Analogues fluorescents de l'epicocconone et sondes pour le piégeage de produits naturels azaphiles.

Samuel Oger

▶ **To cite this version:**

Samuel Oger. Analogues fluorescents de l'epicocconone et sondes pour le piégeage de produits naturels azaphiles.. Chimie analytique. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR035 . tel-02003484

HAL Id: tel-02003484
https://theses.hal.science/tel-02003484

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Analogues fluorescents de l'epicocconone et sondes pour le piégeage de produits naturels azaphiles

Présentée et soutenue par
Samuel OGER

Thèse soutenue publiquement le 5 décembre 2017 devant le jury composé de		
M. Alain BURGER	Professeur, Université de Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
Mme Delphine JOSEPH	Professeur, Université de Paris-Sud 11, Orsay	Rapporteur
Mme Soizic PRADO	Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Examinateur
M. Xavier FRANCK	Directeur de Recherches, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Stéphane LELEU	Maître de Conférences, Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse
M. Thibault GALLAVARDIN	Chargé de Recherches, Université de Rouen Normandie	Membre invité
M. Thomas LECOURT	Professeur, Institut National des Sciences Appliquées de Rouen	Membre invité

Thèse dirigée par le Dr. Xavier FRANCK, laboratoire COBRA (UMR 6014)

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ed 508

Laboratoire Cobra — Chimie organique, Bioorganique, Réactivité et Analyse.

« L'homme absurde dit oui et son effort n'aura plus de cesse. S'il y a un destin personnel, il n'y a point de destinée supérieure ou du moins il n'en est qu'une dont il juge qu'elle est fatale et méprisable. La lutte elle-même vers les sommets suffit à remplir un cœur d'homme. Il faut imaginer Sisyphe heureux »

Albert Camus, Le Mythe de Sisyphe.

Je remercie vivement le Prof. Alain Burger (Professeur des Universités à l'Université de Nice Sophia Antipolis), le Prof. Delphine JOSEPH (Professeur des Universités à l'Université de Paris-Sud 11, Orsay) et le Prof. Soizic Prado (Professeur des Universités au Muséum National d'Histoire Naturelle) pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Ce sujet de thèse a été financé par une bourse MRT (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) et effectuée au sein du laboratoire COBRA (UMR 6014) de Rouen sous la direction du Dr. Xavier Franck et le co-encadrement du Dr. Stéphane Leleu.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier du fond du coeur mes encadrants de thèse, je ne puis malheureusement énumérer tout ce qu'ils m'ont apporté tellement la liste est longue ! En lieu et place d'un deuxième manuscrit intitulé « Remerciements à Xavier et Stéphane », j'essaierais dans les lignes qui suivent de retranscrire la substantifique moëlle de mes sentiments d'amitié et de respect qu'ils m'inspirent. Je remercie le Dr. Stéphane Leleu pour ses remarques toujours pertinentes, sa relecture assidue du manuscrit pendant la rédaction, ses encouragements et pour sa bonne humeur assortie de son rire plus que communicatif. Je le remercie également pour sa vigilance et son aide pour maintenir l'équipement du laboratoire et plus généralement la cellule en bon fonctionnement. *Last but not least* comme disent nos voisins outre Manche, je remercie également le Dr. Xavier Franck pour sa présence de tous les instants, sa passion communicative pour ce projet : même lorsque j'ai commencé à baisser les bras il a toujours su m'orienter et ouvrir de nouvelles portes, celle de son bureau étant toujours ouverte à ses étudiants. Merci de m'avoir laissé la liberté quasi-totale à la paillasse, de ta bonne humeur et de toutes tes qualités de chef qui nous incitent à donner le meilleur de nous même chaque jour. Merci encore à vous deux pour ces trois années.

Je souhaite aussi remercier le Dr. Thibault Gallavardin, qui nous a rejoint sur la route du biphoton, pour son expertise et sa culture encyclopédique en spectro. C'est grâce à son aide que j'ai pu comprendre la plupart des points théoriques. Merci aussi de t'être déplacé à Lyon pour les mesures sur mes analogues pendant que je rédigeais. C'est un réel plaisir pour moi d'avoir pu travailler à tes côtés et notre équipe a vraiment beaucoup de chance de t'avoir.

Mais que serait notre labo sans les étudiants qui le composent ? Accrochez vous la liste est longue !

J'exprime donc toute ma gratitude à mes collègues de paillasse. D'abord à Thibault (non pas le même qu'avant) et Mehdi, pour m'avoir accueilli un 1er octobre 2014 en cellule 229. Merci à Thibault pour avoir su me donner les tuyaux sur le fonctionnement du laboratoire, pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ton rire (je commence à rire pareil, ça me fait peur !) et les surnoms rigolos que tu as donné à tout le monde. Je te remercie aussi Mehdi pour m'avoir maintenu cette cellule à un bon niveau de M2 en chimie (ou peut-être un peu plus), pour tes expressions de crapule du sud de la France (à partir de Lyon). Vient ensuite compléter ce trio infernal, notre voisin d'à côté Antoine, alias Dr. Poupousse. Tu m'as appris à rebondir sur mes échecs un peu comme les ballons rebondissent sur le carrelage (des fois ça ne marche pas !). Tu dois être la personne la plus malchanceuse que j'aie jamais recontré, mais peut être aussi celui qui m'a le plus manqué après ton départ (et le fait que tes exploits finissaient en montage Paint n'y est absolument pour rien). Enfin merci au Dr. Cyrille Sabot, pour m'avoir fait confiance et permis de participer à la publi de Mehdi sur les chaétoviridines et à Patricia, notre maman de la cellule, pour avoir apporté durant le début de cette thèse un peu de douceur féminine et des infrarouges.

Un petit paragraphe lié à celui des anciens pour remercier les stagiaires que notre labo a pu accueillir : Amaury (spécialiste de la détection de silice sous les paillasses), Pauline (ma demi-sœur) et sa copine Sarah, Axel (ou Alex je sais plus) pour avoir appris à manipuler à ton maître de stage (qui aura un paragraphe à lui tout seul tellement j'ai de choses à dire sur lui), Hasan (CF), Alexandre (alias le petit Mougeot) pour avoir transformé le labo en piscine et lavé ses produits à l'aspirateur en l'espace d'un seul stage et enfin S.A.S Jordan (Jason ?) pour les fous rires qu'on a pu avoir durant tes deux stages, notamment sur les révélateurs CCM et un tas de choses que je ne peux pas lister ici (bien évidemment par manque de place).

Parlons un peu de la nouvelle génération qui nous a rejoint : aux petits nouveaux Margot (alias cyanine ou $CuSO_4$ puisqu'elle a la même couleur de cheveux et la même taille que ces produits) et Alexis (arrêtez s'il vous plaît tous les prénoms en Alex- on s'y perd !), je vous souhaite bon courage. On n'a fait que se croiser quelques mois mais je vous aime déjà (en tout bien tout honneur évidemment). Merci également à Kévin, alias Bescherelle, qui a succédé à Poupousse en 228, accroche-toi pour la rédaction !

Pour conclure ces remerciements de labo, il me reste à parler de Romain, alias Père Mougeot (dire que c'est vraiment ton nom !) ou le stagiaire. Tes lundis matin dédiés au lâcher de ballon sur le sol avec un regard ténébreux me manqueront, néanmoins je constate que tu fais des progrès chaque jour en matière de préhension manuelle, ce qui laisse supposer que tu ne lâcheras pas le pointeur laser par terre au milieu de ta soutenance, même si jamais des téléphones portables se mettent à sonner. Je sais que tu t'en sortiras avec brio (nous verrons cela l'année prochaine). Par contre partager une chambre d'hôtel

avec toi ne me manqueras pas trop, désolé ! J'espère quand même te croiser rapidement sur Paris quand tu viendras tester tes molécules (si toutefois elles sont fluorescentes).

Je remercie aussi les anciens du deuxième étage que j'ai pu croiser : Arnaud, Yul, Emilie, Pierre, Xavier, Killian, Morgan, Alex, Maha, Fabien, Karine, Thomas. Parmis eux des remerciements plus particuliers vont à Sovy, alias Synovie, qui mange des poussins morts et des insectes mais que j'ai adoré côtoyer. Et enfin à Benoît, alias Roubax, de retour parmis nous mais dans le privé, pour ces délires sur les barres de zinc et la république de Martinique, grâce à toi mes talents de cinéaste seront un jour récompensés aux Oscars c'est certain !

J'ai une pensée particulière pour mes camarades qui ont commencé en même temps que moi et vont ou ont soutenu leur thèse : David (alias Pépito), Anissa et surtout ma mère spirituelle Kathleen. Je termine ce paragraphe en me consacrant plus particulièrement à toi fille du président de la Martinique, premier pays exportateur de goyave (prononcez « goillave »), tu partage une place particulière dans mon cœur avec le Dr. Poupousse et je pense que la pause café de 16h et ton rire qui tourne au hoquet vont me manquer énormément. Tu peux néanmoins compter sur ta fidèle Money Penny (ou Poney) en la personne de Dorra (que je remercie également pour ses connaissances théoriques en RMN et en chromatographie sur couche mince) pour te suppléer ! On se reverra le 16 mars en présence du Président pour ton investiture en tant que 1er Docteur de la Martinique (on dit que ce serait le passage obligé de tous les futurs dirigeants de ce grand pays).

Merci et bon courage enfin à tout le reste du deuxième étage, même si je ne vous nomme pas tous j'ai évidemment une pensée pour vous.

Il me reste à remercier l'ensemble de mes proches et en particulier mes parents pour leur soutien durant ces trois années qui n'ont pas été de tout repos pour vous comme pour moi. Du fond du cœur merci d'avoir été là pour moi car tout cela n'aurait pas pu se faire sans vous (en plus d'un point de vue biologique c'est une évidence !).

Finalement une pensée particulière pour la personne qui partage ma vie depuis plusieurs années. Merci de ta douceur et de ta patience à tout instant. Tu as su me montrer le verre à moitié plein quand je le voyais à moitié vide et tu n'as cessé de m'encourager à persévérer.

Table des matières

Introduction générale……..23

1 Le phénomène de fluorescence 25

1.1 Considérations physiques et paramètres caractéristiques du phénomène de fluorescence 26

1.1.1 Types de transitions électroniques dans les molécules polyatomiques – Diagramme de Perrin-Jablonski – Temps de vie des états excités 26

1.1.2 Spectres d'absorption et d'excitation 27

1.1.3 Déplacement de Stokes 29

1.1.4 Coefficient d'extinction molaire 30

1.1.5 Rendement quantique de fluorescence 30

1.1.6 Brillance 31

1.2 Absorption à deux photons 31

1.2.1 Comparaison des processus d'absorption à un photon et à deux photons 31

1.2.2 Facteurs favorisant l'absorption biphotonique 33

1.2.3 Mesure de la section efficace d'absorption à deux photons 35

1.3 Microscopie de fluorescence 37

1.3.1 Microscopie de fluorescence conventionnelle et microscopie confocale 37

1.3.2 Microscopie à nappe de lumière 38

1.3.3 Microscopie de fluorescence à excitation biphotonique 39

1.3.4 Limite de résolution – Microscopies de fluorescence super résolutives 40

2 Utilisation des produits naturels fluorescents en tant que sondes et marqueurs en biologie et imagerie 46

2.1 Protéines fluorescentes 46

2.1.1 La Green Fluorescent Protein (GFP) 47

2.1.2 Autres protéines fluorescentes 50

2.2 Biomarqueurs fluorescents 52

2.2.1 Luciférines 53

2.2.2 Acides anthraniliques et dérivés 56

2.2.3 Umbelliferone et 4-méthylumbelliferone 57

2.2.4 Flavonols 5-O-glycosylés 58

2.3 Molécules fluorescentes affines d'une cible spécifique 61

2.3.1 Polyènes fluorescents 61

2.3.2 Curcumin 65

2.3.3 Berbérine 68
2.3.4 Cryptolépine 70
2.3.5 Hypéricine 72
2.4 Molécules à fluorescence pH-dépendante 75
2.4.1 7-hydroxycoumarines 75
2.4.2 Quinine 77
2.4.3 Benzo[c]phénanthridines 78
2.5 Epicocconone 82
3 Conclusion 87

Chapitre 1 : Synthèse d'analogues de l'epicocconone et évaluation de leurs propriétés spectrales……89

1 Travaux antérieurs du laboratoire 91

1.1 Voie de synthèse des analogues de l'epicocconone 92
1.1.1 Synthèse du partenaire alcool désaromatisé 93
1.1.2 Synthèse des partenaires dioxinones 94
1.1.3 Réaction d'acylfuranonisation 95
1.2 Synthèse d'analogues polyfonctionnels de l'epicocconone 98
1.2.1 Principe 98
1.2.2 Utilisation de la CuAAC comme étape clé de formation des sondes polyfonctionnelles 98

2 Présentation du projet 101

3 Résultats et discussion 102

3.1 Synthèse de nouveaux analogues de l'epicocconone fonctionnalisables par CuAAC 102
3.1.1 Introduction du point de fonctionnalisation sur l'alcool désaromatisé 102
3.1.2 Introduction du point de fonctionnalisation sur la dioxinone 110
3.1.3 Réaction de CuAAC entre un analogue de l'epicocconone et un partenaire biologiquement actif : la SN-38 118
3.1.4 Conclusion sur la réaction de CuAAC appliquée aux analogues de l'epicocconone 124
3.2 Synthèses d'analogues de l'epicocconone pour la spectroscopie de fluorescence à excitation bi-photonique 125
3.2.1 Synthèses de dioxinones fluorènes sans groupement donneur 127
3.2.2 Optimisation de la synthèse de la dioxinone bromée 154 130
3.2.3 Couplage de Suzuki – Introduction des groupements donneurs sur la dioxinone ... 137

3.2.4 Formation des analogues de l'epicocconone optimisés pour l'absorption bi-photonique 139

4 Conclusion et perspectives 162

Chapitre 2 : Synthèse de sondes pour l'identification de composés azaphiles présents dans des extraits biologiques…….169

1 Introduction bibliographique : méthodes de découverte et d'identification de produits naturels 171

1.1 Méthodes basées sur l'activité biologique 172

1.2 Approche basée sur la réactivité 173

1.2.1 Utilisation de résines d'affinité pour l'enrichissement en produits naturels 174

1.2.2 Utilisation de molécules organiques en tant que sondes à produits naturels 182

1.3 Conclusion sur les méthodes de découverte de produits naturels 191

2 Présentation du projet 191

3 Marquage d'un extrait naturel par une sonde analytique 194

3.1 Synthèse de la sonde 264 194

3.2 Addition de la sonde 264 sur une molécule azaphile modèle 195

3.3 Utilisation de la sonde 264 pour le marquage d'un extrait naturel 199

4 Synthèses de sondes préparatives comportant un groupement biotine clivable 201

4.1 Utilisation d'un motif siloxane en tant que lien clivable – sondes de première génération 201

4.2 Utilisation d'un éther silylé en tant que lien clivable – sondes de deuxième génération 205

4.3 Utilisation du groupement azoture comme précurseur de la fonction amine primaire 210

4.4 Etude de la nature des groupements portés par le silicium 212

5 Conclusion et perspectives 213

Conclusion générale……. 219

1 Conclusion 221

1.1 Synthèse de nouveaux analogues de l'epicocconone 221

1.2 Synthèse de sondes pour l'analyse et l'isolement de produits naturels azaphiles 226

2 Perspectives 228

2.1 Synthèse de nouveaux analogues de l'epicocconone 228

2.2 Synthèse de sondes pour l'identification et l'isolement de produits naturels azaphiles .. 230

Partie expérimentale……..235

1 General information 237

2 Methods 238

2.1 HPLC system 238

2.2 Photophysical properties 238

2.2.1 1 photon absorption and emission spectra in water (pH = 2.5) with SDS (0.1% w/v) 238

2.2.2 1 photon absorption and emission spectra in CH_2Cl_2 or Toluene 238

2.2.3 Quantum yields determination 239

2.2.4 2 photons absorption spectra and cross-section determination in CH_2Cl_2 or Toluene 239

2.3 LC-MS method 240

2.4 Cyclic voltametry 240

3 Experimental data 242

Abréviations et acronymes

1PA	Absorption à un photon
2PA	Absorption à deux photons
3D	Trois Dimensions
A ou abs	Absorbance
A	Adénine
Aβ	Peptides béta-amyloïdes
Ac	Groupement acétyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
AOT^-	Dioctylsulfosuccinate
APTS ou PTSA	Acide para-toluènesulfonique
aq.	Aqueux
Ar	Aromatique
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
atm.	Atmosphère
ATP	Adénosine triphosphate
B	Brillance
Bn	Benzyle
Boc	*Tert*-butoxycarbonyle
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfert ou Tranfert d'énergie radiatif par bioluminescente
BSA	Bovine Serum Albumine ou Albumine de Sérum Bovin
BuLi	Butyllithium
c	Concentration
C	Cytosine
CCD	Charge Coupled Device ou Dispositif à Transfert de Charge
cm	Centimètre
CTAB	CetylTrimethylAmmonium Bromide
CuAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne Catalysée au Cuivre
Da	Dalton
DABCO	1,4-diazacyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
dba	Dibenzylidèneacétone
DiBAl-H	Hydrure de diisobutylaluminium
DIPEA	N,N-diisoprpyléthylamine
DMAP	4-N,N-diméthylaminopyridine
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMF	Diméthylformamide

DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dr.	Docteur
DTT	Dithiothréitol
E	Potentiel
EDCI	1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide
EDG	Groupe donneur d'électrons
EIC	Exctracted Ion Chromatogram
Em.	Emission
ESI	Electrospray
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transfer ou transfert de proton intramoléculaire à l'état excité
ESPT	Excited State Proton Transfer ou Transfert de Proton à l'Etat Excité
Et	Ethyle
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
Exc.	Excitation
FPALM	Fluorescent PhotoActivated Localisation Microscopy
FRET	Förster Resonance Energy Transfer ou Transfert d'énergie par résonance de type Förster
g	gramme
G	Guanine
GFP	Green Fluorescent Protein ou Protéine Fluorescente Verte
Glu	Acide glutamique
GM	Goeppert-Mayer
h	Heure
HOMO	Orbitale Haute Occupée
HPLC	Chromatographie Phase Liquide Haute Performance
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry ou Spectrométrie de Masse Haute Résolution
HSA	Human Serum Albumine ou Albumine de Sérum Humaine
IBA	Acide iodosobenzoïque
IBX	Acide 2-iodoxobenzoïque
i-Pr	isopropyle
j	Jour
k	Kilo
L	Litre
LC	Chromatographie phase liquide
LDA	Diisopropyle amidure de lithium
LDL	Lipoprotéines de Basse Densité
LiHMDS	Hexaméthyldisilazane de lithium
LRMS	Low Resolution Mass Spectrometry ou Spectrométrie de Masse Basse Résolution

Abbréviations et acronymes

LUMO	Orbitale Basse Vacante
M	Mole par litre
M.S.	Tamis moléculaire
MβCD	Méthyl-β-CycloDextrine
Max	Maximum
Me	Méthyle
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
min	Minute
mol	Mole
MOM	Méthoxyméthyle
MS	Spectrométrie de masse
mV	Millivolt
n	Indice de réfraction
Naph	Naphtyle
NBS	N-bromosuccinimide
Ne	Nombre d'électrons π
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIS	N-iodosuccinimide
nm	Nanomètre
Ox	Oxydation
Pal^-	Palmitate
PALM	PhotoActivated Localisation Microscopy
PATMAN	6-hexadecanoyl-2-(((2-(trimethylammonium)ethyl)methyl)amino)naphtalene chloride
Pd/C	Palladium sur charbon
PDT	Photothérapie dynamique
PE	Ether de pétrole
PeT	Transfert d'électron photo-induit
Ph	Phényle
PhMe	Toluène
PMB	Paraméthoxybenzyle
PMBC	Peroxydation lipidique dans les cellules sanguines mononucléaires périphériques
PPi	Pyrophosphate
Prof.	Professeur
Red	Réduction
RESOLFT	REversible Saturable Optically Linear Fluorescence Transition
RFP	Red Fluorescent Protein ou Protéine Fluorescente Rouge
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species ou Espèces Réactives de l'Oxygène

Abbréviations et acronymes

s	Seconde
sat.	Saturé
SDBS	Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
Ser	Sérine
SPAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne Spontanée
SPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2′,6′-dimethoxybiphényle
SPIM	Selective Plane Illumination Microscopy ou Microscopie à Nappe de Lumière
STED	STimulated Emission Depletion
STORM	STochastic Optical Reconstruction Microscopy
T	Thymine
TA ou RT	Température ambiante
TBAB	Bromure de tétrabutylammonium
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
$TBAHSO_4$	Bisulfate de tétrabutylammonium
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TBDMS	*Tert*-butyldiméthylsilyle
TBDPS	*Tert*-butyldiphénylsilyle
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIC	Total Ion Chromatogram
TMR	Tétraméthylrhodamine
TMS	Triméthylsilyle
TPB^-	Tétraphénylborate
Tos^-	Tosylate
u.a.	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
V	Volt
Xantphos	4,5-Bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene
YFP	Yellow Fluorescent Protein ou Protéine Fluorescente Jaune
δ	Section efficace d'absorption à deux photons
Δ	Chauffage
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde
Φ_F	Rendement quantique de fluorescence
µM	Micromolaire
Å	Angström
° C	Degré Celsius

Préambule

La chimie des fluorophores est un domaine de la chimie organique en pleine expansion depuis ces cinquante dernières années. L'utilisation de ces molécules fluorescentes s'est en effet fortement généralisée en sciences de la vie où elles permettent de marquer et de suivre spécifiquement *in vivo* des entités biologiques, telles que les enzymes ou les protéines, de manière non-invasive. Du fait de l'existence d'une fluorescence naturelle des milieux biologiques, il est nécessaire, dans le but d'une observation efficace, de concevoir des fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge (zone spectrale où aucune molécule issue des cellules n'absorbe de lumière). La conception de fluorophores optimisés pour l'absorption biphotonique permet de répondre à ces besoins mais également d'augmenter la profondeur de pénétration de l'excitation lumineuse dans les tissus biologiques et confine son activité au point focal d'un laser assurant ainsi une haute résolution spatiale.

L'epicocconone, un profluorophore organique naturel issu du champignon *Epicoccum nigrum* et découvert en 2003 par l'équipe du Prof. Karuso, possède la capacité de se lier de manière covalente mais réversible, en fonction du pH, aux amines primaires des chaînes latérales des protéines. L'adduit énaminone formé est fortement fluorescent dans le proche infrarouge (610 nm) lorsqu'il est excité par un rayonnement UV (395 nm) ou visible (520 nm), faisant de ce composé un outil précieux en protéomique pour la détection des protéines sur gel d'électrophorèse. Cependant, un problème de photoblanchiment lié à l'instabilité de l'énaminone sous irradiation UV continue et l'absence de synthèse totale de cette molécule naturelle ont amené le laboratoire du Dr. Xavier Franck à développer différents analogues de l'epicocconone.

Le but principal de ce travail de thèse est d'élargir la gamme d'analogues de l'epicocconone existante en y apportant deux nouvelles dimensions : la sélectivité vis-à-vis d'une cible biologique particulière grâce à la conception de sondes fluorescentes polyfonctionnelles, mais aussi d'optimiser la structure de ces analogues pour l'absorption biphotonique. Ces deux thématiques ont pour but d'amener le développement d'outils pour l'imagerie dont la structure est basée sur celle de l'epicocconone. Les deux premières parties de ce manuscrit seront donc consacrées à cet aspect, à savoir :

- La **première partie** sera une introduction au phénomène de fluorescence, détaillant brièvement les aspects physiques relatifs à ce phénomène et à l'absorption biphotonique, ainsi qu'une présentation concise et exemplifiée des différents produits naturels fluorescents utilisés en imagerie.
- La **deuxième partie** regroupera les efforts synthétiques mis en place dans le cadre du développement de nouvelles sondes fluorescentes polyfonctionnelles basées sur le squelette de l'epicocconone grâce à l'utilisation de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre. Dans un deuxième temps, l'optimisation de la structure des analogues pour l'absorption biphotonique et l'évaluation de ces propriétés optiques non linéaires seront exposées.

Une **troisième partie**, complémentaire de ces travaux et motivée par la réactivité particulière de l'epicocconone (et plus généralement des azaphilones), décrit les synthèses de sondes à produits naturels azaphiles. Une introduction bibliographique regroupant les différentes stratégies d'identification ou d'isolement de produits naturels sera présentée en amont des différentes études réalisées dans le cadre de cette partie.

Introduction Générale

1 Le phénomène de fluorescence

La première observation du phénomène de fluorescence est décrite par Monardes en 1565 dans une infusion de bois provenant de *Lignum nephriticum* où une intense luminescence bleue due à l'oxydation spontanée de la coatline B en matlatine est observée (Figure 1).[1] Bien que l'incandescence et la luminescence aient été observées depuis l'antiquité, c'est Stokes qui introduira le terme de fluorescence en 1853 soit presque 300 ans après Monardes.

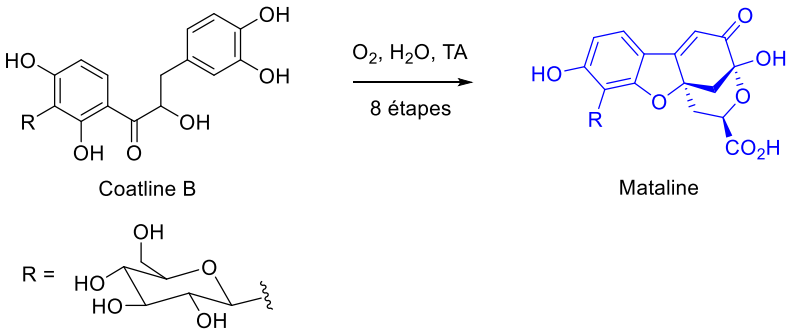


Figure 1 : Fluorescence bleue d'une infusion de *Lignum nephriticum* due à l'oxydation de la coatline B.

Lors d'un apport énergétique à un corps, une partie de l'énergie est absorbée permettant alors le passage de ce corps d'un état fondamental à un état excité. Le retour à l'état fondamental peut s'accompagner d'une émission d'énergie sous forme de lumière. Suivant la nature de l'apport énergétique, cette émission lumineuse est classée selon deux catégories : l'incandescence et la luminescence (Figure 2).

L'incandescence caractérise l'émission d'énergie sous forme de radiations électromagnétiques par une substance du fait de l'élévation de sa température. Il s'agit donc d'une excitation d'origine thermique à laquelle est appliquée le qualificatif de lumière dite « chaude ».

La luminescence peut être définie comme l'émission de radiation par une espèce dont l'excitation n'est pas d'origine thermique, lui valant d'être qualifiée de lumière dite « froide ».

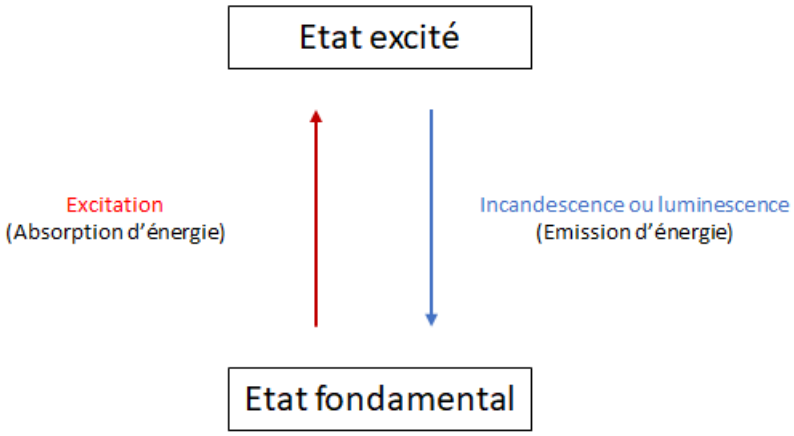


Figure 2 : Principe général de l'incandescence et de la luminescence.

Parmi les différents types de luminescence existant, la photoluminescence désigne une luminescence dont le mode d'excitation est l'absorption d'un photon. C'est cette sous-catégorie de la luminescence qui regroupe la phosphorescence et la fluorescence.[2]

[1] Acuña, A. U., Amat-Guerri, F., Morcillo, P., Liras, M., Rodríguez, B. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3020-3023.

