₃ (54761-04-5) (+ TMEDA) (110-18-9)	127
	Nd(OTf) ₃ (34622-08-7)	
	Gd(OTf) ₃ (52093-29-5)	
	Sc(OTf) ₃ (144026-79-9)	
	Nb ₂ O ₅ (12326-08-8)	
	TiO ₂ (1317-70-0)	

Tableau II.2 - Réactifs pouvant potentiellement activer le carbonyle de manière efficace et permettant ainsi d'obtenir des cinétiques plus rapides que celles décrites dans la publication pour les composés SD209 et SD304.

Une autre stratégie plus élégante (mais plus compliquée à mettre en œuvre) consiste à modifier la structure du précurseur "cagé" de type éther de diaryle, afin de rendre le centre carboné, siège de l'attaque nucléophile à l'origine de la cyclisation, plus réactif. Deux approches distinctes peuvent ainsi être explorées (Fig. II.28) : (1) exalter l'électrophilie du carbonyle *via* des liaisons hydrogènes intramoléculaires ou (2) augmenter le caractère nucléofuge du substituant de la position benzylique.

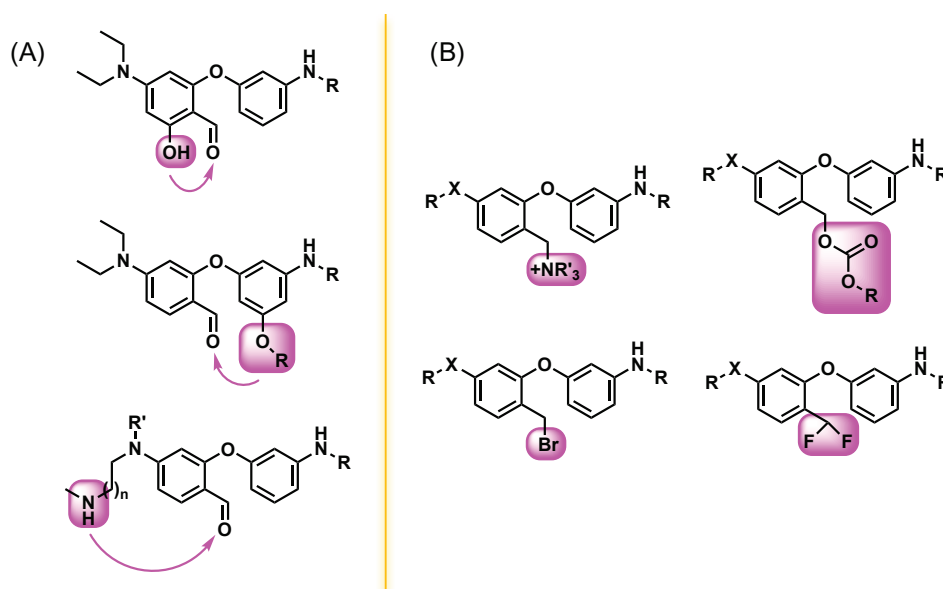


Figure II.27 - Modifications chimiques (surlignées en magenta) possibles de la structure du précurseur "cagé" de type éther de diaryle pour obtenir des cinétiques d'activation plus rapides : (A) Stratégies visant à exalter l'électrophilie du carbonyle. (haut et milieu) Formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire avec le carbonyle ; la structure du milieu doit posséder un phénol protégé par le même groupement que l'aniline pour éviter une cyclisation pré-activation dû à l'effet donneur du phénol en ortho de la position 8a/b, elle est également intéressante car la liaison hydrogène devrait favoriser le rapprochement du cycle aromatique de sa position de cyclisation. Les groupements hydroxyle supplémentaires ne devraient pas avoir une grande influence (négative) sur les propriétés de fluorescence du cœur formé. (bas) Formation d'une imine cyclique. (B) Stratégies visant à optimiser la structure du groupe partant. (haut) Structures déjà présentées dans ce chapitre. (bas) Structures non discutées précédemment mais potentiellement accessibles à partir d'un dérivé méthyle ou carbonylé. Pour (B) et (C) : la position en para doit être protégée (si X = NH₂ ou NEt₂, le précurseur ne sera pas stable car un processus d'élimination 1,6 pourra se produire) et donc sera seulement exploré pour des stratégies de détection "dual-analytes" ou "mono-analyte" avec double déclenchement.

¹²⁷ a) S. Kobayashi et I. Hachiya, *J. Org. Chem.*, **1994**, (59), 3590-3596 ; b) S. Kobayashi et K. Manabe, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, (35), 209-217 ; c) T. Okuhara, *Chem. Rev.*, **2002**, (102), 3641-3665 ; d) R. Ding, K. Katebzadeh, L. Roman, K.-E. Bergquist et U. M. Lindstroem, *J. Org. Chem.*, **2006**, (71), 352-355 ; e) K. Nakajima, Y. Baba, R. Noma, M. Kitano, J. N. Kondo, S. Hayashi et M. Hara, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, (133), 4224-4227 ; f) K. Nakajima, R. Noma, M. Kitano et M. Hara, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, (117), 16028-16033.

II.4.4. "Screening" d'oxydants utilisables pour la synthèse ou l'activation fluorogénique des sondes

Les très bons rendements de réaction obtenus lors du couplage d'Ullmann impliquant le 5-amino-*ortho*-crésol permet d'envisager une nouvelle voie synthèse pour obtenir des sondes "mono-" et dual-analytes" (voir Fig. II.23). Elle consiste à former le lien éther dans un premier temps puis à introduire sur les groupements amino les motifs de déclenchement réactifs vis-à-vis des analytes ciblés dans un second temps et enfin à oxyder le méthyle en alcool primaire (pour la stratégie "PABA-like") ou en aldéhyde pour obtenir des sondes similaires (sur le plan du mécanisme d'activation) à **SD209** et **SD304**. Notons que pour que cette stratégie soit valable, l'étape d'oxydation doit être optimisée afin d'éviter une dégradation prématurée des motifs de déclenchement notamment si des sondes à ROS ou sensibles à l'oxydation sont envisagées. Par ailleurs, elle doit être réalisée une fois les anilines protégées, sinon la formation d'un intermédiaire de type "azaquinonemethide", discutée précédemment sera favorisée. Ce dernier induira une cyclisation prématurée en pyronine (Fig. II.23). Ce type de réactivité est intéressante car elle peut nous permettre d'envisager la conception de sondes "dual-analytes" qui pourraient se révéler après déclenchement à l'aide d'un oxydant agissant comme révélateur de fluorescence (Fig. II.29). Une oxydation enzymatique pourrait également être envisagée avec l'utilisation de laccases (enzymes sécrétés principalement par les champignons et les plantes supérieures), qui ont montré une activité oxydante sur le toluène et ses dérivés¹²⁸.

L'oxydation après l'événement de détection est possible et peut permettre de cibler d'autres types d'activités en gardant à l'esprit que l'équilibre xanthidol-pyronine, effectif en milieu aqueux¹²⁹, peut favoriser la formation de la xanthone non-fluorescente en conditions oxydantes. Il s'agit alors de cribler différents oxydants pour avoir une meilleure idée des potentiels rédox des différentes espèces présentes en solution lors des dosages effectués. Avec une heureuse coïncidence, certains de ces oxydants pourront être d'intérêt biologique et donc pertinents à détecter¹³⁰. Ils pourraient également permettre une détection "dual-analytes" en mode séquentiel (le premier analyte déprotège l'amine et déclenche la cyclisation, puis l'oxydant agissant comme second analyte accélère l'aromatisation pour conduire à la pyronine fluorescente).

¹²⁸ Pour des articles et des revues sur l'utilisation des laccases comme biocatalyseurs, voir : a) A. M. Mayer et R. C. Staples, *Phytochemistry*, **2002**, (60), 551-565 ; b) P. K. Chaurasia, R. S. S. Yadav et S. Yadava, *Res. Rev. BioSci.*, **2013**, (7), 66-71 ; c) P. K. Chaurasia, S. L. Bharati et S. K. Singh, *Research in Plant Sciences*, **2013**, (1), 32-37 ; d) K. W. Wellington, Application of laccases in organic synthesis: a review, *Green Chemistry*, Nova Science, 1ère édition édition, **2014** ; e) S. Herter et N. J. Turner, Oxidation using laccases, *Science of Synthesis, Biocatalysis in Organic Synthesis Vol. 3*, Thieme, **2015** ; f) M. M. Rodriguez-Delgado, G. S. Aleman-Nava, J. M. Rodriguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S. O. Martinez-Chapa, D. Barcelo et R. Parra, *Trends Anal. Chem.*, **2015**, (74), 21-45 ; g) M. D. Cannatelli et A. J. Ragauskas, *Chem. Rec.*, **2017**, (17), 122-140.

¹²⁹ M. El Baraka, M. Deumié, P. Viallet et T. J. Lampidis, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1991**, (56), 295-311.

¹³⁰ Pour des revues sur les oxydants biologiques, voir : a) P. Wardman, *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, (43), 995-1022 ; b) F. A. Villamena, Fluorescence Technique, *Reactive Species Detection in Biology*, Elsevier, **2017**.

Concernant les aspects synthétiques, l'oxydation de la position benzylique pourra être envisagée avec le DDQ ou avec d'autres oxydants comme l'IBX, le *m*-CPBA, le NBS, le CAN et le dichloro-DABCO (N°_{CAS} 1043686-88-9 et d'autres oxydants listés dans la publication de S. Habibzadeh¹³¹). Des systèmes catalytiques non usuels listés par le groupe de E. Ali¹³² et les laccases peuvent également être considérés, tout en gardant à l'esprit que la méthode d'oxydation doit être compatible avec les fonctionnalités (motifs amide ou carbamate) préalablement introduites sur l'une ou les deux anilines.

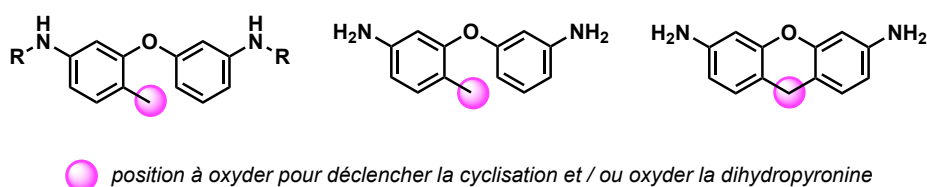


Figure II.28 - Structures des molécules intéressantes à oxyder dans le contexte des sondes fluorogéniques dont le mécanisme d'activation repose sur la formation in situ d'une pyronine. (gauche) Intermédiaire de synthèse où R est le groupe protecteur reconnu et clivé par l'analyte ; la position benzylique (surlignée en magenta) peut être oxydée pour aboutir à des sondes similaires à SD209 et SD304 ou de type "PABA-like". (centre) Une sonde préalablement activée par un ou deux analyte(s) (ce qui provoque la libération des anilines) et qui par oxydation / cyclisation peut donner une pyronine fluorescente. (droite) Dihydropyronine suspectée de se former lors de l'activation de la sonde SD316 par NTR / NADH et qui doit être oxydée pour obtenir un signal de fluorescence.

Pour la partie révélation des tests *in vitro*, ces oxydants devront être efficaces dans l'eau, compatibles avec les anilines et ne devront pas suroxyder la ou les pyronine(s) formée(s). Ainsi, l'utilisation d'oxydants chimiques comme le DDQ, le periodate de sodium (NaIO₄), l'oxone, et le ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) pourra être envisagée. Dans le cas d'applications *in cellulo*, on peut espérer que certains oxydants d'origine endogène soient efficaces pour générer la pyronine fluorescente et donc obtenir des systèmes "dual-analytes". Par exemples, les laccases si l'on souhaite détecter des champignons (microbiologie) ou les ROS (H₂O₂ notamment) dans le contexte des zones d'inflammation ou des tumeurs cancéreuses.

Dans le cadre des travaux qui concernent les sondes destinées à la détection des réductases (comme **SD316**), de nombreux oxydants sont utilisables pour neutraliser l'effet réducteur du cofacteur (NADH) et favoriser les cinétiques d'aromatization, mais uniquement pour des procédés de dosage *in vitro*. On peut citer les ions Fe(II), Fe(III), Cu(II), le TEMPO, l'oxone, le DDQ, K₃Fe(CN)₆, et NaIO₄.

¹³¹ S. Habibzadeh et M. Tajbakhsh, *J. Chem. Res.*, **2009**, 696-698.

¹³² M. A. M. Hossain, M. E. Ali, S. B. Abd Hamid et M. M. Rahman, Catalytic Oxidation of Alkyl Benzene, présenté au Malaysia-Japan International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Nanoengineering, **2014**.

II.5. Perspectives plus lointaines sur la base des précurseurs de type éther de diaryle

La voie "PABA-like", si elle fonctionne, pourrait connaître des prolongements intéressants et plus ambitieux que ceux énoncés dans ce chapitre. Le premier concerne la libération de deux fluorophores par le biais de deux stimulus distincts. Comme suggéré sur la Fig. II.30A, le mécanisme de libération du premier fluorophore pourrait s'effectuer classiquement *via* une réaction d'élimination 1,6 (induite par l'analyte 1 ciblant le motif R_1) et la seconde activation (analyte 2 ciblant le motif R_2) devrait permettre de finaliser la formation *in situ* de la pyronine. Cette cyclisation pourrait également avoir lieu si le motif R_2 est clivé en premier. Dans ce cas, la cinétique de libération du fluorophore phénolique devrait être plus lente que si celle-ci était induite par le processus d'élimination 1,6. Quel que soit l'ordre d'action des deux analytes, celui-ci pourra libérer le fluorophore phénolique mais seule une action combinée des deux entraînera la formation de la pyronine.

Un exemple d'application de ce type de système fluorogénique à deux canaux de détection ("dual readout") concernerait les maladies hépatiques pour lesquelles la présence d'une multitude d'enzymes ne permet pas d'établir un diagnostic fiable en ciblant une seule enzyme (nombreux faux-positifs). Une sonde ciblant les enzymes ALP et GGT peut être envisagée pour améliorer ce type de diagnostic (Fig. II.30). Ce concept de sonde peut être également appliqué à des schémas de détection tirant partie de la complémentarité de deux modalités (e.g., la fluorescence et l'électrochimie, en utilisant par exemple une unité ferrocène "redox-active" très populaire pour ce type d'applications bioanalytiques¹³³, Fig. II.30).

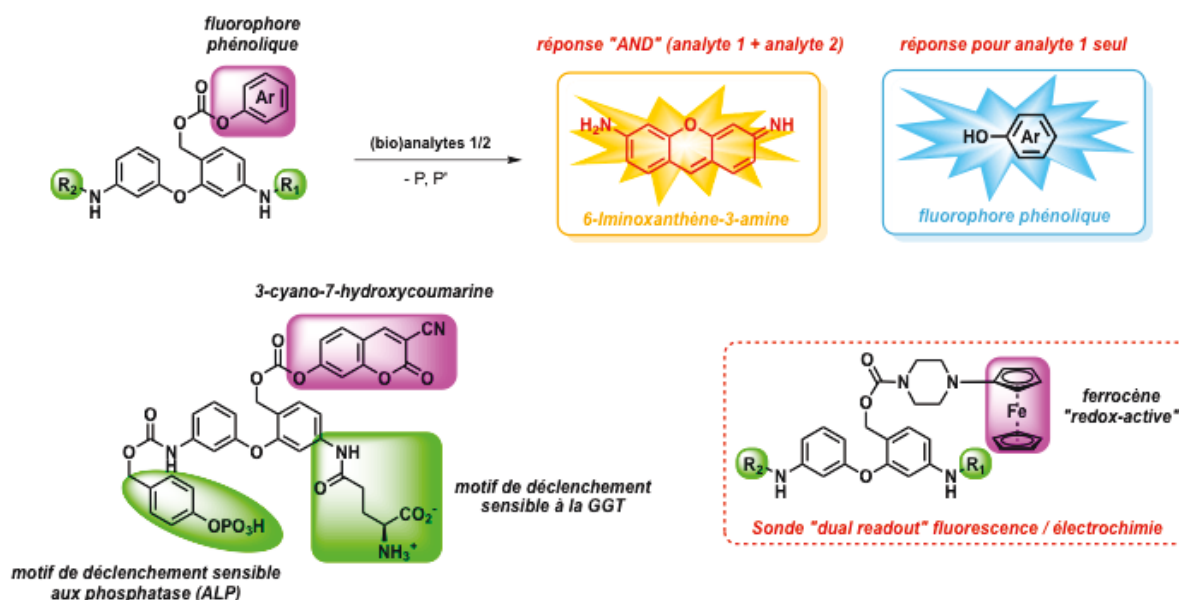


Figure II.29 - Exemple de sondes "dual readout" basées sur la formation d'un cœur pyronine et la libération d'une second marqueur (fluorescent ou électrochimique).

¹³³ a) B. Seiwert et U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, (390), 181-200 ; b) B. J. Marsh, L. Hampton, S. Goggins et C. G. Frost, *New J. Chem.*, **2014**, (38), 5260-5263.

Concernant l'application de notre concept à la détection d'analytes d'intérêt biologique, il semble intéressant d'étudier le cas du formaldéhyde (FA) endogène¹³⁴. En effet, il a été mis en évidence lors d'études sur le déclin neuronal ou le cancer et apparaît comme un produit de certaines voies biologiques, notamment dans le métabolisme mitochondrial du carbone ("mitochondrial one-carbon metabolism"). Celui-ci fait l'objet d'un intérêt récent et croissant en biochimie et des outils chimiques commencent à être développés pour faciliter son étude dans les systèmes biologiques. Ainsi, une nouvelle sonde fluorogénique pour la détection "Off-On" du formaldéhyde pourrait être accessible en combinant les travaux récents du groupe de C. J. Chang¹³⁵ et notre approche de formation *in situ* du cœur pyronine. Le type de structure envisagée ainsi que le mécanisme d'activation supposé sont présentés Fig. II.31.

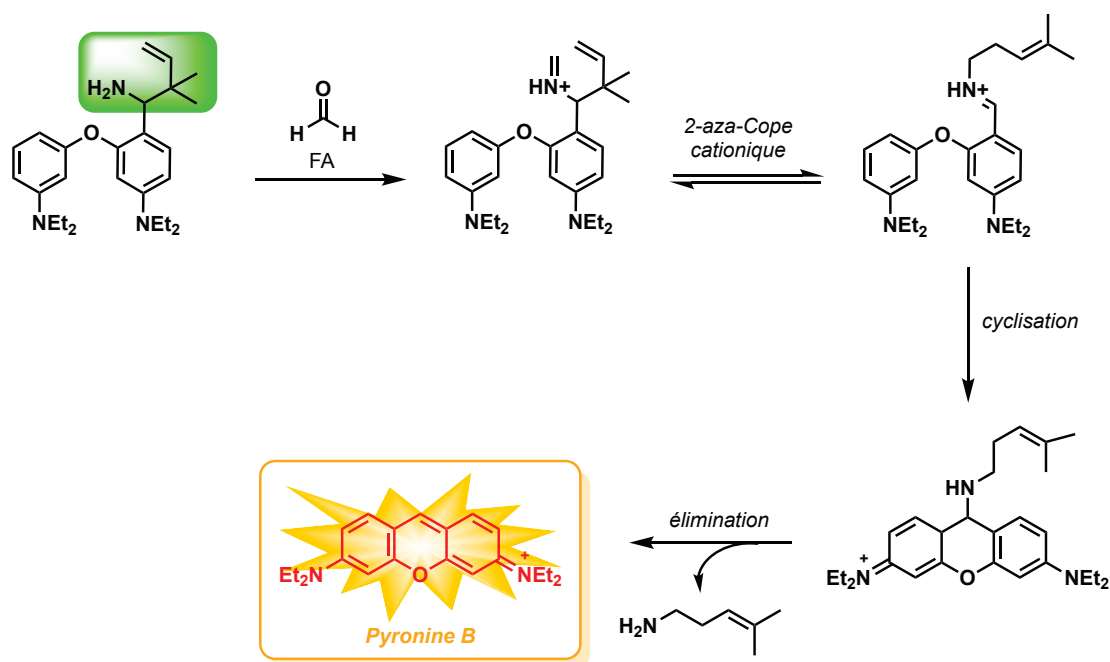


Figure II.30 - Exemple de sonde fluorogénique "Off-On" pour la détection du formaldéhyde. Mécanisme postulé pour la formation *in situ* de la pyronine B mettant en jeu un réarrangement sigmatropique 2-aza-Cope cationique.

¹³⁴ Pour deux revues récentes sur le sujet, voir : a) Z. Xu, J. Chen, L.-L. Hu, Y. Tan, S.-H. Liu et J. Yin, *Chin. Chem. Lett.*, **2017**, sous presse, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccl.2017.1007.1018> ; b) K. J. Bruemmer, T. F. Brewer et C. J. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, (39), 17-23.

¹³⁵ K. J. Bruemmer, R. R. Walvoord, T. F. Brewer, G. Burgos-Barragan, N. Wit, L. B. Pontel, K. J. Patel et C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, (139), 5338-5350.

Chapitre III

*Hybrides DHX-hémicyanine
hydrosolubles et
benzophenoxazines*

Hybrides DHX-hémicyanine hydrosolubles et benzophénoxazines

Ce troisième chapitre présentera quelques idées de nouvelles plateformes moléculaires déclenchables par un ou deux analytes et conduisant à la formation *in situ* de fluorophores émettant dans le rouge lointain voire dans le proche-IR. Nous nous intéresserons dans un premier temps à une stratégie pour former des cœurs benzophénoxazines en développant successivement la bibliographie des colorants organiques tirés de ce motif puis les précurseurs "cagés" envisagés et enfin nos premiers résultats expérimentaux. Nous discuterons ensuite d'une famille récente de fluorophores proche-IR connus sous le nom d'hybrides dihydroxanthène (DHX)-hémicyanine et la stratégie "covalent assembly principle" applicable à ce type de composés mais également à d'autres fluorophores de type cyanine.

III.1. Benzophénoxazines

III.1.1. Bibliographie

Le nom benzophénoxazine vient des oxazines (hétérocycles à 6 chaînons possédant un oxygène, un azote et deux doubles liaisons). En fusionnant deux cycles benzéniques à une 1,4-oxazine, la phénoxazine est obtenue. La fusion d'un cycle benzénique supplémentaire conduit à une structure de type benzophénoxazine (BPO) (Fig. II.1A)¹. Les benzophénoxazines les plus utilisées sont le "Nile Red" (appartenant aux benzo[a]phénoxazinones), le "Nile Blue" (appartenant aux benzo[a]phénoxaziniums) et le "Cresyl Violet" (appartenant à la même classe que le "Nile Blue"). Leurs structures aromatiques compactes offrent stabilité et fluorescence intense dans les solvants organiques mais également une faible fluorescence dans l'eau voire une absence de fluorescence pour le "Nile Red". La méthode historique de formation du cœur BPO consiste en une condensation entre un dérivé *ortho*-nitrosophénol et un dérivé 1-naphtol ("Nile Red") ou un dérivé 1-aminonaphtalène ("Nile Blue") en milieu acide comme décrit en (Fig. II.1C). Cependant une méthode en milieu basique mettant en jeu une condensation entre un dérivé de benzoquinone et un dérivé *ortho*-hydroxyaniline peut aussi être utilisée². La conception de nouveaux cœurs BPO a été explorée³ et continue aujourd'hui, avec par exemple le travail récent sur des analogues du "Meldola's Blue" du groupe de K. H. Ahn⁴.

¹ Pour une revue sur le "Nile Red", "Nile Blue" et la classification des oxazines, voir : a) V. Martinez et M. Henary, *Chem. - Eur. J.*, **2016**, (22), 13764-13782, voir également : b) L. D. Lavis et R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, (9), 855-866.

² A. Grzelakowska, J. Kolinska, M. Zaklos-Szyda, R. Michalski et J. Sokolowska, *Color. Technol.*, **2017**, (133), 145-157.

³ a) H. A. Slovirer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, (71), 3360-3362 ; b) A. Simmonds, J. N. Miller, C. J. Moody, E. Swann, M. S. J. Briggs et I. E. Bruce, *WO9729154 A1*, **1997** ; c) J. Long, Y.-M. Wang, T. Matsuura et J.-B. Meng, *J. Heterocycl. Chem.*, **1999**, (36), 895-899.

⁴ M. Santra, Y. W. Jun, Y. J. Reo, S. Sarkar et K. H. Ahn, *Dyes Pigm.*, **2017**, (142), 161-166.

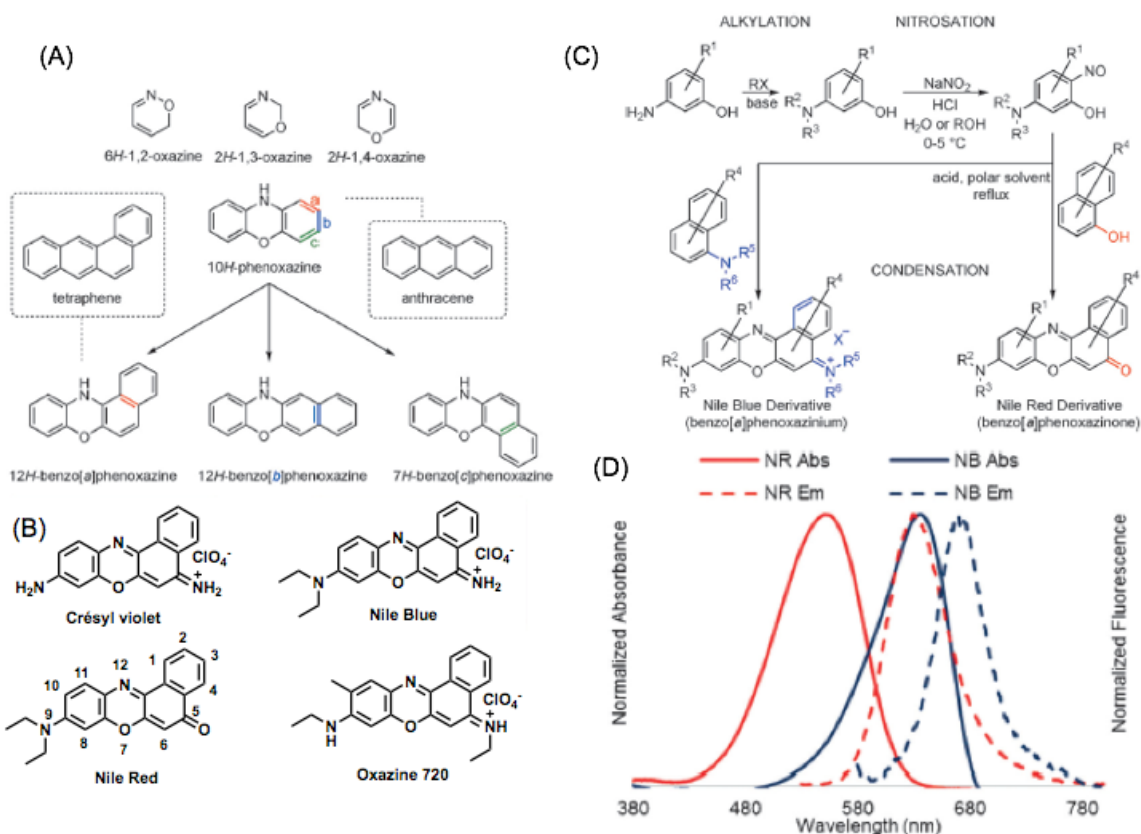


Figure III.1 - (A) Nomenclature des oxazines et de leurs dérivés dont les benzophénoxazines. (B) Structure des principaux fluorophores à cœur BPO avec la numérotation du cœur précisée pour le "Nile Red". (C) Schéma de synthèse classique des dérivés "Nile Blue" et "Nile Red". (D) Spectres d'absorption et d'émission du "Nile Red" (NR) et du "Nile Blue" (NB) dans le DMSO. Illustrations issues de la référence [1a].

Les deux colorants "Nile" présentent un fort solvatochromisme qui pourrait être dû à leur structure composée d'un système "push-pull" et conduisant à un transfert de charge entre les groupes *N,N*-diéthylamino et oxo (pour le "Nile Red") à l'état excité. Celui-ci pourrait alors s'expliquer par un phénomène de TICT mais des études⁵ rejettent ce mécanisme pour le "Nile Red". En effet, dans ce cas, les liaisons hydrogène contractées avec l'environnement influent sur le temps de vie de fluorescence contrairement aux interactions dipolaires "classiques" (forces de Van der Waals) soluté-solvant comme c'est le cas dans le phénomène de TICT. Il est montré que l'introduction d'un motif julolidine à la place du groupe *N,N*-diéthylamino (pour le "Nile Blue") n'augmente pas les rendements quantiques de fluorescence comme c'est le cas avec d'autres types de fluorophores ; les auteurs pensent que cela est la conséquence de phénomènes d'agréments exacerbés par le caractère plus hydrophobe de ce substituant⁶. D'autres études portant sur la solvatochromie du "Nile Red" et du "Nile Blue" ont été également conduites⁷ et notent toutes l'influence importante de l'environnement sur la fluorescence de ce type de composés.

⁵ a) A. Cser, K. Nagy et L. Biczok, *Chem. Phys. Lett.*, **2002**, (360), 473-478 ; b) P. J. G. Coutinho, *Photophysics and Biophysical Applications of Benzo[a]phenoxazine Type Fluorophores*, *Reviews In Fluorescence 2007*, Springer, **2009**.

⁶ B. R. Raju, G. Ribeiro, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Synthesis and Photophysics of New Benzophenoxazine Derivatives Fused with Julolidine*, présenté au Proceedings of the 18th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, **2014**.

⁷ a) H. Tajalli, A. G. Gilani, M. S. Zakerhamidi et P. Tajalli, *Dyes Pigm.*, **2008**, (78), 15-24 ; b) J. F. Deye, T. A. Berger et A. G. Anderson, *Anal. Chem.*, **1990**, (62), 615-622.

Ainsi, les effets de différentes structures biologiques (membranes et micelles⁸, ADN⁹, fibrilles amyloïdes¹⁰, quadruplexes de guanine¹¹) sur les caractéristiques de fluorescence de ces molécules ont également été étudiées dans le but d'identifier des sondes fluorogéniques efficaces pour la détection de ces assemblages biomoléculaires. En 2016, des études théoriques ont également été entreprises¹² afin de mieux comprendre l'influence des milieux biologiques complexes sur la photophysique et les mécanismes photochimiques inhérents au "Nile Blue" et au "Nile Red" qui restent, pour une grande part, toujours non éclaircis.

En dépit de ces incertitudes mécanistiques, cette classe de composés a fait l'objet de nombreux travaux notamment de la part du groupe de P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves dont sont issus la plupart des observations photophysiques précédentes. P. J. G. Coutinho a notamment contribué à *Reviews in fluorescence 2007*^{5b} où il expose un état de l'art sur les benzophénoxazines, en faisant un point sur les processus énergétiques à l'œuvre au sein du "Nile Red" et en proposant un modèle à deux états pour la dynamique de l'état excité de ce colorant qui ne repose que sur les effets de relaxation du solvant (Fig. III.2A). Il présente également les propriétés photophysiques de nombreux dérivés du "Nile Blue". Les travaux de ce groupe sont vastes et comprennent la synthèse¹³ et la caractérisation spectrale¹⁴ de nouveaux composés, des études d'interactions avec l'ADN¹⁵, l'utilisation en tant que sonde pour l'étude d'interactions cholestérol / liposomes¹⁶ ou pour le marquage covalent d'acides aminés¹⁷.

Le groupe de K. Burgess s'est lui aussi intéressé à cette classe de composés afin de les rendre plus solubles et fluorescents dans l'eau¹⁸, notamment pour des applications en bioconjugaison. La stratégie du groupe repose sur l'introduction d'un phénol au sein de la structure (dérivés 2-hydroxy de "Nile Blue" ou "Nile Red") et / ou des motifs hydrosolubilisants sur les substituants alkyles de l'aniline tertiaire et / ou de l'aniline primaire du "Nile Blue" (principalement des motifs anioniques, voir partie 0.3.3). A peu près au même moment, une méthode similaire a également été publiée par le groupe de C. H. Tung pour l'obtention de dérivés hydrosolubles du "Nile Blue"¹⁹.

⁸ a) M. M. G. Krishna, *J. Phys. Chem. A*, **1999**, (103), 3589-3595 ; b) R. K. Mitra, S. S. Sinha et S. K. Pal, *J. Fluoresc.*, **2008**, (18), 423-432.

⁹ Q.-Y. Chen, D.-H. Li, H.-H. Yang, Q.-Z. Zhu, J.-G. Xu et Y. Zhao, *Analyst*, **1999**, (124), 901-906.

¹⁰ R. Mishra, D. Sjoelander et P. Hammarstroem, *Mol. BioSyst.*, **2011**, (7), 1232-1240.

¹¹ K. I. E. McLuckie, Z. A. E. Waller, D. A. Sanders, D. Alves, R. Rodriguez, J. Dash, G. J. McKenzie, A. R. Venkitaraman et S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, (133), 2658-2663.

¹² M. Marazzi, H. Gattuso et A. Monari, *Theor. Chem. Acc.*, **2016**, (135), 1-11.

¹³ B. R. Raju, D. M. F. Sampaio, M. M. Silva, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Ultrason. Sonochem.*, **2014**, (21), 360-366.

¹⁴ a) V. H. J. Frade, M. S. T. Gonçalves et J. C. V. P. Moura, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, (47), 8567-8570 ; b) B. R. Raju, A. M. F. Garcia, A. L. S. Costa, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Dyes Pigm.*, **2014**, (110), 203-213 ; c) S. Naik, C. M. A. Alves, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2491-2497 ; d) M. I. P. S. Leitao, B. R. Raju, S. Naik, P. J. G. Coutinho, M. J. Sousa et M. S. T. Gonçalves, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, (57), 3936-3941 ; e) B. R. Raju, M. M. T. Carvalho, M. I. P. S. Leitao, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Dyes Pigm.*, **2016**, (132), 204-212.

¹⁵ a) C. M. A. Alves, S. Naik, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Tetrahedron*, **2009**, (65), 10441-10452 ; b) B. R. Raju, S. Naik, P. J. G. Coutinho et M. S. T. Gonçalves, *Dyes Pigm.*, **2013**, (99), 220-227 ; c) B. R. Raju, M. S. T. Gonçalves et P. J. G. Coutinho, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2017**, (171), 1-9.

¹⁶ G. Hungerford, E. M. S. Castanheira, A. L. F. Baptista, P. J. G. Coutinho et M. E. C. D. Real Oliveira, *J. Fluoresc.*, **2005**, (15), 835-840.

¹⁷ V. H. J. Frade, P. J. G. Coutinho, J. C. V. P. Moura et M. S. T. Gonçalves, *Tetrahedron*, **2007**, (63), 1654-1663.

¹⁸ a) J. Jose et K. Burgess, *J. Org. Chem.*, **2006**, (71), 7835-7839 ; b) J. Jose, Y. Ueno et K. Burgess, *Chem. - Eur. J.*, **2009**, (15), 418-423 ; c) J. Jose, A. Loudet, Y. Ueno, R. Barhoumi, R. C. Burghardt et K. Burgess, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, (8), 2052-2059.

¹⁹ a) N.-H. Ho, R. Weissleder et C.-H. Tung, *Tetrahedron*, **2006**, (62), 578-585 ; b) N.-H. Ho, R. Weissleder et C.-H. Tung, *ChemBioChem*, **2007**, (8), 560-566.

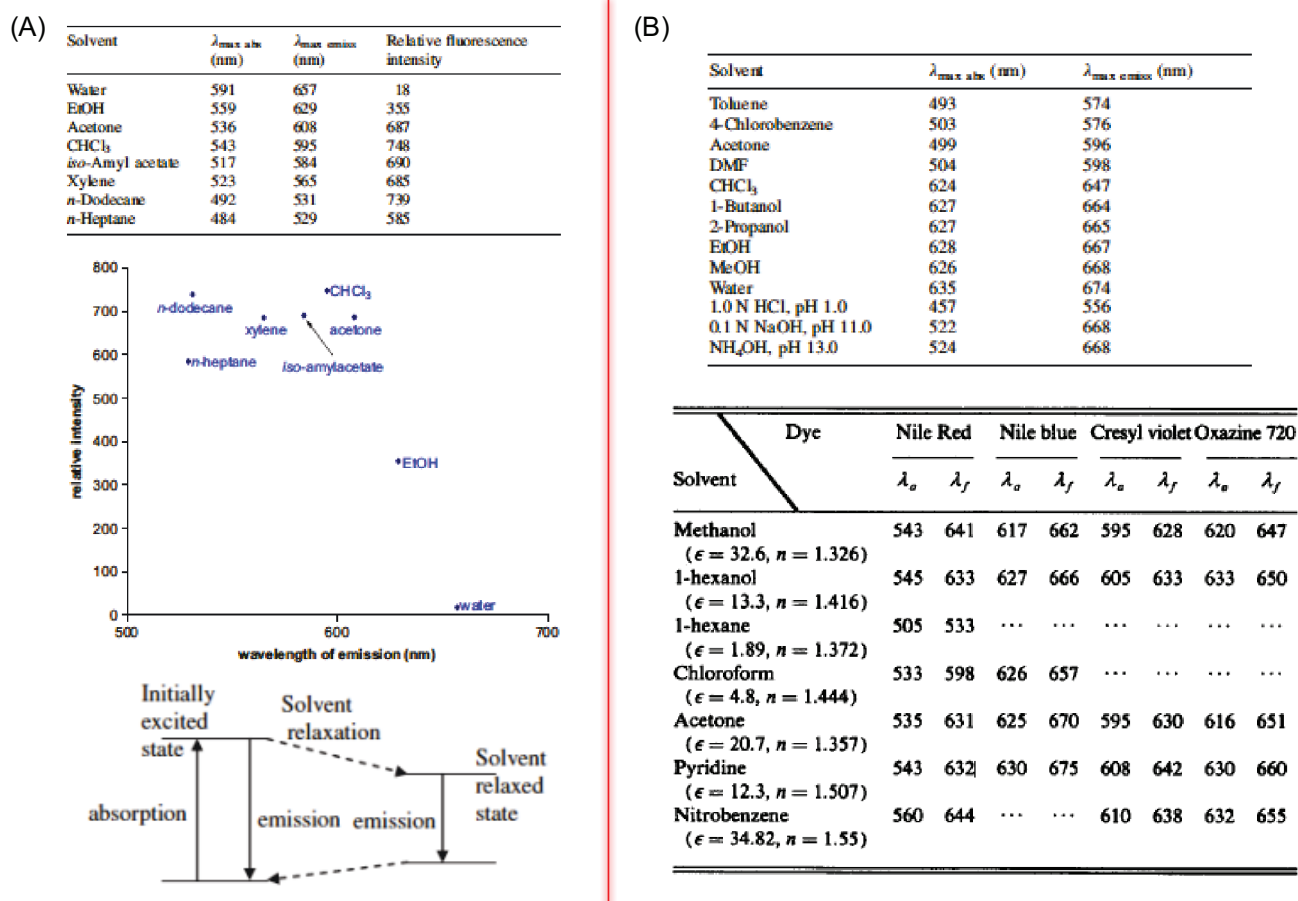


Figure III.2 - Quelques figures illustrant le solvatochromisme des colorants à cœur BPO. (A) En haut : table représentant les caractéristiques spectrales du "Nile Red" dans différents solvants, au milieu : traduction du tableau sur un graphique²⁰, en bas : diagramme énergétique des états fondamentaux et excités du "Nile Red" suivant P. J. G. Coutinho, décrit dans la référence [6b]. (B) En haut : table représentant les caractéristiques spectrales du "Nile Blue" dans différents solvants²⁰, en bas : table représentant les caractéristiques spectrales des quatre principaux fluorophores dans différents solvants²¹.

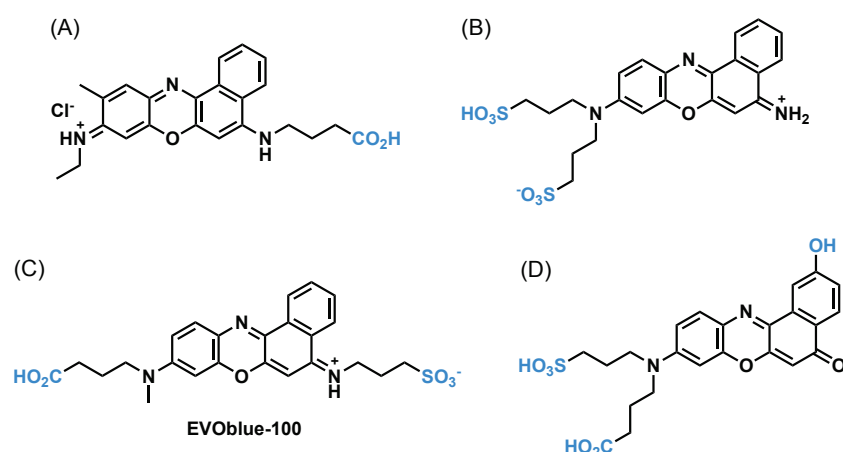


Figure III.3 - Structures de quelques BPO hydrosolubles. (A) & (B) Dérivés de "Nile Blue"^{17,19}. (C) Dérivé de "Nile Blue" développée par la société Evotec (EVOblue-100, N° CAS : 383364-67-8). (D) Dérivé de "Nile Red"^{18a}.

²⁰ J. Jose et K. Burgess, *Tetrahedron*, **2006**, (62), 11021-11037.

²¹ G. B. Dutt, S. Doraiswamy, N. Periasamy et B. Venkataraman, *J. Chem. Phys.*, **1990**, (93), 8498-8513.

Burgess *et al.* ont également utilisé le "Nile Red" comme accepteur d'énergie dans des cassettes "CET" ("Chemiluminescence Energy Transfer") mettant en jeu un mécanisme de transfert d'énergie s'apparentant au TBET²². Il est associé de façon covalente au luminol qui est connu pour donner une chimiluminescence bleue en milieu oxydant ; dans ce cas, c'est l'émission dans le rouge du dérivé "Nile Red" qui est observée confirmant le transfert d'énergie entre l'état excité du luminol et cet accepteur de type BPO (Fig. III.4B). Ce groupe a également publié plusieurs couples donneur-accepteur (ou "energy transfer dyads") possédant un dérivé "Nile Red" comme accepteur et mettant en jeu le mécanisme TBET²³ (Fig. III.4A), dans le but notamment d'obtenir des fluorophores possédant un pseudo-déplacement de Stokes très important d'environ 120-150 nm.

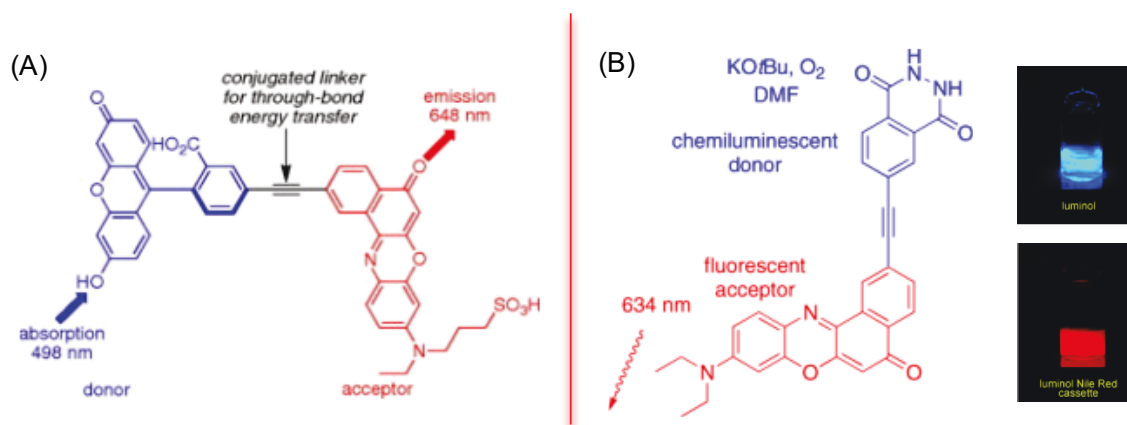


Figure III.4 - Molécules développées par le groupe de K. Burgess. (A) Couple fluorescéine / BPO fonctionnant selon le principe du TBET. (B) Cassette "CET" associant un groupement donneur chimiluminescent (luminol) associé à la BPO ("Nile Red"), qui en milieu oxydant, émet à la longueur d'onde du cœur "Nile Red" (634 nm). Illustrations issues des références [23b] et [22].

Les "Nile Red" et "Nile Blue" ont très vite été utilisés, en tant que tels, pour cibler les zones hydrophobes ou lipidiques en milieu biologique²⁴, avec une application remarquable récemment publiée par le groupe de A. S. Klymchenko^{25,26}. En effet, pour repérer et discerner des microdomaines lipidiques suivant leur phase ("liquid ordered", Lo ou "liquid disordered", Ld), les auteurs utilisent à la fois le solvatochromisme de ces BPO et de l'extinction de fluorescence par FRET (Fig. III.5). Le groupe de M. B. Brown²⁷ utilise l'affinité du "Nile Red" pour la poche hydrophobe de l' α -acide glycoprotéine pour étudier l'interaction de cette dernière avec plusieurs médicaments. Dans une autre étude parue en 2001²⁸, un dérivé du "Nile Blue" est directement utilisé pour imager une tumeur *in vivo* dans un modèle de gliome.

²² J. Han, J. Jose, E. Mei et K. Burgess, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, (46), 1684-1687.

²³ Pour des exemples, voir : a) K. Burgess, *US20090192298 A1*, **2009** ; b) J. Jose, Y. Ueno, J. C. Castro, L. Li et K. Burgess, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, (50), 6442-6445.

²⁴ Pour des exemples, voir : a) P. Greenspan, E. P. Mayer et S. D. Fowler, *J. Cell. Biol.*, **1985**, (100), 965-973 ; b) P. Greenspan et S. D. Fowler, *J. Lipid. Res.*, **1985**, (26), 781-789 ; c) S. D. Fowler et P. Greenspan, *J. Histochem. Cytochem.*, **1985**, (33), 833-836 ; d) E. Bonilla et A. Prella, *J. Histochem. Cytochem.*, **1987**, (35), 619-621 ; e) D. L. Sackett, J. R. Knutson et J. Wolff, *J. Biol. Chem.*, **1990**, (265), 14899-14906 ; f) P. Spiekermann, B. H. A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister et A. Steinbuchel, *Arch. Microbiol.*, **1999**, (171), 73-80.

²⁵ Pour la publication princeps, voir : O. A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich, D. A. Yushchenko, Y. Arntz, P. Didier, Y. Mely et A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, (132), 4907-4916.

²⁶ Pour l'application avec de l'extinction de fluorescence par FRET : a) R. Kreder, K. A. Pyrshev, Z. Darwich, O. A. Kucherak, Y. Mely et A. S. Klymchenko, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, (10), 1435-1442.

²⁷ M. B. Brown, J. N. Miller et N. J. Seare, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, (13), 1011-1017.

²⁸ D. C. Nikas, J. W. Foley et P. M. Black, *Las. Surg. Med.*, **2001**, (29), 11-17.

Comme le "Nile Blue" et ses dérivés possèdent une aniline primaire, ils sont aussi utilisés dans la conception de pro-fluorophores de type "Off-On" ou ratiométrique (voir Fig. III.6 pour plusieurs exemples qui vont être brièvement discutés ci-dessous), *via* la fonctionnalisation de cette fonction amine, pour la détection de divers analytes incluant les cations Hg(II)^{29} , Zn(II)^{30} et H^+ dans le contexte de mesures de variations de pH³¹. Citons par exemple les travaux du groupe de S. P. Armes³², qui concerne des nanoparticules, constituées d'un copolymère dibloc [PMPC-PDPA] et marquées par le "Nile Blue", permettant d'étudier les variations de pH dans les régions interstitielles hypoxiques et acides d'un modèle de tumeur (Fig. III.7B).

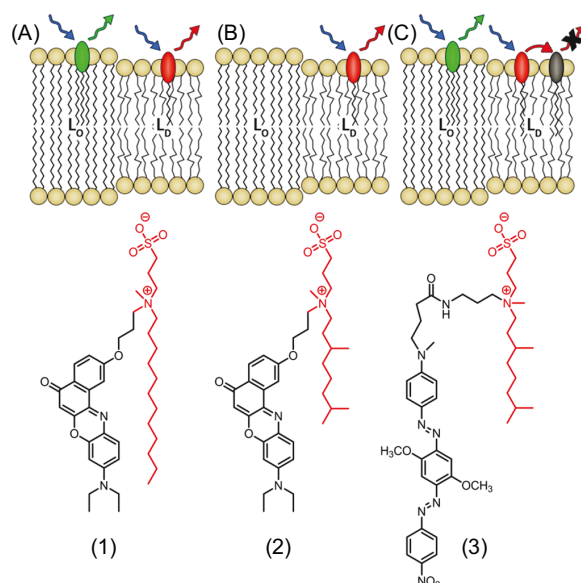


Figure III.5 - Sondes pour imager les différentes phases lipidiques au sein de la membrane cellulaire. (A) Schéma reprenant le type d'image obtenue avec la sonde (1), le discernement se fait par la sensibilité de la sonde à l'environnement lipidique ordonné / désordonné. (B) Schéma reprenant le type d'image obtenu avec la sonde (2), la distinction se fait grâce à l'ancrage spécifique du motif amphiphile greffé sur le "Nile Red" sur la structure (2). (C) Schéma reprenant le type d'image obtenu avec les composés 1,2 et 3 ; la partie hydrophobe de la structure (3) étant similaire à (2), le ciblage sélectif des phases Ld est effectué de façon similaire avec pour conséquence un "quenching" de la fluorescence dans ces domaines lipidiques pour ne laisser que les phases Lo apparentes. Illustration issue de la référence [25].

Dans cette même étude la nature du bras de greffage entre la BPO et la nanoparticule influence directement le pKa du motif *N,N*-diéthylamino dont dépend la réponse fluorescente. Une étude visant à explorer les changements de conformation au sein de la calmoduline suivant la présence et la concentration d'ions Ca(II) utilise également le "Nile Blue"³³. La calmoduline recombinante possède 4 résidus cystéine sur une portion d'hélice α , qui vont réagir avec un dérivé arsénié de cette BPO afin de réaliser un marquage spécifique et covalent de cette protéine³⁴.

²⁹ M. H. Lee, S. W. Lee, S. H. Kim, C. Kang et J. S. Kim, *Org. Lett.*, **2009**, (11), 2101-2104.

³⁰ X.-B. Yang, B.-X. Yang, J.-F. Ge, Y.-J. Xu, Q.-F. Xu, J. Liang et J.-M. Lu, *Org. Lett.*, **2011**, (13), 2710-2713.