[2] Valeur, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications, **2001**, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, page 4.

Une fois qu'une molécule atteint un état excité, le retour à l'état fondamental se traduit dans les cas favorables par une émission de photon (fluorescence) mais d'autres phénomènes en compétition avec le phénomène de fluorescence sont aussi possibles. Ces processus alternatifs peuvent se produire de manière intramoléculaire ou bien impliquer l'environnement entourant la molécule (Figure 3) :

- La conversion interne : il s'agit du retour direct à l'état fondamental de la molécule sans émission de fluorescence.
- Le croisement inter-système : un état excité de spin singulet peut, par transition non radiative, se transformer en son état triplet correspondant. Ceci peut alors engendrer un phénomène de phosphorescence lors du retour à l'état fondamental.
- Des interactions entre la molécule excitée et son environnement : transfert d'électron, de proton, d'énergie ; formation d'excimères (complexes formés par la collision d'une molécule à l'état excité et de son homologue à l'état fondamental) ; formation d'exciplexes.
- Une réaction photochimique.

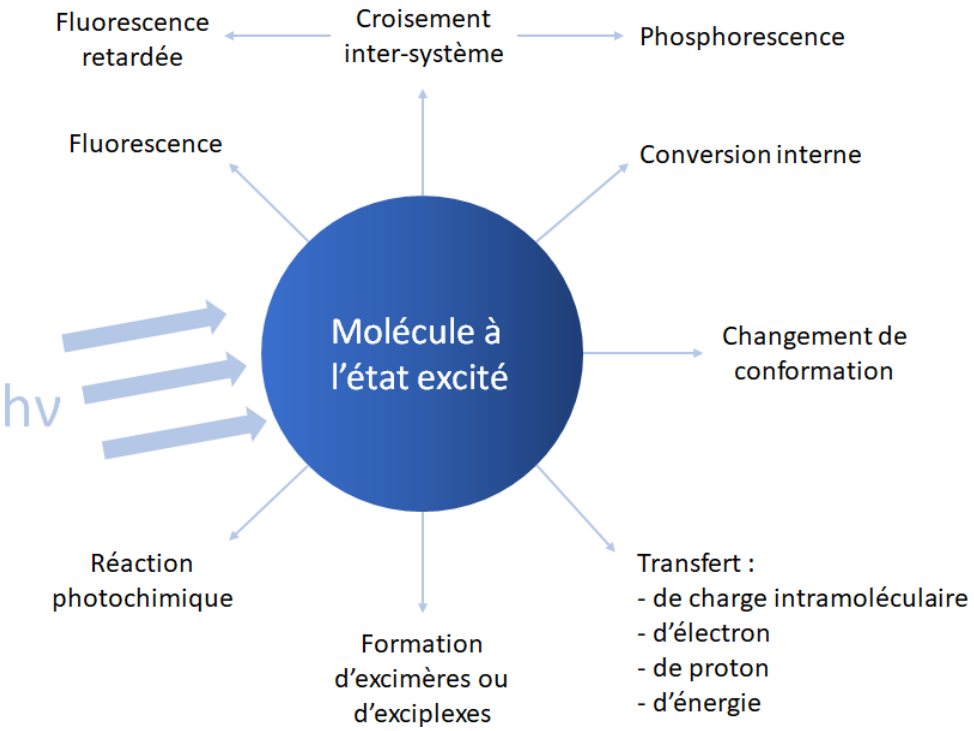


Figure 3 : Phénomènes de désexcitations possibles.[3]

1.1 Considérations physiques et paramètres caractéristiques du phénomène de fluorescence

La photoluminescence regroupe donc les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence qui se caractérisent tous deux par l'absorption d'un photon par une molécule engendrant une modification de son état électronique.

1.1.1 Types de transitions électroniques dans les molécules polyatomiques – Diagramme de Perrin-Jablonski – Temps de vie des états excités

Afin de visualiser simplement les processus possibles lors de l'excitation et de la désexcitation d'une molécule, l'outil de choix est un diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 4). Sur ce diagramme, les états électroniques singulets sont représentés par les abréviations S_0 (état fondamental), S_1 (premier état

[3] Adapté de : Valeur, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications, *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2001**, p 10.

excité) et S_2 (deuxième état excité). A chacun de ces états d'énergie électronique, la molécule fluorescente peut exister à différents états vibrationnels.

Il est important de noter que ce diagramme est simplifié : les transitions entre les états sont représentées par des flèches verticales, ceci matérialise un caractère instantané de l'absorption lumineuse : en effet les transitions électroniques ont lieu sur un temps suffisamment court (de l'ordre de 10^{-15}s) pour pouvoir considérer que les noyaux atomiques demeurent immobiles par rapport aux électrons. Ceci constitue le principe de Franck-Condon.

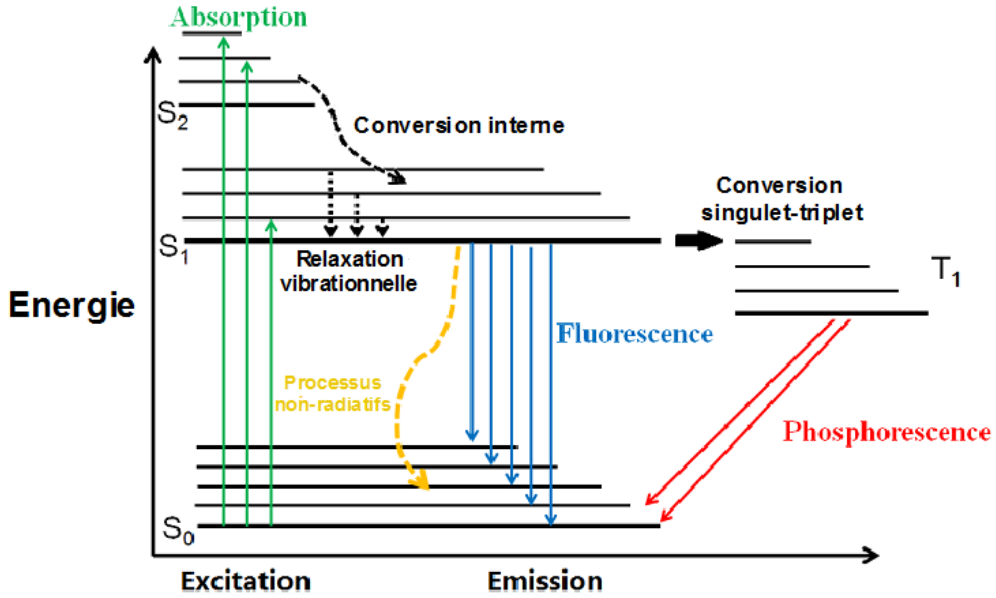


Figure 4 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié[4].

Lorsque la molécule, initialement dans son état fondamental S_0 reçoit de l'énergie sous la forme d'un photon, elle atteint un état excité singulet S_n (10^{-15} s). Cet état très peu favorable énergétiquement ne subsiste que transitoirement et est suivi d'une conversion interne (10^{-11} – 10^{-9} s) ou d'une relaxation vibrationnelle (10^{-12} – 10^{-10} s) menant la molécule dans son état excité de plus basse énergie S_1 (temps de vie : 10^{-10} – 10^{-7} s). Une fois ce niveau atteint le retour de la molécule à son état fondamental S_0 peut suivre plusieurs processus tels que définis précédemment : soit ce retour s'accompagne d'une émission d'un photon de plus basse énergie que le photon absorbé, sous forme de fluorescence ou de phosphorescence *via* un processus de croisement inter-système vers l'état T_1 (temps de vie : 10^{-6} – 1 s) ; soit le processus de désexcitation est non radiatif et ne s'accompagne donc pas de l'émission d'un photon.

Il ressort donc que le paramètre important de la fluorescence, du fait de la rapidité de la conversion interne et de la relaxation vibrationnelle, est le temps de vie de l'état excité S_1. C'est ce temps de vie qui permet de définir une fenêtre temporelle durant laquelle on peut obtenir des informations sur les processus de désexcitation d'une espèce.[5]

1.1.2 Spectres d'absorption et d'excitation

Les propriétés d'absorption et d'émission d'une molécule fluorescentes (ou fluorophores) sont visualisées expérimentalement par les spectres d'absorption et d'émission correspondants. Le spectre d'absorption correspond à l'énergie absorbée par la molécule en fonction de la longueur d'onde ; le

[4] Adapté de : Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Springer* **2010**, p 5.

[5] Cole, M.J, Siegel, J., Webb, S. E. D., Jones, R., Dowling, K., Dayel, M. J., Parsons-Karavassilis, D., French, P. M. W., Lever, M. J., Sucharov, L. O. V., Neil, M. A. A., Juškaitis, R., Wilson, T. *J. Microsc.* **2001**, *203*, 246-257.

spectre d'émission est quant à lui corrélé à l'émission lumineuse qui correspond au retour à l'état fondamental de la molécule excitée.

D'une manière générale, l'émission de fluorescence est indépendante de la longueur d'onde d'excitation. Ceci traduit la rapidité avec laquelle le processus de conversion interne a lieu, ce qui entraîne par conséquent qu'une molécule irradiée émettra toujours de la fluorescence à partir de son état excité de plus basse énergie S_1 (règle de Kasha).

Les niveaux d'énergie vibrationnelle au sein de l'état fondamental S_0 et du premier état excité S_1 sont répartis de manière semblable. Par conséquent les spectres d'absorption et d'émission peuvent être d'allure semblable, image l'un de l'autre dans un miroir (règle miroir-image). Les molécules aromatiques polycycliques comme l'anthracène permettent de bien visualiser cette symétrie (Figure 5).

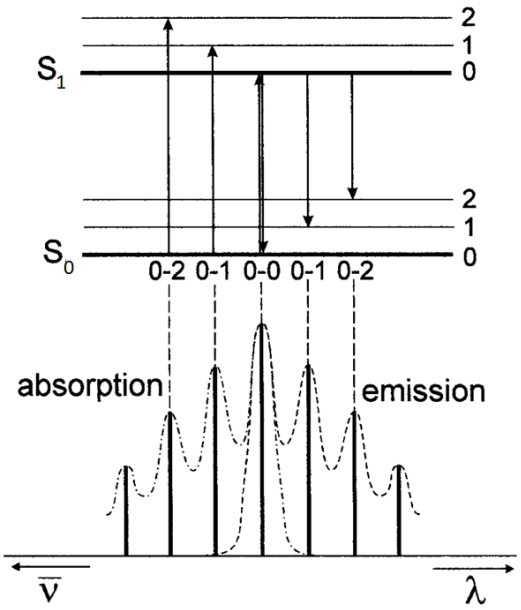
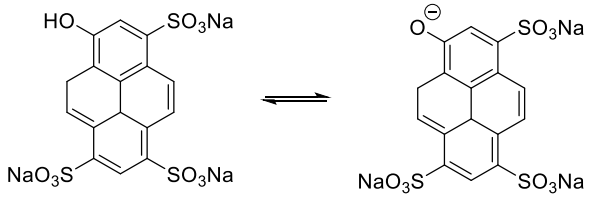


Figure 5 : Illustration de la règle miroir image sur les états d'énergie vibrationnel de l'anthracène.[6]

Cette observation n'est cependant pas du tout générale et dans de nombreux cas les spectres d'absorption et d'émission seront partiellement ou totalement différents ne serait-ce que par les nombreux phénomènes de désexcitation qui entrent en jeu et qui ont été présentés en Figure 3.

Ainsi dans le cas du 1-hydroxypyrène-3,6,8-trisulfonate **1** (HPTS, représenté Figure 6) dont les propriétés spectrales ont été mesurées dans l'eau en faisant varier le pH, les longueurs d'ondes d'absorption et l'allure des spectres sont différentes (Figure 7).



1 : Forme prédominante à pH acide

1' : Forme prédominante à pH basique

Figure 6 : Structure du HPTS **1**.

[6] Valeur, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications, **2001**, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, p 36.

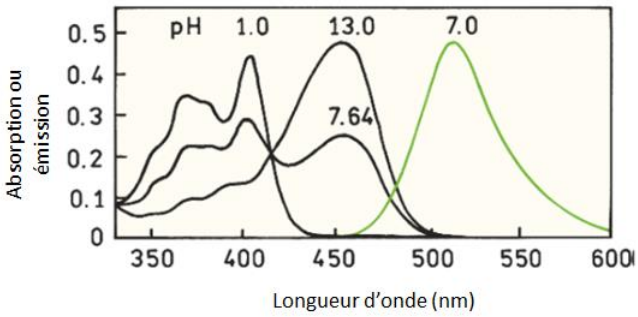


Figure 7 : Spectres d'absorption (noir) et d'émission (vert) de l'HPTS dans l'eau en fonction du pH.[7]

A pH acide (pH = 1.0) la forme phénol **1** présente un spectre d'absorption typique d'une molécule polyaromatique sauf que la règle miroir-image n'est ici pas respectée. Ce spectre d'absorption évolue d'ailleurs avec l'augmentation du pH (7.64 et 13) vers une forme semblable à celle du spectre d'émission enregistré, lui, à pH = 7.

Lors du passage de la molécule à l'état excité il y a ionisation du groupement phénol (pKa ≈ 7.3), qui a alors suffisamment d'énergie pour se dissocier sous forme de phénolate **1'** (*via* un transfert de proton photo-induit). C'est ce qui explique que les spectres d'absorption en milieu basique (pH = 13) et le spectre d'émission à pH = 7 soient semblables : l'espèce excitée à l'origine de la fluorescence est la forme phénolate **1'** de l'HPTS. On parle dans ce cas de transfert de proton à l'état excité (ESPT).

De l'étude des spectres d'absorption et d'émission peuvent donc être extraits un certain nombre de paramètres clés qui viendront parfaire la carte d'identité d'une molécule fluorescente. Ce sont certains de ces paramètres qui seront développés maintenant et utilisées pour caractériser les molécules synthétisées.

1.1.3 Déplacement de Stokes

Le déplacement de Stokes correspond à la différence, exprimée en nombre d'ondes (cm^{-1}) ou en longueur d'onde (nm) entre la longueur d'onde maximale d'émission et la longueur d'onde maximale d'absorption (Figure 8).

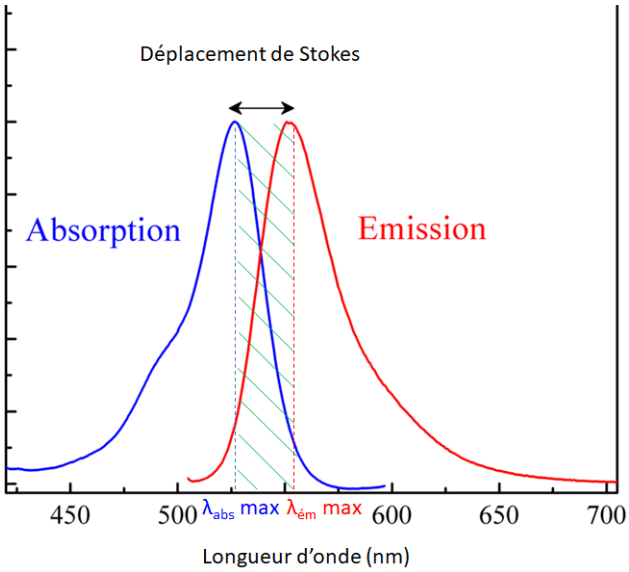


Figure 8 : Visualisation du déplacement de Stokes sur les spectres d'absorption et d'émission. La zone hachurée correspond à un chevauchement des spectres d'absorption et d'émission.

[7] Adapté de : Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Springer* **2010**, p 8.

Un faible déplacement de Stokes peut entraîner une diminution de l'intensité de fluorescence émise : en effet dans la gamme de longueur d'onde où les spectres d'absorption et d'émission se chevauchent (zone hachurée de la Figure 8), il existe une probabilité non nulle qu'une molécule à l'état fondamental F puisse absorber le photon libéré par une molécule excitée F* qui retourne à son état fondamental (F* + F → F + F*). Ce phénomène, qualifié de transfert radiatif,[8] ou d'effet de filtre interne est à l'origine de cette chute de la fluorescence observée.

Il est donc intéressant de concevoir des molécules fluorescentes avec un large déplacement de Stokes car ceci permet de faciliter la détection de l'émission de fluorescence en pratique mais également de limiter le phénomène de transfert radiatif du fluorophore sur lui-même. Une alternative utilisée est la conception de molécules fluorescentes possédant des bandes d'absorption et d'émission très étroites pour éviter leur chevauchement, autorisant ainsi un déplacement de Stokes plus faible.

1.1.4 Coefficient d'extinction molaire

Le coefficient d'extinction molaire ε mesure l'efficacité avec laquelle un fluorophore absorbe l'énergie. Si l'on considère une solution d'une molécule fluorescente, le coefficient ε de cette solution sera dépendant de l'absorbance de cette solution à une concentration en fluorophore donnée. Si la solution étudiée est suffisamment diluée (pas de formation d'agrégats) et en l'absence d'autres espèces pouvant absorber la lumière, l'absorbance de l'échantillon suit alors la loi de Beer-Lambert : l'absorbance A du fluorophore à une longueur d'onde λ donnée est alors directement proportionnelle au produit de sa concentration c (en mol.L^{-1}) par la longueur du chemin optique d'absorption (en cm), la proportionnalité étant assurée par le coefficient d'extinction molaire ε (en L.mol^{-1}.cm^{-1}).

$$A(\lambda) = \varepsilon l c$$

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert.

De manière concrète un fluorophore possédant un coefficient d'extinction molaire élevé absorbe donc davantage de lumière et est donc à même d'en restituer davantage sous forme de fluorescence. Quelques valeurs de coefficient ε sont indiquées dans le Tableau 1. La valeur d'un coefficient étant légèrement dépendante du solvant, ces exemples ne constituent donc que des ordres de grandeur qui sont donnés à la longueur d'onde maximale d'absorption.

Composé	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})
Phénol	≈ 2000
Indole	≈ 5500
Fluorène	≈ 9000
Anthracène	≈ 10000
Pérylène	≈ 34000
Eosin Y	≈ 90000
Rhodamine B	≈ 105000

Tableau 1 : Exemples d'ordres de grandeur de coefficients d'extinction molaire (donnés au λ_{abs} maximum).[9]

1.1.5 Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence, noté Φ_F, se définit comme la fraction de molécules excitées retournant à leur état fondamental par émission de fluorescence, c'est-à-dire comme le rapport entre le

[8] a) Birks, J. B., Salete, M., Leite, S. C. P. *J. Phys. B* **1970**, *3*, 417-424. b) Berberan-Santos, M. N., Choppinet, P., Fedorov, A., Jullien, L., Valeur, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2526-2533.

[9] Adapté de : Valeur, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications, *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2001**, p 27.

nombre de photons émis par la molécule à l'état excité et le nombre de photons absorbés. Sa valeur sera par conséquent comprise entre 0 et 1.

D'un point de vue pratique la méthode expérimentale la plus généralement accessible consiste à utiliser une référence dont le rendement quantique est connu à longueur d'onde et solvant donnés.[10] La molécule de référence est choisie telle que sa longueur d'onde d'excitation soit proche de celle utilisée pour la mesure du fluorophore inconnu et telle que les spectres d'émission de l'analyte et du standard couvrent des gammes spectrales similaires. La formule de calcul utilisée en pratique est la suivante :

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{FR}} = \frac{n^2}{{n_R}^2} \times \frac{\int_0^\infty F(\lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^\infty F_R(\lambda_F) d\,\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_E)}}{1 - 10^{A(\lambda_E)}}$$

Équation 2 : Formule pratique de calcul du rendement quantique de fluorescence.

Dans cette relation, Φ_F désigne le rendement quantique, *n* est l'indice de réfraction du milieu dans lequel la mesure est effectuée, l'intégrale $\int_0^\infty F(\lambda_F) d\lambda_F$ représente l'aire sous la courbe d'émission de fluorescence, *A* désigne l'absorbance de la solution, qui doit être diluée ($A < 0.1$) et l'indice *R* renvoie aux valeurs du standard par rapport auquel la mesure est effectuée.

1.1.6 Brillance

La brillance, notée B et exprimée en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, se définit comme le produit du rendement quantique par le coefficient d'extinction molaire (Équation 3). Elle exprime donc à la fois l'efficacité (rendement quantique) et la capacité à absorber l'énergie (coefficient d'extinction molaire) d'un fluorophore.

$$B = \Phi_F \varepsilon$$

Équation 3 : Formule de calcul de la brillance.

D'une manière générale un fluorophore possédant une brillance élevée sera privilégié pour des applications en biologie puisqu'il pourra être utilisé à de faibles concentrations.

1.2 Absorption à deux photons

Dans la partie 1.1 seule l'absorption d'un seul photon a été considérée. Cependant une absorption simultanée de plusieurs photons peut également être considérée. C'est ce phénomène d'absorption biphotonique qui va être abordé maintenant.

1.2.1 Comparaison des processus d'absorption à un photon et à deux photons

L'absorption à deux photons est un processus non linéaire caractérisé par l'absorption simultanée de deux photons par la même molécule. Cela implique un doublement de la longueur d'onde absorbée et une dépendance quadratique vis-à-vis de l'intensité lumineuse absorbée

L'atténuation de l'intensité *I* d'un faisceau lumineux par *N* molécules par unité de volume et sur une distance *z* selon les hypothèses de la loi de Beer-Lambert peut s'écrire :

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -N\alpha_1 I - N\alpha_2 I^2 = -N\alpha_1 I - N\delta \frac{I^2}{h\nu}$$

Équation 4 : Contribution de l'absorption mono et biphotonique à l'atténuation de l'intensité lumineuse.[11]

[10] Brouwer, A. M. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213-2228.

[11] Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G., Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244-3266.

Le premier terme de cette équation caractérise l'atténuation due à l'absorption d'un photon et le deuxième l'absorption biphotonique avec $\alpha_1 >> \alpha_2$. Cet ordre de grandeur traduit mathématiquement la faible probabilité de l'absorption biphotonique et le facteur δ introduit est appelé section efficace d'absorption à deux photons (exprimé en Goeppert-Mayer, noté GM ; 1GM ≡ 10^{-50} $cm^4.s.photon^{-1}$). Plus concrètement, lorsque la lumière traverse une cuve contenant *N* molécules susceptibles d'absorber la lumière, cette absorption peut être en première approximation considérée comme proportionnelle au nombre de molécules dans la cuve.

En pratique, la mesure de δ peut être déterminée à partir de la fluorescence de la molécule et dans ces conditions, la section efficace d'absorption à deux photons δ à une longueur d'onde λ est calculée de manière analogue au rendement quantique par rapport à un composé de référence (indice *R*) et donné par la relation suivante :

$$\delta(\lambda) = \frac{I}{I_R}\frac{n^2 \Phi_F c_R}{{n_R}^2 \Phi_{FR} c}\delta_R(\lambda)$$

Équation 5 : Formule pratique de calcul de la section efficace d'absorption à deux photons δ.

Dans cette équation, *I* désigne l'intensité de fluorescence mesurée, *n* l'indice de réfraction du solvant, Φ_F le rendement quantique de fluorescence, *c* la concentration de l'espèce, et δ_R la section efficace d'absorption du composé de référence connue.

En général l'absorption à deux photons est représentée sur un diagramme d'énergie comprenant un état fondamental, un état final et un état virtuel (Figure 9). On parle alors de modèle à trois niveaux. L'énergie de l'état virtuel n'est aucunement liée à une résonnance de la molécule.

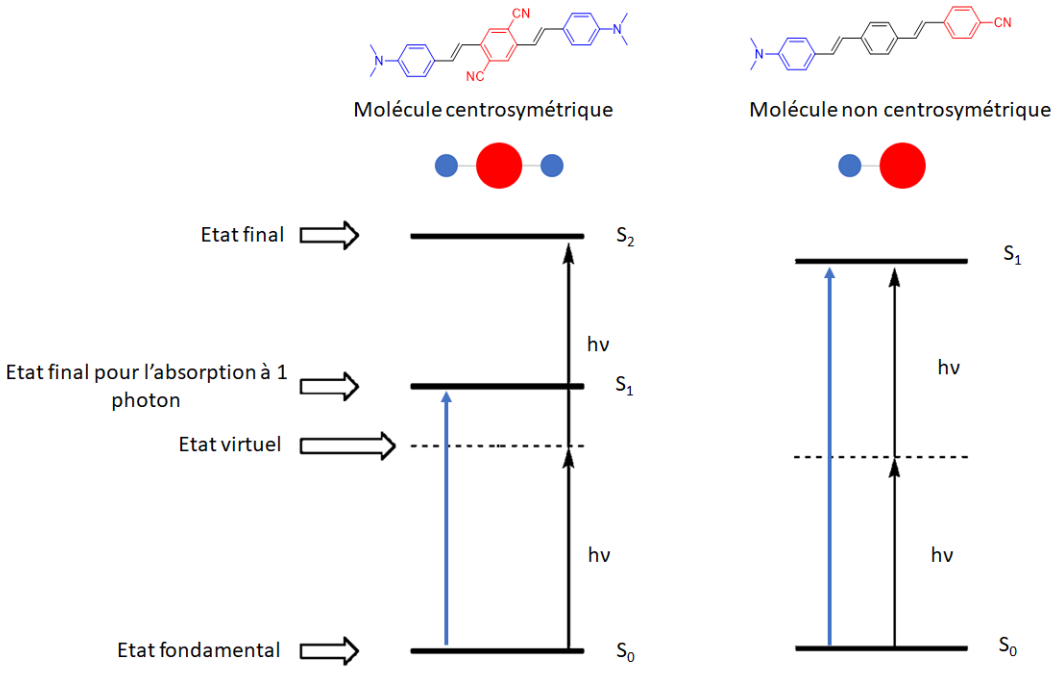


Figure 9 : Diagramme d'énergie représentant les principaux états énergétiques mis en jeu dans l'excitation mono (bleu) et biphotonique (noir) dans le cadre du modèle à trois niveaux. [12] Les deux structures sont données uniquement à titre d'illustration du concept de centrosymétrie.

Si l'on compare les absorptions mono et biphotonique, il faut d'abord distinguer le cas des fluorophores centrosymétriques et celui des fluorophores non centro-symétriques car les états électroniques mis en jeu sont différents :

- Pour une molécule centrosymétrique. La transition électronique correspondant à l'absorption mono-photonique S_0 → S_1, (Figure 9, partie gauche), n'est pas possible en absorption

[12] Bort, G., Gallavardin, T., Ogden, D., Dalko, P. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526-4537.

biphotonique, elle est dite interdite. L'état final, noté S_2 est donc différent. La longueur d'onde d'absorption à deux photons est alors légèrement décalée vers le bleu, comparée à celle observée si la molécule était non centrosymétrique.

- Dans le cas d'une molécule non centrosymétrique, les transitions électroniques mises en jeu sont les mêmes pour l'absorption d'un ou de deux photons : c'est le passage de S_0 à S_1 qui est mis en jeu. Par conséquent la longueur d'onde maximale d'absorption biphotonique est exactement la double de celle de l'absorption mono-photonique.

Dans tous les cas, la longueur d'onde maximum d'absorption biphotonique sera supérieure à celle en mono-photonique.

1.2.2 Facteurs favorisant l'absorption biphotonique

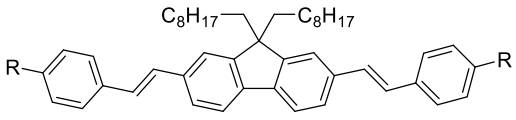
L'absorption à deux photons n'est pas un phénomène prépondérant comparé à l'absorption classique à un photon. Il s'agit donc maintenant de comprendre comment concevoir des molécules possédant la valeur de δ la plus grande possible. Ces études ont permis de déterminer des paramètres structurels clés pour favoriser l'absorption biphotonique, qui sont les suivants :

- La présence de groupes fortement donneurs et/ou accepteurs permettant d'augmenter la polarisabilité de la molécule à l'état excité et donc le transfert de charge interne.[13] Ces groupements peuvent être placés en position terminale ou en position centrale.
- Un système π conjugué et étendu[14] : pour une conjugaison efficace, le système doit être plan, ce qui requiert la présence de motifs cycliques ou complexant de manière à contraindre la structure.[15]

Des études en modélisation peuvent d'ailleurs permettre d'estimer en amont la valeur de δ.[16]

1.2.2.1 Présence de groupes électrodonneurs ou électroattracteurs

Les groupes dialkyl and diaryl amino sont les plus utilisés en tant que groupements donneurs terminaux car ils sont en général plus efficaces que les groupes donneurs oxygénés. Ceci est illustré par la différence de section efficace d'absorption entre les fluorènes **2a** et **2b** synthétisées par le groupe du Dr. Blanchard-Desce : la valeur de δ croît d'un facteur 10 entre ces deux molécules (110 GM contre 1300 GM, Figure 10).