³¹ a) W. Liu, R. Sun, J.-F. Ge, Y.-J. Xu, Y. Xu, J.-M. Lu, I. Itoh et M. Ihara, *Anal. Chem.*, **2013**, (85), 7419-7425 ; b) Y.-H. Zhan, X.-J. Li, R. Sun, Y.-J. Xu et J.-F. Ge, *Anal. Chim. Acta*, **2016**, (933), 175-181.

³² J. Madsen, I. Canton, N. J. Warren, E. Themistou, A. Blanzas, B. Ustbas, X. Tian, R. Pearson, G. Battaglia, A. L. Lewis et S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, (135), 14863-14870.

³³ J. Nakanishi, T. Nakajima, M. Sato, T. Ozawa, K. Tohda et Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **2001**, (73), 2920-2928.

³⁴ Cette technique de marquage basée sur l'utilisation d'un motif de reconnaissance d'un "tag" peptidique "tétra-cystéine" par un dérivé arsénié de fluorophore est très connue (système tétra-cystéine / FIAsH), pour la publication princeps, voir : B. A. Griffin, S. R. Adams et R. Y. Tsien, *Science*, **1998**, (281), 269-272.

Le groupe de H. Ma a également travaillé sur ce type de composés possédant un centre fluorogénique, dans le but de concevoir de nouveaux pro-fluorophores ciblant une activité enzymatique d'intérêt. Ainsi, en 2015 puis en 2016, ce groupe a successivement publié une sonde à GGT (γ -glutamyl transpeptidase)³⁵ et une sonde à pyroglutamate amino- γ -peptidase-1 (PGP-1)³⁶ dont le mécanisme d'activation met en jeu dans les deux cas l'hydrolyse enzymatique d'un lien pseudo-peptidique et la libération d'un analogue du "Cresyl Violet" fluorescent (5-imino-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine, $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ (nm) : 585 / 625 dans le PBS (6,7 mM, pH 7,4)). Il est alors possible d'étudier le niveau d'expression et la distribution de cette enzyme dans le cytoplasme des cellules exprimant une réponse inflammatoire. Une sonde permettant de détecter l'activité de la dipeptide peptidase IV (DPPIV) et de la protéine activatrice de fibroblaste (FAP)³⁷ a également été conçue par amidification de cet analogue du "Cresyl Violet" et a été utilisée pour étudier l'influence de ces protéines sur la prolifération des cellules cancéreuses.

En 2017³⁸, une sonde à aminopeptidase N (APN) est élaborée toujours sur le même principe. Cette enzyme est soupçonnée de jouer un rôle important dans la malignité des cancers du rein³⁹ et pourrait permettre un dépistage précoce par sa mesure dans les urines.

Le "Cresyl Violet" de par sa stabilité photochimique et sa faible sensibilité à l'oxygène, fait partie des standards pour mesurer les rendements quantiques des fluorophores absorbant / émettant dans la région rouge du spectre⁴⁰. Ainsi dans le méthanol à 24°C, sa bande d'excitation est entre à 540-590 nm et celle d'émission se situe entre 580-750 nm avec des maxima à 602 nm et 623 nm ; son QY est de 0.57⁴¹. D. I. Kreller et P. V. Kamat ont également étudié les propriétés rédox et l'état excité pour évaluer l'effet photosensibilisateur de ce composé⁴².

La possibilité de faire des sondes dérivées du "Cresyl Violet" a été également exploitée par d'autres groupes. On peut citer une sonde utilisant le térapeptide z-DEVD⁴³ comme motif de reconnaissance de la caspase-3 ou bien encore une sonde utilisant la réactivité du motif 2,4-dinitrobenzènesulfonyl (DNBS)⁴⁴ pour détecter la glutathion S-transférase (GST). Citons également un dérivé azoture de cette BPO qui est utilisé pour l'imagerie de cellules vivantes par fluorescence ratiométrique (Fig. III.7A)⁴⁵. En effet, son maximum d'émission est profondément modifié (il passe de 566 à 620 nm) suite à sa réaction *in cellulo* avec des alcynes vrais exogènes selon un réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée ou non par le cuivre(I) (CuAAC et SPAAC, voir 0.3.1)

³⁵ L. Li, W. Shi, Z. Wang, Q. Gong et H. Ma, *Anal. Chem.*, **2015**, (87), 8353-8359.

³⁶ Q. Gong, L. Li, X. Wu et H. Ma, *Chem. Sci.*, **2016**, (7), 4694-4697.

³⁷ Q. Gong, W. Shi, L. Li, X. Wu et H. Ma, *Anal. Chem.*, **2016**, (88), 8309-8314.

³⁸ X. He, Y. Xu, W. Shi et H. Ma, *Anal. Chem.*, **2017**, (89), 3217-3221.

³⁹ Cancer à haut taux de mortalité car le dysfonctionnement qu'engendre la tumeur solide sur l'un des reins n'est pas perçu par le patient. C'est souvent les complications provoquées par les métastases qui alertent le patient mais cela trop tardivement.

⁴⁰ D. Magde, J. H. Brannon, T. L. Cremers et J. Olmsted, *J. Phys. Chem.*, **1979**, (83), 696-699.

⁴¹ A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, **2011**, (83), 2213-2228.

⁴² D. I. Kreller et P. V. Kamat, *J. Phys. Chem.*, **1991**, (95), 4406-4410.

⁴³ B. W. Lee, G. L. Johnson, S. A. Hed, Z. Darzynkiewicz, J. W. Talhouk et S. Mehrotra, *BioTechniques*, **2003**, (35), 1080-1085.

⁴⁴ J. Zhang, A. Shibata, M. Ito, S. Shuto, Y. Ito, B. Mannervik, H. Abe et R. Morgenstern, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, (133), 14109-14119.

⁴⁵ H. Fu, Y. Li, L. Sun, P. He et X. Duan, *Anal. Chem.*, **2015**, (87), 11332-11336.

En 2012, cette même sonde porteuse d'un azoture est utilisée par le groupe de H. Ma pour visualiser en mode ratiométrique le H₂S au sein de cellules vivantes et dans un modèle *in vivo* de poisson-zèbre⁴⁶. En 2014, ce même groupe obtient une sonde sensible aux NTR en remplaçant le motif azido par un groupement nitro et celle-ci a été validée une nouvelle fois sur un modèle de poisson-zèbre⁴⁷. Utilisé tel quel, le "Cresyl Violet" s'avère être également un bon marqueur de lysosomes car il est protoné dans ces organelles⁴⁸, avec une résistance accrue au photoblanchiment comparé aux sondes acidotropes et n'altérant ni le pH, ni le pouvoir tampon des lysosomes.

D'autres positions des BPO peuvent être substituées afin de concevoir des sondes fluorogéniques de type "Off-On" pour la détection du H₂S⁴⁹, de certaines enzymes⁵⁰, ou de l'anion nitrite (NO₂⁻)⁵¹.

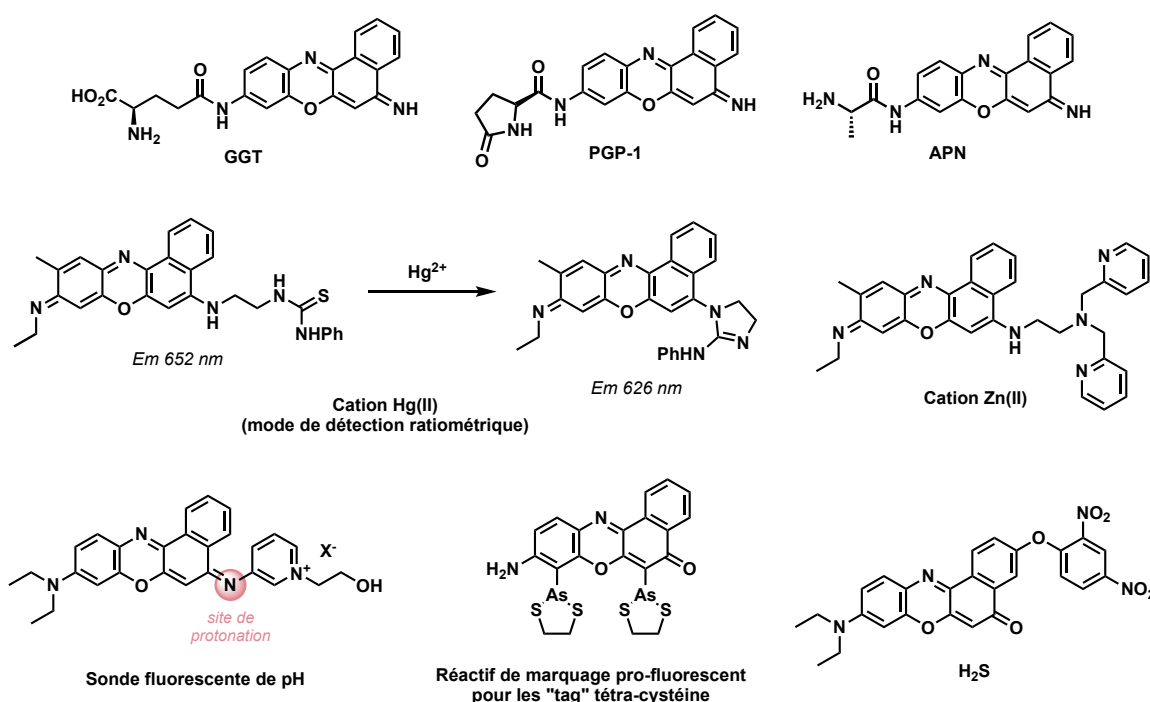


Figure III.6 - Sondes fluorogéniques basées sur coeur BPO ; en haut à gauche : sonde pour la détection de la GGT³⁵ ; en haut au centre : sonde pour la détection de la PGP-1³⁶ ; en haut à droite : sonde pour la détection de l'APN³⁸ ; au milieu à gauche : sonde pour la détection du cation Hg(II)²⁹ ; au milieu à droite : sonde pour la détection du cation Zn(II)³⁰ ; en bas à gauche : sonde pH-métrique^{31a} ; en bas au centre : dérivé arsénié pour le marquage de protéines possédant un "tag" tétra-cystéine^{33,34} ; en bas à droite : sonde pour la détection des thiols⁴⁹.

⁴⁶ Q.-Q. Wan, Y. Song, Z. Li, X. Gao et H. Ma, *Chem. Commun.*, **2013**, (49), 502-504.

⁴⁷ Q.-Q. Wan, X.-H. Gao, X.-Y. He, S.-M. Chen, Y.-C. Song, Q.-Y. Gong, X.-H. Li et H.-M. Ma, *Chem. - Asian J.*, **2014**, (9), 2058-2062.

⁴⁸ P. P. Ostrowski, G. D. Fairn, S. Grinstein et D. E. Johnson, *Traffic* **2016**, (17), 1313-1321.

⁴⁹ X.-D. Liu, C. Fan, R. Sun, Y.-J. Xu et J.-F. Ge, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, (406), 7059-7070.

⁵⁰ H. Ma, J. Zhang, Z. Zhang, Y. Liu et J. Fang, *Chem. Commun.*, **2016**, (52), 12060-12063.

⁵¹ Y.-H. Zhan, R. Sun, W.-J. Zhu, Y.-J. Xu et J.-F. Ge, *Sens. Actuator B-Chem.B*, **2017**, (240), 1283-1290.

Parmi les autres sondes recensées, dans une publication de 2016⁵², le groupe de R. J. Anderson en collaboration avec le département R&D Microbiologie de la société bioMérieux décrit une sonde pour la détection colorimétrique de la β -alanine aminopeptidase (AAP), enzyme exprimée uniquement par quelques espèces de bactéries à Gram négatif, libérant une amino-phénoxazinone. Dans le même esprit, un brevet déposé par bioMérieux en 2003⁵³ utilise les dérivés de phénoxazinones (chromophoriques ou fluorescents) pour détecter des enzymes aux sein de microorganismes.

Le phénomène de FRET a aussi été utilisé pour concevoir des sondes à caspases ou peptidases en greffant un accepteur (qui peut être une BPO ou un composé apparenté) à l'extrémité N- ou C-terminale et le donneur sur l'autre extrémité du substrat peptidique⁵⁴. En présence de l'enzyme ciblée, il y a clivage du peptide, disparition du phénomène de FRET et la fluorescence du donneur est restaurée.

Enfin, un autre point intéressant à mentionner concerne les propriétés rédox de ces composés^{55,56}, par analogie avec une molécule apparentée et nommée résorufine. En effet, cette dernière est d'une grande utilité en biochimie, ses formes oxydée (résaruzine) et réduite (dihydrorésorufine) sont non fluorescentes et sont respectivement utilisées comme marqueur de la survie cellulaire ("resaruzin reduction test")⁵⁷ et comme substrat fluorogénique d'oxydases⁵⁸.

Des applications autres que la conception de sondes fluorogéniques ont également été explorées. Sur certains dérivés, les propriétés optiques non linéaires du troisième ordre ont été déterminées afin d'envisager leur utilisation dans des applications en photonique rapide⁵⁹. D'autres composés ont été développés et utilisés pour la conception de cellules solaires à colorants organiques⁶⁰. Une autre application importante de ces composés est leur utilisation comme photosensibilisateurs pour la PDT. En effet, en remplaçant l'atome d'oxygène de l'oxazine par un atome lourd de type sélénium, le rendement quantique de fluorescence chute mais celui de production d'oxygène singulet augmente fortement⁶¹. Enfin, en termes d'activités pharmacologiques recensées, le "Cresyl Violet" et le "Nile Blue" sont connus pour inhiber l'activité des MAOs (A pour le "Cresyl Violet" et A et B pour le "Nile Blue")⁶². Dans la même veine, les travaux du groupe de S. Salunke-Gawali⁶³ qui s'intéressent au potentiel cytotoxique de ces composés *via* des modulations structurales incluant l'introduction de groupements méthyle ou d'atomes de chlore sur diverses positions du cycle, ou en substituant l'oxygène intracyclique par un soufre sont également à mentionner.

⁵² A. F. Bedernjak, A. V. Zaytsev, M. Babolat, M. Cellier, A. L. James, S. Orenge, J. D. Perry, P. W. Groundwater et R. J. Anderson, *J. Med. Chem.*, **2016**, (59), 4476-4487.

⁵³ A. James, A. Rigby, S. Stanforth et J. Perry, *FR2854893 A1*, **2004**.

⁵⁴ X. Yan, S. Miraglia et P. M. Yuan, *WO2002094778 A2*, **2002**.

⁵⁵ Pour des études électrochimiques sur le "Nile Blue", voir : A. J. Wilson, N. Y. Molina et K. A. Willets, *J. Phys. Chem. C*, **2016**, (120), 21091-21098.

⁵⁶ Pour des études de voltamétrie cyclique couplée à la spectroscopie de fluorescence sur le "Cresyl Violet", voir : C. Lei, D. Hu et E. J. Ackerman, *Chem. Commun.*, **2008**, 5490-5492.

⁵⁷ J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton et F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, (267), 5421-5426

⁵⁸ M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina et R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, **1997**, (253), 162-168.

⁵⁹ B.-Q. Liu, R. Sun, J.-f. Ge, N. Li, X.-L. Shi, L. Qiu et J.-M. Lu, *Dyes Pigm.*, **2010**, (88), 50-56.

⁶⁰ F. A. Y. N. Schroeder, J. M. Cole, P. G. Waddell et S. McKechnie, *Adv. Energy Mater.*, **2015**, (5), 1401728.

⁶¹ a) L. Cincotta, J. W. Foley et A. H. Cincotta, *Cancer Res.*, **1993**, (53), 2571-2580 ; b) O. E. Akilov, S. Kosaka, K. O'Riordan, X. Song, M. Sherwood, T. J. Flotte, J. W. Foley et T. Hasan, *Chem. Biol.*, **2006**, (13), 839-847.

⁶² A. Delport, B. H. Harvey, A. Petzer et J. P. Petzer, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2017**, (325), 1-8.

⁶³ D. Chadar, S. S. Rao, A. Khan, S. P. Gejji, K. S. Bhat, T. Weyhermuller et S. Salunke-Gawali, *RSC Adv.*, **2015**, (5), 57917-57929.

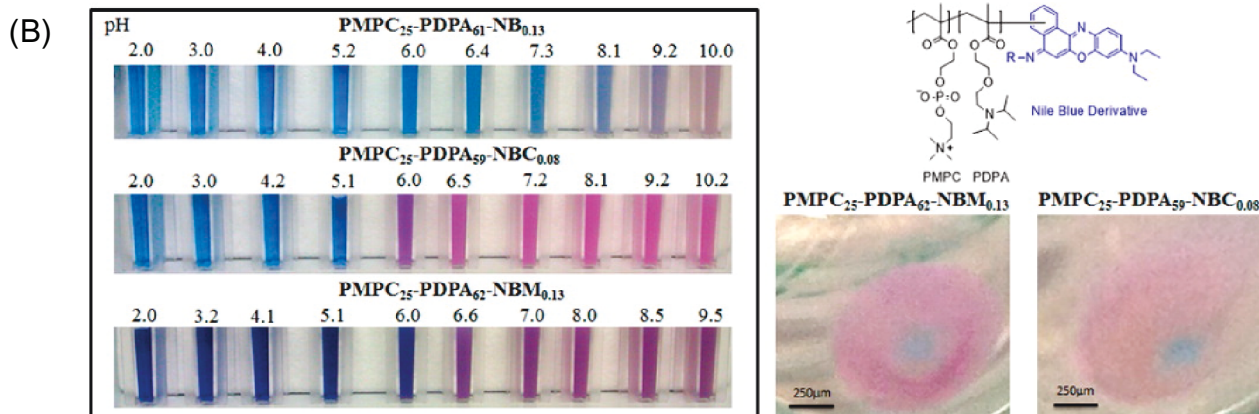
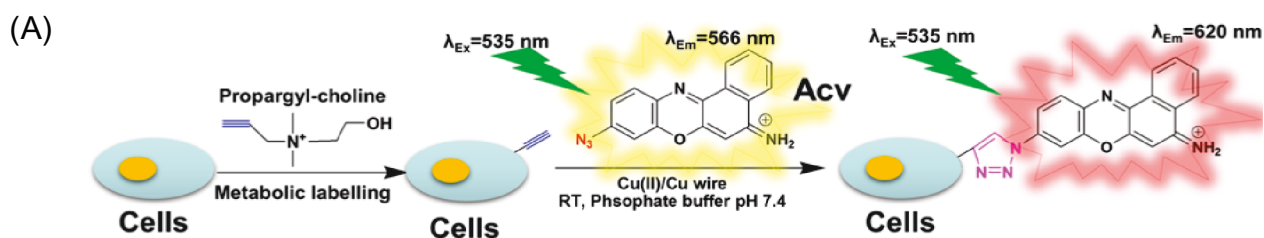


Figure III.7 - Autres exemples de sondes fluorogéniques basées sur un coeur BPO. (A) Utilisation de la réaction CuAAC pour marquer des cellules vivantes à l'aide d'un dérivé azoture du "Cresyl Violet" fluorescent⁴⁵. (B) Utilisation en tant que colorant pH-sensible au sein d'un copolymère dibloc [PMPC-PDPA] pour l'étude des variations de pH au sein des cellules³². Illustrations issues des références [44] et [32].

III.1.2. Précurseurs "cagés" envisagés et synthèses préliminaires

Cette sous-partie porte sur la conception de précurseurs de type éther de diaryle porteur d'une aniline primaire protégée sur l'un des deux aryles et d'un motif quinonique sur le second. La stratégie de déclenchement repose sur la capacité de l'aniline, une fois déprotégée par l'analyte ciblé, à réagir avec le carbonyle adjacent du motif quinonique. Cette cyclisation devrait conduire après déshydratation au cœur BPO fluorescent (Fig. III.8). Si ce mécanisme n'a jamais été envisagé dans la conception de sondes fluorogéniques, quelques précédents de la littérature exploitent une réaction similaire dans un but synthétique ou l'ont mis en évidence comme une réaction secondaire non désirée. Ainsi, dans un exemple de synthèse totale de la cystodamine (un alcaloïde aza-aromatique pentacyclique)⁶⁴, l'une des étapes clés met en jeu la réduction d'un nitro-aryle en aniline et sa réaction intramoléculaire sur une quinone adjacente. La synthèse totale d'un autre alcaloïde aza-aromatique pentacyclique (sebastianine A)⁶⁵ repose sur une réaction similaire mais l'aniline impliquée dans la cyclisation intramoléculaire est obtenue par déprotection d'un dérivé trifluoroacétamide ; la réaction de cyclisation est réalisée en milieu biphasique (DCM / aq. 1.0 M NaOH). Une autre publication⁶⁶ rapporte la formation d'une benzophénoxazine comme produit secondaire (et en quantité minoritaire) lors de la réaction de condensation entre le lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) et un dérivé aminophénol. Cette formation de BPO est aussi un sous-produit de la réaction entre la 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone et le 2-aminophénol dans la pyridine comme décrit dans une publication de 1980⁶⁷. Le plus parlant des exemples reste la formation de phénothiazones assistée ou pas par une laccase⁶⁸. Dans ce cas, la cyclisation intramoléculaire entre l'aniline et la quinone est réalisée en tampon acétate (contenant 15% MeOH). La même réaction conduite dans le MeOH pur a également été décrite dans le but de préparer un large éventail de phénothiazones^{69,70}. Enfin, plusieurs publications mettent en lumière la réactivité de dérivés aniline vis-à-vis de motifs quinoniques et ce dans des conditions douces^{71,72,73}, ce qui constitue un argument de poids en faveur de la stratégie que nous souhaitons développer.

Ce qui est intéressant avec cette approche, c'est la possibilité de faire des sondes fluorogéniques "Off-On" pour un large éventail d'analytes ce qui n'est pas le cas avec les pro-fluorophores à cœur BPO, plus conventionnels et qui fonctionnent pour la plupart selon un mode ratiométrique (*vide supra*). Pour valider ce modèle, une fois n'est pas coutume, la PGA a été choisie comme enzyme modèle et le motif PhAc utilisé pour protéger le site de déclenchement (i.e., aniline primaire). Ainsi la sonde **SD335** a été envisagée comme cible potentielle et une rétrosynthèse a été proposée (voir Fig III.9A).

⁶⁴ Y. Kitahara, F. Tamura et A. Kubo, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, (38), 4441-4442.

⁶⁵ L. Legentil, J. Bastide et E. Delfourne, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, (44), 2473-2475.

⁶⁶ L. Kathawate, P. V. Joshi, T. K. Dash, S. Pal, M. Nikalje, T. Weyhermuller, V. G. Puranik, V. B. Konkimalla et S. Salunke-Gawali, *J. Mol. Struct.*, **2014**, (1075), 397-405.

⁶⁷ N. L. Agarwal et W. Schaefer, *J. Org. Chem.*, **1980**, (45), 5144-5149.

⁶⁸ M. D. Cannatelli et A. J. Ragauskas, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, (57), 3749-3753.

⁶⁹ A. W. Hinman, D. Davis et W. D. Shrader, *US20160039776 A1*, **2016**.

⁷⁰ S. R. Prakash, R. L. Ellsworth et H. E. Mertel, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1987**, (24), 97-105.

⁷¹ A. I. Ononye et J. G. Graveel, *Environ. Toxicol. Chem.*, **1994**, (13), 537-541.

⁷² I. Y. Mainagashv, L. S. Klimenko, V. P. Vetchinov et V. I. Mamatyuk, *Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim.*, **1993**, 940-944.

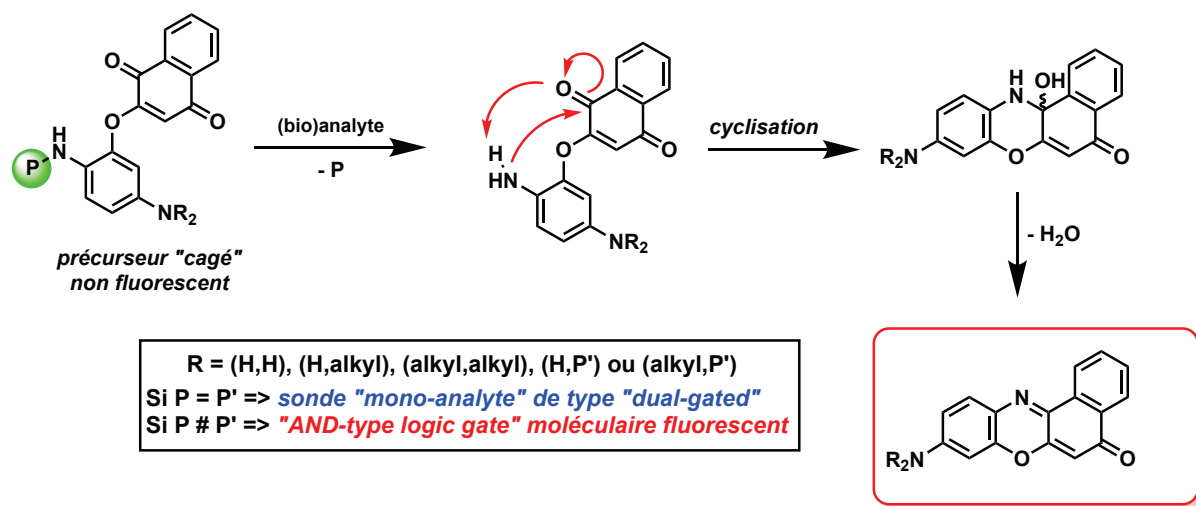


Figure III.8 - Schéma d'activation des sondes fluorogéniques mettant en jeu la formation in situ d'un cœur BPO analogue du "Nile Red".