2a : R = OMe, δ = 110 GM à 705 nm
2b : R = $N(C_4H_9)_2$, δ = 1300 GM à 740 nm

Figure 10 : Influence des groupements donneurs terminaux sur la section efficace de dérivés du fluorène.

Il existe une corrélation entre cette tendance et les valeurs des coefficients de Hamett, qui mesurent le caractère mésomère donneur, de ces groupements : σ_p = -1.7 pour -NMe_2 contre σ_p = -0.78 pour -OMe. Cependant des exceptions à cette tendance existent, en effet le groupement diarylamino est un

[13] Albota, M., Beljonne, D., Brédas, J.-L., Ehrlich, J. E., Fu, J.-Y., Heikal, A. A., Hess, S. E., Kogej, T., Levin, M. D., Marder, S. R., McCord-Maughon, D., Perry, J. W., Röckel, H., Rumi, M., Subramaniam, G., Webb, W. W., Wu, X.-L., Xu, C. *Science* **1998**, *281*, 1653-1656.

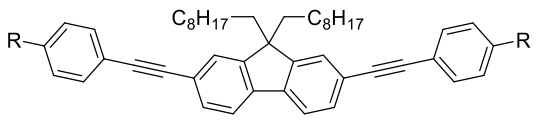
[14] Rumi, M., Ehrlich, J. E., Heikal, A. A., Perry, J. W., Barlow, S., Hu, Z., McCord-Maughon, D., Parker, T. C., Röckel, H., Thayumanavan, S., Marder, S. R., Beljonne, D., Brédas, J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9500-9510.

[15] Mongin, O., Porrès, L., Charlot, M., Katan, C., Blanchard-Desce, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1481-1498.

[16] Dreuw, A., Polkehn, M. A., Binder, R., Heckel, A., Knippenberg, S. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 1797-1805.

meilleur donneur en absorption biphotonique malgré un coefficient de Hamett de -1.4. Ceci s'explique par le plus grand nombre d'électrons π de ce groupe.

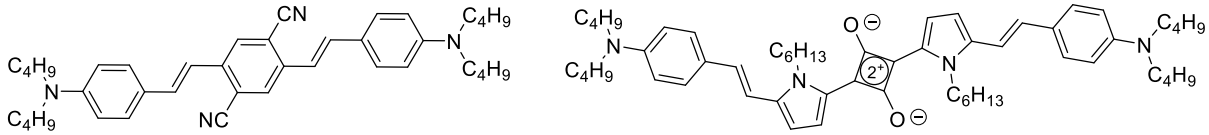
De nombreux groupes électroattracteurs terminaux ont été étudiés également,[13, 15, 17] notamment des hétérocycles possédant des systèmes π appauvris. Cependant les mesures de sections efficaces tendent à montrer qu'une structure conjuguée possédant 2 groupements donneurs terminaux (D-π-D, D pour Donneur) est plus efficace en absorption à deux photons que son équivalent possédant des groupes électroattracteurs terminaux (A-π-A, A pour Accepteur). Ceci est illustré par les composés **3a** et **3b** (Figure 11).[15]



3a : R = $N(C_6H_{13})_2$, δ = 1200 GM à 705 nm
3b : R = SO_2CF_3, δ = 83 GM à 705 nm

Figure 11 : Comparaison de l'influence de groupes donneurs et attracteurs sur la section efficace.

Mais il est aussi intéressant de constater que ces groupes, qu'ils soient donneurs ou accepteurs peuvent être placés au centre de la molécule, donnant également des propriétés intéressantes pour l'absorption à deux photons. En général c'est d'ailleurs la combinaison d'effets électroniques de la partie centrale de la molécule avec ceux des groupements terminaux qui est utilisée pour concevoir des molécules ayant des valeurs de δ importantes. La bibliographie montre ainsi l'existence de systèmes conjugués D-π-A-π-D (Figure 12)[13, 18] souvent préférés à leurs homologues A-π-D-π-A, ces derniers étant davantage sujets à des réactions de dégradation par photo-oxydation. [11]



4a : δ = 1700 GM à 830 nm **4b** : δ = 27000 GM à 960 nm

Figure 12 : Exemples de systèmes D-π-A-π-D.

1.2.2.2 Influence du système π

La section efficace d'absorption δ dépend fortement de la taille du système π conjugué et donc du nombre d'électrons π. En effet le moment dipolaire de la molécule est lié à la distance sur laquelle les charges peuvent être déplacées pendant une transition électronique par conséquent il est proportionnel au nombre d'électrons π délocalisés. La planéité de la molécule est cruciale pour permettre la délocalisation des électrons. Les valeurs de δ sont en effet plus grandes pour des molécules planes et rigides, qui peuvent être obtenues en privilégiant par exemple des motifs fluorène rigides par rapport à des motifs biphényles pour lesquels des libres rotations sont possibles à l'état excité (Figure 13).[15]

[17] Myung Kim, H., Rae Cho, B. *Chem. Comm.* **2009**, 153-164.

[18] Pond, S. J. K., Rumi, M., Levin, M. D., Parker, T. C., Beljonne, D., Day, M. W., Brédas, J.-L., Marder, S. R., Perry, J. W. *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 11470-11480.

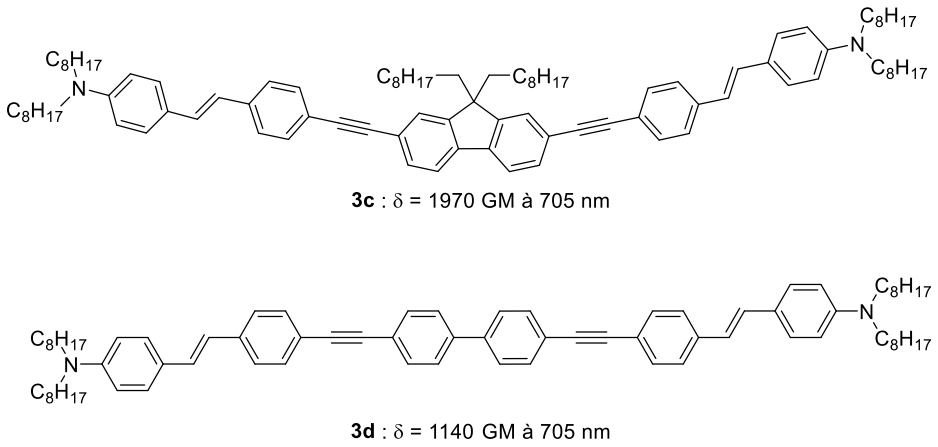


Figure 13 : Effet de la rigidité et de la planéité sur la section efficace δ.

Il existe cependant une valeur limite pour laquelle, du fait de la taille du système π conjugué, la molécule peut perdre sa conformation planaire, confinant alors la délocalisation électronique à un segment de la chaîne conjuguée. Cette limite est parfois appelée « longueur de conjugaison ».

Pour comparer entre elles des molécules ayant des structures et des nombres d'électrons π différents, il est usuel de rapporter la section efficace d'absorption δ au nombre d'électrons π de la molécule, noté N_e. En étudiant δ/N_e en fonction de N_e, cette longueur de conjugaison peut être mise en évidence comme illustré sur la Figure 14.

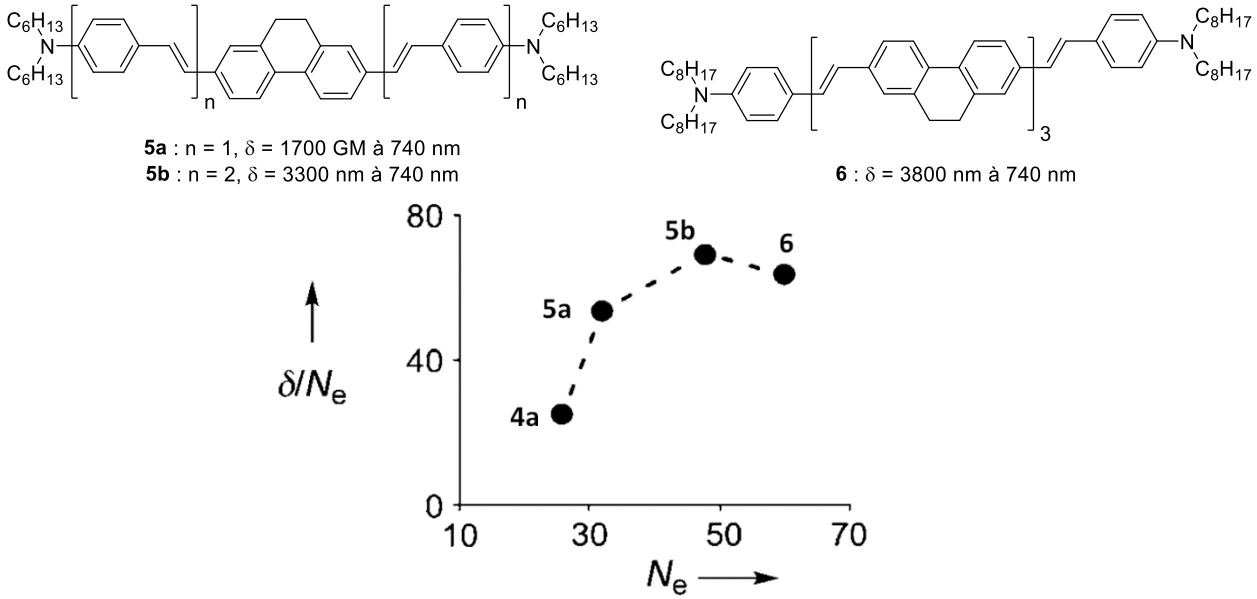


Figure 14 : Evolution de la section efficace d'absorption normalisée à deux photons pour les composés **4a**, **5a**, **5b** et **6**.[11]

Les valeurs de δ/N_e augmentent rapidement pour les deux premiers composés puis un plateau indique que l'augmentation du nombre d'électrons π n'est plus corrélée à une augmentation de la délocalisation.

1.2.3 Mesure de la section efficace d'absorption à deux photons

Dans cette partie, le principe de l'absorption à deux photons puis les paramètres importants pour concevoir une molécule capable de favoriser ce type d'absorption ont été décrits. Néanmoins il demeure nécessaire d'évaluer expérimentalement la section efficace d'absorption à deux photons d'un composé. Pour cela deux techniques sont principalement utilisées : la méthode z-scan et la fluorescence d'excitation biphotonique. Ces deux méthodes requièrent l'utilisation de lasers pulsés.

1.2.3.1 Méthode z-scan

La méthode z-scan consiste à déplacer l'échantillon le long de l'axe optique d'un laser focalisé en analysant l'intensité lumineuse transmise (Figure 15, partie haute). Une figure d'extinction est obtenue en fonction de la position de la cuve par rapport au point focal du laser (Figure 15, partie basse). La comparaison de ce spectre avec celui obtenu par interpolation des calculs théoriques physiques permet de calculer le coefficient α_2 relatif à l'absorption biphotonique (voir Équation 4), ce qui permet ensuite de calculer la section efficace apparente d'absorption à deux photons de la substance analysée.[19]

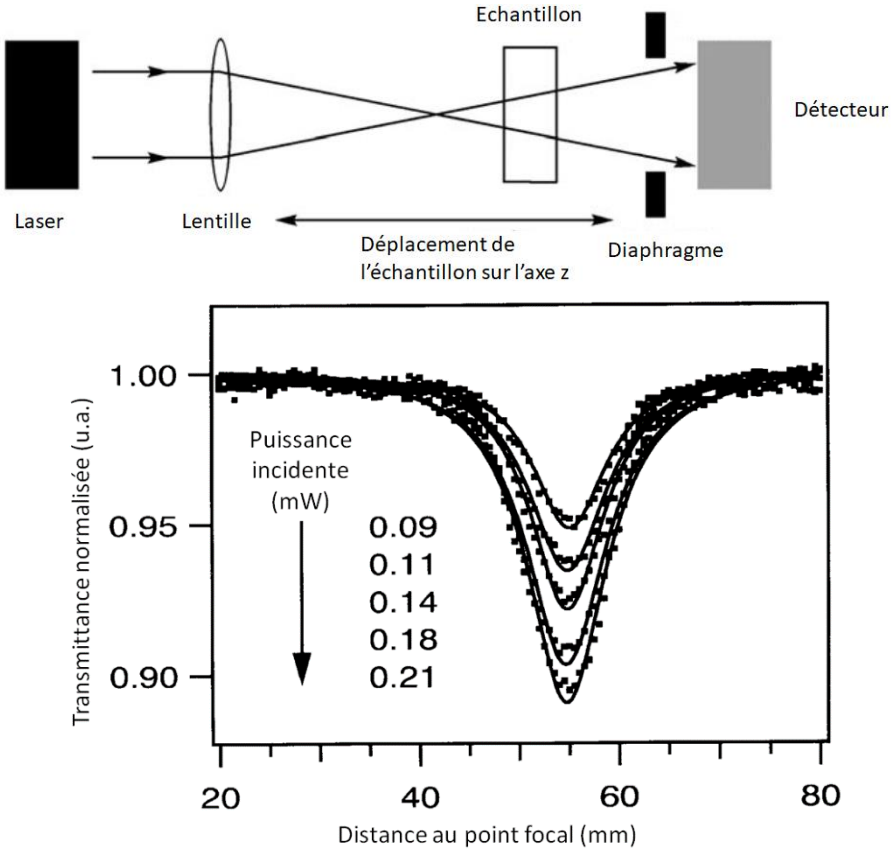


Figure 15 : Principe de la méthode z-scan et exemple de figure d'extinction obtenue.

Cette méthode est très générale et permet d'analyser de nombreux phénomènes non linéaires. Dans le cas d'une mesure de δ, des effets autres que l'absorption à deux photons (auto-défocalisation de la lumière incidente, absorption à l'état excité) peuvent perturber la mesure et artificiellement augmenter la valeur mesurée.[20]

1.2.3.2 Méthode de fluorescence par excitation biphotonique

La mesure de δ par la méthode de fluorescence par excitation à deux photons a été introduite pour la première fois en 1996.[21] De façon identique à la détermination du rendement quantique de fluorescence, cette méthode repose sur la comparaison de la molécule à analyser avec une référence dont les caractéristiques d'absorption à deux photons sont connues. Par conséquent et contrairement à la méthode z-scan, l'incertitude liées aux paramètres du laser est atténuée.[14] Cette méthode a également gagné en

[19] Sheik-Bahae, M., Said, A. A., Wei, T.-H., Hagan, D. J., Van Stryland, E. W. *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, *26*, 760-769.

[20] Kamada, K., Matsunaga, K., Yoshino, A., Ohta, K. *J. Opt. Soc. Am. B* **2003**, *20*, 529-537.

[21] Xu, C., Webb, W. W. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481-491.

attractivité grâce à la publication des caractéristiques d'absorption biphotonique d'un grand nombre de fluorophores commerciaux.[22]

La formule de calcul de la section efficace d'absorption à deux photons δ utilisée en pratique, donnée dans la partie 1.2.1 est rappelée ci-après :

$$\delta(\lambda) = \frac{I}{I_R}\frac{n^2 \Phi_F c_R}{{n_R}^2 \Phi_{FR} c}\delta_R(\lambda)$$

Équation 5 : Formule pratique de calcul de la section efficace d'absorption à deux photons δ.

Cette méthode est cependant moins générale que le z-scan. En effet elle requiert que l'échantillon soit fluorescent (ou plus généralement photoluminescent) même si la valeur de δ n'est liée qu'au phénomène d'absorption.

1.3 Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est une technique d'analyse développée principalement pour l'étude des tissus biologiques marqués par des fluorophores, mais aussi pour l'étude physico-chimiques de matériaux.[23] Plusieurs types de microscopies de fluorescence existent, les techniques suivantes seront évoquées ici : la microscopie de fluorescence conventionnelle et sa modification en microscopie confocale et la microscopie à nappe de lumière (en anglais SPIM pour Selective Plane Illumination Microscopy).

1.3.1 Microscopie de fluorescence conventionnelle et microscopie confocale

Un microscope en fluorescence conventionnel (ou en épifluorescence) diffère du microscope usuel de par la nature de la source lumineuse, celle-ci devant en effet produire de la lumière dans le domaine UV – visible. La longueur d'onde d'excitation voulue est ensuite sélectionnée grâce à un filtre ou un monochromateur. L'observation de la fluorescence peut se faire ensuite à l'œil nu, par révélation sur film photographique ou par acquisition en signal numérique sur un capteur CCD. Le schéma de montage d'un tel microscope est donné ci-après (Figure 16).

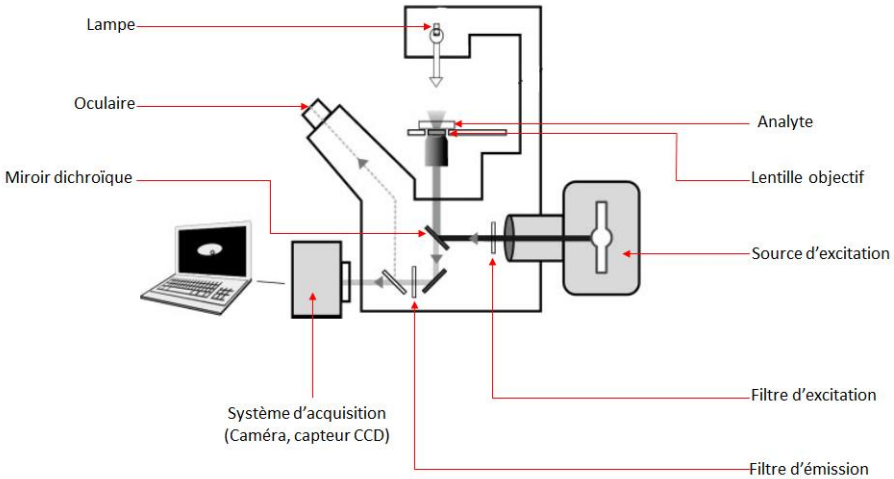


Figure 16 : Schéma d'un microscope de fluorescence conventionnel. [24]

[22] Makarov, N. S., Drobizhev, M., Rebane, A. *Opt. Express* **2008**, *16*, 4029-4047.

[23] Davidson, R. S. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 241-253.

[24] Adapté de : Dobrucki, J. W. Fluorescence Microscopy : From Principles to Biological Applications, *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2013**, *3*, p 104.

Dans un microscope en épifluorescence, la source d'excitation (laser) émet de la lumière à une longueur d'onde donnée grâce au filtre d'excitation. La lumière ainsi émise est ensuite réfléchie par le miroir dichroïque en direction de l'objectif et focalisée par la lentille objectif pour venir exciter l'analyte. Les molécules fluorescentes émettent alors de la lumière captée de nouveau par l'objectif et transmise au miroir dichroïque. La lumière est ensuite analysée par le système d'acquisition.

Pour le cas d'un microscope confocal, un diaphragme (ou sténopé) est placé en amont du détecteur : ainsi seule la lumière située dans le plan focal d'une lentille insérée sur le chemin optique entre la source et le miroir dichroïque sera transmise. L'échantillon est alors analysé point par point (Figure 17 : ligne en pointillés rouges) permettant ainsi d'obtenir l'image d'un unique plan de l'échantillon.

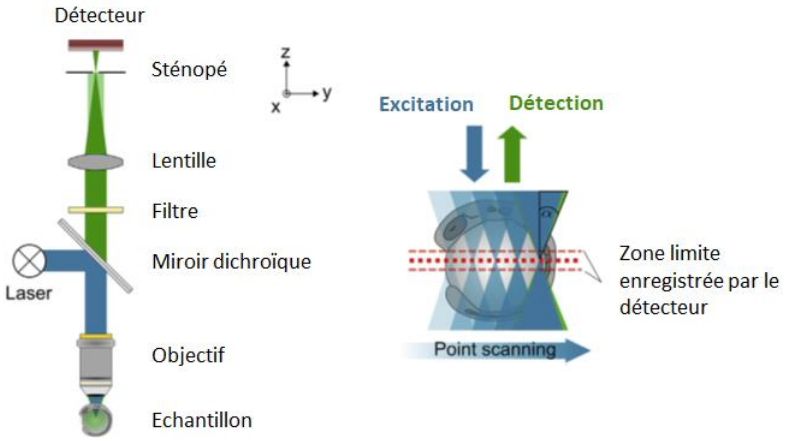


Figure 17 : Schéma de principe d'un microscope confocal de fluorescence et de l'enregistrement confocal.[25]

Le principal inconvénient de la microscopie confocale de fluorescence est la résolution temporelle de l'image (défini comme le nombre de pixels mesurés par seconde) que l'on souhaite obtenir. Ainsi une mesure plus longue augmentera le nombre de points mesurés dans un plan focal et donc la qualité de l'image obtenue mais multipliera les risques de dégradation de l'échantillon dues à une irradiation prolongée (photoblanchiment, photooxydation). En effet l'acquisition n'est obtenue que pour un plan mais l'échantillon est entièrement exposé à un cône de lumière pour chaque point enregistré (Figure 17 partie droite).

1.3.2 Microscopie à nappe de lumière

La différence entre la microscopie de fluorescence conventionnelle ou confocale et celle à nappe de lumière est le découplage des chemins optiques d'excitation et de détection. Deux objectifs optiques sont alors nécessaires pour l'illumination de l'échantillon et l'analyse. Cette géométrie alternative permet d'exciter l'échantillon selon un plan lumineux perpendiculaire à celui-ci. Contrairement aux méthodes décrites précédemment, seule une section plane mais sur la totalité de l'échantillon est excitée (Figure 18).

[25] Adapté de : Kromm, D., Thumberger, T., Wittbrodt, J. *Methods Cell Biol.* **2016**, *133*, 105-123.

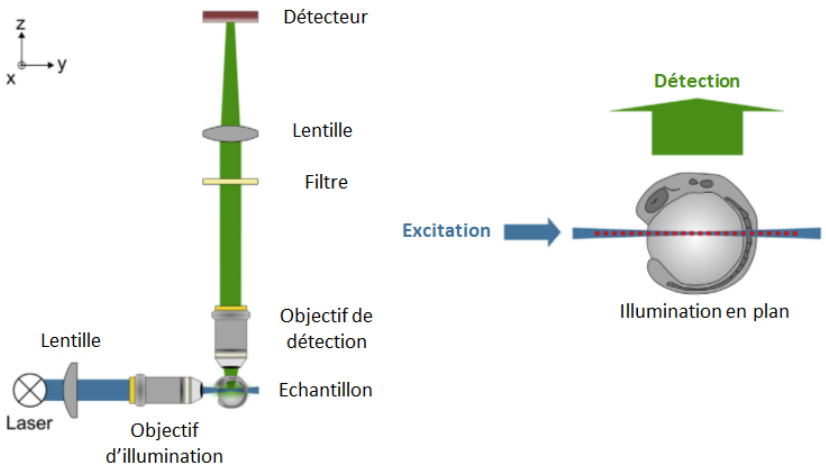


Figure 18 : Schéma de principe d'un microscope à nappe de lumière et de l'enregistrement correspondant.

La vitesse d'acquisition d'un système de microscopie à nappe de lumière est très supérieure à celles des méthodes conventionnelles ou confocale, ceci permet par exemple d'analyser des phénomènes biologiques rapides. De plus de par la nature de l'illumination, il est possible d'observer des échantillons de grande taille en conservant une bonne résolution temporelle.[26]

1.3.3 Microscopie de fluorescence à excitation biphotonique

Les techniques d'analyse présentées précédemment permettent donc d'illuminer et de détecter la lumière d'un même volume au sein de l'échantillon et cela de manière tridimensionnelle.

Bien que la microscopie confocale et la microscopie de fluorescence à excitation biphotonique soient très proches, cette dernière présente 3 grands avantages :

- La dépendance quadratique de l'intensité d'absorption biphotonique (Équation 4) restreint l'excitation des molécules à un volume, appelé volume focal, au voisinage du point auquel le laser est focalisé (Figure 19).

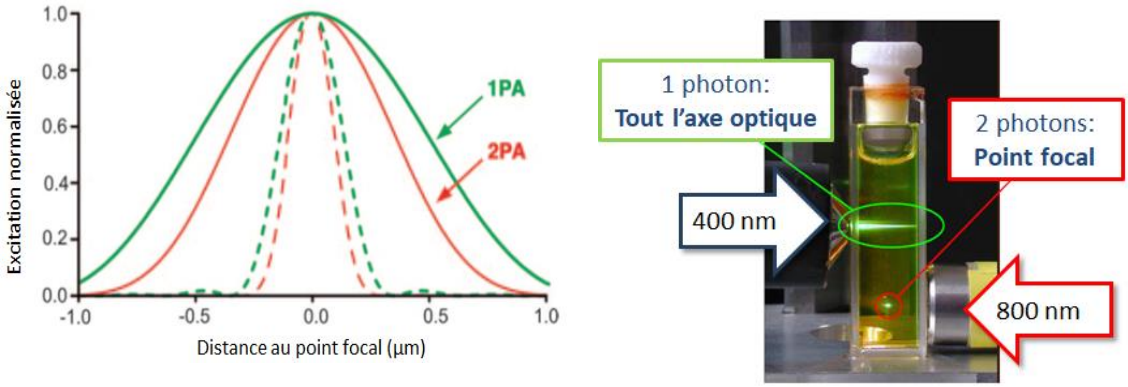
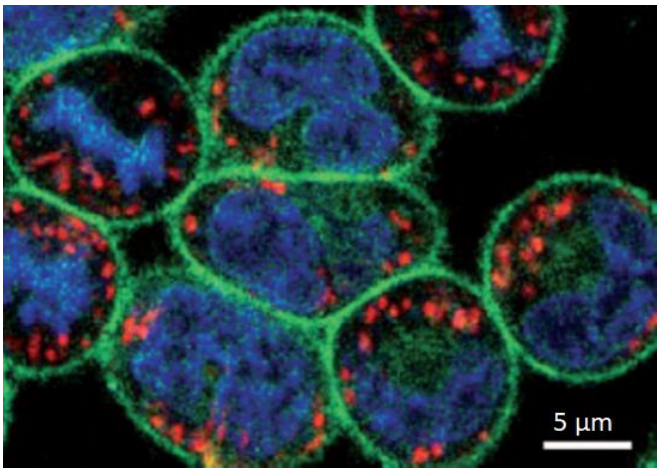


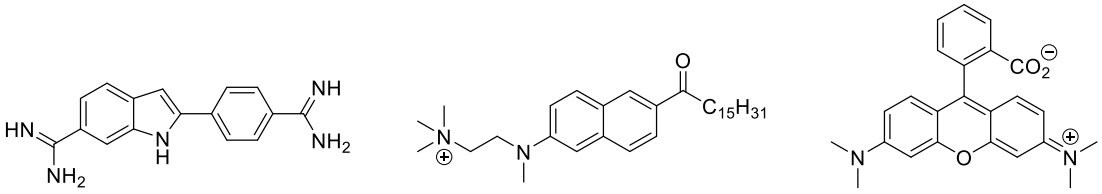
Figure 19 : Partie gauche : densité d'excitation à un photon (1PA, vert) ou deux photon (2PA, rouge) en fonction de la distance axiale (trait plein) ou radiale (trait pointillé) au point focal.[11] Partie droite : localisation de l'excitation mono et biphotonique d'une solution de fluorescéine.

- Les longueurs d'ondes d'absorption se situant dans la gamme 750-1100 nm, l'absorption et la diffusion des tissus biologiques est très atténuée.
- Très peu de chromophores biologiques absorbent efficacement à des longueurs d'ondes mentionnées précédemment, ce qui limite les possibles dommages causés par l'irradiation en imagerie *in vivo*.

[26] Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J., Stelzer, E. H. K. *Science* **2008**, *322*, 1065-1069.

A la différence de la microscopie confocale, où la résolution 3D est obtenue en limitant le volume d'observation, l'utilisation de la microscopie de fluorescence à excitation biphotonique restreint le volume d'excitation. Par conséquent ceci limite également le volume dans lequel d'éventuels dommages causés par l'irradiation peuvent survenir. Un exemple d'image obtenue par cette technique est présenté ci-dessous (Figure 20).





DAPI **7** (bleu)
λ_{exc} (1P) = 360 nm
λ_{em} = 460 nm
dans l'eau

PATMAN **8** (vert)
λ_{exc} (1P) = 360 nm
λ_{em} = 475 nm
dans l'eau

TMR **9** (rouge)
λ_{exc} (1P) = 543 nm
λ_{em} = 572 nm
dans MeOH

Figure 20 : Excitation simultanée à 780 nm de trois fluorophores différents dans des cellules cancéreuses RBL (Rat Basophilic Leukemia) marquées par le DAPI **7**, le PATMAN **8** et la tétraméthylrhodamine (TMR) **9**.[27]

Cette image a pu être obtenue en excitant trois fluorophores à 780 nm, chacun étant spécifique d'une partie de la cellule. Le DAPI **7** (bleu) permet de visualiser l'ADN du noyau cellulaire, le PATMAN **8** (vert) marque les membranes plasmiques et la TMR **9** (rouge) est spécifique des mitochondries. L'excitation à 780 nm de ces trois fluorophores résulte uniquement d'un processus biphotonique, et est simultanée bien qu'ils aient des longueurs d'ondes d'émission différentes.

1.3.4 Limite de résolution – Microscopies de fluorescence super résolutives

Les microscopes peuvent être utilisés pour visualiser de petites zones d'un échantillon par formation d'une image agrandie. Cependant même un très fort grossissement optique n'implique pas la capacité de visualiser l'infiniment petit : la lumière étant une onde elle est sujette au phénomène de diffraction.

1.3.4.1 Limite de résolution

Un microscope peut être considéré comme un système optique de lentilles produisant une image agrandie d'un petit objet. Dans ce processus, les rayons lumineux incidents provenant d'un point objet ne convergent pas parfaitement vers un point image comme cela est décrit par les lois de l'optique géométrique. Ceci entraîne une distribution tridimensionnelle de l'intensité lumineuse de l'image d'un point objet appelée fonction d'étalement du point (Figure 21 : courbes bleues et rouges). C'est cette fonction qui va déterminer la limite de résolution d'un appareil optique. Deux points ne seront pas

[27] Zipfel, W. R., Williams, R. M., Webb, W. W. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369-1377.

résolus si leurs fonctions d'étalement respectives se recouvrent. Pour la microscopie optique, la limite de résolution spatiale imposée par l'objectif est donnée par la formule d'Abbe (Figure 21).[28]

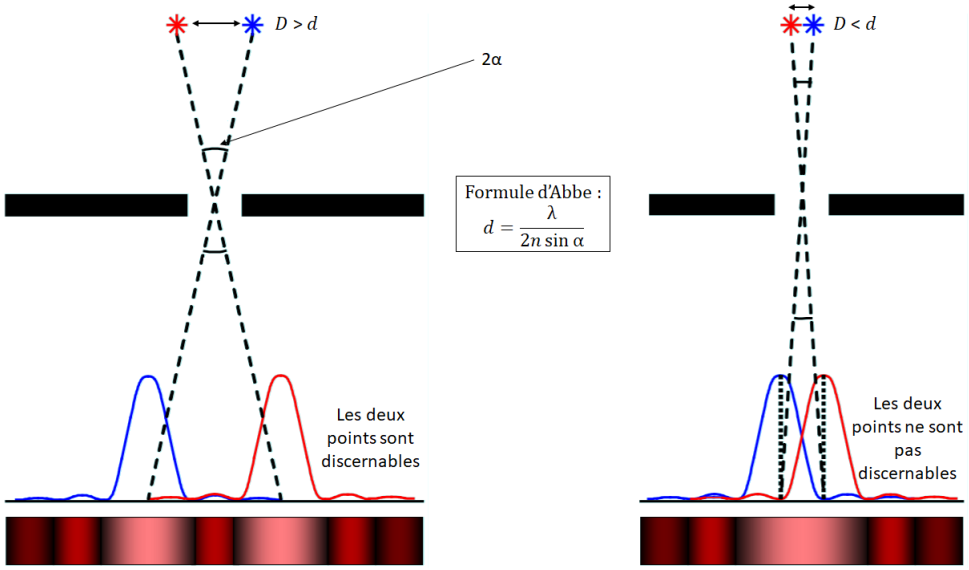


Figure 21 : Illustration de la formule d'Abbe pour deux points objet séparés d'une distance D supérieure (partie gauche) ou inférieure (partie droite) à la distance limite d.

Cette formule stipule que la distance limite d entre deux points lumineux est proportionnelle à la demie longueur d'onde λ de l'onde lumineuse émise rapportée à l'ouverture numérique *n* sin α, où *n* désigne l'indice de réfraction du milieu et α le demi-angle du cône lumineux produit par l'objectif.

Afin de combattre ce phénomène, des techniques de microscopie avancées ont été développées. Le principe de deux grands types de microscopies s'affranchissant de la limite d'Abbe sera évoqué ici. Celles-ci sont qualifiées de microscopies super résolutives et ont valu en 2014 au Dr. Eric Betzig et aux Prof. Stefan Hell et William Moerner, pionniers de la microscopie super résolutive, le prix Nobel de Chimie.

1.3.4.2 Microscopie de fluorescence super résolutive déterministe

Une première possibilité est d'introduire un motif spatial d'excitation supplémentaire capable d'atténuer le phénomène de diffraction. De ce principe ont découlé deux méthodes baptisées STED[29,30] (STimulated Emission Depletion) et RESOLFT (REversible Saturable Optically Linear Fluorescence Transition).

La technique du STED repose sur l'utilisation conjointe de deux lasers, le premier sert de source d'excitation classique et le deuxième, qualifié de laser STED, est utilisé pour supprimer l'émission de fluorescence provenant des molécules situées dans la zone lumineuse créée par le phénomène de diffraction. Cette suppression se fait par émission stimulée : lorsqu'un fluorophore à l'état excité rencontre un photon dont l'énergie est égale à la différence entre l'état excité et l'état fondamental de ce fluorophore, il peut revenir à l'état fondamental *via* un processus dit d'émission stimulée avant qu'une émission de fluorescence puisse avoir lieu (Figure 22).

[28] Bates, M., Huang, B., Zhuang, X. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 505-514.

[29] Hell, S. W., Wichmann, J. *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780-782.

[30] Klar, T. A., Hell, S. W. *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 954-956.

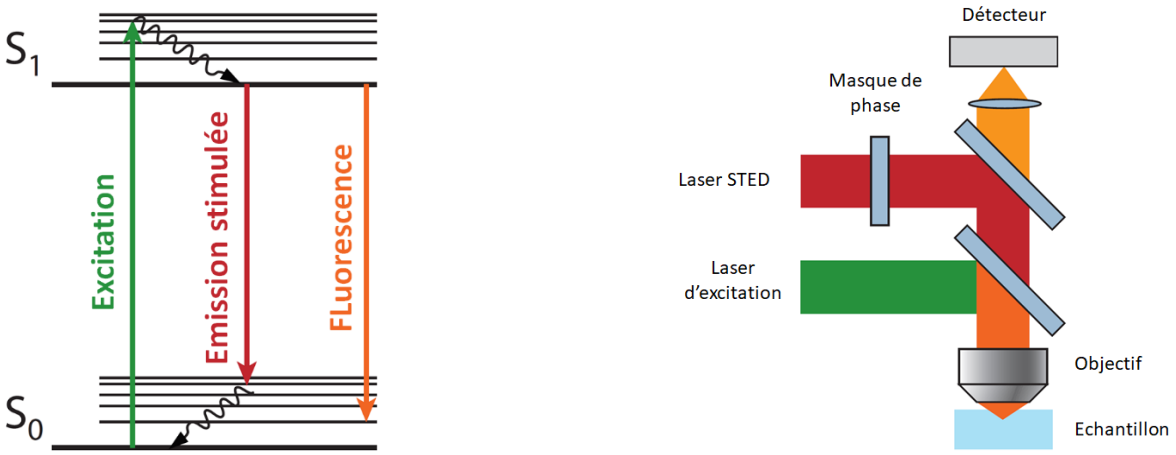


Figure 22 : Principe de l'émission stimulée (partie gauche) et schéma de principe d'un microscope STED (partie droite).

En pratique, un masque de phase (filtre polarisant) est placé sur le chemin optique du laser STED de manière à annuler son intensité. De manière à ce que ce masque ne subisse pas lui-même le phénomène de diffraction, l'intensité du laser STED doit également être suffisamment grande. Un motif en forme de donut, dont le centre correspond au maximum d'intensité du laser d'émission, est donc appliqué sur ce dernier. Ce motif donut réduit l'étalement de l'excitation lumineuse en éteignant par émission stimulée toutes les molécules qui ont été excitée dans la zone de diffraction (Figure 23).

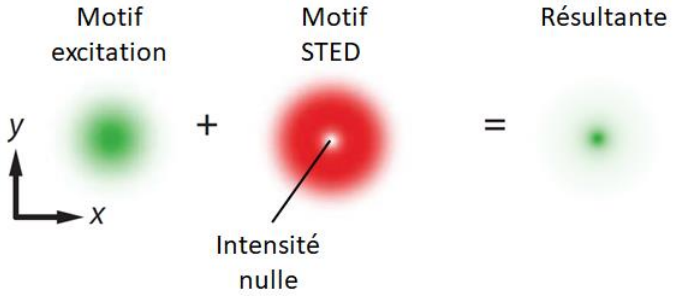


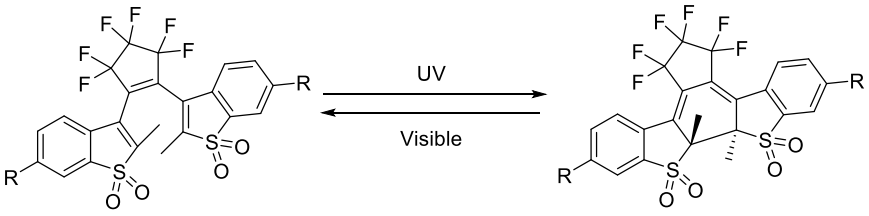
Figure 23 : Effet du laser STED sur la source d'excitation.

Les fluorophores utilisés en microscopie STED doivent posséder une large section efficace d'émission stimulée et une bonne photostabilité dans les conditions de microscopie STED, puisque l'intensité du laser STED est très importante.

La méthode RESOLFT[31] suit le même principe que la microscopie STED, à ceci près que l'extinction de la fluorescence aux alentours du point central d'excitation n'est pas réalisée par excitation stimulée. A la place, des fluorophores capables de passer sous irradiation d'un état fluorescent à un état non-fluorescent de manière réversible (aussi appelés fluorophores « photoswitchable ») sont utilisés. Cependant le nombre de fluorophores organiques adaptés à la méthode RESOLFT reste très faible et ces derniers sont largement dominés par des protéines fluorescentes beaucoup plus photostables (Figure 24).[32]

[31] Hell, S. W. *Science* **2007**, *316*, 1153-1158.

[32] Roubinet, B., Bossi, M. L., Alt, P., Leutenegger, M., Shojaei, H., Schnorrenberg, S., Nizamov, S., Irie, M., Belov, V. N., Hell, S. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15429-15433.



10, R = Ar
Forme ouverte, non fluorescente

10', R = Ar
Forme fermée, fluorescente

Figure 24 : Exemple de molécules dites « photoswitchable » : les diaryléthènes.

1.3.4.3 Microscopie de fluorescence super résolutive stochastique

Pour un échantillon biologique marqué pour la fluorescence, le nombre très important de fluorophores par unité de volume rend impossible la localisation précise de chacun d'entre eux par des méthodes classiques, puisqu'ils seront tous excités en même temps. En effet leurs images respectives ne pourront pas être distinguées puisque l'incertitude sur leur position est très supérieure à la distance les séparant.

Une solution à ce problème est l'approche « stochastique » qui consiste à « allumer » aléatoirement un faible nombre de fluorophores, généralement par impulsion lumineuse, de façon à obtenir des signaux de fluorescence que de molécules isolées spatialement. Chaque tache de luminescence ne correspondant alors qu'à une molécule unique, il est possible après traitement informatique de localiser chaque source de lumière. En effet, à la différence de ce qui a été évoqué précédemment, il est possible de détecter avec une grande précision un fluorophore si celui-ci est isolé et à condition que son image résulte de l'émission de plusieurs photons. D'une manière plus formelle, une molécule fluorescente seule formant un point image avec une fonction d'étalement de largeur Δ (qui matérialise les défauts du système optique et qui dépend de l'intensité lumineuse) composée de N photons donne une information sur sa position avec une incertitude exprimée par la relation suivante :[33]

$$\Delta_{loc} \approx \frac{\Delta}{\sqrt{N}}$$

Équation 6 : Incertitude sur la position Δ_{loc} d'un fluorophore formant une image avec une fonction d'étalement de point de largeur Δ constituée de N photons.

La méthode stochastique requiert comme la méthode RESOLFT, l'utilisation de fluorophores « photoswitchable » tels que les diaryléthènes.[34]

Ces fluorophores sont initialement dans un mélange statistique de forme éteinte ou « off », sous laquelle ils ne fluorescent pas et allumée ou « on », sous laquelle ils sont fluorescents. Un premier laser irradie alors l'intégralité du milieu, à une longueur d'onde, différente de la longueur d'onde d'excitation pour l'émission de fluorescence, faisant passer les molécules d'un état à l'autre (« off » vers « on » ou « on » vers « off »). Suivant ce processus, les fluorophores sont excités à leur longueur d'onde d'absorption par un autre laser, et la fluorescence émise est analysée. Cette distinction entre activation et excitation permet de n'exciter qu'une fraction aléatoire (d'où l'appellation stochastique) des fluorophores qui peuvent être alors considérés comme isolés et ainsi précisément localisés. La répétition un grand nombre de fois de ce procédé et la reconstruction informatique en une image de ces acquisitions permet d'obtenir une image de haute résolution de l'échantillon (Figure 25).

Trois acronymes correspondants à la méthode stochastique existent : STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (PhotoActivated Localisation Microscopy) et FPALM (Fluorescent PhotoActivated Localisation Microscopy).

[33] Thompson, R. E., Larson, D. R., Webb, W. W. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2775-2783.

[34] Roubinet, B., Weber, M., Shojaei, H., Bates, M., Bossi, M. L., Belov, V. N., Irie, M., Hell, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6611-6620.

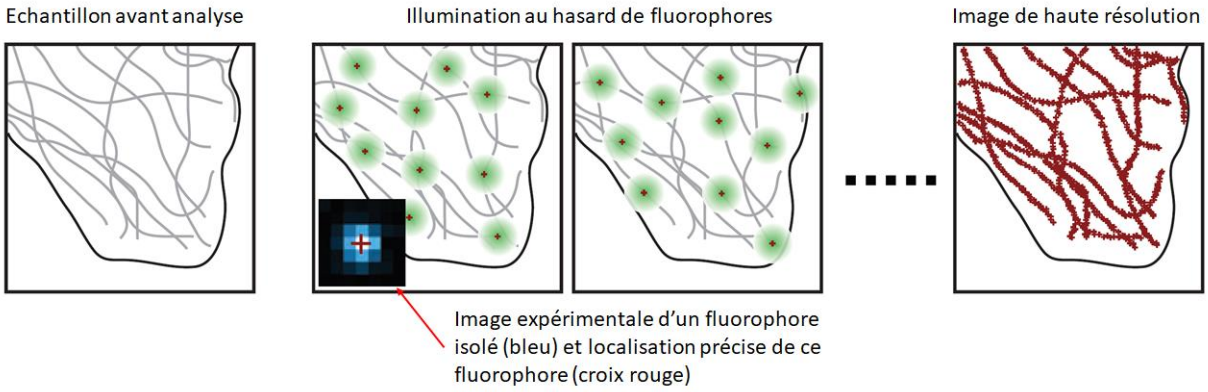


Figure 25 : Principe de la méthode stochastique.

Récemment, le groupe du Prof. Urano a reporté l'utilisation de flurorophores de la famille des rhodamines capables de passer spontanément d'une forme fluorescente à une forme non fluorescente sans photoactivation pour des applications de microscopie super résolutive stochastique. Grâce à la possibilité de spirocyclisation intramoléculaire, la conjugaison peut être interrompue au sein de la molécule et la fluorescence est ainsi inhibée (Figure 26). De tels molécules ont été qualifées dans la littérature de « blinking » fluorophores (fluorophores clignotants).[35]

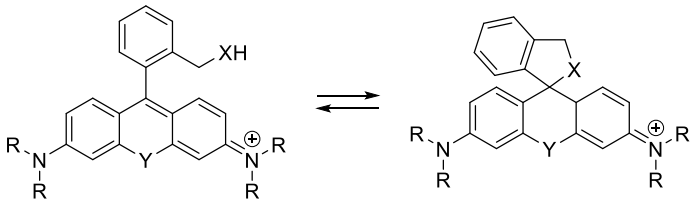


Figure 26 : Dérivés de rhodamines qualifiés de « blinking ».

1.3.4.4 Conclusion sur les méthodes de microscopies super résolutives

Les méthodes de microscopies super résolutives sont finalement divisées en deux concepts : soit la diffraction est diminuée en travaillant sur la source d'excitation de manière à supprimer ce phénomène intrinsèque ; soit l'analyse ponctuelle et aléatoire de la fluorescence émise est réalisée de manière à ce que ce ne soit plus la diffraction qui gouverne la limite de résolution. Ceci permet de développer un ensemble de techniques d'imagerie qui surpasse de très loin les méthodes optiques classiques (Figure 27). Ces méthodes nécessitent cependant l'utilisation de fluorophores très robustes et des temps d'acquisition longs : il faut réaliser une acquisition point par point dans le cas du STED et accumuler un grand nombre d'images dans le cas du STORM.

[35] Uno, S. N., Kamiya, M., Yoshihara, T., Sugawara, K., Okabe, K., Tarhan, M. C., Fujita, H., Funatsu, T., Okada, Y., Tobita, S., Urano, Y. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 681-689.

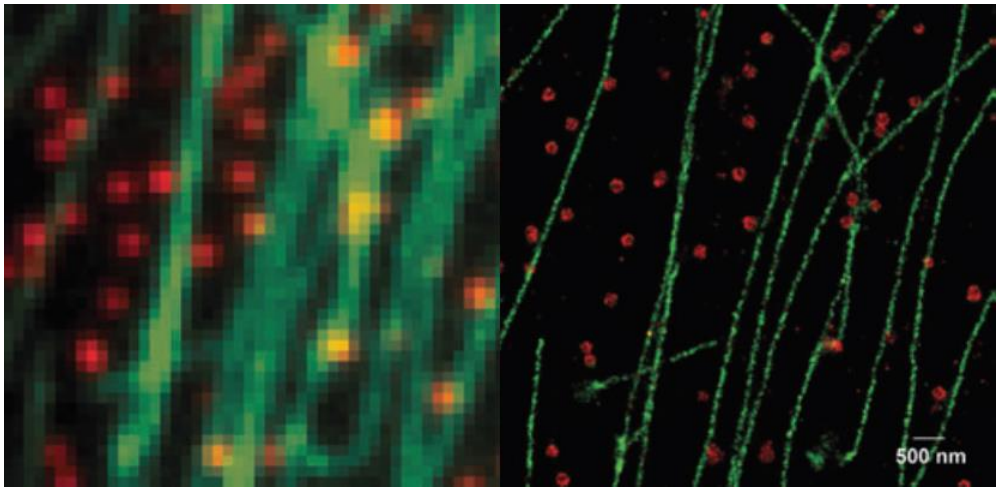


Figure 27 : Exemple d'image de microtubules (vert) et de vésicules entourées de clathrines (rouge) obtenues par microscopie de fluorescence conventionnelle (à gauche) et par microscopie STORM (droite).[36]

[36] Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T., Zhuang, X. *Science* **2007**, *317*, 1749-1753.

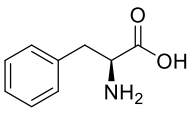
2 Utilisation des produits naturels fluorescents en tant que sondes et marqueurs en biologie et imagerie

Les sondes fluorescentes sont des outils devenus indispensables au biologiste pour explorer la complexité du milieu cellulaire et comprendre ainsi les mécanismes du vivant. Ces molécules peuvent être conçues pour fluorescer dépendamment des propriétés du milieu (pH, viscosité, force ionique, hydrophobicité, effets de chélation, interactions avec l'ADN ou des protéines spécifiques). La majorité des sondes employées sont des fluorophores synthétiques, malgré le manque de spécificité pour une cible ou les effets biologiques indésirables sur le système étudié. A l'inverse la fluorescence des produits naturels est souvent occultée par leur complexité structurelle et leurs activités biologiques très spécifiques. Les produits naturels se définissent de manière simple comme des molécules produites par une source biologique.[37] Dans la suite de cette partie, des exemples de produits naturels fluorescents dans la gamme des longueurs du visible (400-800 nm) qui sont intéressants pour des applications en imagerie seront développés.[38] Ces composés ont été classés suivant les cinq catégories suivantes : les protéines fluorescentes, les biomarqueurs fluorescents, les molécules à fluorescence pH dépendante, les ligands fluorescents et l'epicocconone qui constitue un cas très particulier ne pouvant être rangé dans les catégories précédemment citées.

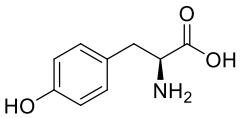
2.1 Protéines fluorescentes

Dans la théorie centrale de la biologie, qui résume le rôle des macromolécules biologiques (ADN, ARN, protéines) au sein du vivant, les protéines apparaissent en dernier mais sont cependant responsables de la majorité des fonctions cellulaires. La diversité de leurs fonctions est encodée dans leur séquence peptidique constituée d'une succession de 20 différents acides α-aminés (structure primaire) et dans l'agencement spatial de cette séquence (structures secondaire, tertiaire et quaternaire). Le rôle primordial joué par les protéines dans la biologie moderne continue de stimuler les chercheurs dans la compréhension des processus biochimiques et biophysiques qu'elles engendrent.

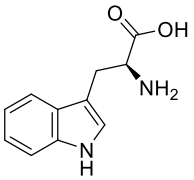
A cause de leur chaîne latérale aromatique, des acides aminés naturels natifs comme la phénylalanine **11**, la tyrosine **12** et le tryptophane **13** possèdent des propriétés d'absorption et d'émission dans le domaine UV-visible (Tableau 2).



L-Phénylalanine **11**



L-Tyrosine **12**



L-Tryptophane **13**

Amino acide	λ_{abs} max (nm)	λ_{em} (nm)	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F	B (L.mol^{-1}.cm^{-1})
Phénylalanine **11**	258	282	200	0.024	4.8
Tyrosine **12**	275	310 (340)	1410	0.14	157.4
Tryptophane **13**	279	365	5580	0.01-0.4	55.8-2232

Tableau 2 : Propriétés spectrales des acides aminés naturels natifs possédant une chaîne latérale aromatique.[39]

[37] Fischbach, M. A., Clardy, J. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 353-355.

[38] Duval, R., Duplais, C. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 161-193.

[39] Sinkeldam, R. W., Greco, N. J., Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.

Un chromophore naturel comme le tryptophane **13**, dont la brillance et le maximum d'émission sont très sensibles à la polarité de l'environnement[40], permet d'étudier les changements de structure tertiaire par modification de la longueur d'onde d'émission de fluorescence.[41]

Tout l'intérêt d'utiliser des protéines fluorescentes en tant que sondes réside dans la simplicité de les incorporer dans un organisme ou un milieu biologique en déclenchant l'expression du gène codant leur synthèse, introduit par manipulation du matériel génétique des cellules (mutation). Ceci en fait une classe de macromolécules largement utilisée pour étudier les systèmes biologiques complexes, l'expression des gènes, la localisation et les rôles des protéines pour lesquelles ils codent. Les protéines fluorescentes ont également une très bonne photostabilité particulièrement adaptée aux techniques de microscopie de fluorescence haute résolution comme le RESOLFT.[32]

Structurellement parlant, les protéines fluorescentes sont souvent apparentées à la Protéine Fluorescente Verte (en anglais Green Fluorescent Protein, abrégé en GFP), autour de laquelle sera centré ce qui suit.

2.1.1 La Green Fluorescent Protein (GFP)

La GFP a été isolée pour la première fois de la méduse *Aequorea victoria* par le groupe du Prof. Shimomura en 1962.[42] Elle est constituée de 11 feuillets β s'arrangeant de manière cylindrique et composée de 238 résidus acides aminés[43] pour une masse moléculaire d'environs 27 kDa (Figure 28).

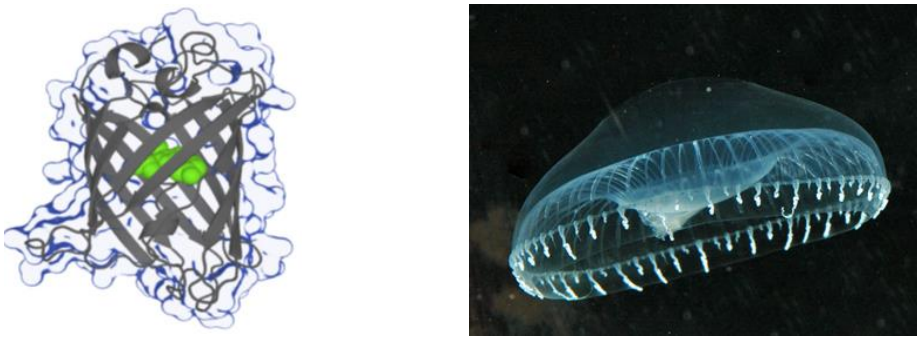


Figure 28 : Structure de la GFP (partie gauche) et la méduse *Aequorea victoria* (partie droite).

Le spectre d'absorbance de la GFP présente deux maxima à 395 nm (forme phénol du chromophore) et 475 nm (forme phénolate du chromophore).[44] A ces deux pics correspond un seul pic d'émission à 510 nm, dû à un phénomène de transfert de proton à l'état excité (ou ESPT) (Figure 29 et Figure 30).

[40] Pierce, D. W., Boxer, S. G. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 1583-1591.

[41] Royer, C. A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769-1784.

[42] Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. *J. Cell. Physiol.* **1962**, *59*, 223-239.

[43] Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J. *Science* **1996**, *273*, 1392-1395.

[44] Ward, W. W., Prentice, H. J., Roth, A. F., Cody, C. W., Reeves, S. C. *Photochem. Photobiol.* **1982**, *35*, 803-808.

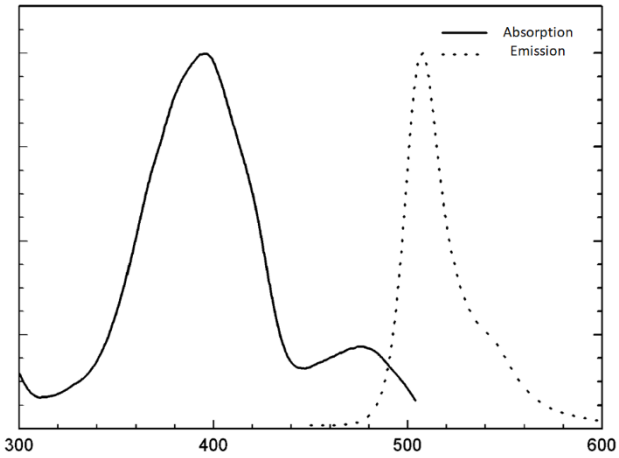
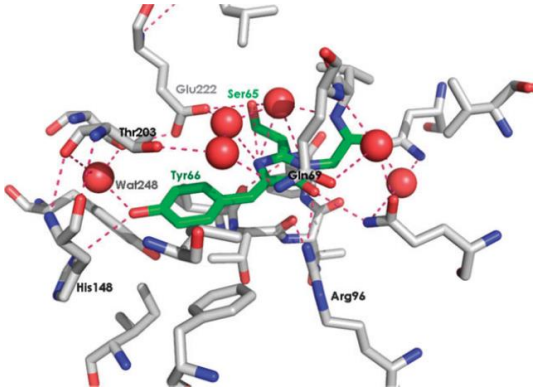
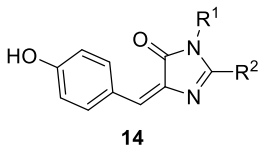


Figure 29 : Spectre d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) de la GFP isolée d'*Aequorea victoria*.