La synthèse a ensuite été entreprise. La 2-bromo-1,4-naphtoquinone qui sert d'intermédiaire dans la synthèse de la sonde **SD335** et du fluorophore de référence **SD340** peut être synthétisée à partir du 1-naphtol et de NBS dans un mélange acétique / eau (50 : 50, v/v) à 60°C et avec un rendement de 31%. Pour accéder au fluorophore de référence, elle est mise en présence du 2-amino-5-nitrophénol et du K_2CO_3 dans le DMF pour former le composé cyclique avec un rendement de 30% après purification par chromatographie sur colonne de silice. Ce composé est ensuite réduit par hydrogénation catalytique comme décrit dans la littérature pour obtenir la 9-amino-5-benzophénoxazone fluorescente avec un rendement de 46% après précipitation et lyophilisation³³. Pour la préparation de la sonde, il faut également partir du 2-amino-5-nitrophénol dont l'aniline primaire est protégée sous forme de phénylacétamide avec un rendement de 91%. A ce stade, nous avons mis en évidence que le composé obtenu n'était pas capable de réagir sur la 2-bromo-1,4-naphtoquinone, en raison de l'effet électro-attracteur du groupement nitro. Ainsi, ce groupement a été réduit à l'aide du chlorure d'étain(II) (la réduction par hydrogénation catalytique n'a pas fonctionné) avec un rendement de 57%. L'aniline ainsi formée a pu être à son tour protégée sous forme de phénylacétamide avec un rendement de 64%. Notre but étant d'obtenir une sonde "mono-analyte" mais possédant deux sites de déclenchement sensibles à la PGA. L'étape finale de la synthèse a consisté en une réaction S_NAr (addition-élimination) du phénol sur la 2-bromo-1,4-naphtoquinone afin de former le lien éther. La sonde **SD335** a été isolée avec un rendement très faible non optimisé de 1%, après deux purifications chromatographiques : la première sur colonne de silice et la seconde par HPLC-semi-préparative en phase inverse. Cette sonde a été caractérisée par RMN et analyse de masse et son très bon degré de pureté (96% à 260 nm) confirmé par analyse HPLC (Fig. III.10).

Si l'on souhaite obtenir une sonde avec une seule position déclenchable, la substitution nucléophile entre **SD329** ou son dérivé *N,N*-diéthylamino et la 2-bromo-1,4-naphtoquinone peut être envisagée mais cette alternative n'a pas encore été testée faute de temps.

⁷³ E. B. Skibo, *J. Org. Chem.*, **1985**, (50), 4861-4865.

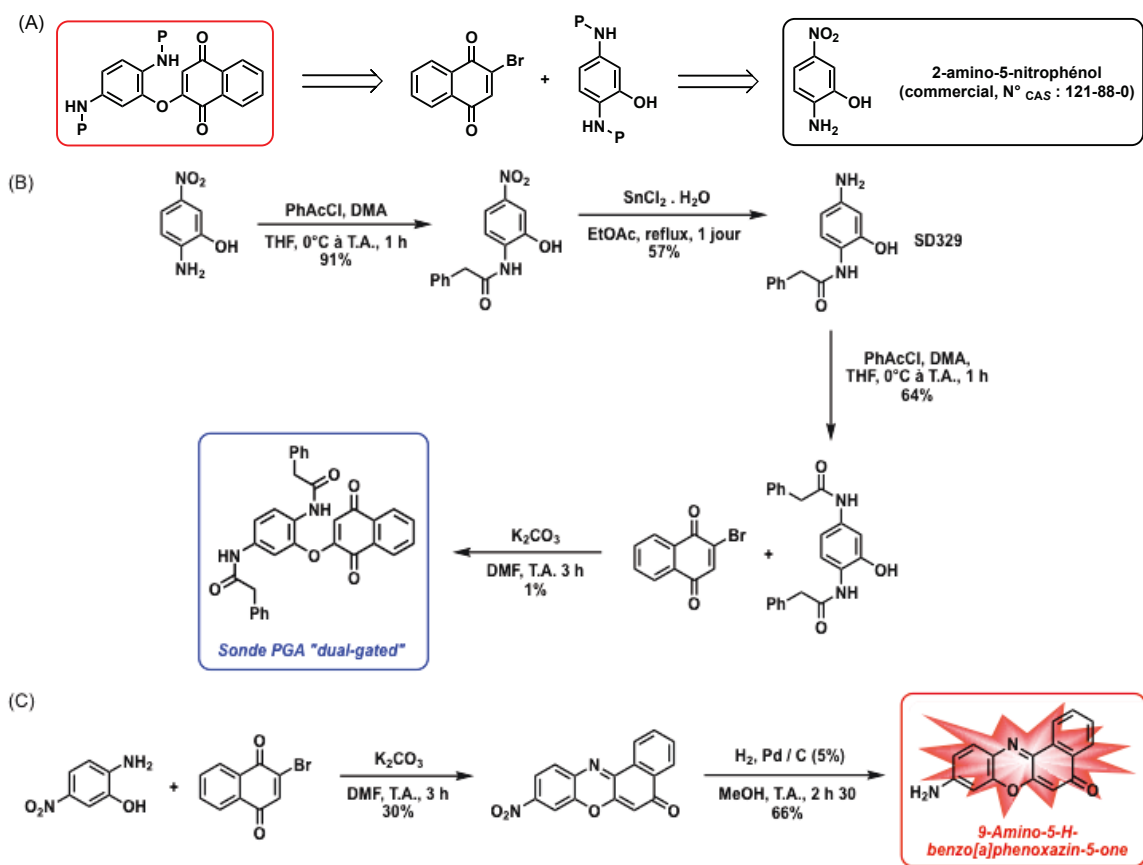


Figure III.9 - Préparation de la première sonde "mono-analyte" PGA de type "dual-gated" basée sur la formation d'un coeur BPO. (A) Analyse rétrosynthétique du composé ciblé. (B) Synthèse de la sonde PGA SD335. (C) Synthèse du fluorophore de référence SD340 (9-Amino-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one).

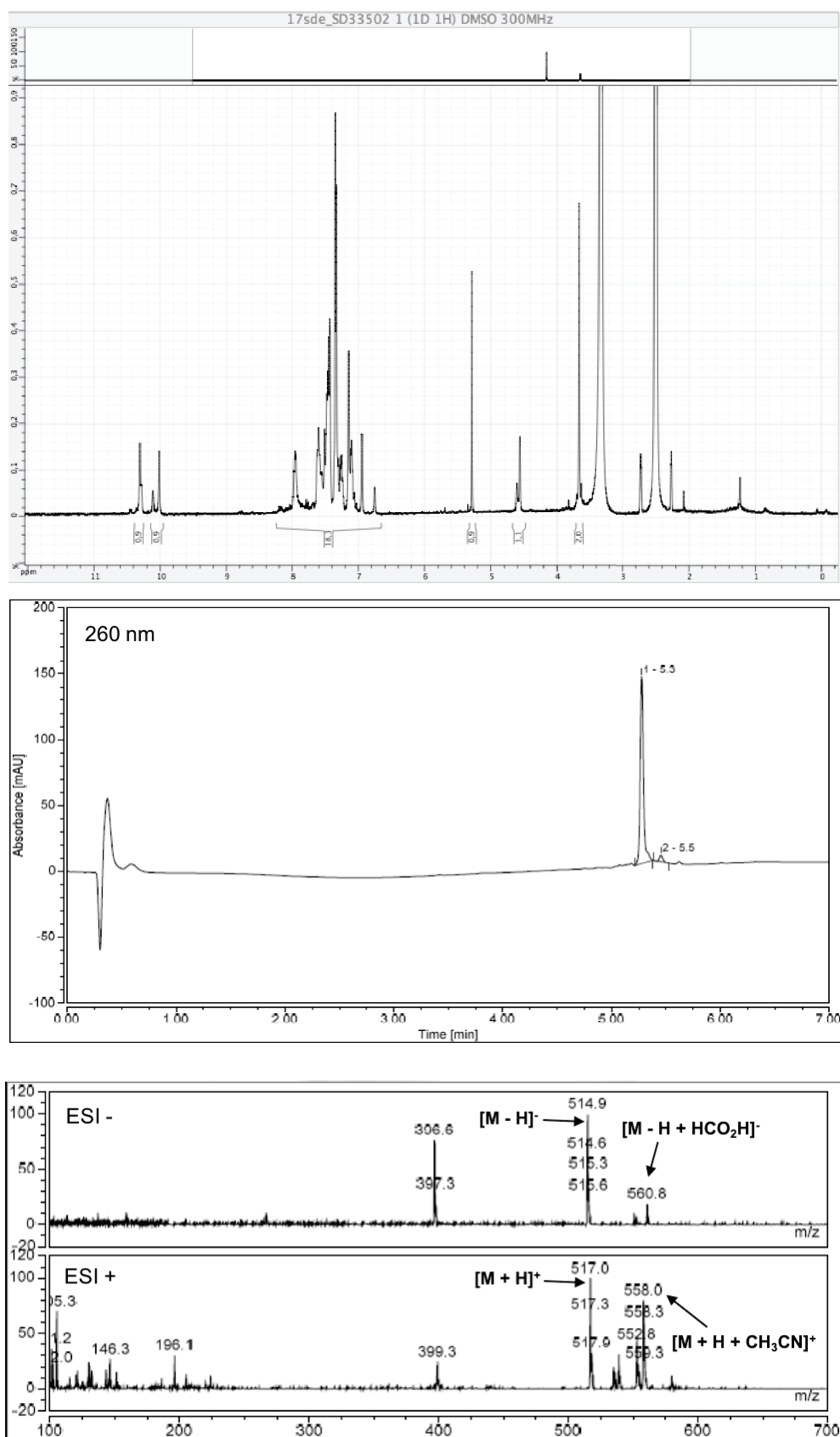


Figure III.10 - (haut) Spectre ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C) de SD335. Il semble qu'un des deux CH_2 apparaît sous forme de deux signaux distincts (non équivalents) et les pics ont tendance à se dédoubler. (centre) Profil d'éluion HPLC du composé SD335 (conditions : "system A" (voir la partie informations supplémentaire)). (bas) Spectres de masse ESI(-/+) basse résolution.

Au moment de l'écriture de ce manuscrit, les tests de déclenchement de la sonde **SD335** avec la PGA n'ont pas encore été réalisés et seront présentés ultérieurement si les résultats s'avèrent intéressants. A la lumière de la Fig. III.11, il se pourrait que les réactions enzymatiques effectuées en tampon aqueux (e.g., PBS) ne donnent pas de résultats satisfaisants en terme d'intensité de réponse fluorogénique, en raison du faible QY du fluorophore formé dans ce milieu.⁷⁴ Si c'est le cas, l'ajout d'un additif chimique (composé amphiphile de type SDS ou TCAB) ou protéique (BSA ou lipoprotéines de basse densité (LDL))^{24a,b} pourra être envisagé pour confiner ce dérivé BPO dans un environnement hydrophobe au sein duquel son QY sera optimal. L'utilisation d'un co-solvant organique peut être également envisagée afin d'exalter la fluorescence de ce dérivé du "Nile Red". Si la formation du cœur BPO s'avérait problématique en raison d'un manque de réactivité de l'aniline vis-à-vis du carbonyle de la quinone, l'emploi d'un catalyseur acide type Ag_2O ⁵² pourra être intéressant à explorer. En effet, l'acidité de Lewis du cation Ag(I) peut exalter l'électrophilie de la liaison C=O .

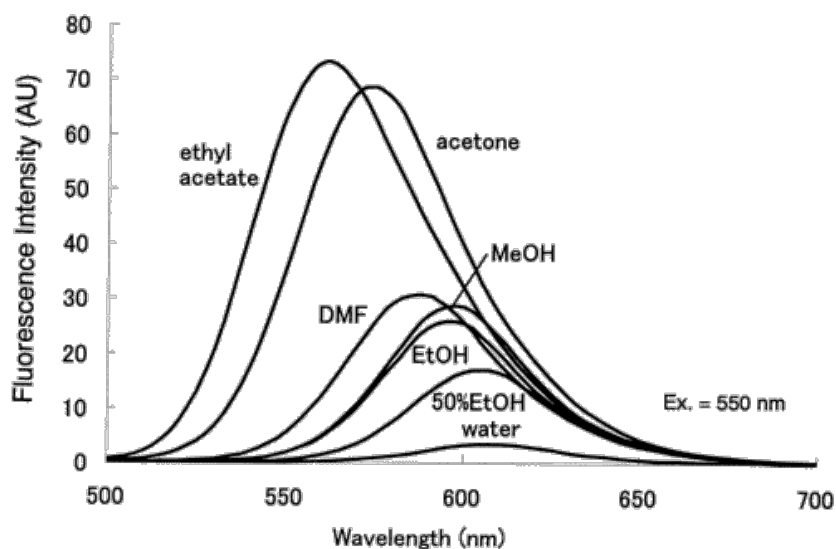


Figure III.11 - Spectres d'émission de fluorescence de SD340 (théoriquement formé in situ à partir de la sonde SD335 activée par la PGA) enregistrés dans différents solvants (Ex = 550 nm). Illustration issue de la référence [33].

⁷⁴ Pour une caractérisation photophysique complète de ce fluorophore dans différents solvants, voir : a) N. A. Kuznetsova, L. E. Marinina, V. I. Alekseeva et E. A. Luk'yanets, *J. Applied. Spectrosc.*, **1978**, (29), 315-317 ; b) V. I. Alekseeva, O. V. Bokucharov, A. I. Krymova, E. A. Luk'yanets, L. E. Marinina, V. A. Petukhov et L. P. Savvina, *J. Appl. Spectrosc.*, **1988**, (49), 570-573.

III.2. Hybrides DHX-hémicyanine

III.2.1. Bibliographie

En 1996, P. Czerney et U.-W. Grummt décrivent des fluorophores de la famille des dihydroxanthènes (DHX) pour la première fois dans le "*Journal of Chemical Research*"⁷⁵. Puis en 2012, au travers de deux publications parues dans le "*Journal of The American Chemical Society*"⁷⁶, le groupe de W. Lin va relancer les travaux d'investigation sur ce type de composés fluorescents qu'ils vont nommer les "Changsha NIR dyes" (Fig. III.12, gauche). La finalité étant de développer de nouveaux fluorophores proche-IR combinant les avantages des cyanines de type Cy5 ou Cy7 (maxima Abs / Em au-delà de 650 nm et facilement modulables) et ceux des xanthènes (stabilité (photo)chimique remarquable et caractère pro-fluorescent *via* la modification chimique réversible d'un centre fluorogénique de type aniline ou phénol, ou le processus de spirolactonisation, voir II.1.2). L'ensemble des travaux de ce groupe sur ces nouveaux fluorophores proche-IR sont résumés dans une revue récente⁷⁷ et Fig. III.12.

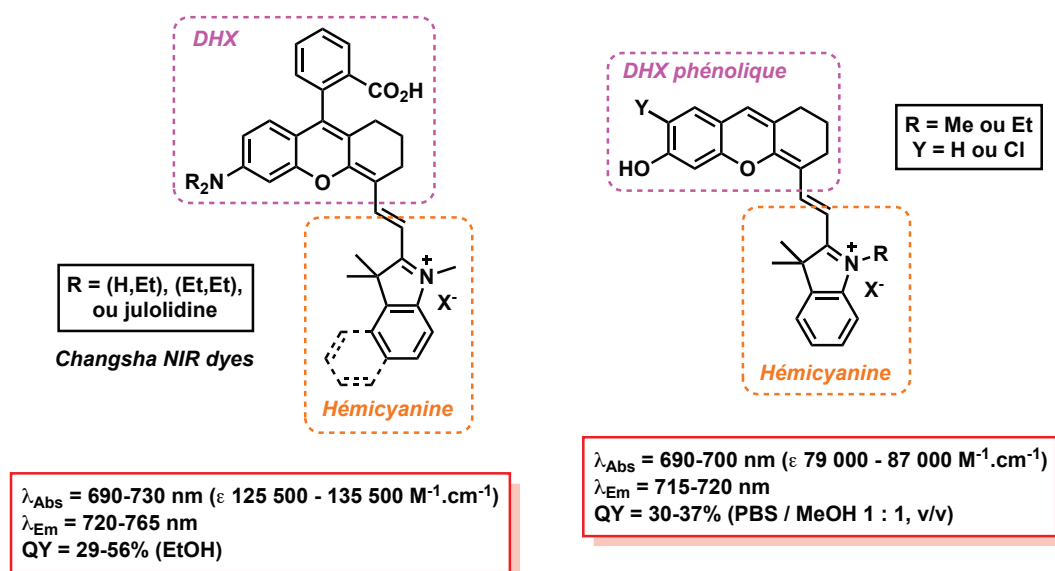


Figure III.12 - Structures des hybrides DHX-hémicyanine développés par le groupe de W. Lin.

Concernant les applications de cette classe émergente de fluorophores proche-IR, une revue récente du groupe de X. Peng sur les sondes fluorogéniques à cœur cyanine⁷⁸, recense dans l'un de ses chapitres de nombreux chemodosimètres fluorescents dérivés d'un fluorophore de type hybride DHX-hémicyanine, en particulier celui possédant un centre fluorogénique de type phénol présenté Fig. III.12 (droite). L'éventail des analytes détectés est très large, comme le montre la bibliographie des cinq dernières années. On peut mentionner le développement de sondes pour la

⁷⁵ P. Czerney et U.-W. Grummt, *J. Chem. Res., Synop.*, **1996**, 173.

⁷⁶ a) L. Yuan, W. Lin, Y. Yang et H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, (134), 1200-1211 ; b) L. Yuan, W. Lin, S. Zhao, W. Gao, B. Chen, L. He et S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, (134), 13510-13523.

⁷⁷ H. Chen, B. Dong, Y. Tang et W. Lin, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, (50), 1410-1422.

⁷⁸ W. Sun, S. Guo, C. Hu, J. Fan et X. Peng, *Chem. Rev.*, **2016**, (116), 7768-7817.

détection de cations⁷⁹, des ROS et RNS^{76,80}, des thiols biologiques⁸¹, du H₂Se⁸², du palladium⁸³, de diverses enzymes (principalement des hydrolases et des enzymes rédox)⁸⁴, du pH⁸⁵, des ions fluorure⁸⁶, et enfin de l'hydrazine⁸⁷ (même si pour cette dernière, on peut se poser la question de la spécificité de cette sonde car elle possède un acétyle comme groupe protecteur du phénol, qui est aussi substrat des estérases ; il aurait été préférable d'utiliser un ester d'acide lévulinique).

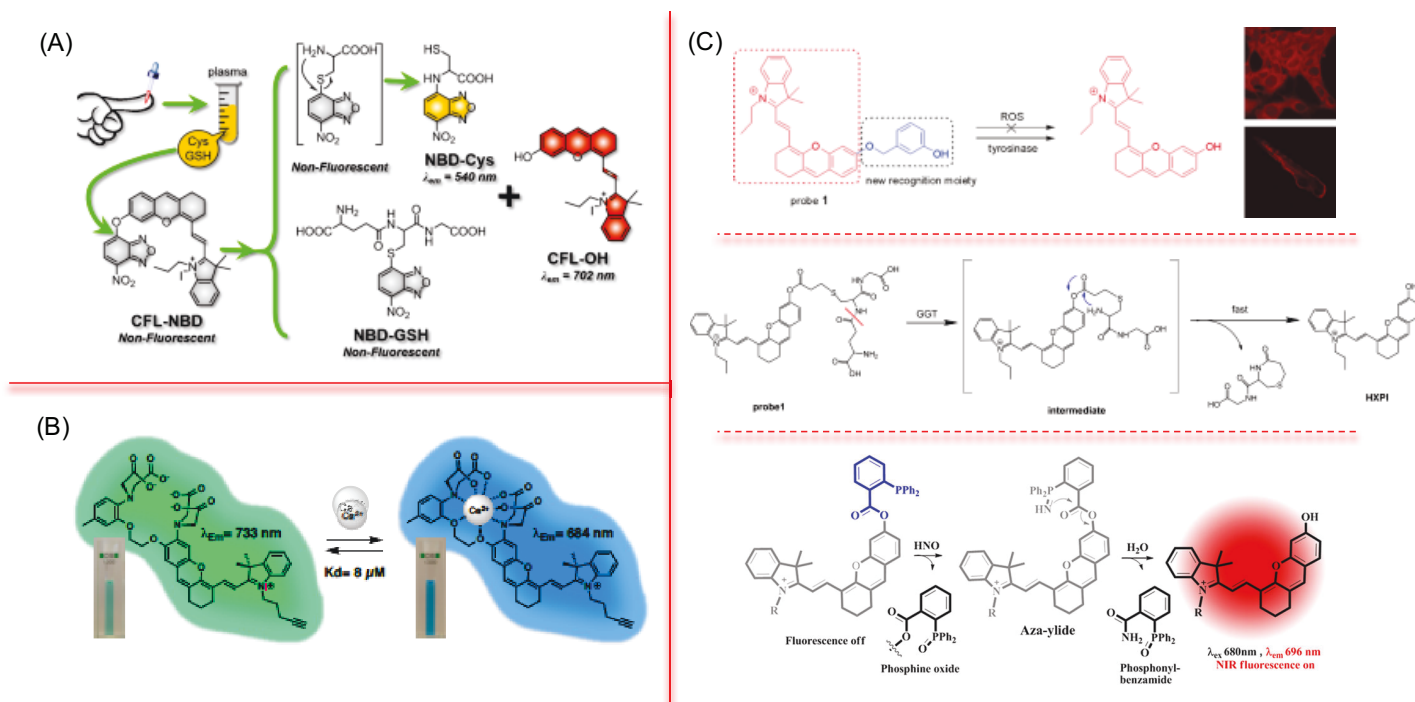


Figure III.13 - Quelques exemples de sondes fluorogéniques de type "Off-On" ou ratiométriques basées sur un cœur de type hybride DHX-hémicyanine. (A) Sonde pour la détection des thiols biologiques qui permet la discrimination entre le GSH et la cystéine, cette dernière déclenchant également la fluorescence du NBD ce qui permet de l'imager sur deux canaux d'émission distincts⁸¹. (B) Sonde ratiométrique pour la détection du cation Ca(II)^{79a}. (C) (haut) Sonde pour la détection d'une activité de type tyrosinase^{84c}; (centre) Sonde pour la détection de la GGT^{84b}; (bas) Sonde pour la détection du HNO^{80b}. Illustrations issues des références [81], [79a], [84c] [84b] et [80b].

⁷⁹ a) M. Collot *et al.*, *Chem. Comm.*, **2017**, (53), 6117-6120 ; b) H. Zhang *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, (94), 24-29.

⁸⁰ a) A. T. Wrobel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, (136), 4697-4705 ; b) Y. Tan *et al.*, *Sci. Rep.*, **2015**, (5), 16979 ; c) X. Gong *et al.*, *Dyes Pigm.*, **2016**, (131), 24-32 ; d) F. Xu *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, **2016**, (4), 7363-7367 ; e) J. Zhang *et al.*, *Chem. Comm.*, **2016**, (52), 2679-2682.

⁸¹ a) C. Han *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, (7), 27968-27975 ; b) J. Zhang *et al.*, *Anal. Chem.*, **2015**, (87), 4856-4863 ; c) P. Qi *et al.*, *Anal. Methods*, **2016**, (8), 3339-3344 ; d) L. Zhang *et al.*, *Sci. Rep.*, **2016**, (6), 18868 ; e) J. Ma *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, **2017**, (5), 2574-2579 ; f) C. S. Park *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, (89), 919-926 ; g) J. Xu *et al.*, *Sens. Actuator B-Chem.B*, **2017**, (238), 58-65.

⁸² F. Kong *et al.*, *Chem. Sci.*, **2016**, (7), 1051-1056.

⁸³ W. Su *et al.*, *Dyes Pigm.*, **2017**, (137), 293-298.

⁸⁴ a) L. Li *et al.*, *Anal. Chem.*, **2014**, (86), 6115-6120 ; b) L. Li *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, (81), 395-400 ; c) X. Wu *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, (55), 14728-14732 ; d) D. Li *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, (65), 4209-4215 ; e) Z. Luo *et al.*, *Chem. - Eur. J.*, **2017**, sous presse, DOI: 10.1002/chem.201702210 ; f) C. Zhang *et al.*, *Dyes Pigm.*, **2017**, (143), 245-251 ; g) J. Zhang *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, **2017**, (968), 97-104.

⁸⁵ a) G. K. Vegesna *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, (2), 4500-4508 ; b) Q. Wan *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, (53), 10916-10920 ; c) Y. Li *et al.*, *Anal. Chem.*, **2015**, (87), 2495-2503 ; d) X. Song *et al.*, *RSC Adv.*, **2016**, (6), 69641-69646.

⁸⁶ Q. Yang *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, **2017**, (5), 2002-2009.

⁸⁷ J. Zhang *et al.*, *Anal. Chem.*, **2015**, (87), 9101-9107.

L'utilisation en tant que molécules théranostiques a aussi été envisagée dans deux publications. La première, issue du groupe de S. Han en 2014⁸⁸, utilise une "Changsha NIR dye" couplée à un acide sialique qui permet le ciblage des cellules cancéreuses; la fluorescence se déclenche au sein des lysosomes par l'effet d'un changement de pH. Si ce système fluorogénique est développé pour de l'aide à la chirurgie, le fluorophore choisi permet en plus une thérapie photothermique par illumination proche-IR. La seconde, publiée en 2016 par les groupes de K. Xu et B. Tang⁸⁹, utilise un agent théranostique plus conventionnel dans sa construction. Ainsi, l'hybride DHX-hémicyanine est lié à un médicament anticancéreux (la camptothécine) au niveau de son centre fluorogénique de type aniline par un "linker" disulfure auto-immolable. Ce dernier va être clivé en présence d'un réducteur biologique, puis donner lieu à une élimination 1,6 et ainsi libérer à la fois le fluorophore et la camptothécine, agissant comme un inhibiteur d'ADN topoisomérase I.