Cette fluorescence est due à un chromophore présent au sein de la protéine, qui a été identifié comme une para-hydroxybenzylideneimidazolone.[45] Cette petite molécule organique (Figure 30) seule n'est que très faiblement fluorescente en solution. Ce sont par conséquent les contraintes imposées par la protéine qui limitent les désexcitations non-radiatives que cette molécule peut subir depuis l'état excité et en font un bon fluorophore.[46]





14

R^1, R^2 = reste de la chaîne peptidique de la GFP

Figure 30 : Le chromophore de la GFP modélisé au sein de l'enzyme (partie gauche) et sa structure chimique (partie droite).[46]

De nombreuses études de modélisation ont été menées afin de comprendre le mécanisme de formation du chromophore de la GFP,[47] aboutissant à l'explication suivante : des résidus (Sérine 65, Tyrosine 66 et Glycine 67) de la chaîne protéique **A** sont capable de cycliser spontanément et de former le motif chromophore en présence de dioxygène (Figure 31).

[45] Shimomura, O. *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 220-222.

[46] Seward, H. E., Bagshaw, C. R. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2842-2851.

[47] a) Wang, S., Smith, S. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 452-458. b) Zhang, H., Wang, S., Sun, Q., Smith, S. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 8422-8424. c) Barondeau, D. P., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3166-3168. d) Wachter, R. M. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 120-127.

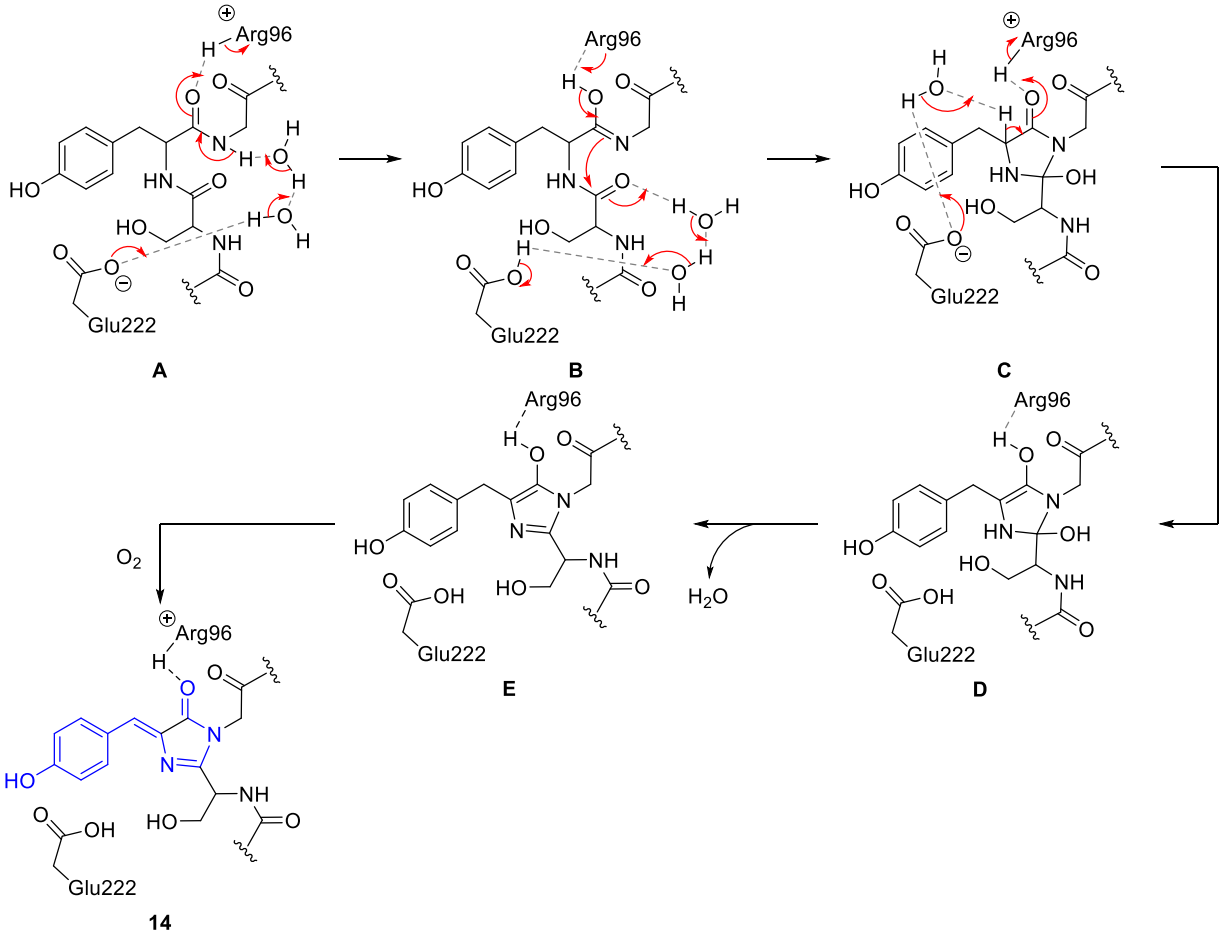


Figure 31 : Mécanisme de formation du chromophore de la GFP.[48]

Le mécanisme le plus conforme aux calculs théoriques[48] commence par la tautomérisation de l'azote peptidique du résidu Glycine 67 de **A** assistée par les résidus Acide glutamique 222 et Arginine 96, permettant ainsi d'obtenir l'intermédiaire **B**. Cet intermédiaire peut ensuite cycliser par addition nucléophile de l'azote du résidu Glycine 67 sur l'amide de la Sérine 65, formant ainsi le cycle hydroxy-imidazolidinone de l'intermédiaire **C**. Finalement l'aminal **D**, obtenu est déshydraté pour former l'intermédiaire **E** qui conduit après oxydation du dioxygène[49] à **14**. Ce processus, qualifié de post-traductionnel (c'est-à-dire ayant lieu après la traduction de l'ARNm du gène en séquence peptidique), est appelé maturation de la protéine.[50]

Une fois la formation du chromophore expliquée, il est possible de s'intéresser au mécanisme de fluorescence de la GFP. Il a été montré précédemment que le chromophore **14** fluoresçait suivant un mécanisme d'ESPT. Le spectre d'absorption de la GFP (Figure 29) montre que la forme phénolique de **14** est prépondérante (λ_{abs} = 395 nm). Ceci s'explique par le réseau de liaisons hydrogène, impliquant des molécules d'eau et notamment les résidus Sérine 205 et Acide glutamique 222, qui existe au sein de la protéine. Des variations de pH ont ainsi une influence sur les propriétés spectrales de la GFP, puisqu'elles peuvent induire des modifications structurelles de la protéine, notamment *via* le réseau de liaisons hydrogène évoqué précédemment, et donc des déplacements de longueur d'onde d'absorption puisque l'environnement du chromophore **14** est alors modifié.[51]

---

[48] Ma, Y., Sun, Q., Zhang, H., Peng, L., Yu, J.-G., Smith, S. C. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 9698-9705.

[49] Nienhaus, K., Nienhaus, G. U. *J. Phys. Condens. Matter* **2016**, *28*, 1-19.

[50] Swaminathan, R., Hoang, C. P., Verkman, A. S. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1900-1907.

[51] a) Agmon, N. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2452-2461. b) Stoner-Ma, D., Jaye, A. A., Matousek, P., Towrie, M., Meech, S. R., Tonge, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2864-2865. c) Leiderman, P., Huppert, D., Agmon, N. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1009-1018.

Sous irradiation UV, il est possible de déplacer le maximum d'absorption de la GFP à 483 nm. Ce changement est expliqué par la décarboxylation photo-induite de l'acide carboxylique en γ du résidu Acide glutamique 222, qui ne participe alors plus à la stabilisation de **14** sous forme phénol. La forme prépondérante du chromophore **14** devient alors le phénolate correspondant.[52] Cette décarboxylation, qui s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de fluorescence émise, constitue un processus de photoactivation irréversible (Figure 32).

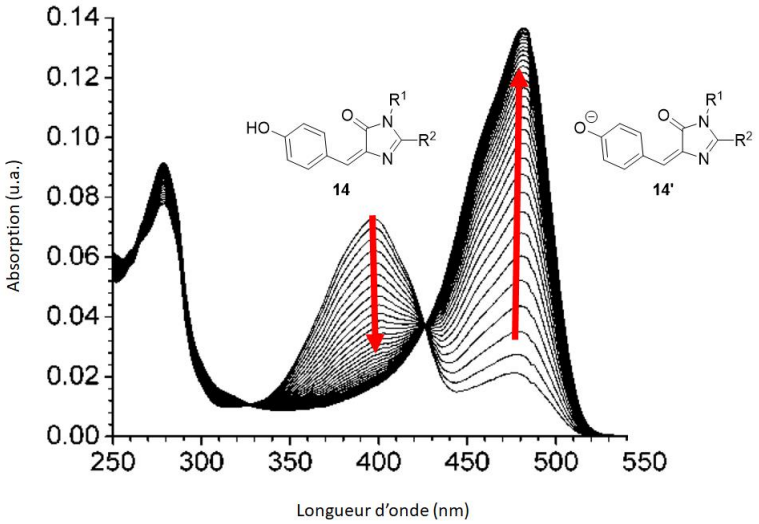


Figure 32 : Evolution de l'absorbance de la GFP sous irradiation UV (254 nm) en fonction du temps.[52]

A l'inverse, l'excitation de la GFP non maturée à 488 nm dans une atmosphère pauvre en oxygène permet d'obtenir une émission de fluorescence vers 600 nm de manière réversible. Ce type de photoactivation a permis d'observer la diffusion des protéines cytoplasmiques marquées par la GFP chez des bactéries *Escherichia coli* génétiquement modifiées.[53]

Ayant ouvert des avancées majeures sur la compréhension du vivant par sa découverte, la GFP a révolutionnée l'imagerie en biologie. Les Prof. Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien ont été récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2008 pour leurs travaux pionniers sur la GFP.

2.1.2 Autres protéines fluorescentes

Afin de souligner encore une fois l'étroite relation qui existe entre la structure de la protéine et ses propriétés spectrales, il est judicieux d'évoquer une protéine qui partage un chromophore de la même famille que la GFP : la Red Fluorescent Protein ou RFP. Isolée des coraux *Discosoma*, cette protéine se caractérise par une longueur d'onde d'absorption maximale à 480 nm et une émission à 500 nm. Après maturation, ces longueurs d'ondes sont déplacées vers le rouge, à 558 nm pour le maximum d'absorption et 583 nm pour l'émission. Cette différence réside dans le fait que le chromophore mature **15** de la RFP a une conjugaison plus étendue que celui de la GFP (**14**) par la présence d'un groupe acylimine (Figure 33).[54]

[52] van Thor, J. J., Gensch, T., Hellingwerf, K. J., Johnson, L. N. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, *9*, 37-41.

[53] Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P.-E., Stock, J., Leibler, S. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 809-812.

[54] Tubbs, J. L., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. *Biochemistry* **2005**, *44*, 9833-9840.

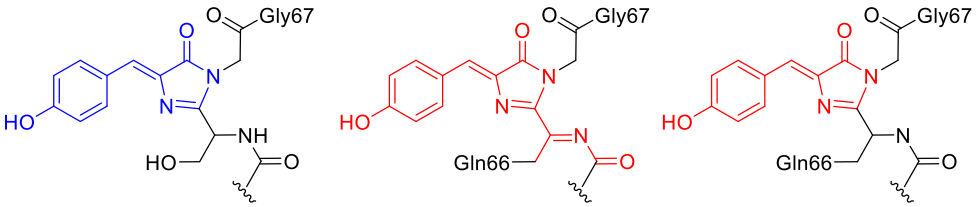


Figure 33 : Chromophores matures de la GFP (**14**) et de la RFP (**15**). Le chromophore de la RFP avant maturation (**15'**) est également dessiné.

La maturation de la RFP demeure incomplète même après des temps importants et est donc composée d'un mélange de chromophores non mature **15'** et mature **15**.[55]

Des nombreuses possibilités d'applications de la GFP en tant que sonde fluorescente ont découlé tout autant d'améliorations en termes de propriétés spectrales. L'induction de mutations dans les gènes codant pour sa synthèse a permis la modification de la séquence peptidique. De ces modifications génétiques découlent des variations des structures protéiques et donc également des propriétés spectrales des mutants de GFP[56] mais aussi des mutants de la RFP. Ces nouvelles protéines étant obtenues synthétiquement par bio-ingénierie, elles ne feront pas l'objet d'une étude détaillée ici. Néanmoins la grande diversité spectrale de ces protéines fluorescentes mutantes est soulignée sur la figure ci-dessous (Figure 34).

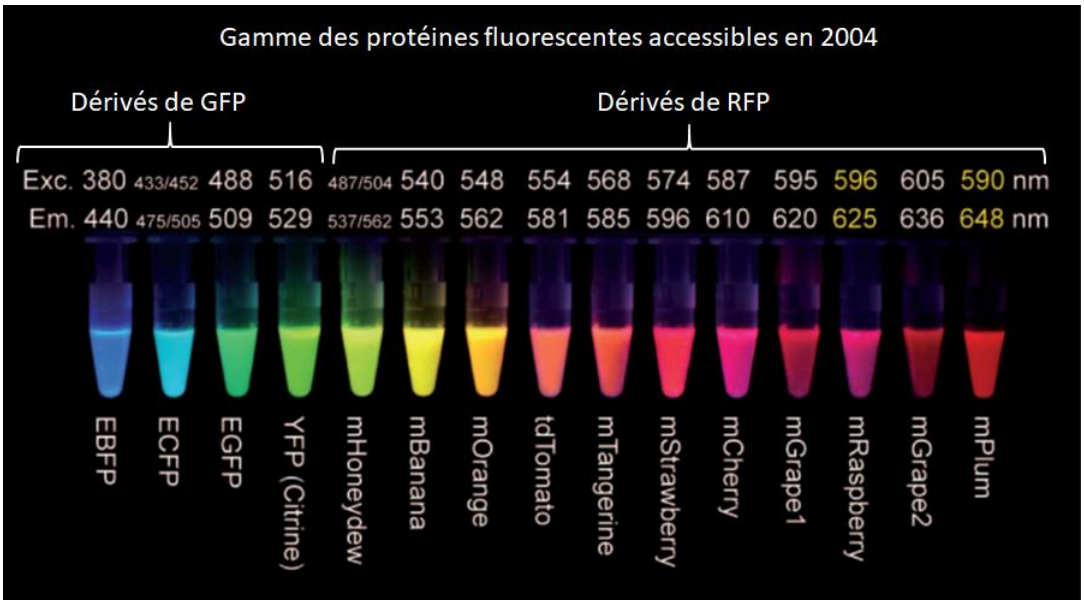


Figure 34 : Protéines fluorescentes dérivant de la GFP et de la RFP, exprimées au sein de bactéries et purifiées.[56a)]

Il est à noter que des analogues du chromophore de la GFP ont également été synthétisés. L'objectif était de concevoir des composés possédant des propriétés de fluorescence comparables à celle de la GFP et par conséquent de mimer la contrainte stérique imposée par la protéine autour du chromophore qui limite les désexcitations non radiatives de ce dernier. Dans un premier temps, des dérivés hétérocycliques de **14** ont été synthétisés afin d'obtenir des composés non fluorescents nativement mais dont la conformation pouvait être figée par un cation métallique, entraînant alors une émission de fluorescence L'inhibition des désexcitations non radiatives dans le cas du composé **16** se fait

[55] Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11984-11989.

[56] a) Tsien, R. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612-5626. b) Rodriguez, E. A., Campbell, R. E., Lin, J. Y., Lin, M. Z., Miyawaki, A., Palmer, A. E., Shu, X., Zhang, J., Tsien, R. Y. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *42*, 111-129. c) Shcherbakova, D. M., Subach, O. M., Verkhusha, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10724-10738.

sélectivement en présence des ions Zn^{2+}, qui sont indispensables pour observer la fluorescence (Figure 35).[57]

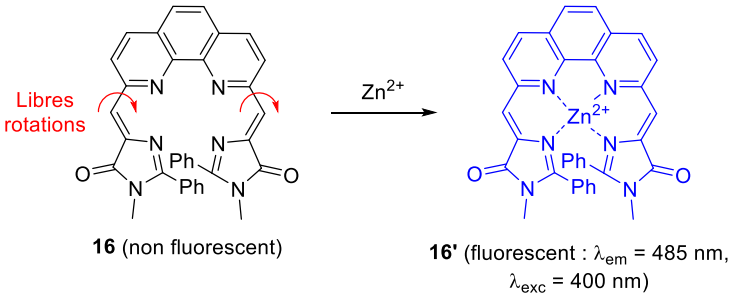
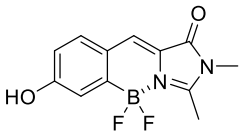


Figure 35 : Exemple de sonde spécifique des ions Zn^{2+} basée sur le squelette du chromophore de la GFP.

La présence d'un cation métallique exogène n'est plus nécessaire si un groupement susceptible d'être chélaté est introduit directement sur l'hydroxybenzylidène et dans ce cas le verrouillage conformationnel est irréversible (Figure 36).[58]



17, λ_{em} = 485/527 nm, λ_{exc} = 400 nm, Φ_F = 0.73 (dans MeCN)

Figure 36 : Exemple de fluorophore à conformation verrouillée.

Le composé **17** a ainsi pu être utilisé comme modèle du transfert de proton à l'état excité qui a lieu dans les protéines de la famille des GFP.[58]

La nature peut donc utiliser des matrices comme les protéines pour induire une conformation spécifique à une molécule naturelle, afin que celle-ci remplisse un rôle métabolique. La luminescence verte due à la GFP chez *Aequorea victoria* résulte d'un transfert d'énergie par résonance (qualifié de BRET pour Bioluminescence Resonance Energy Transfer) entre l'aequorine, qui émet de la luminescence bleue (470 nm) et la GFP. La bioluminescence est induite par un changement de structure de l'aequorine suite à la complexation de cations calcium Ca^{2+}. Cette photoprotéine réalise alors l'oxydation de la luciférine qui lui sert de chromophore, cette réaction s'accompagnant de l'émission d'un photon qui excite alors le chromophore de la GFP.[59]

2.2 Biomarqueurs fluorescents

Le terme biomarqueur se réfère ici aux métabolites prenant part, dans un organisme, à un phénomène ou à une fonction biologique. Dans le cas présent, la luminescence peut, comme ce sera montré par la suite, être utilisée par l'organisme à des fins de communication. Ce type de marqueurs peut donc être utilisé pour détecter le phénomène qui lui est lié grâce à la fluorescence mais peut également être source d'inspiration pour la conception d'une sonde biologique plus complexe pour l'imagerie.

[57] Li, Y., Shi, L., Qin, L.-X., Qu, L.-L., Jing, C., Lan, M., James, T. D., Long, Y.-T. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 4361-4363.

[58] Baranov, M. S., Lukyanov, K. A., Borissova, A. O., Shamir, J., Kosenkov, D., Slipchenko, L. V., Tolbert, L. M., Yampolsky, I. V., Solntsev, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6025-6032.

[59] Gorokhovatsky, A. Y., Marchenkov, V. V., Rudenko, N. V., Ivashina, T. V., Ksenzenko, V. N., Burkhardt, N., Semisotnov, G. V., Vinokurov, L. M., Alakhov, Y. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 703-711.

2.2.1 Luciférines

La bioluminescence se définit comme un phénomène impliquant l'émission de lumière due à une réaction biochimique catalysée par une enzyme. Ce phénomène se retrouve chez de nombreux organismes vivants. Un des couples enzyme-substrat dont le phénomène de bioluminescence a été très étudié est le couple luciférase-luciférine. Ce couple est en général propre à chaque type d'organisme bioluminescent (Figure 37).[60]

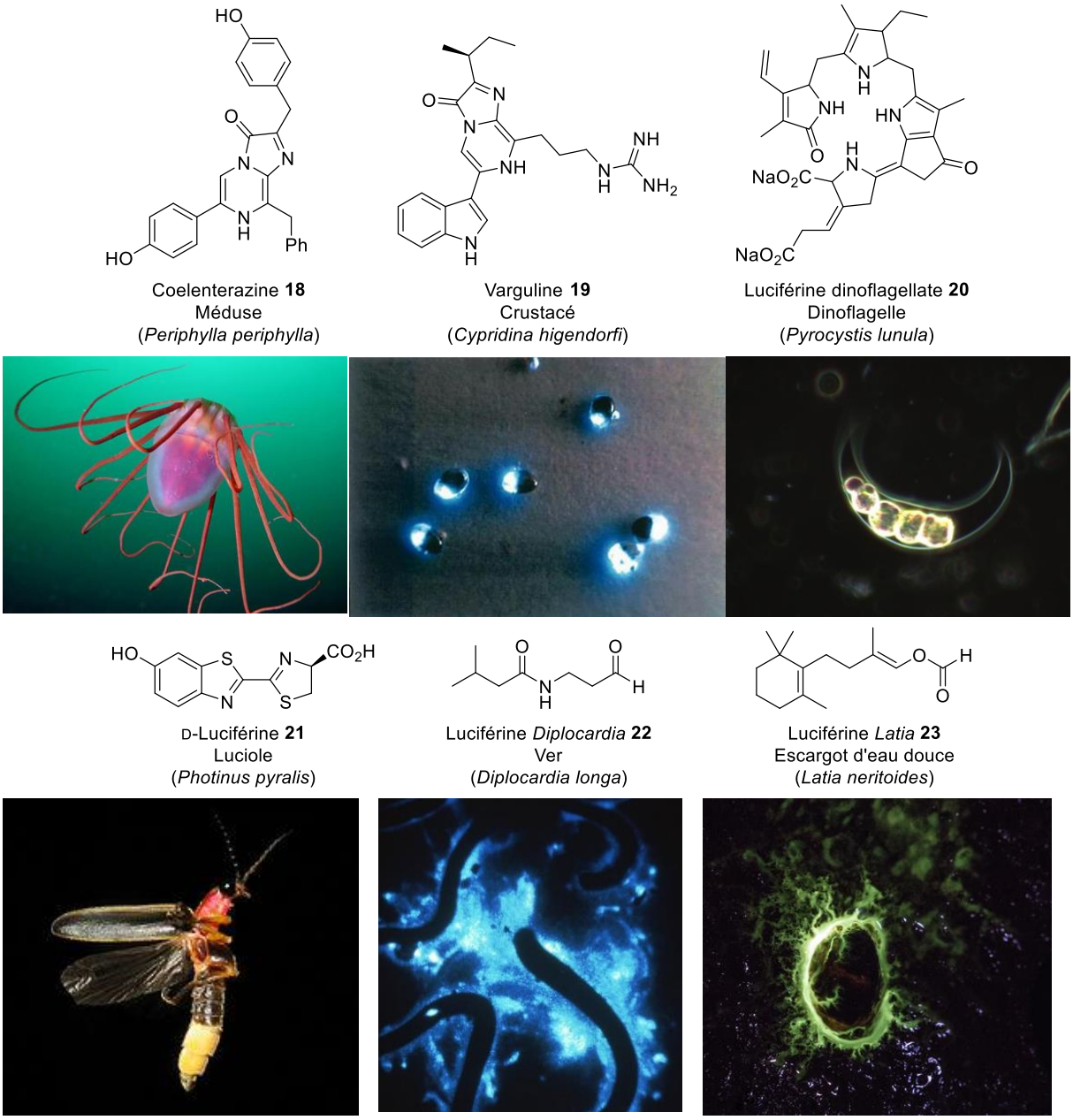


Figure 37 : Exemples de luciférines isolées chez différents types d'organismes vivants (un exemple d'être vivant est donné entre parenthèses).

Cette diversité des structures implique un mécanisme propre à chaque type d'organisme et donc chaque couple luciférase-luciférine. Parmi ces êtres vivants, la classe la plus intéressante est celle des

[60] Rees, J.-F., De Wergifosse, B., Noiset, O., Dubuisson, M., Janssens, B., Thompson, E. M. *The Journal of Experimental Biology* **1998**, *201*, 1211-1221.

coléoptères qui sont capables d'émettre, suivant l'espèce, une grande variété de couleur par bioluminescence. Ces changements peuvent être attribués à une conformation spatiale différente des luciférases.[61] En effet la bioluminescence sera conditionnée par les interactions entre la luciférine et le site actif de la luciférase. Afin d'aller plus loin, il faut maintenant expliquer le mécanisme suivant lequel le couple enzyme-substrat peut émettre de la lumière, l'exemple de la D-luciférine, présente chez les lucioles *Photinus pyralis*, sera ici considéré (Figure 38).[62]

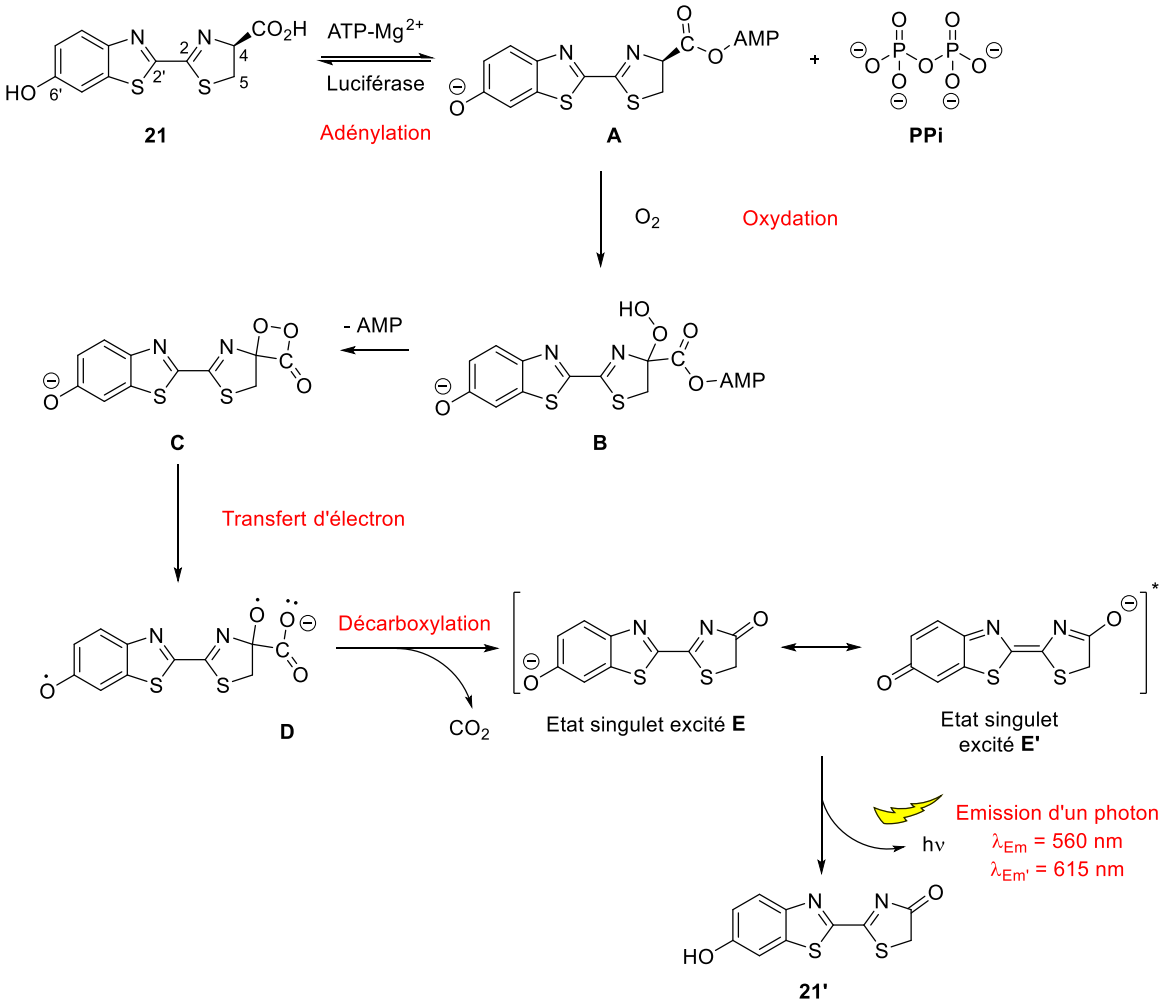


Figure 38 : Mécanisme de bioluminescence pour la D-luciférine **21**.