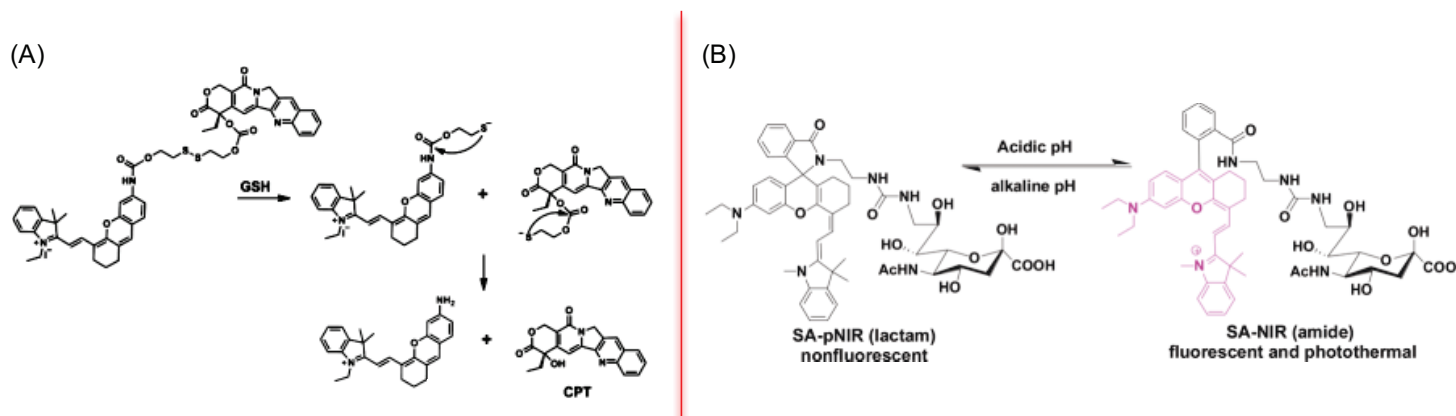


Figure III.14 - Les deux exemples d'application théranostique utilisant un hybride DHX-hémicyanine comme plateforme. (A) La libération du fluorophore et de la CPT est déclenchée par le GSH qui vient cliver le pont disulfure⁸⁹ ; (B) Le ciblage spécifique des cellules tumorales se fait à l'aide de l'acide sialique, puis une fois le composé internalisé, à pH acide, la lactone s'ouvre pour conduire à la forme ouverte du dérivé de type "Changsha NIR dye" qui est fluorescent. De plus, ce composé produit de la chaleur lorsqu'il est irradié⁸⁸. Illustrations issues des références [89] et [88].

Historiquement, il y a deux voies d'accès aux hybrides DHX-hémicyanine. La première passe par la dégradation d'une cyanine de type Cy7 "stabilisée" mise en évidence accidentellement lors d'une réaction de S_NR1 de l'atome de chlore en position *meso* par le résorcinol (Fig. III.15A). La seconde est une synthèse *de novo* mettant en jeu deux étapes de condensation distinctes (Fig. III.15B). Ces travaux de synthèse ont été réalisés par le groupe de W. Lin. Dans l'une des deux publications princeps^{76b}, ils utilisent la voie de dégradation pour obtenir des hybrides DHX-hémicyanine phénoliques. Dans la seconde^{76a}, ils décrivent une voie plus classique mettant en jeu une réaction de condensation entre la cyclohexanone et un synthon de type benzophénone hautement fonctionnalisé (provenant de la dégradation d'une rhodamine en milieu basique, aq. 12 M KOH, reflux) pour accéder au cœur DHX. Ce dernier est ensuite engagé dans une réaction de type Knoevenagel avec l'aldéhyde de Fisher.

⁸⁸ X. Wu, M. Yu, B. Lin, H. Xing, J. Han et S. Han, *Chem. Sci.*, **2015**, (6), 798-803.

⁸⁹ F. Kong, Z. Liang, D. Luan, X. Liu, K. Xu et B. Tang, *Anal. Chem.*, **2016**, (88), 6450-6456.

La plupart des travaux relatifs aux sondes fluorogéniques mentionnés précédemment utilisent la voie de dégradation des cyanines pour accéder au pro-fluorophore (le plus souvent à phénol) désiré. Cette voie facile à mettre en œuvre, permet d'obtenir des rendements moyens à bons (50 à 80%) pour accéder au squelette DHX-hémicyanine. Cependant, le coût de la cyanine de départ (à synthétiser au préalable ou à acheter) se pose en obstacle à la diversité structurale (*via* des fonctionnalisations pour optimiser les propriétés physico-chimiques par exemple) et à l'intérêt économique d'une telle approche. La stratégie *de novo* "historique", quant à elle, offre un rendement assez faible (17% sur 3 étapes) et l'utilisation de l'aldéhyde de Fischer ne permet pas d'apporter de la diversité structurale au niveau de la partie hémicyanine.

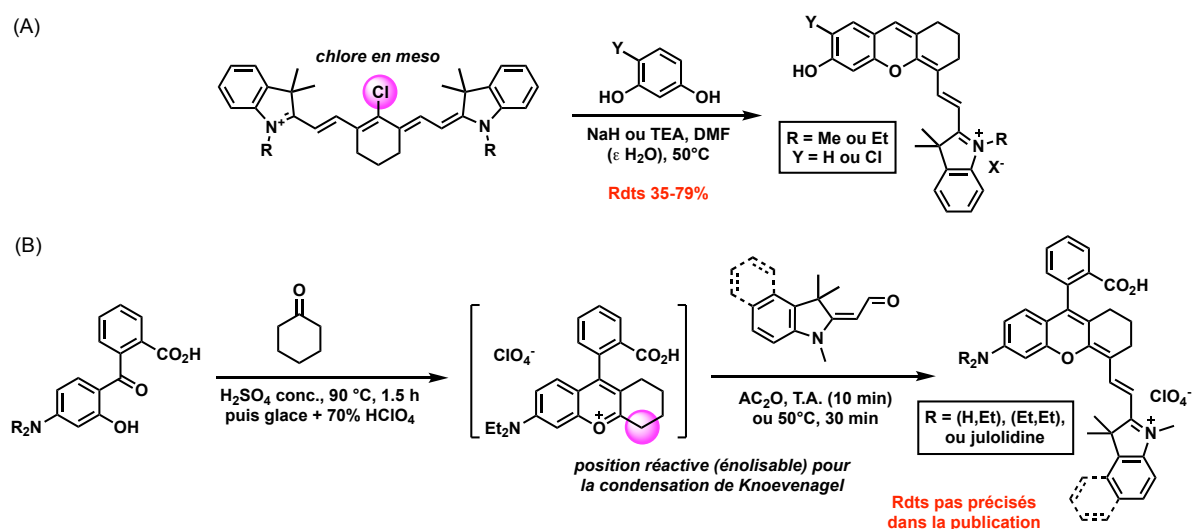


Figure III.15 - Les deux voies d'accès synthétiques aux hybrides DHX-hémicyanine, développées par le groupe de W. Lin.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de J.-A. Richard. En 2015, dans le journal *Organic and Biomolecular Chemistry*⁹⁰, il publie une nouvelle méthode de synthèse *de novo* ou il parvient à préparer l'aldéhyde du dihydroxanthène "one-pot" à partir d'un composé simple et bon marché, le 4-méthoxysalicyaldéhyde (Fig. III.16A). Il le condense ensuite avec la base de Fischer (1,3,3-triméthyl-2-méthylèneindoline). Le composé obtenu est ensuite déprotégé par traitement au BBr₃ et l'hybride DHX-hémicyanine phénolique est isolé avec un rendement de 70% sur 3 étapes. Par la suite, il a mis au point avec ses collaborateurs un protocole d'amination de Buchwald-Hartwig de l'aldéhyde du DHX bromé, et ce avant l'étape de condensation avec la base de Fischer pour obtenir de nombreux dérivés 6'-NR₂ d'hybrides DHX-hémicyanine (Fig. III.16B)⁹¹. La détermination des propriétés spectrales de ces composés a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec notre groupe. Cette collaboration s'est également matérialisée par la synthèse et la caractérisation photophysique d'hybrides DHX-pyrylium présentant des maxima d'émission supérieurs à 800 nm (Fig. III.16C)⁹².

⁹⁰ J.-A. Richard, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 8169-8172.

⁹¹ M. J. H. Ong, R. Srinivasan, A. Romieu et J.-A. Richard, *Org. Lett.*, **2016**, (18), 5122-5125.

⁹² A. Romieu et J.-A. Richard, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, (57), 317-320.

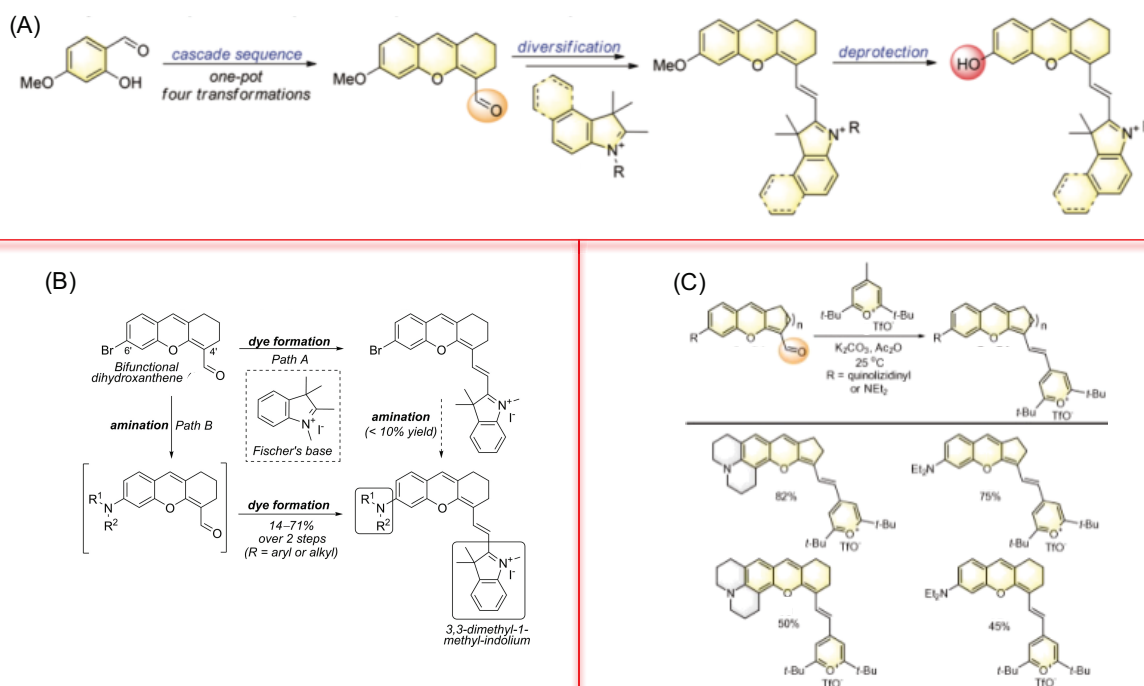


Figure III.16 - Travaux de J.-A. Richard et de ses collaborateurs sur les hybrides DHX-hémicyanine. (A) Synthèse de novo, à partir du 4-méthoxysalicyaldéhyde, des hybrides DHX-hémicyanine phénoliques⁹⁰. (B) Accès synthétique aux dérivés 6'-NR₂ DHX-hémicyanine à partir du 6'-bromo-4'-formyl-DHX⁹¹. (C) Accès synthétique aux hybrides DHX-pyrylium⁹². Illustrations issues des références [90], [91] et [92].

Suite à ces travaux de synthèse et de diversification structurale, nous souhaitons avec le Dr. J.-A. Richard explorer la possibilité de moduler les propriétés physico-chimiques de ces composés (notamment leur solubilité en milieu aqueux) et démontrer leur potentiel en marquage covalent de biomolécules. En effet, ces différents aspects n'avaient jamais été abordés dans la littérature alors qu'ils constituent un passage obligé pour envisager des applications en bioimagerie de ces composés. Notre séjour à Singapour (au sein du laboratoire du Dr. J.-A. Alexandre) effectué en juin 2016 et financé par un Partenariat Hubert-Curien Merlion a permis de définir une stratégie de fonctionnalisation des hybrides DHX-hémicyanine à la fois ambitieuse et efficace. Plus d'une dizaine de composés hydrosolubles et / ou bioconjuguables ont été synthétisés et totalement caractérisés du point de vue photophysique (à la fois lors de notre séjour puis à Dijon). Des expériences de bioconjugaison à une protéine modèle ont également été réalisées. L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Chemistry - An Asian Journal* dont le manuscrit est présenté ci-dessous.

Si ce travail annexe peut apparaître au premier abord totalement hors sujet avec les objectifs de mon travail de thèse, il n'en demeure pas moins intéressant pour les futurs travaux de notre groupe qui ambitionne d'appliquer le concept de "covalent assembly dye" à la formation *in situ* d'hybrides DHX-hémicyanine déclenchée par un analyte ou une paire d'analytes d'intérêt et ce dans un contexte *in vivo* (voir III.2.3).

III.2.2. Article 3 : Synthesis of N,N-Dialkylamino-nor-Dihydroxanthene-Hemicyanine Fused Near-Infrared Fluorophores and Their First Water-Soluble and/or Bioconjugatable Analogues

NIR Fluorescent Dyes | *Very Important Paper*

VIP **Synthesis of *N,N*-Dialkylamino-*nor*-Dihydroxanthene-Hemicyanine Fused Near-Infrared Fluorophores and Their First Water-Soluble and/or Bioconjugatable Analogues**

Michelle Jui Hsien Ong^{+, [a]} Sylvain Debieu^{+, [b]} Mathieu Moreau,^[b] Anthony Romieu,^{*, [b, c]} and Jean-Alexandre Richard^{*, [a]}

Abstract: The effective synthesis of extended conjugated *N,N*-dialkylamino-*nor*-dihydroxanthene-based fluorophores is described from diversely functionalized salicylic aldehydes. The access to these original fluorescent derivatives proceeded in two steps through a one-pot construction of the unusual *nor*-dihydroxanthene (*nor*-DHX) scaffold followed by a diversification step providing a wide variety of *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes emitting in the range of 730–790 nm. The versatility of our approach has enabled a further extension to the late-stage introduction of negatively/positively

charged polar groups onto their terminal nitrogen heterocyclic subunit, thereby giving access to the first water-soluble and/or bioconjugatable members of this emerging class of NIR fluorophores. Our water-solubilizing method is easily implementable, and the *nor*-DHX-hemicyanine skeleton maintains satisfying fluorescence quantum yields (5–20%) under physiological conditions. Finally, the bioconjugation ability of fluorescent derivatives bearing a free carboxylic acid was demonstrated through the covalent labeling of a model protein, namely, bovine serum albumin.

Introduction

Compared to the vast number of options offered for the choice of organic-based fluorophores emitting in the UV and visible region of the electromagnetic spectrum, near-infrared (NIR) families of dyes are in much shorter supply.^[1] The need for new classes of NIR fluorophores is, however, apparent considering the benefits they provide in biological systems because of the gain of sensitivity (i.e., directly linked to low background fluorescence in the therapeutic window of 700–900 nm), safety profile compared to dyes absorbing at more energetic wavelengths, and deeper tissue penetration.^[2] The families of NIR fluorophores emitting above 700 nm^[3] have so

far been dominated by the cyanine^[4,5] and (aza-)BODIPY^[6,7] dyes and despite intense research interest for alternative scaffolds, new classes of high-performance NIR fluorescent organic dyes are slow to emerge.^[8]

In this context, we became interested in the dihydroxanthene (DHX) fluorescent scaffold first reported by Czerney and Grummt in 1996.^[9] This fluorescent core is a modified rhodamine skeleton where the C1'–C2' double bond is reduced and the π -conjugated system extended at the position C4', resulting in a fluorescence emission above 700 nm. Since the rediscovery of the DHX skeleton by Lin and co-workers in 2012,^[10] particularly through a fortuitous synthesis during the reaction between a *meso*-chloro substituted heptamethine cyanine dye and resorcinol,^[11] an increasing number of publications reporting their use in a wide range of biosensing/bioimaging applications have demonstrated the growing interest for this family of fluorophores,^[12] especially those bearing an aniline/phenol moiety in C6' and acting as an effective fluorescence switch (i.e., fluorogenic center).^[13] However, the two synthetic routes reported so far to form the DHX core rely either on the use of Fischer's aldehyde precursors with limited diversification potential (Figure 1A)^[10] or on the degradation of structurally advanced, valuable heptacarbocyanine dyes (Figure 1B).^[11,14] These approaches have not given much leeway to access analogues featuring improved photophysical properties or provide site-specifically functionalized dyes. To streamline the access to the DHX-hemicyanine fused dyes and study more in depth their fluorescence properties, we developed a methodology allowing the one-pot access to DHX skeletons featuring an aldehyde function at the position C4' and/or a bromine atom as

[a] M. J. H. Ong,⁺ Dr. J.-A. Richard
Organic Chemistry, Institute of Chemical and Engineering Sciences, ICES
Agency for Science, Technology and Research, A*STAR
8 Biomedical Grove, Neuros, #07-01
Singapore 138665 (Singapore)
E-mail: jean_alexandre@ices.a-star.edu.sg

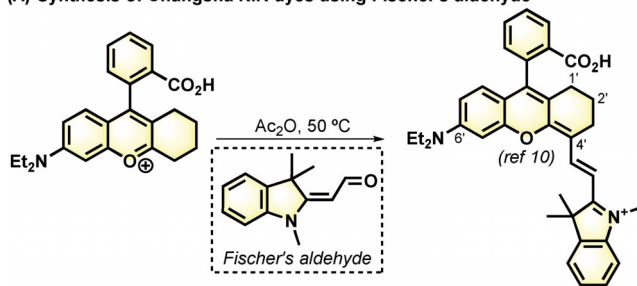
[b] S. Debieu,⁺ Dr. M. Moreau, Prof. A. Romieu
ICMUB, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté
9, Avenue Alain Savary
21078 Dijon cedex (France)
E-mail: anthony.romieu@u-bourgogne.fr
Homepage: <http://www.icmub.fr>

[c] Prof. A. Romieu
Institut Universitaire de France
103, Boulevard Saint-Michel
75005 Paris (France)

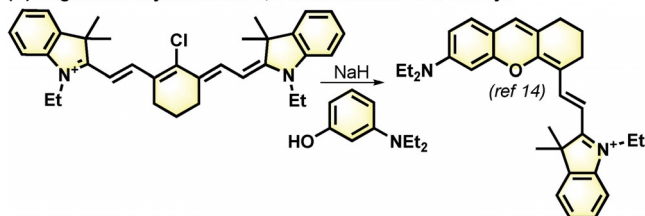
[*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/asia.201700176>.

(A) Synthesis of Changsha NIR dyes using Fischer's aldehyde



(B) Degradative synthesis of *N,N*-disubstituted DHX NIR dye



(C) This work: *de novo* synthesis of *N,N*-disubstituted *nor*-DHX NIR dyes

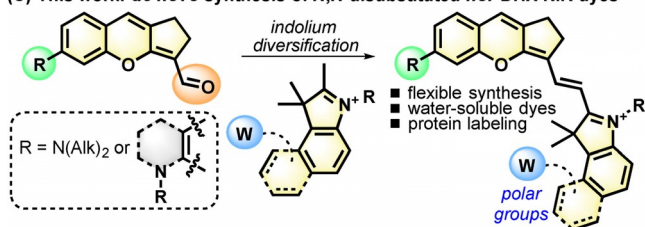


Figure 1. (A,B) Previous approaches to access dihydroxanthene-hemicyanine fused NIR fluorophores; (C) Alternative *de novo* synthesis allowing the easy access to structural analogues.

C6' substituent, both of them used as handle(s) for late-stage diversification.^[15] Using that approach, we also synthesized the first *nor*-dihydroxanthene (*nor*-DHX) scaffold, a more compact skeleton than its original sibling and for which we have already reported *N,N*-dialkylamino-dihydroxanthene-pyrylium conjugated fluorophores emitting above 800 nm.^[16]

However, a systematic diversification of the electron-pulling and electron-donating parts of the *nor*-DHX-based dyes has not been explored yet. In order to fill this gap, we considered the synthesis of a small library of such NIR fluorophores

through substituent variations for the *N,N*-dialkylamino donor and by changing the nature of indolium acceptor moiety. This library enabled us to conduct a structure–fluorescence relationship (SFR) study providing valuable information related to the fine-tuning of photophysical properties of these unconventional DHX-type fluorophores. In this article, we report the results of this ambitious study as well as a further extension of the claimed synthetic methodology to the preparation of the first water-soluble DHX-hemicyanine fused dyes (Figure 1C). Furthermore, the availability of a free carboxylic acid moiety within the terminal indolic subunit of some of these compounds has enabled us to use them in fluorescent covalent labeling of proteins.

Results and Discussion

Synthesis of *N,N*-dialkylamino-*nor*-DHX-hemicyanine fused NIR fluorophores

The access to a wide variety of fluorescent organic dyes could be ensured at the outset by choosing an appropriate range of salicylic aldehydes displaying diversity on the amino group donor. We therefore sourced or prepared salicylic aldehyde precursors featuring either an acyclic *N,N*-dialkylamino (**1a–c**), a cyclic *N,N*-dialkylamino (**1d–f**) or a fused *N,N*-dialkylamino (**1g,h**) moiety (Figure 2), the latter presenting the additional advantage to potentially lead to fluorophores not accessible using our previously reported late-stage amination strategy.^[15b] The construction of the *nor*-DHX scaffold could be secured using our optimized conditions (i.e., Cs₂CO₃, DMF) where *N,N*-substituted salicylic aldehydes condensed one-pot with 2-bromocyclopent-1-ene-1-carbaldehyde **2** to form the formyl derivatives **3a–h** in yields ranging from 47% to 87%. With eight *nor*-DHX aldehyde precursors **3a–h** in hand, we then performed a diversification step to vary the electron-acceptor moiety of the targeted NIR fluorophores. In accordance with the recent results reported by Yuan and co-workers,^[17] the work conducted in our group identified the 1,3,3-trimethyl-2-methyleneindoline unit (also known as Fischer's base) and related derivatives as the ideal structural moieties to maximize both absorption and emission of the π -extended *nor*-DHX fluo-

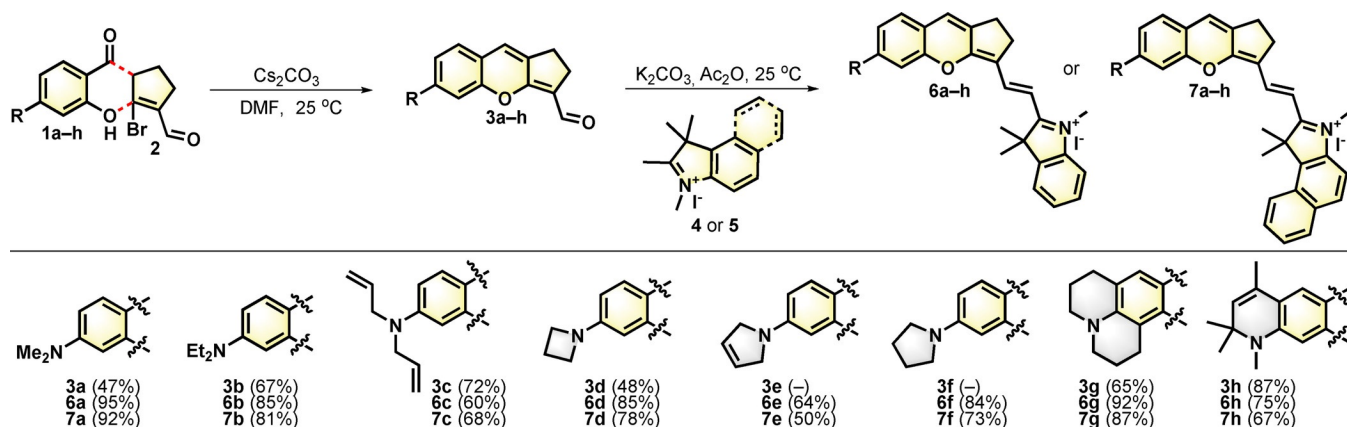


Figure 2. Synthesis of *N,N*-dialkylamino-*nor*-dihydroxanthene-hemicyanine fused NIR fluorophores.

rophores in the NIR range. We therefore chose two of such indolinium salts in order to produce sixteen new NIR fluorophores upon condensation with **3a–h**, whose fluorescence properties would give us insight regarding the SFR of this family of dyes. We chose 1,2,3,3-tetramethyl-3*H*-indolinium **4** and 1,1,2,3-tetramethyl-1*H*-benz[e]indolinium **5** (both as iodide salt) as condensing partners because of their simplicity and the availability of related precursors functionalized at various positions of the indolinium or benzoindolinium skeleton. The Knoevenagel condensation proceeded in good to excellent yields (50–95%) under mild conditions (i.e., K₂CO₃, Ac₂O). The structures of these sixteen novel DHX-type fluorophores (Figure 2) were unambiguously confirmed by ESI-HRMS and NMR spectroscopic analyses (see the Supporting Information).

Photophysical properties of *N,N*-dialkylamino-*nor*-DHX-hemicyanine fused NIR fluorophores

The photophysical properties of these novel DHX-based fluorophores were evaluated in different media including phosphate-buffered saline (PBS) with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) as simulated body fluid, EtOH, and CHCl₃. These spectroscopic data are gathered in Table 1, and selected examples of electronic absorption, excitation and emission spectra of **6b** and **7b** are available in Figure 3. As expected, fluorophores **6a–h** and **7a–h** display absorption and fluorescence emission peaks in the NIR region at 710–774 nm and 728–791 nm depending on the substitution pattern of the amino group and the medium. However, no significant solvatochromism effect was observed for this class of DHX-hemicyanine hybrids. The reduction of the dihydro ring size has no real positive or negative impact on the spectral features of these DHX-based fluorophores because values close to those of cyclohexenyl-based congeners previously studied have been obtained. Comparing the properties of the **6** and **7** series differing only by the addi-

tional aromatic ring on the hemicyanine part of the dye showed a 13–21 nm red-shift between **6a–h** and their π -extended analogues **7a–h**. The relative fluorescence quantum yields under physiological conditions were better for the indolinium analogues **6a–h** (8–16%) than for benzoindolinium **7a–h** (4–6%), and sufficient for considering the further use of these NIR emitters in biosensing/bioimaging applications. Furthermore, it is known that the presence of BSA or related proteins in aqueous media enhances the emission of organic-based fluorophores owing to a combination of rigidification, a reduction in the polarity of the dye's microenvironment (binding in the hydrophobic BSA pocket), and deaggregation.^[18] Interestingly, we noted that the quantum yields of the *nor*-DHX indolinium analogues **6a–h** were notably superior compared to the values (4–11%) already reported for a similar subset of *N,N*-dialkylamino-dihydroxanthene-based fluorophores.^[15b] This may be explained by the lower flexibility of the 5-ring system that limits molecular motions involved in the non-radiative decay pathways. The nature of the *N,N*-dialkylamino electron-donating group appeared to be also important to influence the brightness of the *nor*-DHX fluorophores. For instance, it is worth highlighting the superiority of dyes **6e** and **6f** featuring either a 3,4-dihydro pyrrolidinyl or pyrrolidinyl over the other *N,N*-dialkylamino donating moieties, including the azetidiny ring which had previously been reported as being the optimum electron-donating group for brighter rhodamine-based fluorophores, namely, Janelia Fluor dyes (Table 1).^[19]

Synthesis of water-soluble *N,N*-dialkylamino-*nor*-DHX-hemicyanine fused NIR fluorophores

Capitalizing on the promising fluorescence properties obtained for the *nor*-DHX- and DHX-based fluorophores in PBS containing 5% BSA, we were then interested in exploring the synthe-

Table 1. Photophysical properties of *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes **6a–h** and **7a–h** at 25 °C. For structures, see Figure 2.

entry	dye	Abs λ_{\max} [nm] ^[a]			Em λ_{\max} [nm] ^[c]			ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]			Stokes' shift [cm ⁻¹]			Φ_F [%] ^[d]		
		PBS ^[b]	EtOH	CHCl ₃	PBS ^[b]	EtOH	CHCl ₃	PBS ^[b]	EtOH	CHCl ₃	PBS ^[b]	EtOH	CHCl ₃	PBS ^[b]	EtOH	CHCl ₃
1	6a	719	712	722	731	739	737	89 865	90 530	101 580	228	513	282	12	19	30
2	6b	726	720	731	736	744	745	76 530	84 020	100 430	187	448	257	12	20	28
3	6c	715	710	720	728	736	735	81 480	107 430	125 050	250	498	283	11	19	32
4	6d	721	712	727	735	744	745	82 430	75 310	86 165	264	604	332	13	20	31
5	6e	717	713	723	728	738	738	130 770	109 480	127 070	211	475	281	16	18	30
6	6f	725	720	731	734	748	745	116 460	98 875	118 200	169	520	257	16	20	28
7	6g	747	740	750	758	768	764	94 530	115 840	137 540	194	493	244	8	11	19
8	6h	750	742	757	764	773	774	73 050	93 080	110 380	244	540	290	9	12	17
9	7a	737	730	741	748	760	756	52 810	110 590	120 360	200	541	268	5	8	14
10	7b	742	737	748	749	764	764	66 970	90 205	109 080	126	480	280	5	8	14
11	7c	735	729	739	746	753	755	72 150	108 210	123 635	201	437	287	6	6	14
12	7d	739	731	744	752	765	764	62 895	70 150	81 885	128	608	352	6	7	15
13	7e	735	731	742	742	758	757	36 485	69 365	82 930	128	487	267	4	9	16
14	7f	742	738	749	749	763	765	56 680	92 960	112 900	126	444	279	6	5	11
15	7g	765	757	768	778	783	781	79 420	103 160	128 780	218	439	217	5	7	15
16	7h	766	759	774	779	791	789	65 920	102 400	130 170	218	533	246	4	8	13

[a] Assigned to S0–S1 transition but vibronic and/or S0–S2 transitions are also observed (see Figure 3 for examples of Abs spectra). [b] PBS buffer containing 5% BSA. [c] Excitation at 650 nm. [d] Determined at 25 °C by using ICG ($\Phi_F = 10.6\%$ in DMSO, $\lambda_{\text{ex}} = 650$ nm) as standard (see the Supporting Information).

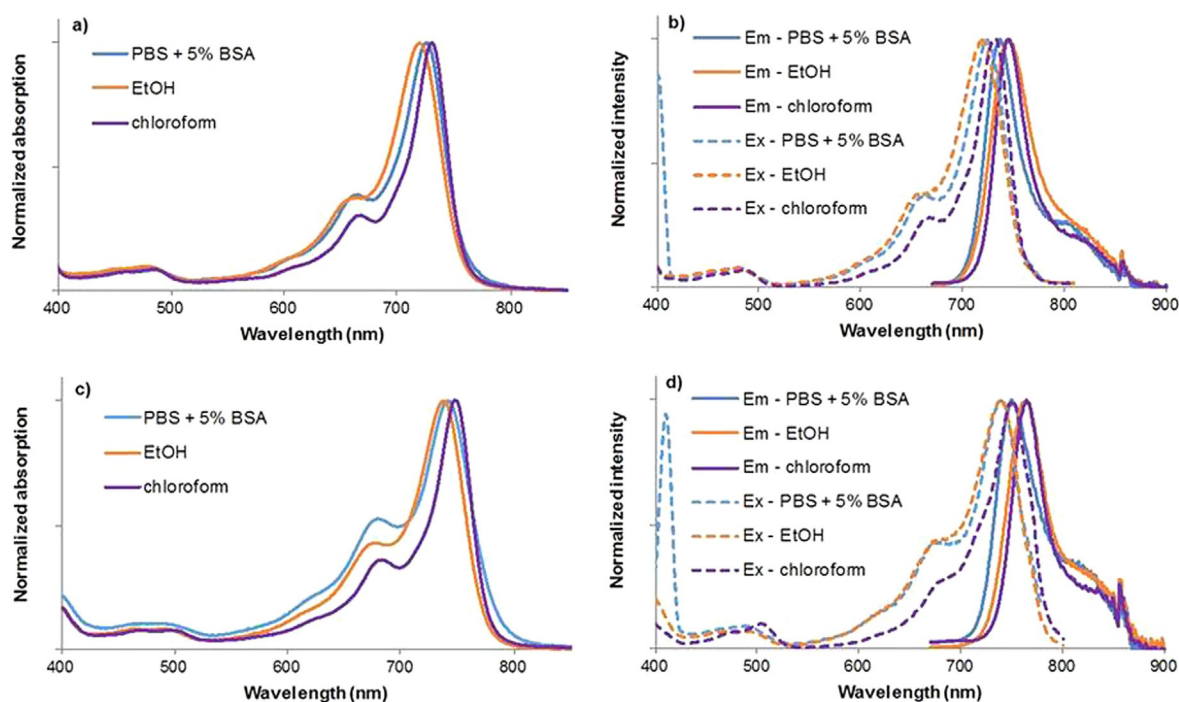


Figure 3. Normalized absorption, fluorescence emission (excitation at 650 nm) and excitation (emission at 800, 820 or 830 nm) spectra of *N,N*-diethylamino-*nor*-DHX NIR fluorophores **6b** (a and b) and **7b** (c and d) at 25 °C. Please note: absorption and fluorescence emission spectra were recorded with solutions whose concentrations are in the range 10^{-5} – 10^{-6} M and 10^{-6} – 10^{-7} M, respectively. All emission spectra (also those of standard ICG) are corrected until 850 nm, which explains the artefact observed at this wavelength.

sis of the first hydrophilic variations of these unusual fluorescent scaffolds to facilitate their applications in biological media. To the best of our knowledge, no water-soluble DHX analogue has been reported to date, and we hypothesized that the hemicyanine part could be functionalized through the site-specific introduction of polar group(s) onto the phenyl ring and/or through the *N*-quaternarization of the (benzo)indole unit with a hydrophilic alkylating agent. For this purpose, we set out to take advantage of the divergency of our synthetic route to introduce one or two polar groups negatively and/or positively charged at physiological pH, to the skeleton of the fluorophore. The three hydrophilic moieties (i.e., carboxylate, sulfonate and trimethylalkylammonium) selected to be added to the *nor*-DHX-hemicyanine hybrid scaffold during the diversification step were therefore positioned at various specific positions of the indolium partner. Because of its convenient availability on gram scale, we performed the water-solubilization step on *nor*-DHX aldehyde precursor **3b** (see Figure 4 as an illustration of the scope of our investigations). Our previously established conditions for the Knoevenagel condensation (i.e., K_2CO_3 , Ac_2O) proved to be disappointing since only traces of mono-sulfonated fluorophore **8** could be identified in the reaction mixture. To our delight, we realized that the presence of base was detrimental to the formation of the dye and that by simply removing it (i.e., Ac_2O , conditions A), the Knoevenagel-type condensation between **3b** and a set of indolinium salts bearing either a single or two sulfonates or a carboxylic acid functionality worked well. The resulting hydrophilic derivatives were isolated by flash column chromatography on silica

gel in good yields (53–88%). It is worth noting the additional benefit of the carboxylic acid function in **11** and **12** which can also be used as a reactive handle for further functionalization through amidification reactions. As an illustrative example, we performed an amide coupling between **12** and 2-aminoethane-1,1-disulfonic acid (DIEA salt)^[20] and mediated by uronium reagent HATU,^[21] that allowed the post-synthetic sulfonation of this DHX-hemicyanine fused dye **12** under very mild conditions. After purification by semi-preparative RP-HPLC with aqueous 0.1% TFA and CH_3CN as eluents, compound **13** was obtained in pure form and in a satisfying isolated yield of 31%.

Further extension of the Knoevenagel-type reaction with a more polar indolinium condensing partner failed due to solubility issues even at higher reaction temperatures. Inspired by a literature precedent,^[22] we found that the use of CH_3OH as solvent was not only able to solubilize all the starting materials but also successfully led to the desired water-soluble DHX-based fluorophores **14–18** in the presence of a trace amount of a weak base (i.e., pyridine, CH_3OH , conditions B). Isolation of **15**, **16** and **18** in a pure form was achieved by semi-preparative RP-HPLC with aqueous 0.1% TFA and CH_3CN as eluents (isolated yields: 10%, 14% and 37%, respectively) whereas compounds **14** and **17** were purified by flash column chromatography on silica gel. It is important to underline that the preparation of the indolinium precursor involved in the synthesis of **15** was not trivial because the *N*-quaternarization of 2,3,3-trimethyl-3*H*-indole-5-carboxylic acid with an excess of 1,3-propanesultone (acting as both reagent and solvent) at 120–145 °C also led to complete esterification of the carboxylic acid

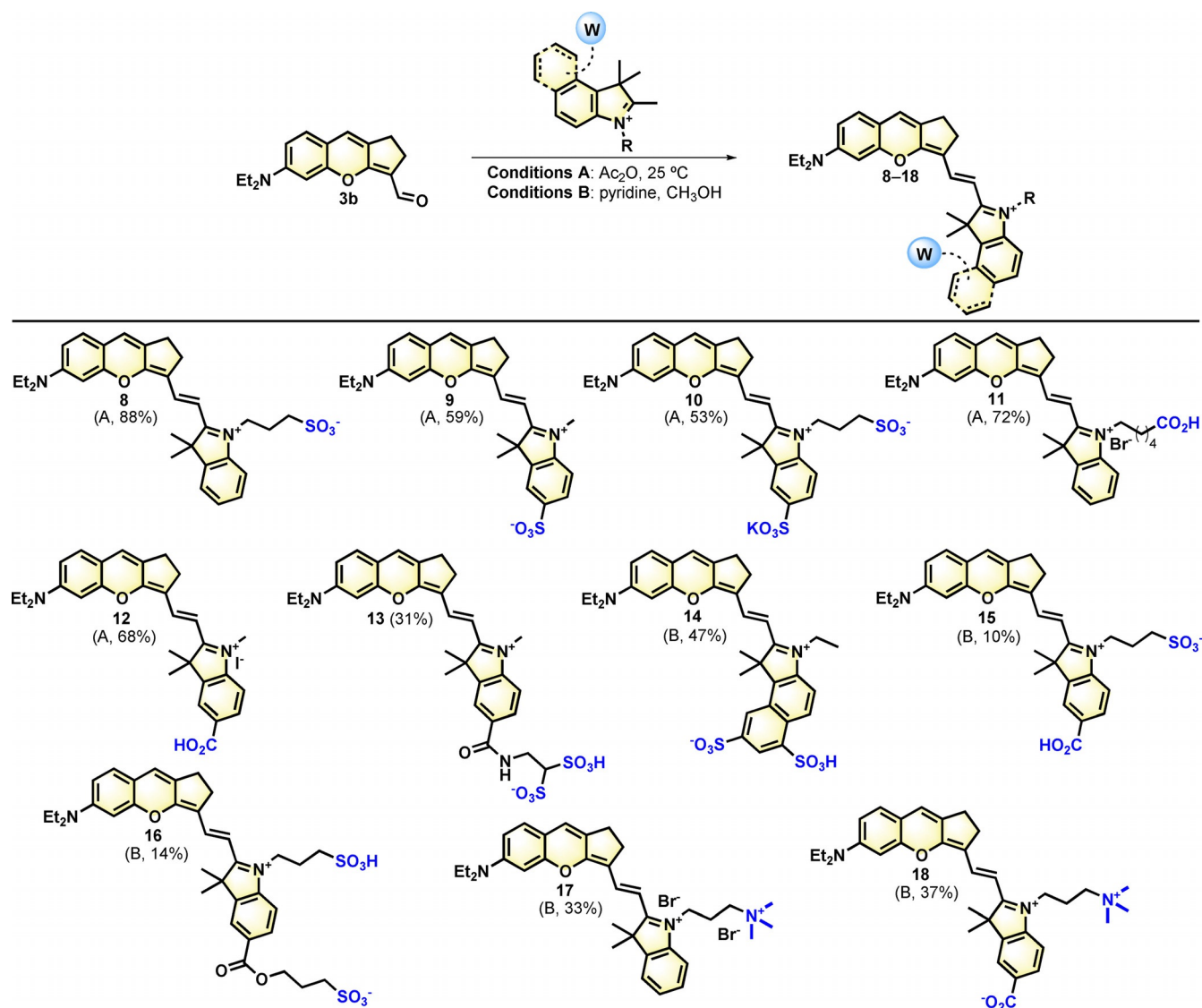


Figure 4. Synthesis of water-soluble *N,N*-diethylamino-*nor*-dihydroxanthene NIR fluorophores (compounds 13, 15, 16 and 18 were isolated as TFA salts; the number of TFA molecules was determined by elemental analysis).

(see the Supporting Information for the preparation of such starting indolinium salt). A further acidic hydrolysis (aq. 6 N HCl) followed by a purification by semi-preparative RP-HPLC with aqueous triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB, 50 mM, pH 7.5) and CH₃CN as eluents were required to readily obtain this starting material. Trimethylalkylammonium groups have recently emerged as valuable water-solubilizing moieties to dramatically improve the solubility of a wide range of organic-based fluorophores under physiological conditions.^[23] That approach, mainly applied to heptamethine cyanine dyes, has led to better performances *in vivo* in the context of NIR fluorescence molecular imaging^[5b,e,f,i,24] and prompted us to introduce the positively charged trimethylpropylammonium group onto the *nor*-DHX-hemicyanine hybrid scaffold. Fluorophores 17 and 18 bearing a positive net charge $q = +2$ and $q = +1$ at physiological pH were therefore synthesized, the latter one featuring an additional carboxylic acid group for further functionalization (see below).

Photophysical properties of water-soluble *N,N*-dialkylamino-*nor*-DHX-hemicyanine fused NIR fluorophores

The introduction of polar groups onto the skeleton of the *nor*-DHX-based fluorophores gave us the opportunity to assess their influence on the solubility and aggregation behavior under physiological conditions. As a general trend, *nor*-DHX derivatives bearing a single hydrophilic group are soluble in water and related aqueous buffers in the concentration range 1–100 μ M, and the upper limit is 1–2 mM for the bis-sulfonated derivatives 10, 13, 14 and 16, and carboxylic acids 15 and 18. The photophysical properties were determined in pure PBS and in PBS containing 5% (w/v) BSA and are gathered in Table 2 (see Figure 5 and the Supporting Information for the electronic absorption, excitation and emission spectra). In the concentration range 5–15 μ M, we found that a partial aggregation occurred in PBS with fluorophores 8–16 featuring carboxylate and/or sulfonate group(s) (i.e., negatively charged at

Table 2. Photophysical properties of water-soluble *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes **8–18** at 25 °C. For structures, see Figure 4.

entry	dye	Abs λ_{\max} [nm] ^[a]		Em λ_{\max} [nm]		ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]		Stokes' shift [cm ⁻¹]		Φ_F [%] ^[b]	
		PBS	PBS + 5% BSA	PBS	PBS + 5% BSA	PBS	PBS + 5% BSA	PBS	PBS + 5% BSA	PBS	PBS + 5% BSA
1	8	719, 787 ^[c]	731	743	738	— ^[d]	81 835	449	130	9	18
2	9	648, 704	729	745	744	— ^[d]	—	2009, 782	277	6	13
3	10	663, 716	734	750	751	— ^[d]	85 600	1750, 633	308	7	11
4	11	652, 713	669, 732	742	740	— ^[d]	45 130, 168 540	1860, 548	1434, 148	7	16
5	12	648, 709	730	747	742	— ^[d]	97 520	2045, 717	222	6	10
6	13 (1.5 TFA)	666, 717	722	752	748	— ^[d]	150 520	1717, 649	481	5	10
7	14	677, 728	740	760	755	— ^[d]	106 400	1613, 578	268	3	13
8	15 (1.5 TFA)	664, 719	736	747	752	58 930, — ^[d]	122 270	1673, 521	289	5	11
9	16 (1.25 TFA)	660, 707	738	746	761	79 540, — ^[d]	147 300	1747, 739	410	3	8
10	17	705	724	745	740	85 700	77 350	762	299	7	12
11	18 (3.5 TFA)	717	724	751	744	128 730	131 200	631	371	5	11

[a] Assigned to S0–S1 transition but vibronic and/or S0–S2 transitions are also observed (see Figure 5 and the Supporting Information for the corresponding Abs spectra). [b] Determined at 25 °C by using ICG ($\Phi_F = 10.6\%$ in DMSO, $\lambda_{\text{ex}} = 650$ nm) as standard (see the Supporting Information). [c] Only one absorption maxima at 715 nm was observed at a lower 10^{-6} – 10^{-7} M concentration. [d] A non-linear relationship between absorption and concentration was obtained due to the formation of H-type dimer aggregates.

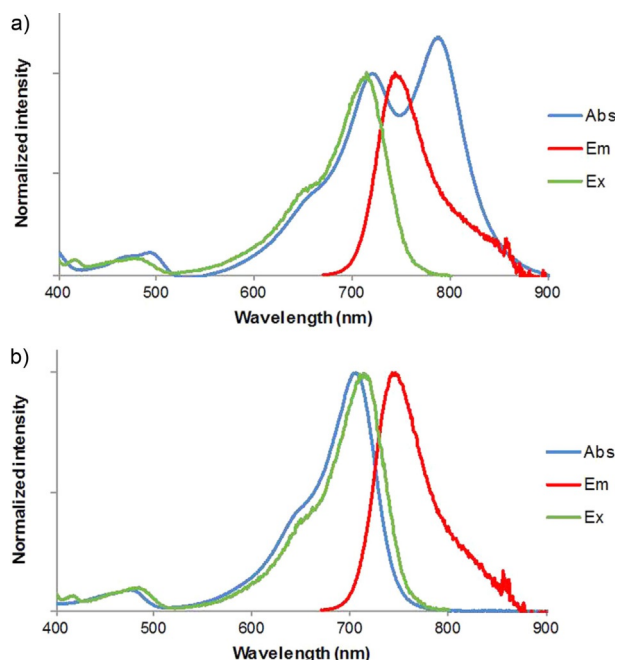


Figure 5. Normalized absorption, fluorescence emission (excitation at 650 nm) and excitation (emission at 820 nm) spectra of water-soluble *N,N*-diethylamino-*nor*-DHX NIR fluorophores **8** (a) and **17** (b) in PBS at 25 °C. Please note: absorption and fluorescence emission spectra were recorded with solutions whose concentrations are in the range 10^{-5} – 10^{-6} M and 10^{-6} – 10^{-7} M, respectively. All emission spectra (also those of standard ICG) are corrected until 850 nm, which explains the artefact observed at this wavelength. If the absorption spectrum of **8** in PBS is recorded in the range of 10^{-6} – 10^{-7} M, the red-shift band at 787 nm disappears and a single maximum at 715 nm is observed.

physiological pH), which prevents an accurate determination of their molar extinction coefficients at absorption maxima. However, these compounds remained fluorescent and satisfactory fluorescence quantum yields (3–9%) were obtained. Such aggregation phenomenon in PBS could be completely avoided through the introduction of the positively charged trimethylpropylammonium moiety. Indeed, for compounds **17** and **18**,

a good matching between the absorption and excitation spectra was observed, and a linear relationship between absorbance and concentration was obtained (see Figure 5b and the Supporting Information). Compared to these measurements, those achieved in PBS/BSA revealed a notable red-shift for the absorption spectra, resulting in lower Stokes shifts (7–26 nm, 130 – 480 cm⁻¹ vs. 24 – 41 nm, 449 – 782 cm⁻¹). Using the optical properties of **6b** as benchmark (i.e., Abs/Em $\lambda_{\text{max}} = 726/736$ nm, $\epsilon = 76530$ M⁻¹ cm⁻¹ and $\Phi_F = 12\%$ in PBS containing 5% BSA) to compare with those of more hydrophilic *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes **8–18** in PBS/BSA, we observed that the absorption and emission maxima were in the range 722–740 nm and 738–761 nm, respectively, directly dependent on the presence of ionized substituent(s) on the *N*-alkyl arm and/or phenyl ring of indolinium unit. Gratifyingly, a 50% increase of fluorescence quantum yield was obtained with fluorophore **8**, showing the beneficial effect of such functionalization to obtain bright and biocompatible DHX-hemicyanine fused dyes.

Water-soluble *N,N*-dialkylamino-*nor*-DHX-hemicyanine fused dyes as fluorescent covalent labeling reagents of biomolecules

The marked solubility in aqueous media, the valuable optical properties, and the availability of a free carboxylic acid group on their core structure, are positive features for the use of DHX derivatives **12**, **15** and **18** in fluorescent bio-labeling applications.^[25] To demonstrate their ability both to readily react with proteins under mild conditions and to give fluorescent bioconjugates, the labeling of BSA as a model protein was explored. BSA contains 59 lysine residues, and more than thirty are accessible for conjugation.^[26] Since the ϵ -amino groups of lysine residues of BSA are known to form amides through reaction with a wide range of activated esters in aqueous buffers, the conversion of **12**, **15** and **18** into their corresponding NHS esters using the uronium-based coupling agent TSTU^[27] (1.1 equiv.) and DIEA (2–3 equiv.) in DMSO was considered. BSA was labeled after overnight incubation with either a 15- or 30-

fold molar excess of the NHS ester in phosphate buffer (pH 7.0 or pH 7.7) at 4 °C. The *nor*-DHX-conjugated proteins **BSA-12**, **BSA-15** and **BSA-18** were washed with an ultra-centrifugal filter device (30 kDa cut-off) to remove most of the excess of free unbound *nor*-DHX-hemocyanine fused dye. Since the method of choice for analyzing protein conjugates is mass spectrometry, all labeled protein samples were subjected to matrix-assisted laser desorption time-of-flight (MALDI-TOF) analyses, and their spectra were compared with that of the parent BSA (Figure 6 and Figures S1–S3 in the Supporting Information). In all of the mass spectra, a main peak assigned to $[M+H]^+$ (molecular ion) was observed. The mass difference between molecular ions of BSA and its fluorescent conjugates allowed to estimate labeling densities, defined as the (average) number of fluorophore molecules attached to a protein (F/P). The corresponding values are gathered in Table 3. Moderate to high F/P values (4.9–14.4) were obtained but a poor correlation was observed with those determined by the UV/Vis spectrophotometric method (see the Supporting Information), mainly for fluorescent conjugates **BSA-15** and **BSA-18**. Even if there are no scientific certainties to interpret these unexpected results, we assumed the heterogeneity of labeled protein samples containing residual amounts of free *nor*-DHX-hemocyanine fused dye (monomeric and/or aggregated forms) not removed by ultracentrifugation and adsorbed on the protein.