La première étape consiste en la formation du complexe enzyme-substrat entre la luciférase et la D-luciférine **21**, qui est alors adénylée en présence d'ATP et d'ions Mg^{2+}. L'intermédiaire **A** ainsi formé est alors rapidement oxygéné en position 4 sous l'action du dioxygène formant le composé intermédiaire peroxydé **B**. Ce peroxyde forme alors un cycle 4-dioxétanone très instable **C**, dont la formation a été confirmée par des marquages isotopiques à l'oxygène ^{18}O. Cette dioxétanone luminesce *via* un mécanisme de décomposition par échange d'électron initié chimiquement (CIEEL pour Chemicaly Initiated Electron Exchange Luminescence) en oxyluciférine **21'**. Ce procédé se compose comme suit : un transfert d'électron de la partie phénolate (qualifiée de partie donneuse) au motif dioxétanone (qui constitue la partie accepteuse) provoque la rupture hétérolytique de sa liaison O-O donnant l'intermédiaire **D**, qui par décarboxylation et échange d'électron aboutit à la formation d'un état singulet excité **E**.[62] Cet état singulet possédant une forme limite **E'**, l'émission d'un photon peut alors se faire

[61] Wood, K. V. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 662-673.

[62] Teranishi, K. *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 82-111.

selon deux longueurs d'ondes respectivement à 560 nm pour **E** et 615 nm pour **E'**.[63] Il est à noter cependant que l'émission à 615 nm pour la D-luciférine **21** est encore sujette à discussions, de nombreux mécanismes et/ou intermédiaires ayant été proposés depuis les années 1990 pour expliquer la dualité des longueurs d'ondes d'émission outre la mésomérie évoquée précédemment.[62, 63]

A l'instar des protéines fluorescentes où un travail de bio-ingénierie est requis pour modifier les propriétés spectrales du fluorophore, il est ici possible d'obtenir des variations de longueur d'onde d'émission de bioluminescence en modifiant la luciférase par mutation génétique ou bien en synthétisant des analogues de luciférine naturelle. Les études en imagerie ont surtout été menées sur le couple luciférase- D-luciférine **21**, le substrat étant stable et non toxique en milieu biologique.[64]

L'idée d'une modification de la structure de l'enzyme impliquée dans la bioluminescence est étroitement liée aux observations précédentes quant à l'existence de plusieurs longueurs d'ondes d'émission. Il s'agit donc de promouvoir une désexcitation préférentielle de l'oxyluciférine **21'** avec émission d'un photon dans le proche infrarouge ($\lambda > 600$ nm) autorisant des applications d'imagerie *in vivo*. Cependant le déplacement des longueurs d'ondes s'accompagne d'une chute importante de l'intensité lumineuse émise lorsque la D-luciférine **21** est associée à la luciférase mutante PRE9 plutôt qu'à l'enzyme naturelle.[65]

C'est donc naturellement que les recherches se sont focalisées sur les luciférines synthétiques. Cette approche est d'autant plus pertinente que la luciférase des lucioles est relativement tolérante aux modifications chimiques de son substrat. De nombreux analogues de la D-luciférine **21** autorisant des émissions de bioluminescence décalées vers le proche infrarouge ont ainsi été synthétisés (Figure 39).[64]

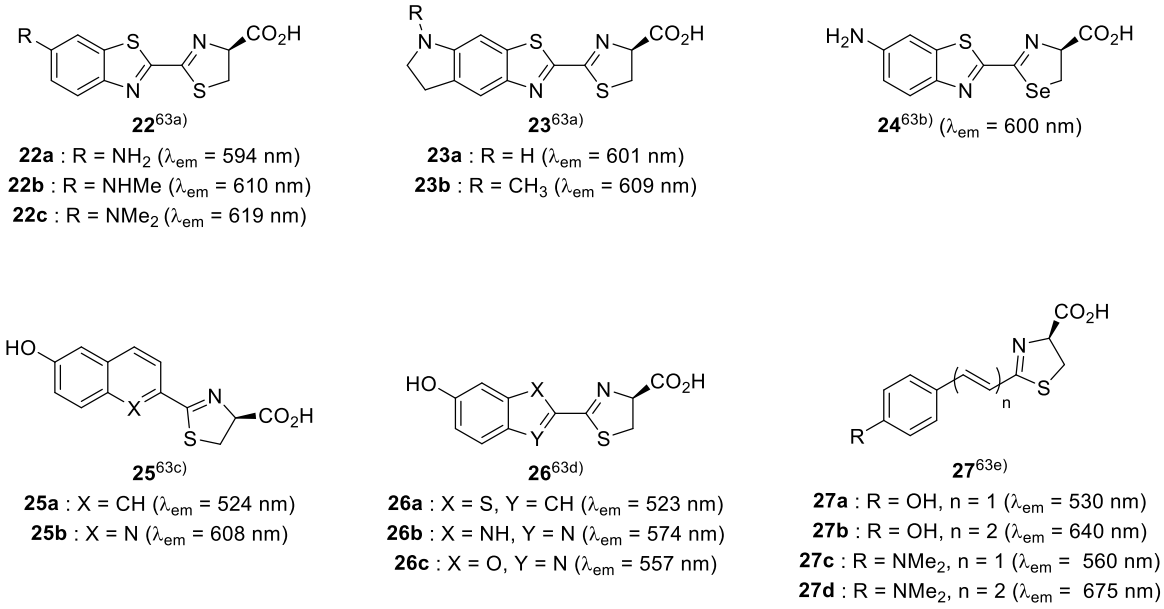


Figure 39 : Principaux analogues de D-luciférine présents dans la bibliographie, les longueurs d'ondes d'émission de bioluminescence sont données en présence de la luciférase de luciole à pH optimum.[66]

---

[63] Shimomura, O. Bioluminescence : Chemical Principles and Methods, *World Scientific* **2006**, 1, p 16-19.

[64] Adams, S. T. J., Miller, S. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 112-120.

[65] Liang, Y., Walczak, P., Bulte, J. W. M. *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17*, 0160041-0160046.

[66] a) Mofford, D. M., Reddy, G. R., Miller, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13277-13282. b) Conley, N. R., Dragulescu-Andrasi, A., Rao, J., Moerner, W. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3350-3353. c) Branchini, B. R., Hayward, M. M., Bamford, S., Brennan, P. M., Lajiness, E. J. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 689-695. d) Woodroofe, C. C., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Kovic, Y., Rosenberg, J. C., Behney, C. E., Southworth, T. L., Branchini, B. R. *Biochemistry* **2012**, *51*, 9807-9813. e) Iwano, S., Obata, R., Miura, C., Kiyama, M., Hama, K., Nakamura, M., Amano, Y., Kojima, S., Hirano, T., Maki, S., Niwa, H. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3847-3856.

Malgré leurs émissions respectives, aucun des analogues présentés ci-dessus ne surpasse la D-luciférine en termes d'intensité de bioluminescence. Ceci peut être dû à l'empoisonnement de l'enzyme par l'oxyluciférine correspondante formée pour les amino D-luciférine **22** et **23**.[67] Dans le cas des dérivés **26** et **27** pour lesquels le noyau benzothiazole de la D-luciférine a été remplacé par d'autres groupements, une étape d'adénylation ou d'oxydation plus lente.[64]

La combinaison de la bio-ingénierie des luciférases et des propriétés spectroscopiques des luciférines de synthèse est le bon compromis. Ainsi le simple remplacement de la luciférase de luciole par le mutant Ultra-Glo couplé à l'utilisation des amino D-luciférines cycliques **23** a permis une augmentation de la bioluminescence par un facteur 5.7 par rapport au couple naturel luciférase-luciférine.[67]

2.2.2 Acides anthraniliques et dérivés

Les anthranilates, ou 2-aminobenzoates, forment un petit groupe d'intermédiaire métaboliques du L-tryptophane[68]. Ces composés comptent parmi les fluorophores organiques les plus simples qui existent, et sous excitation dans l'UV (320-350 nm) émettent dans le bleu (410-475 nm) avec des rendements quantiques compris entre 0.4 et 0.65.[69]

Des études sur *Caenorhabditis elegans* ont montré qu'une intense fluorescence bleue se propageait dans les cellules intestinales des nématodes mourants et récemment décédés. L'observation du cytoplasme de ces cellules intestinales a révélé la présence de granules contenant les dérivés d'acides anthraniliques, synthétisés à partir du tryptophane *via* une kynurénine (Figure 40). Au sein de ces granules, les anthranilates n'émettent pas de fluorescence dans les conditions normales.

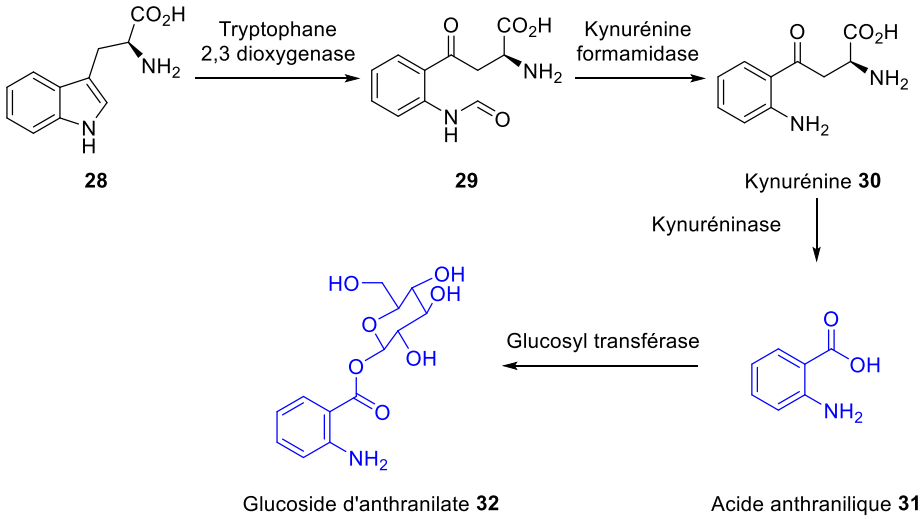


Figure 40 : Métabolisation du L-tryptophane **18** *via* les kynurénines en glucosides d'anthranilates.

Lors d'un traumatisme, l'ischémie (diminution de l'apport sanguin) provoque l'augmentation du taux de calcium intracellulaire (Ca^{2+}) au niveau intestinal. Cet influx calcique active une cascade métabolique impliquant tout d'abord un ensemble de calpaïnes, des enzymes dont l'activité dépend du taux de calcium. Les calpaïnes vont alors provoquer la destruction des lysosomes en diminuant le pH intracellulaire et ainsi la libération de cathépsines. C'est l'activation de ces dernières enzymes qui enclenche le processus de mort cellulaire par nécrose. Les granules intestinaux contenues dans le cytoplasme libèrent alors les anthranilates et la fluorescence apparaît. Ce phénomène se propage de

[67] Reddy, G. R., Thompson, W. C., Miller, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13586-13587.

[68] Dewick, P. M. Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach, *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2008**, *3*, p 395.

[69] a) Beeby, A., Jones, A. E. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 10-15. b) Beeby, A., Jones, A. E. *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *64*, 109-116.

proche en proche entre les parties antérieures et postérieures de l'intestin du nématode entraînant la mort de l'organisme (Figure 41).[70]

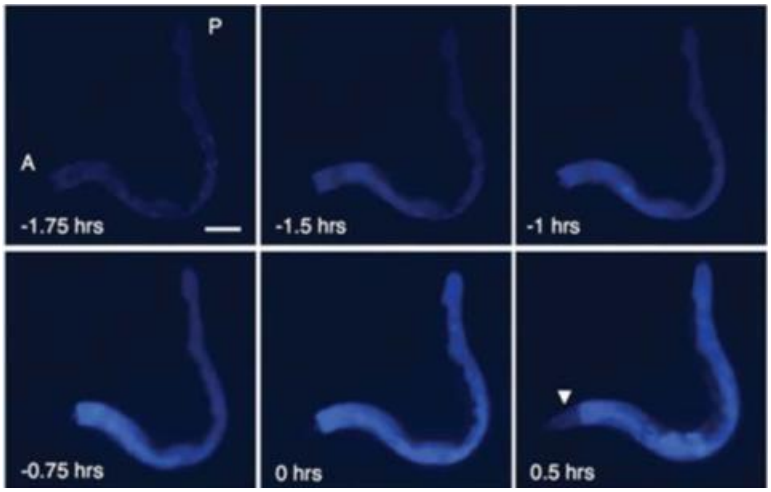
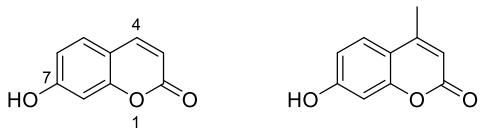


Figure 41 : Apparition de la fluorescence nécrotique chez *C. elegans*. Le temps t = 0 h correspond à la mort de l'animal (cessation de mouvement).

2.2.3 Umbelliferone et 4-méthylumbelliferone

L'umbelliferone **33** appartient à la famille des 7-hydroxycoumarines, possède une fluorescence qui dépend fortement du pH et fluoresce dans le violet (400-450 nm). C'est un marqueur chimique de plusieurs espèces de plantes comme *Apiaceae* et *Rutaceae*. Un métabolite de structure proche est la 4-méthylumbelliferone **34** qui a été isolée chez le scorpion asiatique *Mesobuthus martensii* (Figure 42).[38]



umbelliferone **33** 4-méthylumbelliferone **34**

Figure 42 : Structures de l'umbelliferone **33** et de la 4-méthylumbelliferone **34**.

Le régime alimentaire de *M. martensii*, principalement composé d'insectes et de larves, l'expose aux toxines végétales comme la coumarine, qui est alors métabolisée par l'organisme sous forme d'umbelliferone et de 4-méthylumbelliferone.[71] Des processus de détoxification de la coumarine par les enzymes P450 chez l'homme[72] viennent confirmer un tel mécanisme. Cependant la raison de l'accumulation de ces coumarines fluorescentes dans la cuticule de *M. martensii* (Figure 43) demeure inconnue et seules des hypothèses sont proposées dans la bibliographie. La lumière de la Lune, émettant suffisamment de rayonnement UV, peut exciter les composés **33** et **34** au sein de la cuticule. Ainsi la lumière émise par fluorescence des umbelliferones permettrait donc aux scorpions de se localiser la nuit et joueraient un rôle de communication. Alternativement, ces molécules pourraient avoir joué le rôle de barrière protectrice aux UV chez ces organismes au moment de leur terrestrialisation.[38]

---

[70] Coburn, C., Allman, E., Mahanti, P., Benedetto, A., Cabreiro, F., Pincus, Z., Matthijssens, F., Araiz, C., Mandel, A., Vlachos, M., Edwards, S.-A., Fischer, G., Davidson, A., Pryor, R. E., Stevens, A., Slack, F. J., Tavernarakis, N., Braeckman, B. P., Schroeder, F. C., Nehrke, K., Gems, D. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001613.

[71] Cao, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., Di, Z., He, Y., Chen, Z., Yang, W., Shen, Z., He, X., Sheng, J., Xu, X., Pan, B., Feng, J., Yang, X., Hong, W., Zhao, W., Li, Z., Huang, K., Li, T., Kong, Y., Liu, H., Jiang, D., Zhang, B., Hu, J., Hu, Y., Wang, B., Dai, J., Yuan, B., Feng, Y., Huang, W., Xing, X., Zhao, G., Li, X., Li, Y., Li, W. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2602.

[72] Lewis, D. F. V., Ito, Y., Lake, B. G. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 256-264.

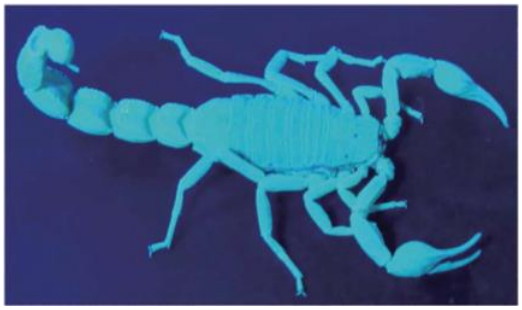


Figure 43 : Le scorpion *M. martensii* émet de la fluorescence bleue lorsqu'il est irradié dans l'UV (340 nm).

2.2.4 Flavonols 5-*O*-glycosylés

Les flavonols appartiennent à la famille des flavonoïdes, qui comporte également les flavones et les iso-flavones. D'une manière générale, les flavonols absorbent dans la gamme des UVA (entre 315 et 400 nm) et ont deux bandes d'émission dans le visible : l'une entre 400 et 430 nm et l'autre entre 510 et 570 nm. L'existence de ces deux bandes d'émission est attribuée au phénomène d'ESIPT (ou transfert de proton intramoléculaire à l'état excité) qui peut avoir lieu sur la forme benzopyrylium **N*** donnant alors un intermédiaire excité **T*** (Figure 44). Suivant la polarité du solvant et plus généralement les propriétés du milieu, les deux bandes peuvent être plus ou moins prépondérantes l'une par rapport à l'autre.[73]

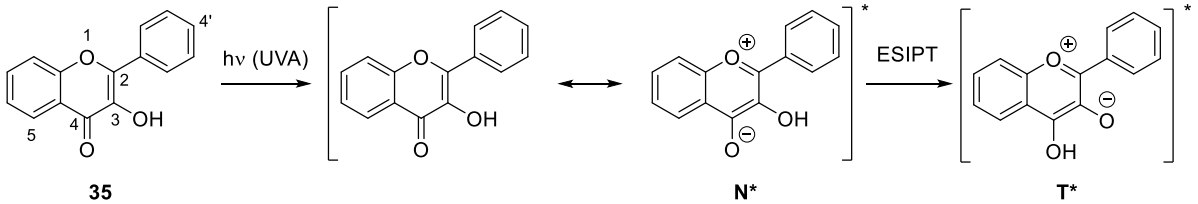


Figure 44 : Existence d'une forme tautomère benzopyrylium **A** à l'état excité conduisant à un phénomène d'ESIPT sur les flavonols **35**.

Ces molécules ont été utilisées en imagerie pour la conception de sondes ratiométriques. L'équipe du Prof. Mély a ainsi développé une sonde basée sur la 3-hydroxyflavone **35** pour étudier les domaines lipidiques des membranes plasmiques. Ceux-ci se distinguent entre des phases dites « liquides ordonnées », riches en lipides saturés (sphingolipides) ainsi qu'en stérols (cholestérol), qui flottent à la surface de phases qualifiées de « liquides désordonnées » plus fluides, qui sont riches en lipides insaturés. Ces domaines sont impliqués dans de nombreux mécanismes membranaires.[74] La sonde **36** est très sensible à l'environnement et capable de marquer spontanément la couche extérieure de la membrane plasmique (Figure 45, partie gauche). Le spectre d'émission de ce composé présente deux bandes qui résultent des formes **N*** et **T*** liées au phénomène d'ESIPT (Figure 45, partie droite, courbe rouge). La déconvolution par traitement informatique de ce spectre permet d'identifier une troisième espèce, notée **N-H***, liée à la formation d'un hydrate de flavonol (Figure 45, partie droite, courbes en pointillés noirs).[75]

[73] Sytnik, A., Gormin, D., Kasha, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 11968-11972.

[74] Oncul, S., Klymchenko, A. S., Kucherak, O. A., Demchenko, A. P., Martin, S., Dontenwill, M., Arntz, Y., Didier, P., Duportail, G., Mely, Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1798*, 1436-1443.

[75] Klymchenko, A. S., Mely, Y., Demchenko, A. P., Duportail, G. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1665*, 6-19.

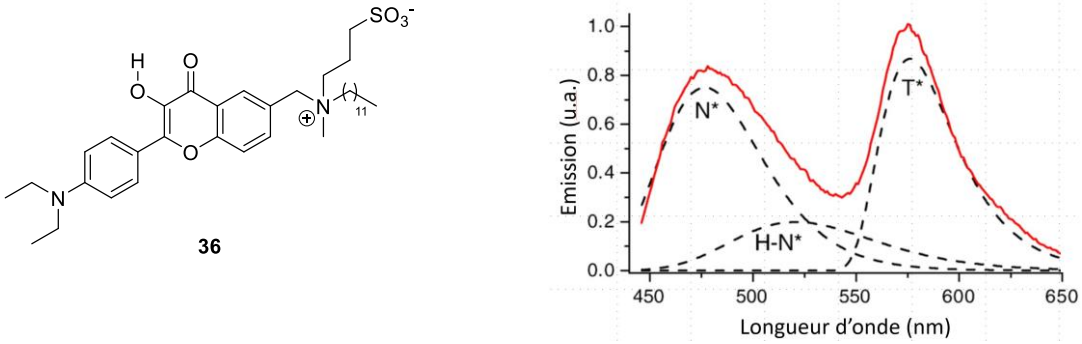


Figure 45 : Structure et spectre d'émission de la sonde **36**.

La proportion d'eau présente localement au sein de la membrane peut donc être étudiée à l'aide de la sonde **36**. En effet, suivant l'hydrophilie de l'environnement, le phénomène d'ESIPT évoqué précédemment peut être inhibé par hydratation de la molécule **36** (Figure 46, partie rouge) et seule la forme normale hydratée **N-H*** contribue à la fluorescence. Ce sont ces variations d'hydrophilie des membranes plasmiques, qui permettent de différentier les domaines lipidiques organisés et non organisés.[74]

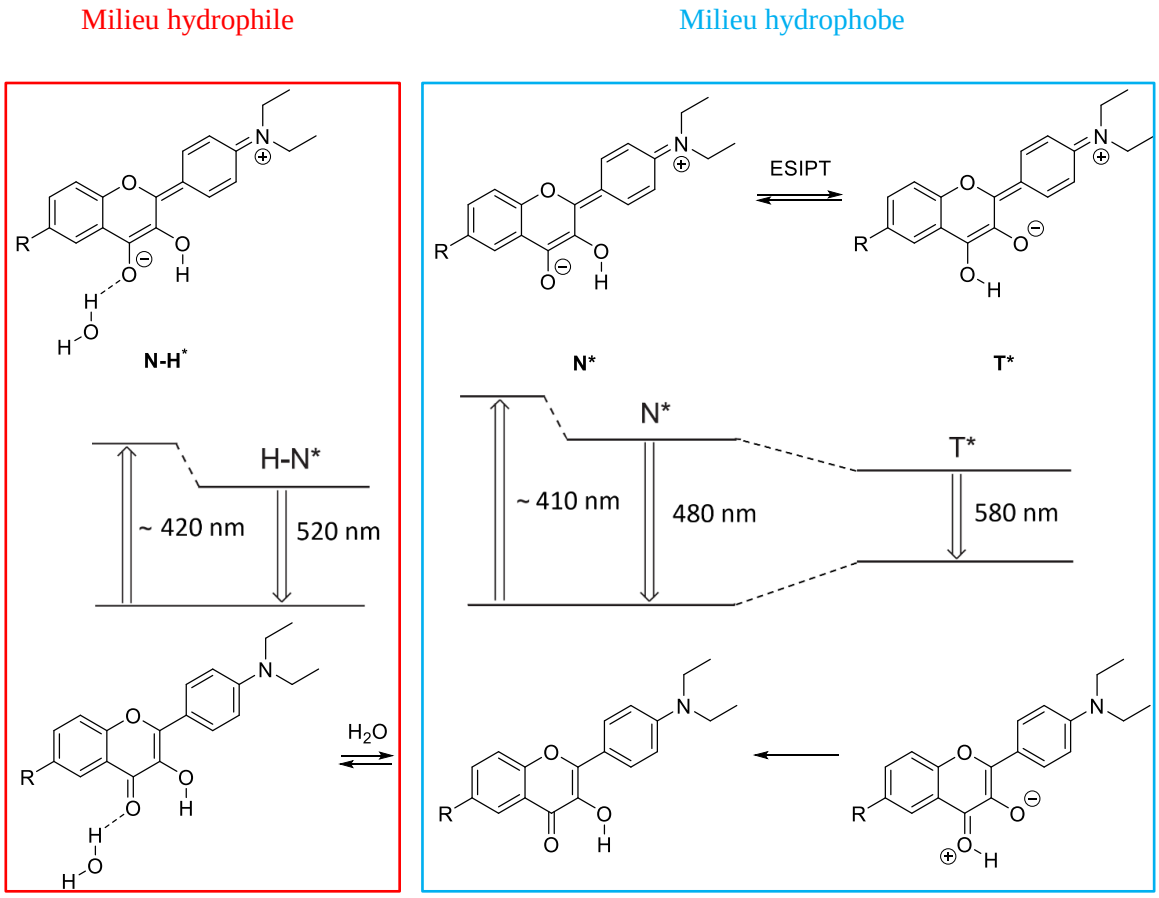


Figure 46 : Illustration des différentes transitions électroniques impliquées sur la sonde **36** en fonction de l'hydrophilie de l'environnement membranaire analysé.

Finalement, la sonde **36** peut également servir à l'analyse de la polarité locale des membranes. Des expériences d'extraction du cholestérol membranaire par la Méthyl-β-CycloDextrine (MβCD) sur des cellules marquées par le composé **36** permettent de visualiser la perte des domaines lipidiques organisés par fluorescence. La corrélation des changements spectroscopiques observés sur ces cellules en présence de MβCD et sur des cellules apoptotiques également marquées par la sonde **36** semblent indiquer que les changements structuraux liés à la disparition des domaines lipidiques organisés auraient aussi lieu dans le processus d'apoptose cellulaire (Figure 47).[74] En effet, la figure ci-dessous montre les différences

structurelles au sein des membranes de cellules normales et apoptotiques. Le rapport de l'intensité d'émission de la sonde **36** à 520 nm par rapport à celle à 580 nm est directement liée à la quantité d'eau présente au sein des membranes plasmiques comme expliqué précédemment. De plus, la bande d'émission à 520 nm permet également d'évaluer la polarité de la membrane comme le montre le spectre obtenu pour d'une cellule normale (cas 2) par rapport à celui d'une cellule déficiente en cholestérol membranaire (cas 3). La molécule **36** est donc un outil permettant à la fois de mesurer la polarité de la membrane plasmique (teneur en cholestérol) mais également la quantité d'eau présente au sein de cette même membrane.