Table 3. Photophysical properties and labeling densities of fluorescent BSA conjugates.

dye	Abs λ_{\max} [nm] ^{[a], [b]}	Em λ_{\max} [nm]	F/P [MS] ^[c]	F/P [UV/vis] ^[d]	Φ_F [%] ^[e]
12, 15 eq., pH 7.0	665, 720	746	5.4	3.1	1.5
12, 30 eq., pH 7.0	658, 716	748	5.2	6.0	1.5
12, 15 eq., pH 7.7	666, 720	748	5.0	4.7	1.5
12, 30 eq., pH 7.7	658, 718	749	4.9	4.2	1.7
15, 15 eq., pH 7.0	682 (sh) ^[f] , 731	747	5.1	1.4	2.0
15, 30 eq., pH 7.0	680 (sh) ^[f] , 729	746	5.0	1.3	1.5
15, 15 eq., pH 7.7	676, 729	751	5.2	2.5	1.0
15, 30 eq., pH 7.7	675, 727	746	6.5	2.4	1.0
18, 15 eq., pH 7.0	673, 723	753	7.8	2.7	1.0
18, 30 eq., pH 7.0	682 (sh) ^[f] , 718	751	13.8	3.9	2.0
18, 15 eq., pH 7.7	679, 724	751	10.1	3.7	1.0
18, 30 eq., pH 7.7	680, 720	751	14.4	3.5	1.5

[a] UV absorption maxima have been omitted. [b] Shorter absorption maximum assigned to H-type dimer aggregates. [c] Determined by MALDI-TOF mass spectrometry. [d] Determined by absorption spectroscopy (for details, see the Supporting Information). [e] Determined by using ICG ($\Phi_F = 10.6\%$ in DMSO, $\lambda_{\text{ex}} = 650\text{ nm}$) as a standard (see the Supporting Information). [f] sh = shoulder.

The latter hypothesis was supported by gel electrophoresis and subsequent imaging of the gel by fluorescence scanning with an IVIS Lumina III in vivo imaging system (Ex/Em filters 660/790 nm, bandwidth 20/40 nm, Figure S4 in the Supporting

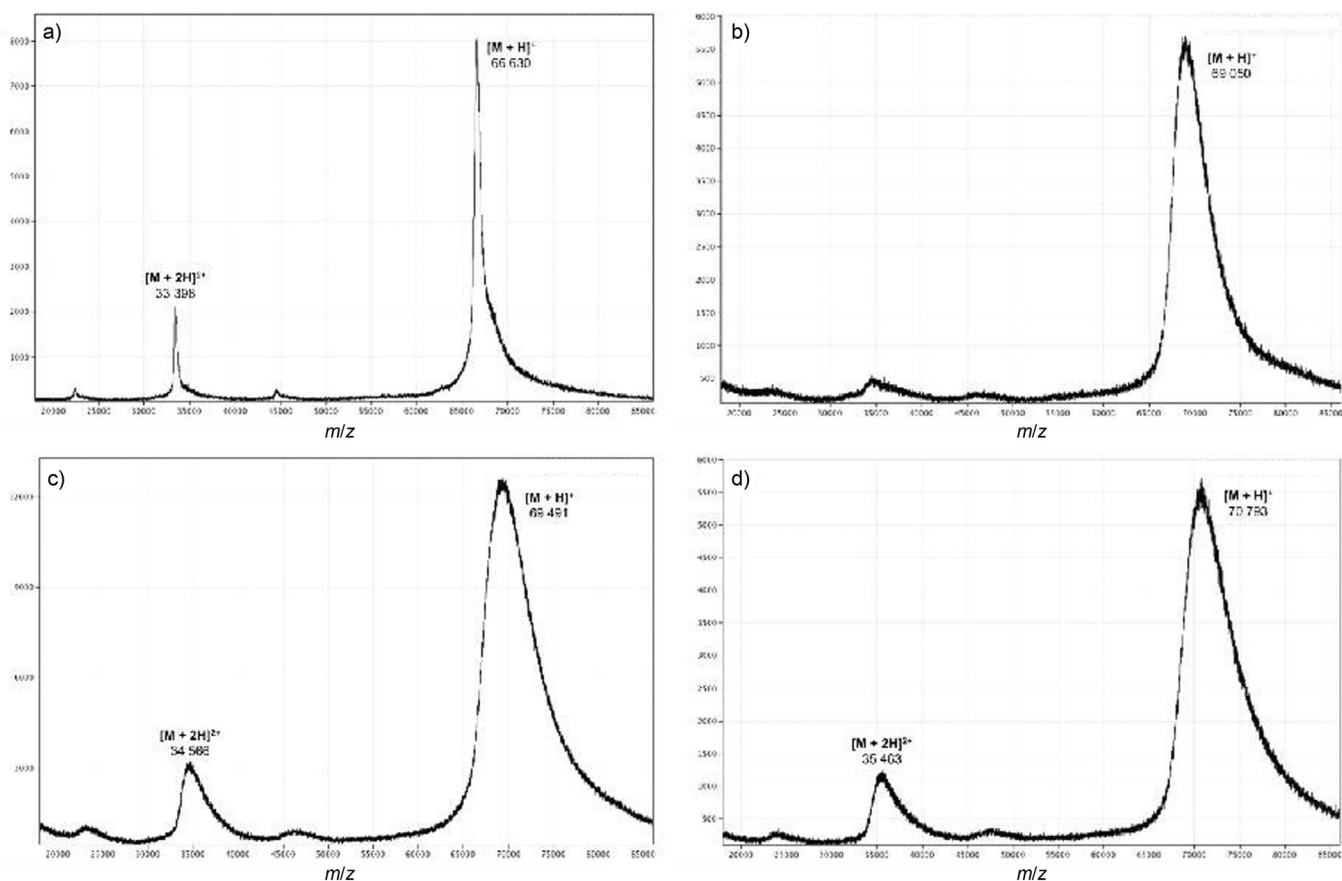


Figure 6. MALDI-TOF mass spectra of BSA (a) and fluorescent conjugates **BSA-12** (b, labeling conditions: 15 equiv. of NHS ester of *nor*-DHX-hemocyanine fused dye 12 in phosphate buffer at pH 7.0), **BSA-15** (c, labeling conditions: 15 equiv. of NHS ester of *nor*-DHX-hemocyanine fused dye 15 in phosphate buffer at pH 7.0) and **BSA-18** (d, labeling conditions: 15 equiv. of NHS ester of *nor*-DHX-hemocyanine fused dye 18 in phosphate buffer at pH 7.0) recorded in the positive mode (matrix: sinapinic acid).

Information), showing the presence of both targeted protein–dye conjugates and free dye. Despite the presence of unbound fluorophore molecules in the labeled protein samples, the spectroscopic features (absorption/emission maxima and quantum yields) of the BSA conjugates were determined (see Table 3 and Figure S5 in the Supporting Information for selected examples of electronic absorption, excitation and emission spectra). The absorption spectrum of fluorescent protein conjugates in PBS revealed two distinct peaks at 658–682 nm and 716–731 nm. The dual absorption, the breadth of the absorption bands and the blue-shift of one of them to 35–50 nm (compared to the absorption maximum of **12**, **15** or **18**) support the formation of non-emissive aggregates (i.e., H-type homodimers).^[28] The low values of the measured quantum yields (1–2% vs. 5–6% for the corresponding free *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes) may be attributed to a combination of several effects, including (1) H-dimer formation and (2) autoquenching induced by interactions between fluorophores and aromatic rings on the side chains of amino acids such as tryptophan and phenylalanine.^[29] These results are mixed but the use of DHX-based fluorophores as fluorescent labeling reagents of amine-containing biomolecules was demonstrated for the first time.

Conclusions

In summary, we developed a new family of organic NIR fluorophores based on the unusual *nor*-dihydroxanthene scaffold. We designed a synthetic route allowing the expedient formation of the *nor*-DHX scaffold which was suitably functionalized for a subsequent diversification step allowing the formation of wide range of DHX-hemicyanine fused dyes. We applied our strategy to the rapid synthesis of *nor*-DHX-based fluorophores featuring either a *N,N*-dialkylamino, a cyclic amino or a fused (bicyclic) amino group as electron-donating moiety and identified 5-membered-ring heterocyclic amines as being an optimum substituent to maximize the fluorescence emission (fluorescence quantum yields 15–20%). A further and easily implementable extension of this methodology has led to the first water-soluble *nor*-DHX-based fluorophores through the introduction of hydrophilic groups performed on the hemicyanine part of the molecule. Despite the “anisotropic” character of this water-solubilizing methodology known to favor the formation of non-fluorescent micellar aggregates,^[30] we managed to identify the positively charged trimethylpropylammonium group as an effective moiety to readily water-solubilize the DHX-hemicyanine fused dyes as well as to avoid their aggregation at physiological pH. To improve the brightness of these water-soluble DHX-based fluorophores, further work is in progress in our laboratories to devise a complementary functionalization approach of the DHX core through the introduction of polar substituent(s) on the donor part of the fluorophore skeleton. Finally, we demonstrated the bioconjugation ability of *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes bearing a free carboxylic acid by performing the fluorescent labeling of the BSA protein. Thus, this contribution paves the way for a further use of DHX-based NIR fluorophores in the rational design of either molecu-

lar imaging agents (mainly, antibody–NIR dye conjugates)^[31] or water-soluble fluorogenic probes (also known as fluorescent chemodosimeters) for various analytes.^[32]

Experimental Section

See the Supporting Information for the details about sections “General”, “Instruments and methods”, “HPLC separations” and all experimental data associated with synthesized compounds and fluorescent BSA conjugates.

Procedure for the synthesis of *nor*-DHX aldehydes **3 a–h**

To a solution of salicylic aldehydes **1 a–d**, **1 g** or **1 h** in dry DMF at 25 °C were added Cs₂CO₃ (3 equiv.) and crude 2-bromocyclopent-1-ene-1-carbaldehyde **2** (2 equiv.) in solution in dry DMF. The resulting reaction mixture was stirred for 48 h at 25 °C to reveal an intense yellow spot (TLC hexane/EtOAc, 8:2, v/v). The insoluble material was then filtered on a pad of silica gel and the filtrate was concentrated under vacuum. The resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with deionized water. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. Purification by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 9:1, v/v) provided the desired aldehydes **3 a–d**, **3 g** or **3 h** as deep orange solids.

Salicylic aldehydes **3 e** and **3 f** were prepared as follows: To a solution of aldehyde **3 c** (37 mg, 0.13 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) were added 1st generation Grubbs’ catalyst (5.2 mg, 0.0063 mmol, 0.05 equiv.) and *p*-benzoquinone (1.4 mg, 0.013 mmol, 0.1 equiv.). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 1 h before it was filtered over a short pad of silica gel. The filtrate was concentrated under vacuum and provided **3 e** which was used directly in the next step, either for the formation of dyes **6 e** and **7 e** (see below) or hydrogenated in toluene for 1 h in the presence of Adam’s catalyst (PtO₂·H₂O). After removing the catalyst on a short pad of silica gel, the filtrate was concentrated and cleanly afforded aldehyde **3 f** which was used without further purification in the formation of *nor*-DHX dyes **6 f** and **7 f**.

General procedure for the synthesis of *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes **6 a–h** and **7 a–h**

To *nor*-DHX aldehydes **3 a–h** in anhydrous Ac₂O (0.025–0.05 M) were added 1,2,3,3-tetramethyl-3*H*-indolium iodide **4** or 1,1,2,3-tetramethyl-1*H*-benz[e]indolium iodide **5** (1.2 equiv.) along with K₂CO₃ (2 equiv.), and the mixture was stirred at 25 °C for 16 h to reveal an intense green spot (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1, v/v). The reaction mixture was concentrated, and the resulting residue dissolved in CH₂Cl₂ and washed with deionized water. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. Purification by flash column chromatography on silica gel (step gradient of CH₃OH in CH₂Cl₂ from 0% to 3%) afforded NIR *nor*-DHX-based fluorophores **6 a–h** and **7 a–h**.

General procedure for the synthesis of water-soluble *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes **8–12**

To *nor*-DHX aldehyde **3 b** in anhydrous Ac₂O (0.025–0.1 M) was added the corresponding indolinium salt (1.2 equiv.), and the mixture was stirred at 25 °C for 16 h to reveal an intense green spot (TLC CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1, v/v). The reaction mixture was concentrated and directly loaded on silica gel and purified (step gradient of

CH₃OH in CH₂Cl₂ from 0% to 10–15%) to afford *nor*-DHX-based fluorophores **8–12**.

Synthesis of *nor*-DHX-hemicyanine fused dye (**13**)

Carboxylic acid-functionalized *nor*-DHX-hemicyanine NIR dye **12** (60 mg, 0.1 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DMF (2 mL). DIEA (34 μL, 0.2 mmol, 2 equiv.) and HATU (43 mg, 0.11 mmol, 1.1 equiv.) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The resulting crude HOAt activated ester was added dropwise to a pre-cooled solution of 2-aminoethane-1,1-disulfonic acid (DIEA salt) in dry DMF (0.19 M in DMF, 1 mmol, 10 equiv.) and DIEA (85 μL, 0.5 mmol, 5 equiv.), and the resulting mixture was stirred at 25 °C for 1 h. The reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1, v/v), quenched by adding glacial AcOH (50 μL) and finally evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a (1:1, v/v) mixture of aq. 0.1% TFA and CH₃CN (ca. 5 mL) and purified by semi-preparative RP-HPLC (for more details, see the Supporting Information). The product-containing fractions were lyophilized to give the TFA salt (1.5 TFA) of compound **13**, as a green amorphous powder (26 mg, yield 31 %).

General procedure for the synthesis of *nor*-DHX-hemicyanine fused dyes **14–18**

To *nor*-DHX aldehyde **3b** in HPLC-grade CH₃OH (0.025–0.05 M) were added the corresponding indolinium or benzoindolinium salt (1.2 equiv.) and dry pyridine (one or two drops). The resulting reaction mixture was stirred under reflux (except for **18**, stirring at 25 °C) for 2 h and at 25 °C for 16 h (please note: the color gradually changed to green). The reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/CH₃OH, 8:2, v/v), evaporated under reduced pressure and purified by flash column chromatography on silica gel or by semi-preparative RP-HPLC.

Isolation of dye 14: The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (dry loading, step gradient of CH₃OH in CH₂Cl₂ from 0% to 20%). Bis-sulfonated *nor*-DHX-hemicyanine NIR dye **14** was obtained as a green solid (42 mg, yield 47 %).

Isolation of dye 15: The crude product was dissolved in a (1:1) mixture of aq. 0.1% TFA and CH₃CN (ca. 5 mL) and purified by semi-preparative RP-HPLC (for more details, see the Supporting Information). The product-containing fractions were lyophilized to give the TFA salt (1.5 TFA) of compound **15**, as a green amorphous powder (22 mg, yield 10%). Please note: the low isolated yield was explained by partial degradation of *nor*-DHX-hemicyanine fused dye in the crude reaction mixture due to too prolonged heating at reflux.

Isolation of dye 16: The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (dry loading, bed size 20 × 170 mm, step gradient of CH₃OH in CH₂Cl₂ from 0% to 30%). Carboxylic acid 3-sulfonatopropyl ester-functionalized mono-sulfonated *nor*-DHX-hemicyanine NIR dye **16** was obtained as a green solid which was submitted to a further purification by semi-preparative RP-HPLC (for more details, see the Supporting Information). The product-containing fractions were lyophilized to give the TFA salt (1.25 TFA) of compound **16**, as a green amorphous powder (17 mg, yield 14 %).

Isolation of dye 17: The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (dry loading, step gradient of CH₃OH in CH₂Cl₂ from 0% to 50%). *N*-(Trimethylammonio)propyl

nor-DHX-hemicyanine NIR dye **17** was obtained as a green solid (44 mg, yield 33 %).

Isolation of dye 18: The crude product was dissolved in a (1:1) mixture of aq. 0.1% TFA and CH₃CN (ca. 5 mL) and purified by semi-preparative RP-HPLC (for more details, see the Supporting Information). The product-containing fractions were lyophilized to give the TFA salt (3.5 TFA) of compound **18**, as a green amorphous powder (60 mg, yield 37 %).

Preparation of fluorescent BSA conjugates

(a) *Synthesis of NHS esters:* Carboxylic acid-functionalized *nor*-DHX-hemicyanine NIR dye **12**, **15** or **18** (1.2–2.0 μmol, 1 equiv., weighed in a 0.5 mL “Eppendorf”-type microtube) was dissolved in dry DMSO (final concentration 25 mM). 1.1 equiv. of TSTU (7.6–9.0 μL of a 180 mM solution in DMSO) and 2 equiv. (or 3 equiv. for **18**) of DIEA (1.47–2.0 μL of a 2.0 M solution in NMP) were sequentially added and the resulting mixture was reacted for 1 h under periodic mixing by vortexing. The reaction was checked for completion by ESI-MS. The resulting NHS esters were used in the next BSA labeling step without purification.

(b) *Fluorescent labeling of BSA:* The solution of NHS ester (see above, 15- or 30-fold excess according to protein) was added to a solution of BSA (500 μL, 1.8 mg mL⁻¹, 13.5 nmol) in phosphate buffer (pH 7.05 or 7.70). The resulting mixture was protected from light and periodically vortexed. The reaction was left at 4 °C overnight and further 2 h at 20 °C. Thereafter, the mixture was diluted with phosphate buffer (1 mL), centrifugated to remove insoluble materials (excess of NHS ester and/or starting dye). Thereafter, the solution was transferred to an ultra centrifugal filter device (Amicon Ultra 2 mL, Ultracel cut-off 30 kDa from Merck Millipore, ref. UFC203024) and centrifugated at 4000 rpm for 15 min. For each fluorescent BSA conjugate, 50–100 μL of solution was recovered. Confirmation of conjugation to the protein was achieved by MALDI-TOF mass spectrometry.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by ICES, A*STAR (Singapore), Institut Universitaire de France (IUF), the Burgundy region (“FABER” programme, PARI Action 6, SSTIC 6 “Imagerie, instrumentation, chimie et applications biomédicales”), and a PHC Merlion grant (2015, 5.04.15). J.-A.R. thanks Ms Doris Tan (ICES) for high resolution mass spectrometric (HRMS) assistance. S.D. thanks the Burgundy region for his Ph. D. grant. The authors thanks the “Plateforme d’Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l’Université de Bourgogne” (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) and the platform “Dispositif Interrégional en Imagerie Cellulaire” (DIImaCell, <http://www.dimacell.fr>) for access to spectroscopy instrumentation. The authors also thank Dr. Pascale Winckler (DIImaCell PIMS, UMR PAM, AgroSup Dijon) for technical assistance during fluorescence measurements, Marie-José Penouilh and Marcel Soustelle (University of Burgundy, ICMUB, UMR CNRS 6302) for HRMS measurements and elemental analysis, respectively.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: fluorescence · NIR dyes · nor-dihydroxanthene · protein labeling · water solubility

- [1] a) L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155; b) L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855–866.
- [2] a) R. Weissleder, U. Mahmood, *Radiology* **2001**, *219*, 316–333; b) J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626–634; c) I. Martinić, S. V. Eliseeva, S. Petoud, *J. Lumin.* **2017**, in press, see DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.09.058>.
- [3] K. Umezawa, D. Citterio, K. Suzuki, *Anal. Sci.* **2014**, *30*, 327–349.
- [4] For comprehensive reviews, see: a) A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973–2012; b) B. Ballou, L. A. Ernst, A. S. Waggoner, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 795–805; c) M. Panigrahi, S. Dash, S. Patel, B. K. Mishra, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 781–805; d) M. Henary, A. Levitz, *Dyes Pigm.* **2013**, *99*, 1107–1116; e) A. P. Gorka, R. R. Nani, M. J. Schnermann, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7584–7598; f) W. Sun, S. Guo, C. Hu, J. Fan, X. Peng, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768–7817.
- [5] For selected examples, see: a) A. Samanta, M. Vendrell, R. Das, Y.-T. Chang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7406–7408; b) H. S. Choi, K. Nasr, S. Alyabyev, D. Feith, J. H. Lee, S. H. Kim, Y. Ashitate, H. Hyun, G. Patonay, L. Strekowski, M. Henary, J. V. Frangioni, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6258–6263; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6382–6387; c) R. K. Das, A. Samanta, H.-H. Ha, Y.-T. Chang, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 573–575; d) N. Kartont-Lifshin, L. Albertazzi, M. Bendikov, P. S. Baran, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20412–20420; e) H. S. Choi, S. L. Gibbs, J. H. Lee, S. H. Kim, Y. Ashitate, F. Liu, H. Hyun, G. Park, Y. Xie, S. Bae, M. Henary, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 148–153; f) H. Hyun, E. A. Owens, L. Narayana, H. Wada, J. Gravier, K. Bao, J. V. Frangioni, H. S. Choi, M. Henary, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 58762–58768; g) H. Hyun, H. Wada, K. Bao, J. Gravier, Y. Yadav, M. Laramie, M. Henary, J. V. Frangioni, H. S. Choi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10668–10672; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10844–10848; h) C. N. Njiojob, E. A. Owens, L. Narayana, H. Hyun, H. S. Choi, M. Henary, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2845–2854; i) D. Su, C. L. Teoh, A. Samanta, N.-Y. Kang, S.-J. Park, Y.-T. Chang, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3989–3992; j) H. Hyun, M. Henary, T. Gao, L. Narayana, E. A. Owens, J. H. Lee, G. Park, H. Wada, Y. Ashitate, J. V. Frangioni, H. S. Choi, *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 52–61.
- [6] For comprehensive reviews, see: a) H. Lu, J. Mack, Y. Yang, Z. Shen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4778–4823; b) Y. Ni, J. Wu, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3774–3791; c) Y. Ge, D. F. O’Shea, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 3846–3864; d) J. Xin-Dong, L. Shuang, G. Jian, F. Tao, L. Xin, X. Lin-Jiu, *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*, 1736–1744.
- [7] For selected examples, see: a) W. Zhao, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1677–1679; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1705–1707; b) W. Zhao, E. M. Carreira, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7254–7263; c) K. Umezawa, Y. Nakamura, H. Makino, D. Citterio, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1550–1551; d) K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio, K. Suzuki, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1096–1106; e) X.-D. Jiang, D. Xi, C.-I. Sun, J. Guan, M. He, L.-J. Xiao, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4868–4870.
- [8] a) S. Achilefu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9816–9818; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10010–10012; b) M. Ptaszek, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 59–108.
- [9] P. Czerney, U.-W. Grummt, *J. Chem. Res. Synop.* **1996**, *4*, 173.
- [10] L. Yuan, W. Lin, Y. Yang, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1200–1211.
- [11] L. Yuan, W. Lin, S. Zhao, W. Gao, B. Chen, L. He, S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13510–13523.
- [12] a) T. Chen, Y. Lai, S. Huang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, *34*, 2937–2941; b) L. Yuan, W. Lin, H. Chen, *Biomaterials* **2013**, *34*, 9566–9571; c) G. K. Vegesna, J. Janjanam, J. Bi, F.-T. Luo, J. Zhang, C. Olds, A. Tiwari, H. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4500–4508; d) A. T. Wrobel, T. C. Johnstone, A. D. Liang, S. J. Lippard, P. Rivera-Fuentes, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4697–4705; e) M. Homma, Y. Takei, A. Murata, T. Inoue, S. Takeoka, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6194–6197; f) X. Wu, M. Yu, B. Lin, H. Xing, J. Han, S. Han, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 798–803; g) B.-L. Wang, C. Jiang, K. Li, Y.-H. Liu, Y. Xie, X.-Q. Yu, *Analyst* **2015**, *140*, 4608–4615; h) Y. Liu, Q. Su, X. Zou, M. Chen, W. Feng, Y. Shi, F. Li, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7466–7469; i) J.-Y. Xie, C.-Y. Li, Y.-F. Li, J. Fei, F. Xu, J. Ou-Yang, J. Liu, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 9746–9752; j) K. Liu, H. Shang, X. Kong, M. Ren, J.-Y. Wang, Y. Liu, W. Lin, *Biomaterials* **2016**, *100*, 162–171; k) X. Song, M. Hu, C. Wang, Y. Xiao, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 69641–69646; l) S. Zhang, R. Adhikari, M. Fang, N. Dorh, C. Li, M. Jaishi, J. Zhang, A. Tiwari, R. Pati, F.-T. Luo, H. Liu, *ACS Sens.* **2016**, *1*, 1408–1415; m) P. Wang, J. Huang, Y. Gu, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 95708–95714; n) J.-W. Xiao, W.-J. Zhu, R. Sun, Y.-J. Xu, J.-F. Ge, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 98985–98993; o) J.-Y. Xie, C.-Y. Li, Y.-F. Li, Y.-J. Fu, S.-X. Nie, H.-Y. Tan, *Dyes Pigm.* **2017**, *136*, 817–824.
- [13] a) H. Chen, W. Lin, L. Yuan, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1938–1941; b) X. Xiong, F. Song, G. Chen, W. Sun, J. Wang, P. Gao, Y. Zhang, B. Qiao, W. Li, S. Sun, J. Fan, X. Peng, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6538–6545; c) S. Zhu, W. Lin, L. Yuan, *Anal. Methods* **2013**, *5*, 3450–3453; d) L. Li, Z. Li, W. Shi, X. Li, H. Ma, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6115–6120; e) H. Chen, B. Dong, Y. Tang, W. Lin, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11696–11700; f) Z. Li, X. He, Z. Wang, R. Yang, W. Shi, H. Ma, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 112–116; g) J. Zhang, L. Ning, J. Liu, J. Wang, B. Yu, X. Liu, X. Yao, Z. Zhang, H. Zhang, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9101–9107; h) J. Zhang, J. Wang, J. Liu, L. Ning, X. Zhu, B. Yu, X. Liu, X. Yao, H. Zhang, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4856–4863; i) Y. Tan, R. Liu, H. Zhang, R. Peltier, Y.-W. Lam, Q. Zhu, Y. Hu, H. Sun, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16979; j) Y. Li, Y. Wang, S. Yang, Y. Zhao, L. Yuan, J. Zheng, R. Yang, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2495–2503; k) C. Han, H. Yang, M. Chen, Q. Su, W. Feng, F. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 27968–27975; l) S. Chen, C. Ma, M.-S. Yuan, W. Wang, D.-E. Wang, S.-W. Chen, J. Wang, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 85529–85537; m) B. Dong, K. Zheng, Y. Tang, W. Lin, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 1263–1269; n) Q. Wan, S. Chen, W. Shi, L. Li, H. Ma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10916–10920; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11096–11100; o) X. Gong, X.-F. Yang, Y. Zhong, Y. Chen, Z. Li, *Dyes Pigm.* **2016**, *131*, 24–32; p) Q. Hu, C. Yu, X. Xia, F. Zeng, S. Wu, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 341–348; q) F. Kong, L. Ge, X. Pan, K. Xu, X. Liu, B. Tang, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1051–1056; r) F. Kong, Z. Liang, D. Luan, X. Liu, K. Xu, B. Tang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6450–6456; s) L. Li, W. Shi, X. Wu, Q. Gong, X. Li, H. Ma, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 395–400; t) F. Xu, H. Li, Q. Yao, J. Fan, J. Wang, X. Peng, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 7363–7367; u) J. Zhang, C. Li, R. Zhang, F. Zhang, W. Liu, X. Liu, S. M.-Y. Lee, H. Zhang, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2679–2682; v) X. Wu, L. Li, W. Shi, Q. Gong, H. Ma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14728–14732; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 14948–14952; w) L. Zhang, X. E. Zheng, F. Zou, Y. Shang, W. Meng, E. Lai, Z. Xu, Y. Liu, J. Zhao, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18868; x) P. Qi, D. Zhang, Y. Sun, Y. Wan, *Anal. Methods* **2016**, *8*, 3339–3344; y) W. Su, B. Gu, X. Hu, X. Duan, Y. Zhang, H. Li, S. Yao, *Dyes Pigm.* **2017**, *137*, 293–298; z) J. Xu, J. Pan, Y. Zhang, J. Liu, L. Zeng, X. Liu, *Sens. Actuators B* **2017**, *238*, 58–65; aa) Y. Pan, T.-B. Ren, D. Cheng, Z.-B. Zeng, L. Yuan, X.-B. Zhang, *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 3575–3582; ab) H. Zhang, L. Feng, Y. Jiang, Y.-T. Wong, Y. He, G. Zheng, J. He, Y. Tan, H. Sun, D. Ho, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *94*, 24–29; ac) Q. Yang, C. Jia, Q. Chen, W. Du, Y. Wang, Q. Zhang, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 2002–2009.
- [14] H. Chen, W. Lin, H. Cui, W. Jiang, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 733–745.
- [15] a) J.-A. Richard, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8169–8172; b) M. J. H. Ong, R. Srinivasan, A. Romieu, J.-A. Richard, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5122–5125.
- [16] A. Romieu, J.-A. Richard, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 317–320.
- [17] Y. Wei, D. Cheng, T. Ren, Y. Li, Z. Zeng, L. Yuan, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1842–1849.
- [18] J. Pauli, M. Grabolle, R. Brehm, M. Spieles, F. M. Hamann, M. Wenzel, I. Hilger, U. Resch-Genger, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1298–1308.
- [19] a) J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 244–250; b) J. B. Grimm, B. P. English, H. Choi, A. K. Muthusamy, B. P. Mehl, P. Dong, T. A. Brown, J. Lippincott-Schwartz, Z. Liu, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 985–988.
- [20] A. Romieu, D. Tavernier-Lohr, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire, P.-Y. Renard, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3304–3308.
- [21] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
- [22] J.-T. Miao, C. Fan, R. Sun, Y.-J. Xu, J.-F. Ge, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 7065–7072.
- [23] a) H. Wang, Z. Lu, S. J. Lord, W. E. Moerner, R. J. Twieg, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3471–3474; b) C. Ruziė, M. Krayter, T. Balasubramanian, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5806–5820; c) F. He, L. Liu, L. Li, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 3143–3149; d) E. L. Cole, E. Arunkumar, S. Xiao, B. A. Smith, B. D. Smith, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5769–5773; e) H.

- Itoi, T. Kambe, N. Kano, T. Kawashima, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *381*, 117–123; f) J. Bartelmess, W. W. Weare, *Dyes Pigm.* **2013**, *97*, 1–8; g) S. Lin, S. Liu, F. Ye, L. Xu, W. Zeng, L. Wang, L. Li, R. Beuerman, D. Cao, *Sens. Actuators B* **2013**, *182*, 176–183; h) Y. Hang, L. Yang, Y. Qu, J. Hua, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6998–7001; i) A. W. Thomas, C. Catania, L. E. Garner, G. C. Bazan, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9294–9297; j) L. Wang, L. Yang, D. Cao, *Sens. Actuators B* **2015**, *221*, 155–166; k) J. Jiang, E. Yang, K. R. Reddy, D. M. Niedzwiedzki, C. Kirmaier, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey, *New J. Chem.* **2015**, *39*, 5694–5714; l) A. Jacquemet, S. Rihn, G. Ulrich, P.-Y. Renard, A. Romieu, R. Ziessel, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 1664–1669; m) B. Roubinet, L. Bailly, E. Petit, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1015–1019; n) B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 166–182; o) S.-J. Woo, S. Park, J.-E. Jeong, Y. Hong, M. Ku, B. Y. Kim, I. H. Jang, S. C. Heo, T. Wang, K. H. Kim, J. Yang, J. H. Kim, H. Y. Woo, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 15937–15947; p) L. Yan, L. Shen, H. Zhou, C. Wu, Y. Zhao, L. Wang, X. Fang, G. Zhang, J. Xu, W. Yang, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 8578–8583; q) M. Sun, K. Müllen, M. Yin, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1513–1528; r) L. Yan, L. Shen, H. Zhou, C. Wu, Y. Zhao, L. Wang, X. Fang, G. Zhang, J. Xu, W. Yang, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 8578–8583.
- [24] a) E. A. Owens, H. Hyun, S. H. Kim, J. H. Lee, G. L. Park, Y. Ashitate, J. Choi, G. H. Hong, S. Alyabyev, S. J. Lee, G. Khang, M. Henary, H. S. Choi, *Biomed. Mater.* **2013**, *8*, 014109; b) K. Sato, T. Nagaya, Y. Nakamura, T. Harada, R. R. Nani, J. B. Shaum, A. P. Gorka, I. Kim, C. H. Paik, P. L. Choyke, M. J. Schnermann, H. Kobayashi, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3303–3311; c) K. Sato, A. P. Gorka, T. Nagaya, M. S. Michie, R. R. Nani, Y. Nakamura, V. L. Coble, O. V. Vaslatiy, R. E. Swenson, P. L. Choyke, M. J. Schnermann, H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 404–413.
- [25] For a review about fluorescent labeling of biomolecules, see: M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212.
- [26] C. C. Goodno, H. E. Swaisgood, G. L. Catignani, *Anal. Biochem.* **1981**, *115*, 203–211.
- [27] a) R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930; b) W. Bannwarth, R. Knorr, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1157–1160; c) A. Barré, M.-L. Tîntaş, V. Levacher, C. Papamicaël, V. Gembus, *Synthesis* **2017**, *49*, 472–483.
- [28] M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 535–546.
- [29] H. Kobayashi, P. L. Choyke, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 83–90.
- [30] S. L. Niu, G. Ulrich, R. Ziessel, A. Kiss, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2049–2052.
- [31] a) M. Mitsunaga, H. Tajiri, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Ther. Delivery* **2013**, *4*, 523–525; b) H. Kobayashi, P. L. Choyke, M. Ogawa, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *33*, 32–38.
- [32] a) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng, F. Li, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 192–270; b) X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590–659.

Manuscript received: February 5, 2017

Accepted Article published: February 22, 2017

Final Article published: March 27, 2017

III.2.3. Formation *in situ* de fluorophores proche-IR de type cyanine (Cy5 / Cy7) ou hybrides DHX-hémicyanines

Parallèlement aux travaux portant sur la synthèse *in situ* de cœurs pyronine absorbant / émettant dans le rouge lointain ou le proche-IR (cf. II.4), nous envisageons d'explorer à moyen terme une approche plus sophistiquée pour démontrer la viabilité du concept "covalent assembly dye" dans le contexte *in vivo*. Pour ce faire, nous souhaitons nous focaliser sur la formation des cœurs fluorescents dont l'utilisation est actuellement privilégiée en imagerie moléculaire de fluorescence, à savoir les cyanines et plus récemment les hybrides DHX-hémicyanine (*vide supra*).

En s'appuyant sur des précédents de la littérature, notamment la synthèse *in situ* de colorants dans le contexte des "oligonucleotide-templated reactions (OTR)"⁹³ et plus particulièrement la preuve de concept publiée en 2010 par le groupe de S. Ladame (Fig. III.17A)⁹⁴, il paraît intéressant de déclencher par un analyte ou une paire d'analytes des réactions de type aldolisation-élimination aboutissant à la formation d'un pont diméthine entre deux précurseurs dont au moins l'un des deux est "cagé" comme illustré Fig. III.17B.

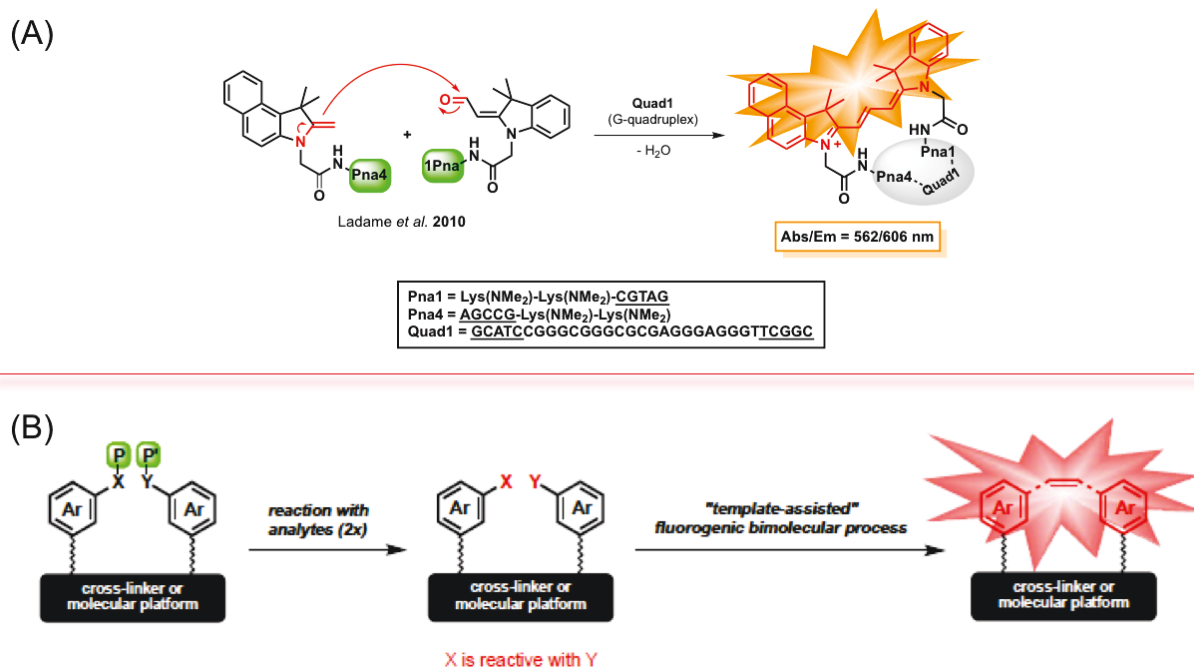


Figure III.17 - Formation *in situ* d'un pont diméthine. (A) Exemple d'application : sonde fluorogénique de type "Off-On" pour la détection des quadruplexes G d'ADN basée sur la formation d'un cœur cyanine (Cy3)⁹⁴. (B) Application de ce concept à la détection d'une paire d'analytes ; approche proposée par A. Romieu⁹⁵. Illustrations issues de la revue [95].

⁹³ Pour des revues et un article récent sur le sujet : voir a) C. Percivalle, J.-F. Bartolo et S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, (11), 16-26 ; b) Y. Choi, G. Metcalf, M. H. Sleiman, D. Vair-Turnbull et S. Ladame, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, (22), 4395-4398 ; c) C. B. Rosen, T. Toerring et K. V. Gothelf, DNA-Templated Synthesis, *Nucleic Acids and Molecular Biology (Vol. 29 / Nucleic Acid Nanotechnology)*, Springer, **2014** ; d) D. Al Sulaiman, J. Y. H. Chang et S. Ladame, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, (56), 5247-5251.

⁹⁴ K. Meguellati, G. Koripelly et S. Ladame, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, (49), 2738-2742.

⁹⁵ A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, (13), 1294-1306.

Dans un premier temps et comme présenté Fig. III.18, on envisage d'appliquer ce concept à des sondes "mono-analyte" dont l'activation conduira à la formation *in situ* d'un hybride DHX-hémicyanine. Cependant, cette stratégie est transposable à des cyanines plus conventionnelles. Outre le fait d'accéder à des cœurs fluorescents absorbant / émettant au-delà de 650 nm, on peut souligner le caractère modulable du précurseur "cagé" requis pour valider ce concept. En effet, en jouant sur la nature de l'unité indolique et ses substituants positionné(s) sur le cycle benzénique ou en lieu et place de l'un des deux méthyles, les propriétés physico-chimiques (notamment, la solubilité dans l'eau) vont pouvoir être modulées et optimisées avec pour conséquence un impact sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de la sonde et du fluorophore formé *in situ*⁹⁶. La principale difficulté de cette approche résidera dans le choix de l'espaceur ou de la plateforme moléculaire multivalente *ad hoc*, requise pour associer les deux précurseurs ("cagé" ou non), et les rapprocher dans l'espace, afin de favoriser la réaction fluorogénique intramoléculaire.

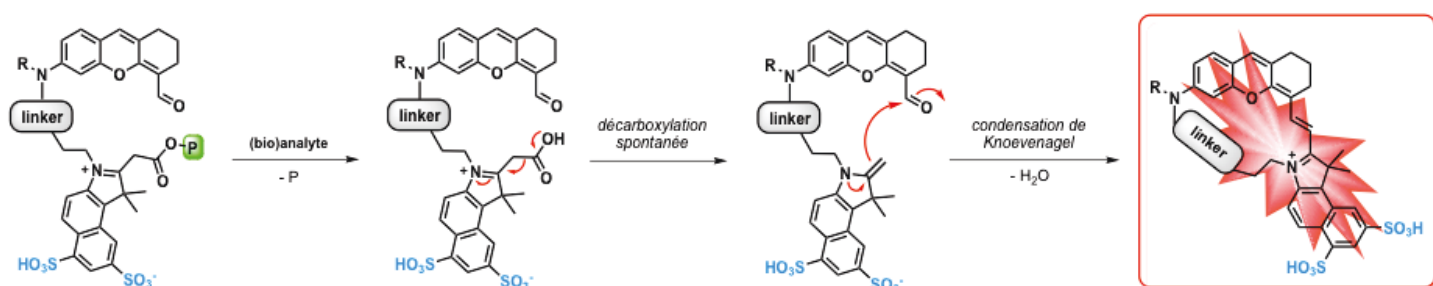


Figure III.18 - Exemple de précurseur "cagé" dont l'activation par un analyte va conduire à la formation *in situ* d'un hybride DHX-hémicyanine via une réaction de condensation de type Knoevenagel.

En conclusion de ce chapitre et à la lumière des idées proposées, il apparaît que le potentiel du concept de "covalent assembly dye" dans le contexte de la détection fluorogénique est immense au regard de la grande diversité de structures qu'offre la chimie des fluorophores organiques (cf. 0.1.2). Par ailleurs, et même si nous n'avons pas encore pu démontrer sa faisabilité, essentiellement par faute de temps, l'approche qui vise à créer un système à conjugaison étendue *via* la formation *in situ* de liens covalents de type diméthine apparaît comme un outil puissant pour obtenir des maxima d'absorption / émission dans la fenêtre thérapeutique, et donc des composés utilisables pour des applications *in vivo*. Ces travaux, au travers des différents mécanismes de déclenchement explorés et / ou mis au point, pourraient également connaître des prolongements dans d'autres domaines, notamment ceux de la chimie médicinale (conception de prodrogues) et de la chimie de synthèse (e.g., synthèse de produits naturels *via* des approches bio-inspirées).

⁹⁶ Pour des articles concernant l'optimisation de ces paramètres pour les agents d'imagerie moléculaires (optique), voir : a) K. Leung, A. Chopra, L. Shan, W. C. Eckelman et A. E. Menkens, *Nanomedicine*, **2012**, (7), 1101-1107 ; J. H. Lee, G. Park, G. H. Hong, J. Choi et H. S. Choi, *Quant. Imaging Med. Surg.*, **2012**, (2), 266-273 ; c) E. A. Owens, M. Henary, G. El Fakhri et H. S. Choi, *Acc. Chem. Res.*, **2016**, (49), 1731-1740.

Conclusion

Conclusion

Ce travail de thèse s'est inscrit dans un projet de recherche ambitieux et novateur qui a débuté au sein de l'équipe P2DA avec mon arrivée en novembre 2014. Comme mentionné dans la partie introductive de ce manuscrit, le but ultime de ce projet est de concevoir des sondes fluorogéniques de type "Off-On" activables uniquement par une paire d'analytes caractéristiques d'un même événement biologique d'intérêt ou spécifiques d'une même pathologie, puis à moyen terme, de les utiliser comme agents de contraste fluorescents en imagerie moléculaire *in-vivo* pour l'aide au diagnostic. Bien entendu, devant l'ampleur et la complexité de la tâche, il a fallu procéder par étapes afin de valider certains concepts clés et démontrer la faisabilité du projet.

Lors de la première année de thèse, j'ai atteint le premier objectif qui m'avait été fixé ; à savoir qu'il était possible de déclencher la formation *in-situ* d'un fluorophore organique (dérivés de 7-hydroxy-2-iminocoumarine) en milieu aqueux et à pH physiologique par l'action simultanée de deux enzymes distinctes sur deux sites de déclenchement distinctif. Ce concept n'avait jamais été décrit dans la littérature et constitue donc une avancée majeure dans le domaine des sondes fluorescentes activables. Nous n'avons pas pu aller au-delà d'une validation *in-vitro* et l'échec rencontré dans une application de détection de souches bactériennes (en ciblant les deux enzymes β -Gal et NTR exprimées par ces bactéries) a permis de mettre en lumière les insuffisances de ces premiers systèmes fluorogéniques.

Par la suite, dans le but de démontrer que le concept de synthèse *in-situ* de fluorophores pouvait être appliqué à des cœurs fluorescents absorbant / émettant à des plus grandes longueurs d'onde, nous avons exploré différentes stratégies qui en théorie devaient conduire à la formation *in-situ* de dérivés pyronine sous l'action simultanée de deux enzymes distinctes. Des difficultés inhérentes à la synthèse de molécules complexes et souvent fragiles n'ont pas permis d'obtenir une preuve de principe similaire à celle publiée avec les précurseurs de 7-hydroxy-2-iminocoumarine. Un objectif un peu moins ambitieux a alors été défini, à savoir démontrer qu'il était possible de déclencher la formation *in-situ* d'une pyronine, une nouvelle fois en milieu aqueux et à pH physiologique sous l'action d'une enzyme (protéase ou NTR). Le succès a été cette fois au rendez-vous et il a permis de mettre en lumière un mécanisme d'activation de ces sondes fluorogéniques, qui pourrait être facilement étendu à un large éventail d'analytes (dont des paires d'analytes) mais également applicable à des cœurs hétéroxanthènes (notamment des sulfone-pyronines) dont les caractéristiques spectrales dans les proches-IR sont compatibles avec le cahier des charges des applications *in-vivo*. Une nouvelle fois, il est important de souligner l'originalité de ces travaux qui n'avaient pas connu de précédents dans la littérature. Ils vont être poursuivis au laboratoire par Mlle G. Dejouy qui va débiter sa thèse au sein de notre groupe à compter du 1^{er} octobre 2017, et ce en collaboration avec le département R&D Microbiologie de la société bioMérieux.

En plus de la réalisation de ces objectifs, ce travail de thèse a été l'occasion d'explorer la chimie d'autres familles de fluorophores organiques (notamment les dérivés BPO et les hybrides DHX-hémicyanine). Mais surtout cela m'a permis d'imaginer et de mettre en œuvre de nouveaux mécanismes d'activation de précurseurs "cagés" qui viennent enrichir la palette des outils chimiques utilisables en vue d'applications fondées sur le principe de "covalent assembly".

Enfin, ces travaux s'inscrivent dans une thématique plus globale qui vise à développer de nouveaux outils d'analyse ou de biodétection dont les applications finales sont à visée clinique. Cela comprend l'aide à la chirurgie, le dépistage et le suivi de maladies, ou bien après combinaison de ces agents d'imagerie avec des substances pharmacologiquement actives, la création d'outils théranostiques. Au final, ces travaux et leurs prolongements futurs permettront également d'élaborer des outils chimiques innovants utiles pour explorer le monde du vivant et éclairer les mécanismes qui s'y déroulent.

Sur le plan de la production scientifique, une partie de ces travaux a donné lieu à trois publications (dont deux comme premier auteur) dans des revues internationales à comité de lecture.

L'imagerie de fluorescence s'est particulièrement développée au fil de ces dernières décennies notamment pour l'exploration des systèmes biologiques. De nombreux développements portant à la fois sur les instruments d'analyse et les agents de contraste (sondes) ont été entrepris pour améliorer cette technique de bioanalyse. Mes travaux de thèse avaient pour but d'explorer diverses plateformes moléculaires pro-fluorescentes pouvant générer, sous l'effet d'un stimulus biologique / chimique, un fluorophore organique. Cette approche de synthèse chimique *in-situ* met en jeu des réactions domino caractérisées par la formation et la rupture de liaisons covalentes. Ce processus devrait ouvrir la voie à des sondes fluorogéniques possédant des rapports signal sur bruit élevés. Cette étude avait aussi pour but d'étudier la synthèse *in-situ* de fluorophores déclenchée par plusieurs stimuli afin de concevoir des portes logiques moléculaires de type "AND", dans un but de détection "multi-analytes". Pour établir la preuve de principe, la formation d'un cœur 7-hydroxy-2-iminocoumarine fluorescent déclenchée par divers couples d'enzymes (hydrolase / nitroréductase) a été étudiée. L'ensemble de ces travaux sont décrits dans le chapitre I de ce manuscrit. Par la suite et comme présenté dans les chapitres II et III, notre intérêt s'est porté sur le développement des plateformes fluorogéniques libérant des fluorophores ayant des maxima d'absorption / émission décalés vers le rouge en comparaison de ceux des coumarines. Une première réalisation a concerné la conception d'un précurseur "cagé" agissant comme sonde à peptidases ou nitroréductase par libération d'un dérivé pyronine. Des travaux portant sur la formation *in-situ* d'une benzophénoxazine sont également en cours et sont présentés au chapitre III. Un dernier aspect de ce travail a concerné la chimie d'une nouvelle famille de fluorophores proche-IR (les hybrides dihydroxanthène-hémicyanine) dont la formation *in-situ* pourra être envisagée pour des applications *in-vivo*.

Mots-clés : activation enzymatique, benzophénoxazine, coumarine, détection "multi-analytes", fluorescence, hybride DHX-hémicyanine, porte logique moléculaire, pro-fluorescence, pyronine, sonde fluorogénique, synthèse *in-situ*

Fluorescence imaging is a growing field of biology over the past decades. Intensive works mainly focused on instrumental developments and chemistry of contrast agents (probes), were already done to improve such bioanalytical technique. The main goal of this Ph. D. thesis was to explore various fluorogenic molecular platforms responsive to various (bio)chemical stimuli and capable of releasing organic fluorophores in the biological medium to analyze. This approach named "*in-situ* synthesis" is based on domino reactions belonging to the repertoire of "covalent chemistry", triggered by the target (bio)analyte. This kind of process should provide advanced fluorogenic probes with high signal-to-noise ratio. Another purpose of this work was to investigate some dual-triggering events to access to fluorogenic molecules acting as "AND-type" molecular logic gates for dual-analytes detection applications. To establish this approach, the formation of highly fluorescent 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds triggered by several enzyme pairs (hydrolase and nitroreductase) was studied and now described in the first chapter of this manuscript. The second part of this work, described in chapters II and III, was devoted to the development of original "caged" precursors able to release fluorophores whose absorption / emission maxima are dramatically red-shifted compared to those of coumarin derivatives. The first achievement concerned the detection of protease or nitroreductase activities through *in-situ* formation of a pyronin scaffold. Further works, currently in progress, are focused on "caged" precursors whose the dual reaction with a model protease should lead to the release of a benzophenoxazine derivative. Finally, some chemistry aspects related to an emerging and promising class of NIR fluorophores (dihydroxanthene-hemicyanine hybrids) are presented and the opportunity to form them in biological media, upon enzymatic triggering is also discussed.

Keywords: benzophenoxazine, coumarin, dihydroxanthene-hemicyanine hybrid, enzymatic activation, fluorescence, fluorogenic probe, *in-situ* synthesis, molecular logic gate, multi-analytes detection, pro-fluorescence, pyronin.