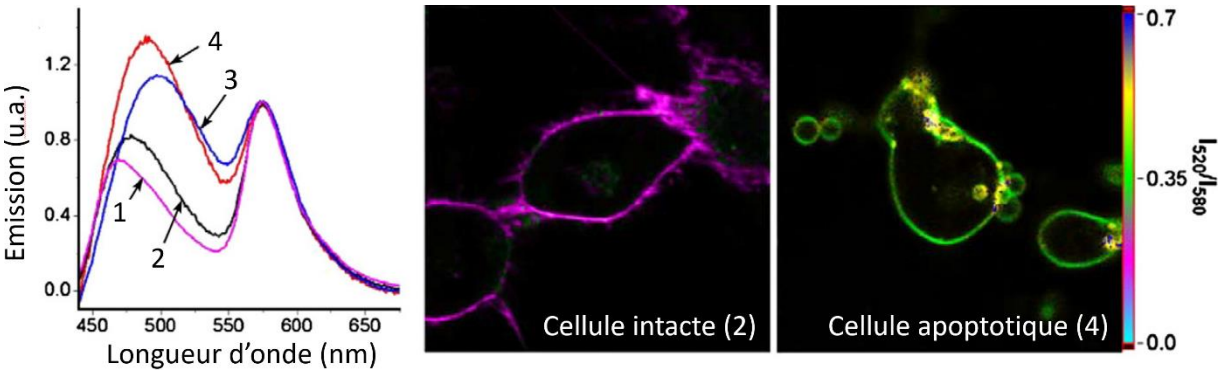
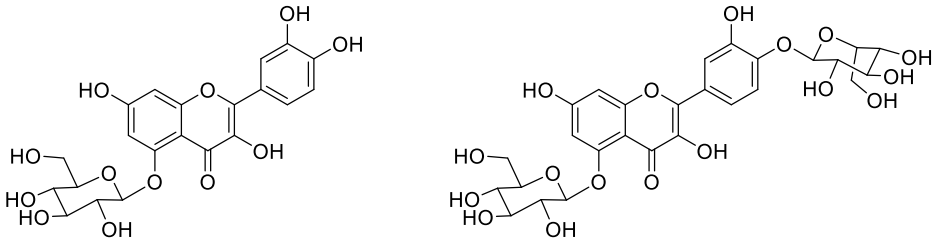


Figure 47 : Spectre d'émission de la sonde **36** en présence de : 1) modèle de domaine lipidique organisé, 2) cellule intacte, 3) cellule traitée par MβCD, 4) cellule apoptotique. Images de fluorescence ratiométrique pour une cellule intacte (cas 2) et une cellule apoptotique (cas 4) marquées par la sonde **36**.

Les vers à soie *Bombyx mori* sont connus pour métaboliser des flavonoïdes contenus dans les feuilles de mûriers. Les 5-*O*-glycosylquercetin **37a** et 5,4'-diglucosylquercetin **37b** ont été identifiés comme des métabolites de ces flavonoïdes présents dans le cocon de cet insecte (Figure 48).



5-*O*-glucosylquercetin **37a**

5,4'-diglucosylquercetin **37b**

Figure 48 : Métabolites de flavonoïdes identifiés chez *B. mori*.

La présence de ces composés rendant les cocons de *B. mori* fluorescents a été corrélée à l'expression d'un cluster de gènes (Bm-UTG10296) codant pour une 5-*O*-glucosyltransférase responsable de la métabolisation des quercetins en leur équivalents glycosylés. Il a été montré que l'inhibition de ce cluster réduisait significativement la quantité de flavonoïdes métabolisés dans les cocons et que ce taux de métabolites était relié à l'efficacité du cocon à faire barrière au rayonnement UV.[76] Ceci est illustré sur la figure ci-dessous : les souches de *B. mori* possédant l'allèle Gb codant pour la glycosyltransférase émettent de la fluorescence dans le jaune sous irradiation UV (Figure 49).

[76] Daimon, T., Hirayama, C., Kanai, M., Ruike, Y., Meng, Y., Kesegawa, E., Nakamura, M., Tsujimoto, G., Katsuma, S., Shimada, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 11471-11476.

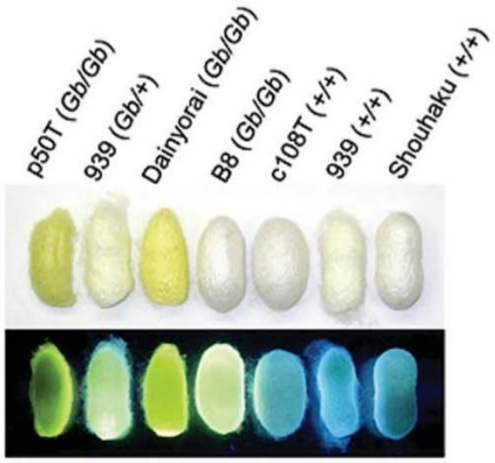


Figure 49 : Cocons de différentes souches de *B. mori*. Les cocons émettant de la fluorescence dans le jaune sous UV possèdent le cluster de gènes codant pour la 5-*O*-glucosyltransférase (génotype Gb/Gb ou Gb/+).

2.3 Molécules fluorescentes affines d'une cible spécifique

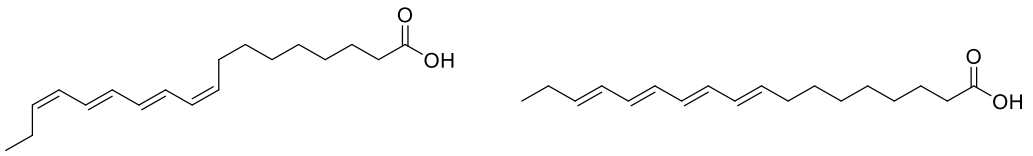
Dans cette partie seront évoquées des molécules capables de se lier spécifiquement à une ou plusieurs protéines ou à un brin d'ADN. Soit les molécules en question ne sont que peu ou pas fluorescentes avant l'interaction avec leur cible. Soit l'affinité pour la cible fait de la molécule, nativement fluorescente, un marqueur spécifique utilisable pour l'imagerie.

2.3.1 Polyènes fluorescents

Le système conjugué des polyènes peut leur permettre sous irradiation dans la gamme des UVA (350 nm) d'émettre de la fluorescence dans la gamme comprise entre 410 et 450 nm. Plus le système conjugué est étendu et moins les désexcitations non radiatives notamment la conversion interne seront prépondérantes, pouvant ainsi permettre l'émission de fluorescence. Un motif cyclique est une alternative pouvant également empêcher par contrainte conformationnelle ce fort phénomène de conversion interne dans les polyènes.[38]

2.3.1.1 Acide cis-parinarique

Présent principalement dans les graines de *Parina laurina* et *Impatiens balsamina*, l'acide *cis*-parinarique **38** se distingue au sein de la famille des acides gras comme en étant le seul représentant fluorescent. Sous excitation dans le domaine spectral des UVB (le maximum d'absorption dans le méthanol est à 303 nm), l'acide *cis*-parinarique **38** émet dans le violet à 416 nm dans le méthanol.[77] Les rendements quantiques pour ce composé sont faibles en solution et compris entre 0.01 et 0.15 suivant le solvant.[38] Il est à noter que la forme *trans* **38'** n'est pas décrite comme étant fluorescente en solution[78]



Acide *cis*-parinarique **38** Acide *trans*-parinarique **38'**

Figure 50 : Isomères de l'acide parinarique *cis* **38** et *trans* **38'**.

[77] Sklar, L. A., Hudson, B. S., Simoni, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 1649-1653.

[78] Sklar, L. A. *Mol. Cell. Biochem.* **1980**, *32*, 169-177.

Etant donnée sa structure très proche des acides gras C_{18} endogènes, l'acide *cis*-parinarique **38** a été utilisé pour comprendre les phénomènes biophysiques mis en jeu au sein des phospholipides membranaires. Les transitions de phase au sein des membranes d'*E. coli* en fonction de la température et l'interaction entre les protéines et les membranes bactériennes ont ainsi pu être étudiées grâce à la forte dépendance de la fluorescence de l'acide parinarique vis-à-vis de la viscosité de son environnement.[77]

Il est également possible d'étudier les lipoprotéines interagissant avec les membranes contenant de l'acide *cis*-parinarique. L'observation de ces phénomènes par fluorescence repose sur l'existence d'un transfert d'énergie de fluorescence entre le tryptophane contenu dans les membranes et l'acide *cis*-parinarique **38**. Ce transfert d'énergie est rendu possible par le recouvrement des spectres d'absorption du tryptophane (donneur) et du spectre d'émission de l'acide **38** (Figure 51). Il est possible de visualiser cette proximité spatiale grâce à l'extinction de fluorescence des résidus tryptophane et l'apparition d'une émission de fluorescence de l'acide *cis*-parinarique sous excitation à des longueurs d'ondes où le tryptophane seul absorbe. Il a ainsi été calculé qu'une distance de 30 à 35 Å permettait une efficacité de transfert de 50%.[79]

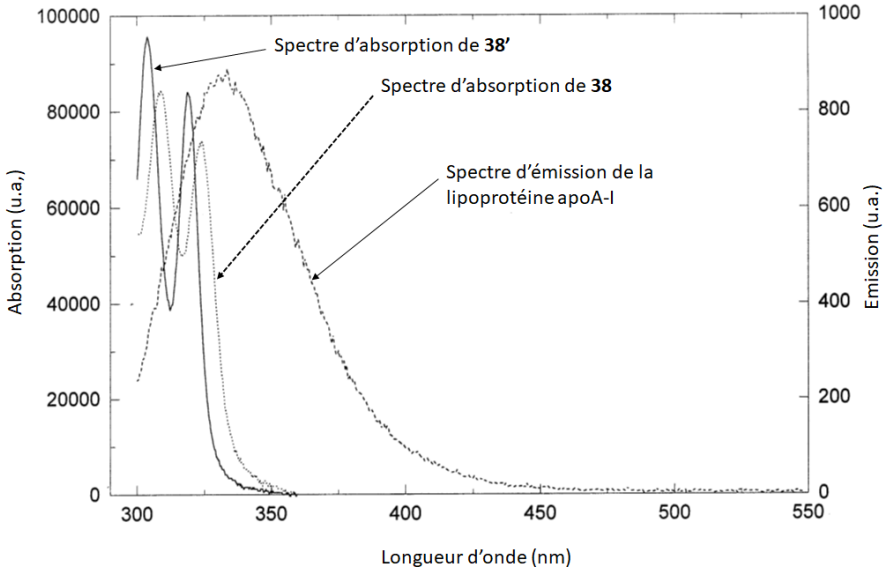


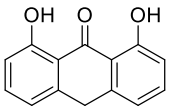
Figure 51 : Spectre d'émission d'une lipoprotéine et spectres d'absorption des acides parinariques **38** et **38'**.[79]

L'acide *cis*-parinarique **38** est sensible aux agents peroxydants au contact desquels il se dégrade rapidement en cessant d'émettre de la fluorescence. Ceci en fait donc une sonde très sensible pour observer les phénomènes liés au stress oxydatif par microscopie de fluorescence.

L'acide *cis*-parinarique **38** a ainsi joué un rôle dans la compréhension du mécanisme d'action de l'anthraline qui est un anti-psoriasis. Il a ainsi été mis en évidence que l'anthraline **39** induisait une peroxydation des lipides au sein de l'épiderme, diminuant ainsi l'inflammation. En effet, des cellules sanguines mononucléaires périphériques et de kératinocytes, connues pour être impliquées dans le développement du psoriasis, ont été mises en présence de **38**, puis traitées par **39**. Les images obtenues par microscopie de fluorescence montrent ainsi une forte diminution de la fluorescence de l'acide *cis*-parinarique **38**, ce qui confirme la mise en jeu d'un processus de peroxydation des lipides (Figure 52).[80]

[79] a) Tecoma, E. S., Sklar, L. A., Simoni, R. D., Hudson, B. S. *Biochemistry* **1977**, *16*, 829-835. b) Dobretsov, G. E., Dergunov, A. D., Taveirne, J., Caster, H., Vanloo, B., Rosseneu, M. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *97*, 65-77.

[80] Peus, D., Beyerle, A., Rittner, H. L., Pott, M., Meves, A., Weyand, C., Pittelkow, M. R. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114*, 688-692.



Anthraline **39**

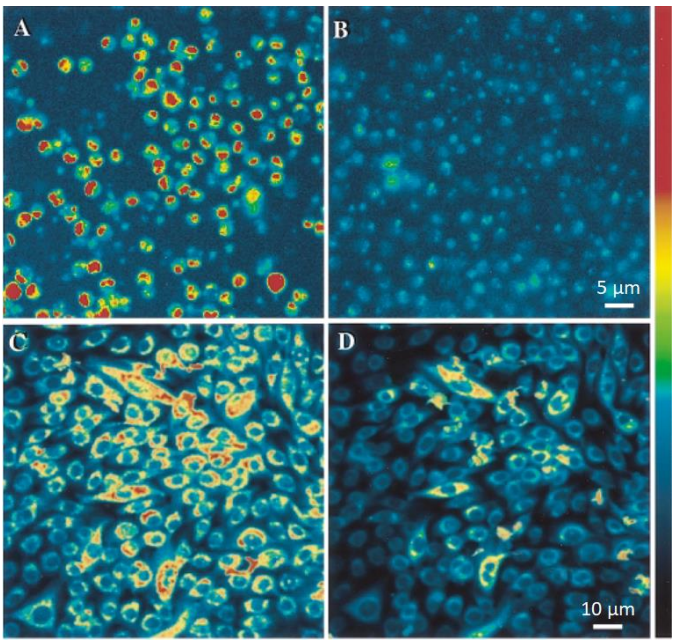
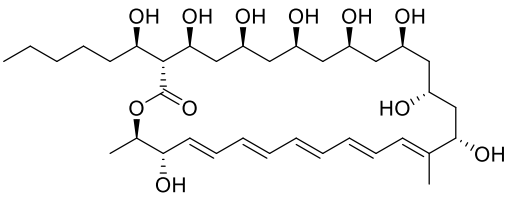


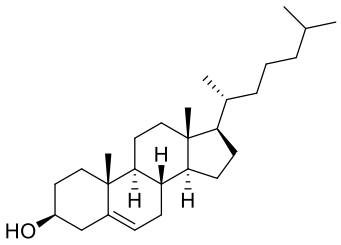
Figure 52 : Perte d'intensité de fluorescence de l'acide *cis*-parinarique **39** due à une augmentation de la peroxydation lipidique dans les cellules sanguines mononucléaires périphériques (PBMC, photo A et B) et les kératinocytes (C et D) avant et 15 minutes après traitement à l'anthraline **37**.

2.3.1.2 Filipin III

Le composé macrocyclique **40**, baptisé fillipin III, est un polyène cyclique produit par *Streptomyces flipinensis* qui possède une grande affinité pour les β-hydroxystérols. Cette affinité a pu être démontrée par des études spectroscopiques en soumettant une solution aqueuse de fillipin III à des concentrations croissantes de cholestérol **41** et d'autres β-hydroxystérols, ce qui a entraîné un déplacement du maximum d'absorption du fillipin III ainsi qu'une augmentation de l'intensité de fluorescence émise : $\Phi_F = 0.08$ sans cholestérol contre $\Phi_F = 0.26$ en présence de 500 µM de cholestérol (Figure 53).[81]



Fillipin III **40**



Cholestérol **41**

[81] a) Bittman, R., Fischkoff, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 3795-3799. b) Castanho, M. A. R. B., Coutinho, A., Prieto, M. J. E. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 204-209.

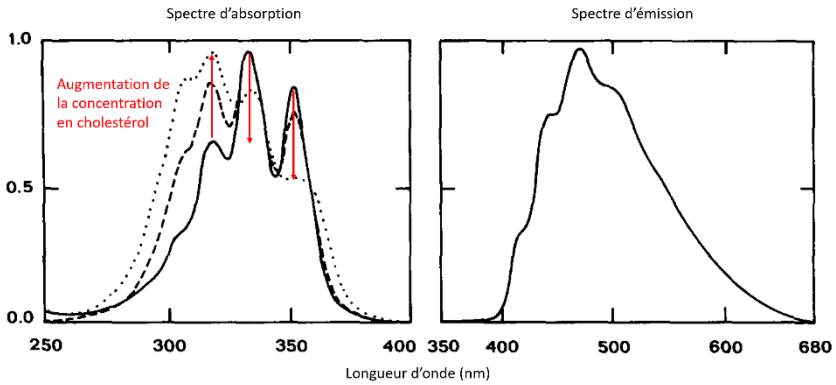
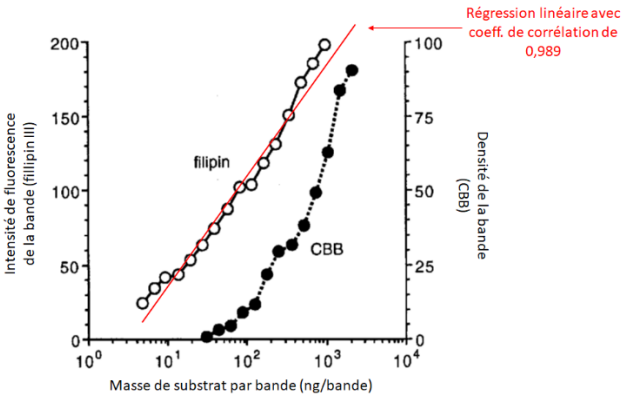
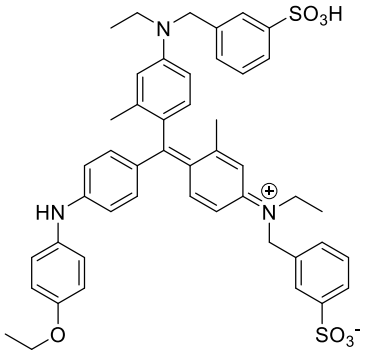


Figure 53 : Structure du fillipin III **40** et spectre d'absorption et d'émission (excitation à 338 nm) normalisés de **40** en présence d'un gradient de concentration de cholestérol.[81b)]

Le fillipin III **40** est ainsi utilisé comme sonde fluorescente pour détecter et quantifier le cholestérol des membranes cellulaires, d'autant plus qu'il n'est pas affin des stérols estérifiés. Le mécanisme de marquage du cholestérol n'est cependant pas clairement compris, des liaisons hydrophobes sont probablement impliquées étant donné que l'ajout de solvant polaire tel que le méthanol inhibe la formation du complexe cholestérol-fillipin III.[81a)]

Néanmoins, le fillipin III **40** perturbe la bicouche lipidique membranaire et ne peut donc par conséquent pas être utilisé pour des applications d'imagerie *in vivo*.[82] Ce composé a donc été utilisé comme révélateur fluorescent des lipoprotéines (qui contiennent une petite quantité de cholestérol libre) dans les gels de polyacrylamide utilisés en électrophorèse afin d'identifier les substances capables de modifier la métabolisation du cholestérol.[83] Ce dernier point peut faire l'objet d'un complément d'information pour illustrer l'intérêt du fillipin III comme révélateur en électrophorèse : sa grande sensibilité permet ainsi de relier empiriquement l'intensité de fluorescence avec la quantité de cholestérol libre dans les lipoprotéines de basse densité (LDL) (Figure 54, courbe) ; par ailleurs, la révélation avec le fillipin III **40** est totalement compatible avec un deuxième marquage colorimétrique utilisant le bleu de Coomassie **42** représenté ci-dessous, même si dans le cas des lipoprotéines, le fillipin III est plus sensible (Figure 54, partie haute).[84]





Bleu de Coomassie **42**

Figure 54 : Structure du bleu de Coomassie **42** (CBB) et corrélation entre la fluorescence du fillipin III **40** et la quantité de cholestérol contenue dans les LDL. Les courbes ont été obtenues en faisant migrer sur gel d'électrophorèse des dilutions successives de LDL, la fluorescence (pour le fillipin III) ou la densité (pour CBB) des bandes ont ensuite été mesurées.

[82] Maxfield, F. R., Wustner, D. *Methods Cell Biol.* **2012**, *108*, 367-393.

[83] Ishitsuka, R., Saito, T., Osada, H., Ohno-Iwashita, Y., Kobayashi, T. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 2084-2094.

[84] Smejkal, G. B., Hoff, H. F. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 922-925.

La présence anormale de cholestérol libre est un marqueur de nombreuses maladies génétiques comme la maladie de Niemann-Pick de type C, la maladie d'Alzheimer, la maladie Huntington et la gangliosidose à GM1.[85] Dans l'étude de cette dernière maladie, il a été récemment montré que le fillipin III **40** était également capable de former avec le ganglioside GM1 un complexe analogue à celui qui est formé entre le fillipin III et le cholestérol.[85] Ceci pourrait remettre en perspective les résultats obtenus sur les marquage de cholestérol cellulaire par le fillipin III, notamment dans le cadre des maladies génétiques où les gangliosides GM1 sont également impliqués.

2.3.2 Curcumin

Le curcumin **42** est un pigment orange extrait des rhizomes de *Curcuma longa*. Il possède deux noyaux feruoyles reliés par un motif β-dicétone (Figure 55).

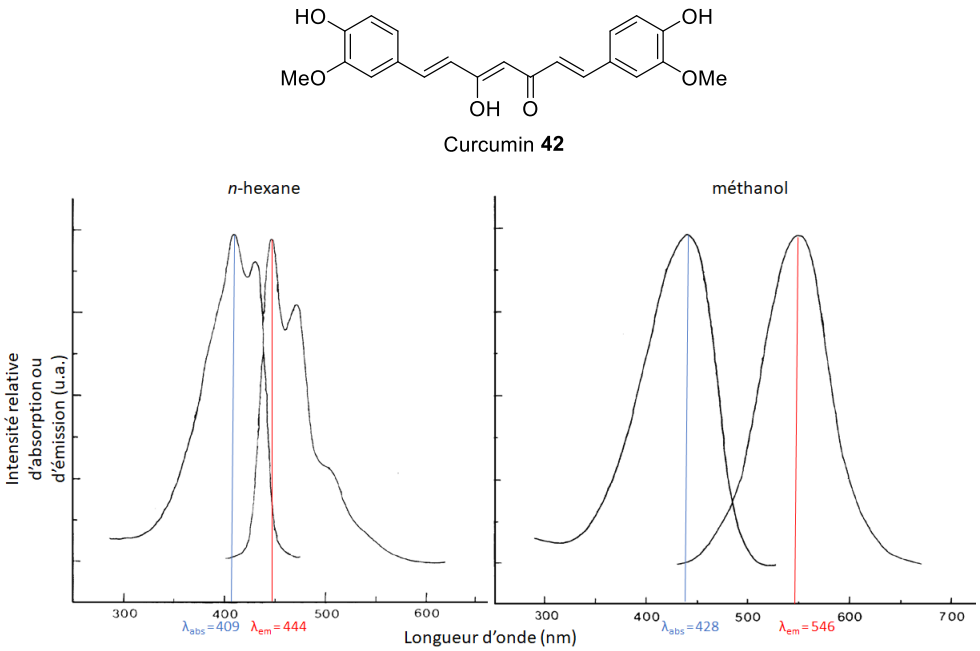


Figure 55 : Structure du curcumin **42** et spectres d'absorption et d'émission dans le *n*-hexane et le méthanol.[86]

Lorsqu'il est excité dans les longueurs d'onde du violet (400 à 430 nm), le curcumin **42** émet de la fluorescence dans le domaine du cyan-jaune, entre 440 et 560 nm suivant la nature du solvant. Cette fluorescence est liée à un transfert de charge intramoléculaire à l'état excité (ESICT) entre l'un des groupements phénols et une fonction carbonyle de la β-dicétone.[38] Le curcumin **42** possède un rendement quantique faible en solution ($\Phi_F < 0.16$)[87], tout particulièrement dans les solvants protiques, ceci est dû à la formation d'un complexe par transfert de charge, non fluorescent, entre le solvant et le composé **42** (**42*** + S → **42***$^-$ + S$^+$).[86]

Le curcumin **42** est cependant capable d'interagir avec un grand nombre de substances chimiques qui modifient ses propriétés spectrales. L'ajout d'un ou plusieurs agents surfactants, au-delà de leur concentration micellaire critique, permet ainsi une augmentation de la fluorescence au sein d'une solution aqueuse de curcumin. Le déplacement de la longueur maximum et l'augmentation de l'intensité de la bande d'absorption de **42** en présence d'agent tensioactif (Sodium Dodécyle Sulfate ou CetylTrimethylAmmonium Bromide) montre l'insertion du composé au sein des micelles dans un

[85] Arthur, J. R., Heinecke, K. A., Seyfried, T. N. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 1345-1351.

[86] Bong, P.-H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*, 81-86.

[87] Priyadarsini, K. I. *J. Photochem. Photobiol. C* **2009**, *10*, 81-95.

environnement relativement aprotique et s'accompagne donc d'une augmentation de fluorescence (Figure 56).[88]

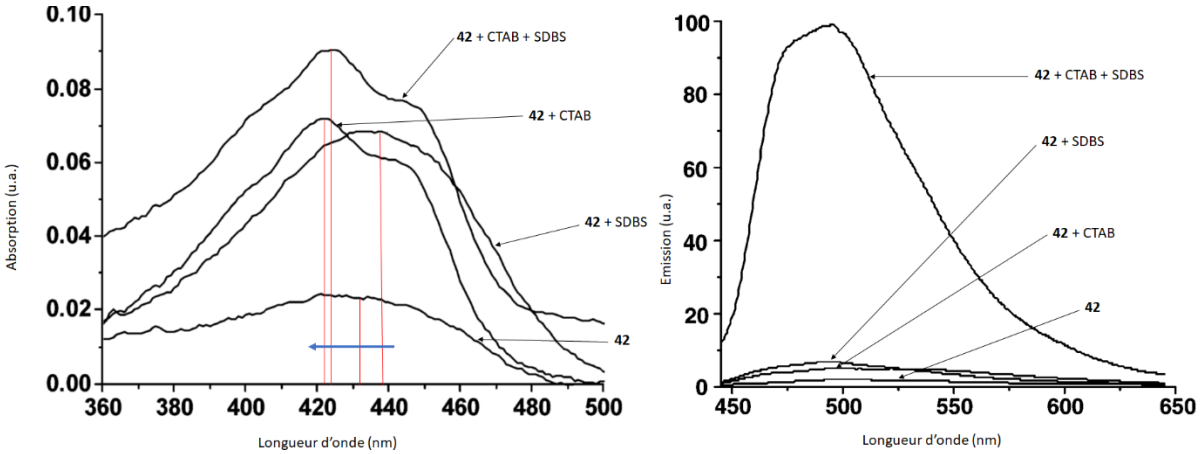
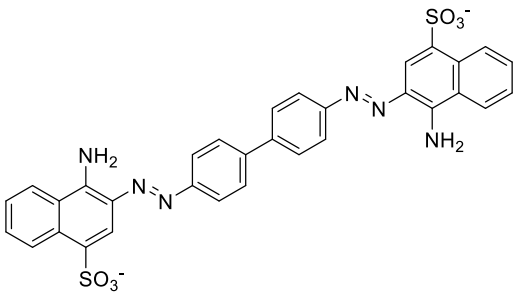


Figure 56 : Augmentation de l'absorbance et de l'intensité de fluorescence (excitation à 426 nm) d'une solution aqueuse de curcumin **42** (1 µM) en présence de Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate (SDBS) (2 nM) et CetylTrimethylAmmonium Bromide (CTAB) (1 nM) à pH = 4.[88] Les traits verticaux rouges représentent les longueurs d'onde des maxima d'absorption.

Ce phénomène d'exaltation de fluorescence est aussi observé en présence de protéines comme les Albumines de Sérum (BSA, HSA)[89] mais également des protéines membranaires.[87]

Un des exemples les plus intéressants est l'affinité du curcumin **42** pour les protéines amyloïdes. Ces protéines sont en effet impliquées dans la cohésion des biofilms bactériens chez *Escherichia* et *Salmonella*. Ces architectures, constituées d'une matrice tridimensionnelle de protéines et de polysaccharides, sont à l'origine de l'adhésion et de l'agrégation des bactéries et contribuent à leur résistance vis-à-vis des antibiotiques.[90] Dans le cadre de la lutte contre les agents pathogènes, la détection des protéines amyloïdes est une stratégie pertinente. Bien qu'il existe des sondes fluorescentes, comme le rouge Congo **43** (Figure 57), susceptibles d'une exaltation de fluorescence lorsqu'ils sont liés aux protéines amyloïdes, celles-ci souffrent d'un manque important de spécificité.



Rouge Congo **43**

Figure 57 : Structure du rouge Congo **43**.

Le groupe du Prof. Cegelski a ainsi montré en 2013 que le curcumin **42** était très spécifique des fibres extracellulaires (aussi nommées curli) des souches UT89 (pathogène) et MC4100 d'*E. coli*, les curli étant responsables de la formation des biofilms chez *E. coli*. Il est par ailleurs à noter que le complexe curcumin-amyloïde est environ 30 fois plus fluorescent qu'avec le rouge Congo (Figure 58).[91]

[88] Wang, F., Wu, X., Wang, F., Liu, S., Jia, Z., Yang, J. *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 53-59.

[89] Barik, A., Priyadarsini, K. I., Mohan, H. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 597-603.

[90] Flemming, H.-C., Wingender, J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623-633.

[91] McCrate, O. A., Zhou, X., Cegelski, L. *Chem. Comm.* **2013**, *49*, 4193-4195.

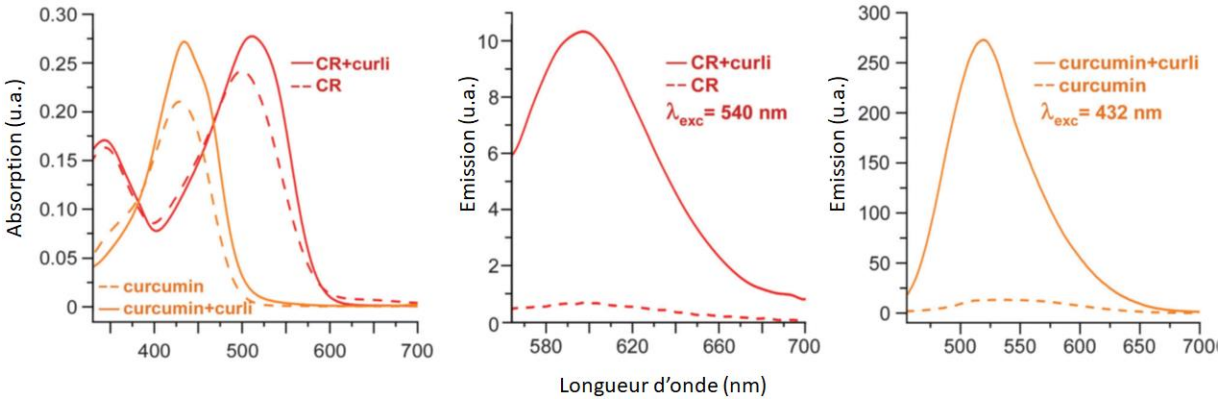


Figure 58 : Propriétés spectrales du curcumin **42** et du rouge Congo **43** vis-à-vis des protéines amyloïdes contenues dans les curli d'*E. coli*.[91]

Les protéines amyloïdes sont également impliquées dans la maladie d'Alzheimer : l'agrégation des peptides β-amyloïdes, sous forme de plaques dites Aβ dans le cerveau des malades, est un des symptômes les plus étudiés puisqu'à l'origine de nombreux troubles cognitifs. L'identification à des stades précoces des plaques Aβ et l'influence des traitements médicaux sur leur formation par des méthodes non-invasives est un des défis majeurs.[92] Dans ce cadre, l'utilisation du curcumin **42** en tant que marqueur fluorescent spécifique des plaques Aβ a été étudiée.

L'équipe du Prof. Farkas a ainsi démontré que le curcumin **42** pouvait servir de sonde fluorescente pour la détection des plaques Aβ rétiniennes *in vivo* chez la souris ou chez l'homme. Des souris ont ainsi été modifiées génétiquement pour exprimer des protéines amyloïdes humaines dans leur système nerveux central de manière à simuler un stade précoce de maladie d'Alzheimer. L'observation par microscopie de fluorescence des rétines de ces mutants après injection de curcumin **42** a permis de visualiser des dépôts de plaques Aβ que ce soit *ex* ou *in vivo* (Figure 59).[92]

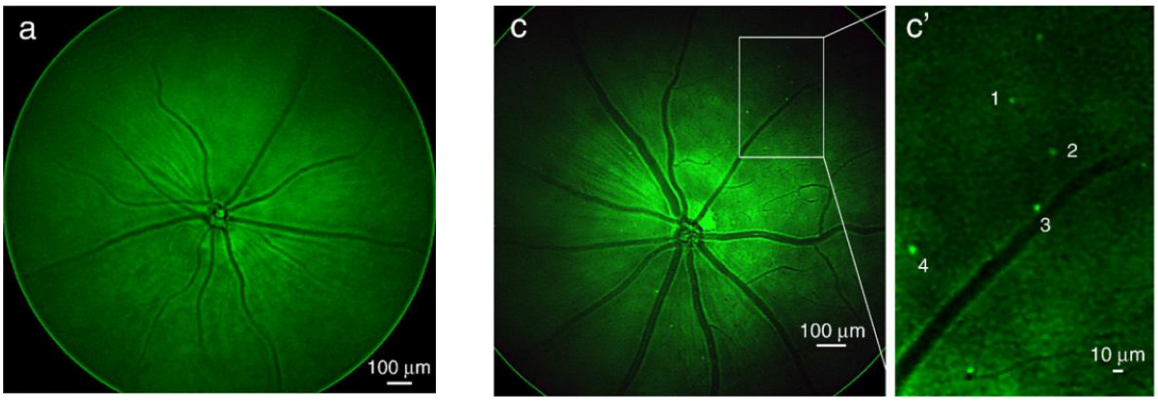


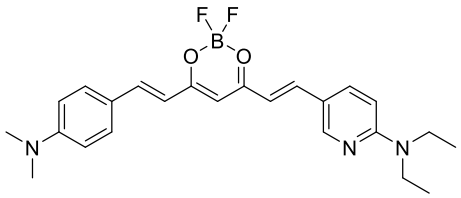
Figure 59 : Images *in vivo* de la rétine de souris saines (image a) et mutantes (images c et c'). Les mutations choisies simulent une maladie d'Alzheimer précoce. Les points brillants sur les images c et c' sont des plaques Aβ marquées par le curcumin **42**. Une seule injection de curcumin **42** (7.5 mg/kg) a été nécessaire 2 h avant la prise des images.[92]

Des observations *post mortem* similaires ont été réalisées sur des patients humains atteints de la maladie d'Alzheimer. Celles-ci révèlent également une accumulation de peptides Aβ dans la rétine de ces patients, qui a pu être mise en évidence grâce au marquage par le curcumin **42**. Dans le cadre du développement d'outils de diagnostic permettant de diagnostiquer de manière précoce la maladie d'Alzheimer, le curcumin **42** semble prometteur. Toutefois baser ce diagnostic sur la présence de plaques Aβ est délicat puisque d'autres pathologies se caractérisent par une accumulation de ce type au niveau de la rétine, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).[92] La DMLA est également

[92] Koronyo-Hamaoui, M., Koronyo, Y., Ljubimov, A. V., Miller, C. A., Ko, M. H. K., Black, K. L., Schwartz, M., Farkas, D. L. *NeuroImage* **2011**, *54*, S204-S217.

une maladie neurodégénérative, qui n'est cependant pas corrélée avec la maladie d'Alzheimer[93] et peut donc être une source de faux positifs.

S'appuyant sur l'affinité du curcumin **42** pour les protéines amyloïdes, des analogues du composé **42** ont été conçus pour inhiber l'agrégation des espèces Aβ neurotoxiques en capturant les ions métalliques du cuivre ou du fer au voisinage des protéines β-amyloïdes autour desquels l'agrégation serait initiée (Figure 60).[94]

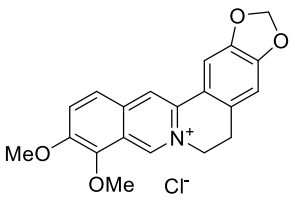


43

Figure 60 : Exemple d'analogue du curcumin **43**.

2.3.3 Berbérine

La berbérine **44** est un alcaloïde isolé des racines de *Berberis vulgaris* (1825) et connu pour ces nombreuses activités biologiques.[95] Ce composé cationique (Figure 61) possède cinq bandes d'absorption respectivement à 230, 267, 344, 352 et 432 nm pour une faible bande d'émission de fluorescence à 548 nm.[96]



Berbérine **44**

Figure 61 : Structure de la berbérine **44**.

Cependant lorsque la berbérine **44** est mise en présence d'ADN de thymus de veau en solution aqueuse, une forte augmentation de l'intensité de fluorescence est observée (Figure 62). C'est l'interaction de la berbérine avec la matrice d'ADN qui, en limitant les effets de solvant et les désexcitations non radiatives, provoque cette multiplication par plus de 200 de l'intensité de fluorescence, accompagnée d'un léger décalage vers le bleu jusqu'à 26 nm.[97]

[93] Keenan, T. D. L., Goldacre, R., Goldacre, M. J. *JAMA Ophthalmol* **2014**, *132*, 63-68.

[94] Zhang, X., Tian, Y., Li, Z., Tian, X., Sun, H., Liu, H., Moore, A., Ran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16397-16409.

[95] Liu, C.-S., Zheng, Y.-R., Zhang, Y.-F., Long, X.-Y. *Fitoterapia* **2016**, *109*, 274-282.

[96] Pavelka, S., Smekal, E. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1976**, *41*, 3157-3169.

[97] Gumenyuk, V. G., Bashmakova, N. V., Kutovyy, S. Y., Yashchuk, V. M., Zaika, L. A. *Ukr. J. Phys.* **2011**, *56*, 524-533.

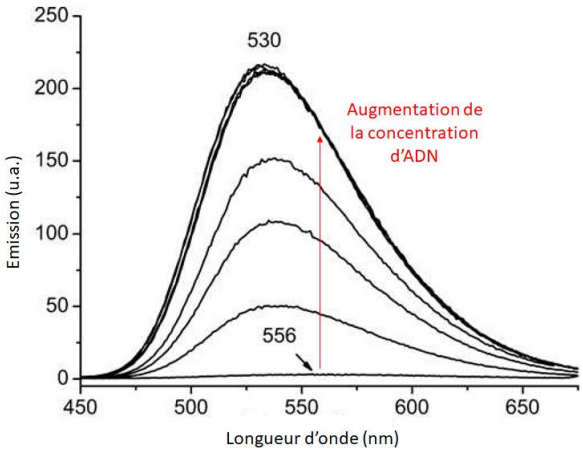


Figure 62 : Evolution de l'intensité de fluorescence de la berbérine **44** avec la concentration d'ADN. Excitation à 450 nm pour une concentration en **44** de 41 µM.[97]

Le mécanisme d'interaction entre la berbérine **44** et l'ADN est encore sujet à débats, des hypothèses de simple interaction et d'intercalation dans le sillon de l'ADN ont été proposés successivement. Des études récentes tendraient à montrer qu'il s'agit d'une combinaison d'interactions électrostatiques et d'intercalation partielle du composé **44**.[98]

En associant le cation berbérine à des anions plus lipophile comme le palmitate (Pal^-), le dioctylsulfosuccinate (AOT^-), le tosylate (Tos^-) ou le tétraphénylborate (TPB^-), des nanoparticules fluorescentes de berbérine peuvent être obtenues. Bien que ces sels lipophiles soient totalement dissociés et possèdent donc dans l'acétonitrile des propriétés spectrales identiques à la berbérine **44**, de grandes différences de cytoperméabilité sont observées chez les cellules cancéreuses HCT-116 (Figure 63).[99]

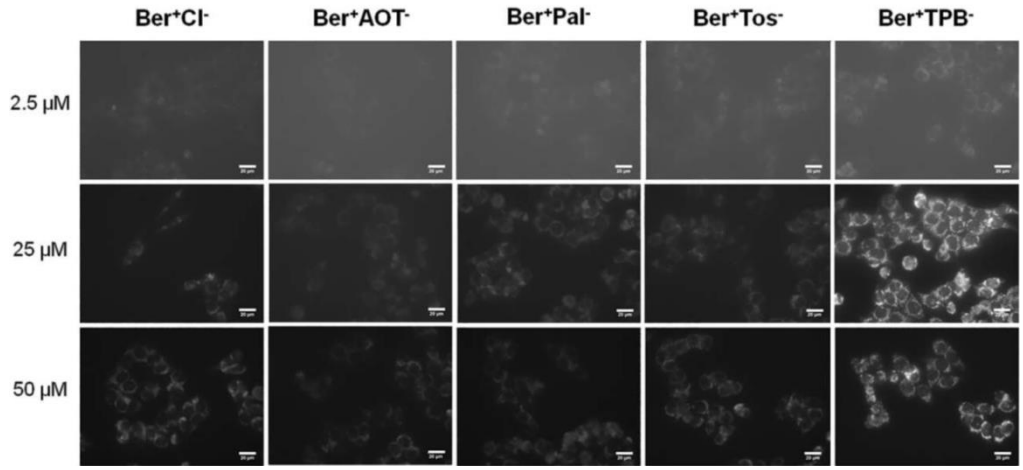


Figure 63 : Cellules HCT-116 incubées en présence de sels lipophiles de berbérine (λ_{exc} = 438 nm). [99]

Il est intéressant de noter qu'initialement la fluorescence des sels de berbérine se localise préférentiellement dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique avant de diffuser, à des vitesses dépendant de la nature du contre-anion, au sein du cytoplasme et cela contrairement à la berbérine **44** qui possédait une affinité préférentielle pour l'ADN. De plus l'irradiation prolongée des cellules HCT-116 en présence des sels de berbérine provoque rapidement leur mort, ce qui n'est pas le cas en l'absence de ces sels fluorescents.[99]

[98] Kundu, N., Roy, A., Banik, D., Sarkar, N. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120*, 1106-1120.

[99] Soulie, M., Frongia, C., Lobjois, V., Fery-Forgues, S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 1181-1190.

2.3.4 Cryptolépine

La cryptolépine **45** est une indoloquinoline isolée pour la première fois en 1929 de la plante *Cryptolepis triangularis*. Cet alcaloïde, qui est comme la berbérine **44** un cation organique, possède un motif benzo-δ-carbolinium. Cette forme cationique est prédominante jusqu'à pH ≈ 11, où la déprotonation du noyau indolique conduit à une forme neutre qui est non fluorescente dans le domaine visible (Figure 64, partie haute). En étant excitée à 367 nm, une solution aqueuse de cryptolépine **45** émet faiblement de la fluorescence (Φ_F = 0.02) avec un maximum d'intensité à 550 nm.[100]

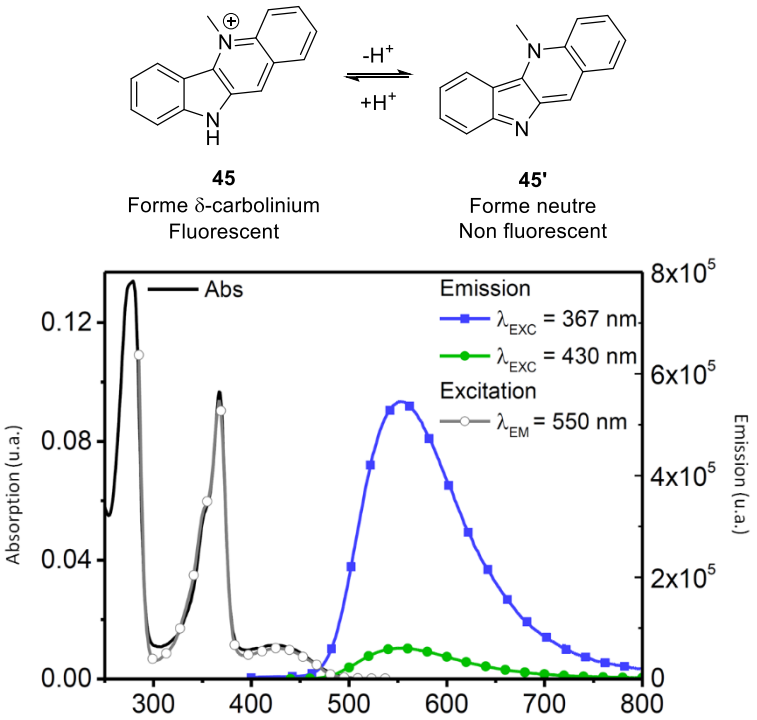


Figure 64 : Structure de la cryptolépine **45** et de sa base conjuguée (pKa ≈ 11) **45'**. Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de la cryptolépine **45** dans l'eau pH = 7.[100]

La cryptolépine **45** possède une structure proche de l'ellipticine **46** (Figure 65) cette dernière étant connue comme ligand de l'ADN[101] du fait de son existence sous forme pyridinium à pH physiologique,[102] des propriétés similaires étaient attendues pour le composé **45**.

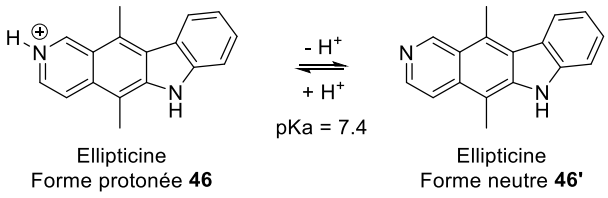


Figure 65 : Structure de l'ellipticine **46** en fonction du pH (pKa = 7.4)**.**

En présence de concentrations croissantes d'ADN de thymus de veau, la longueur d'onde maximale d'absorption de la cryptolépine **45** se décale de 12 nm vers le rouge (Figure 66) et la bande d'émission

[100] Mariz, I. F. A., Pinto, S., Lavrado, J., Paulo, A., Martinho, J. M. G., Macoas, E. M. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 10255-10263.

[101] Kohn, K. W., Waring, M. J., Glaubiger, D., Friedman, C. A. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 71-76.

[102] Froelich-Ammon, S. J., Patchan, M. W., Osheroff, N., Thompson, R. B. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14998-15004.

à 530 nm (excitation à 426 nm) décroît marquant ainsi le changement d'environnement local autour du composé **45**. La formation d'un complexe ADN-cryptolépine a pu être ensuite confirmée par des expériences complémentaires de dichroïsme circulaire et de dénaturation thermique.[103]

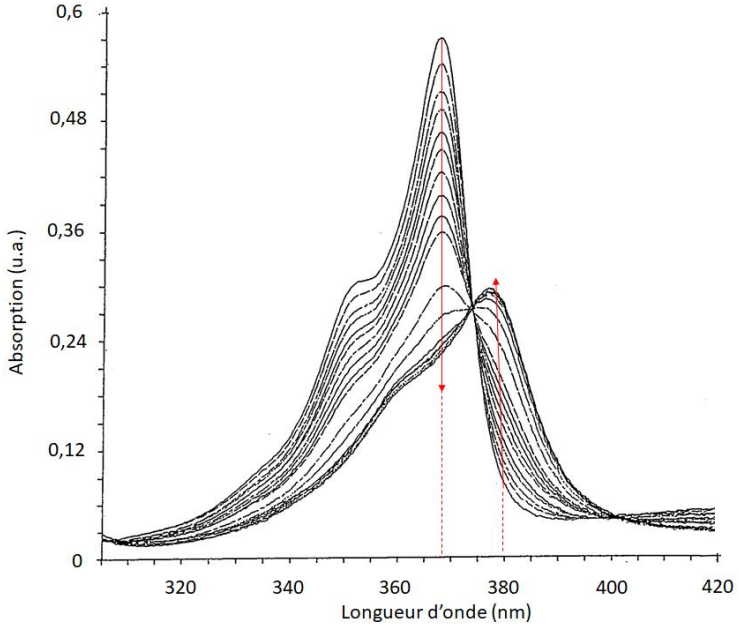


Figure 66 : Décalage des longueurs d'ondes maximales d'absorption en présence de quantités croissantes d'ADN. ([**45**] = 20 µM).[103]

De plus, il a pu être établi que la cryptolépine **45** se liait préférentiellement au niveau des zones riches en Cytosine (C) et Guanine (G) de l'ADN. Ceci a pu être démontré en soumettant des chaînes d'ADN, exposées préalablement à la cryptolépine **45**, à l'activité enzymatique de l'endonucléase ADNase I. Cette enzyme est utilisée pour identifier les sites de complexation de petites molécules comme les intercalants sur les brins d'ADN.[103]

En plus de ses propriétés d'intercalant de l'ADN, la cryptolépine **45** montre également des activités envers les ADN topoisomérases I et II. Ces dernières perdent toute activité vis-à-vis de brins d'ADN circulaires traités par de la cryptolépine **45** à des concentrations supérieures à 10 µM. A de telles concentrations en composé **45**, la perte d'activité enzymatique peut-être due à deux phénomènes différents : soit la cryptolépine peut interférer directement avec les enzymes et inhiber leur activité, soit les propriétés d'intercalant de l'ADN de la molécule **45** empêchent le déroulement du brin d'ADN par l'enzyme. Afin de discriminer lequel de ces deux phénomènes a lieu, l'étude de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en composé actif est cruciale : dans le cas de l'ADN topoisomérase I, une faible concentration en cryptolépine **45** (0.5 à 2.5 µM) améliore le déroulement du brin d'ADN en réduisant la mobilité des fragments sur gel d'électrophorèse puis est totalement inhibée pour des concentrations supérieures (à partir de 5 µM), ce qui est caractéristique d'un agent intercalant (Figure 67 partie A) ; à l'inverse, l'activité enzymatique de l'ADN topoisomérase II est proportionnelle à la concentration en cryptolépine **45**, ce qui démontre l'inhibition de cette enzyme par le composé **45** (Figure 67 partie B).[103]

[103] Bonjean, K., De Pauw-Gillet, M. C., Defresne, M. P., Colson, P., Houssier, C., Dassonneville, L., Bailly, C., Greimers, R., Wright, C., Quetin-Leclercq, J., Tits, M., Angenot, L. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5136-5146.

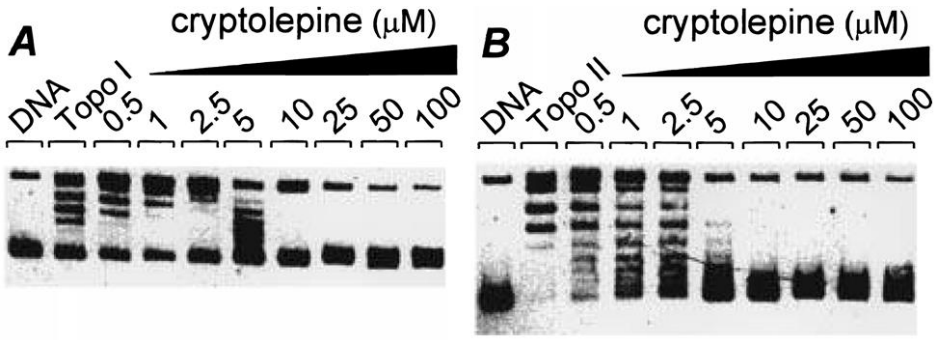


Figure 67 : Activités des ADN topoisomérases I (Partie A) et II (Partie droite) en présence de concentrations variables de cryptolépine **45** visualisées sur gel d'électrophorèse.[103]

Malgré ces activités biologiques importantes, le manque de spécificité et la toxicité *in vivo* de la cryptolépine **45** constitue un obstacle majeur à l'utilisation clinique de ce type de composé.[38]

2.3.5 Hypéricine

L'hypéricine **46** est une quinone polyaromatique présente en très faible proportion dans *Hypericum perforatum* (0.1%). Elle a été identifiée comme une des espèces actives des huiles essentielles de cette plante et contribue notamment à ses propriétés antidépressives et antibactérienne.[104] Des dérivés de l'hypéricine **46** sont présents dans des microorganismes comme *Stentor coeruleus* où la stentorine **46'** est conjugués à deux protéines, baptisées protéine stentorine I et II (le terme « protéine » est ici rajouté pour éviter les confusions avec le chromophore qui porte le même nom) au sein de vésicules de couleur bleu-vert (Figure 68, partie droite).[105] Lorsqu'il est soumis à une irradiation lumineuse intense, *S. coeruleus* se déplace pour s'éloigner de la zone éclairée selon un comportement qualifié de photophobique. Le signal lumineux serait converti par transduction (transformation du stimulus lumineux en message chimique) au sein des photorécepteurs contenant la stentorine **46'**, permettant ainsi de modifier l'orientation des cils cellulaires qui confèrent à *S. coeruleus* la capacité à se déplacer.[106] Des études récentes émettent cependant des doutes quant à ce rôle de la stentorine **46'**, lui attribuant plutôt un rôle défensif de par sa toxicité.[107]

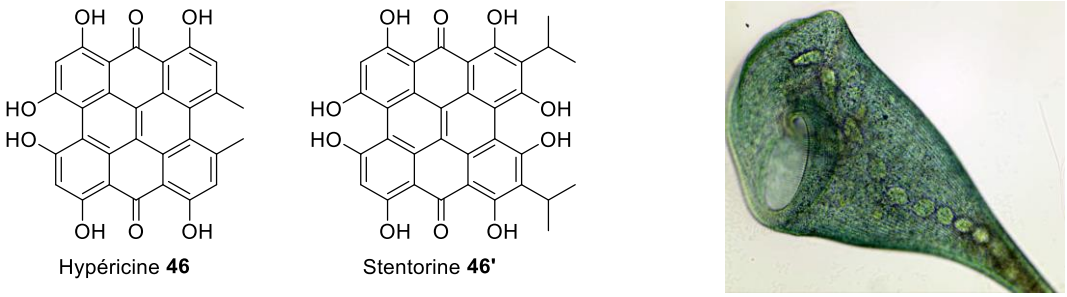


Figure 68 : Structures de l'hypéricine **46**, de la stentorine **46'** (Partie gauche) et *S. coeruleus* (partie droite).

[104] Dewick, P. M. Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach, *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2008**, *3*, p 109.

[105] Song, P.-S., Haeder, D. P., Poff, K. L. *Arch. Microbiol.* **1980**, *126*, 181-186.

[106] Fabczak, H. *Acta Protozool.* **2000**, *39*, 171-181.

[107] Lobban, C. S., Hallam, S. J., Mukherjee, P., Petrich, J. W. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 1074-1094.

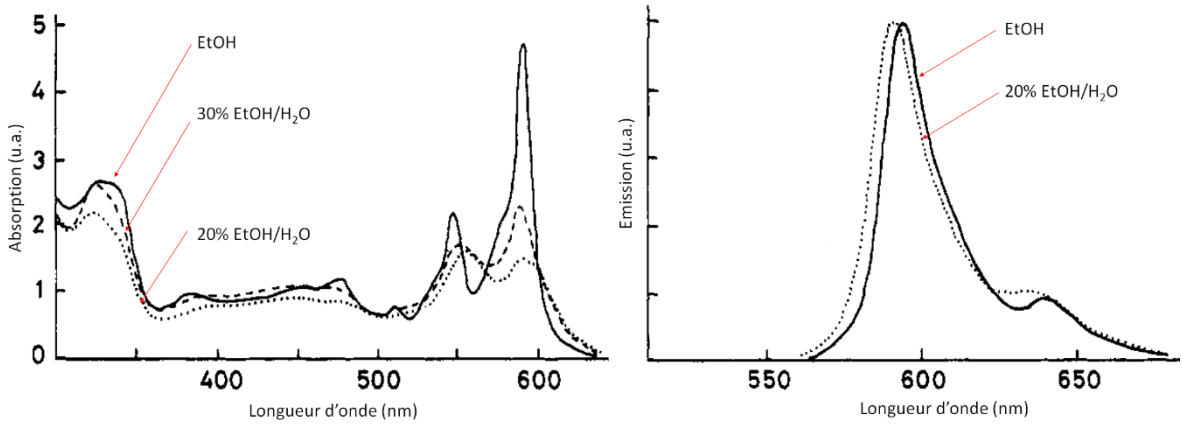


Figure 69 : Spectres d'absorption et d'émission (excitation à 591 nm) du composé **46** dans des mélanges eau/éthanol.

Le spectre d'absorption de l'hypéricine **46** est très fortement influencé par la proportion d'eau présente dans le solvant d'analyse (Figure 69), ceci étant dû à la très faible solubilité du composé en milieu aqueux. En ajoutant à cette observation le fait qu'au contraire le spectre d'émission ne dépend que très peu de la présence de l'eau, les multiples bandes d'absorbance peuvent donc être expliquées par des agrégations de la molécule **46**, le monomère étant le principal contributeur à l'émission de fluorescence.[108]

Sous excitation entre 570 et 590 nm, l'hypéricine fluoresce dans le rouge à environ 600 nm. Les longueurs d'onde maximum d'absorption et d'émission de l'hypéricine **46** se décalent vers le rouge avec l'augmentation de la polarité du solvant à l'exception notable des solvants protiques, qui conduisent à un décalage vers le bleu. Les propriétés spectrales de l'hypéricine sont également influencées par le pH : en milieu basique, une nouvelle espèce absorbant à 640 nm et émettant vers 680 nm est observée (Figure 70). Cette espèce a été identifiée comme un dimère anionique de l'hypéricine.[108]

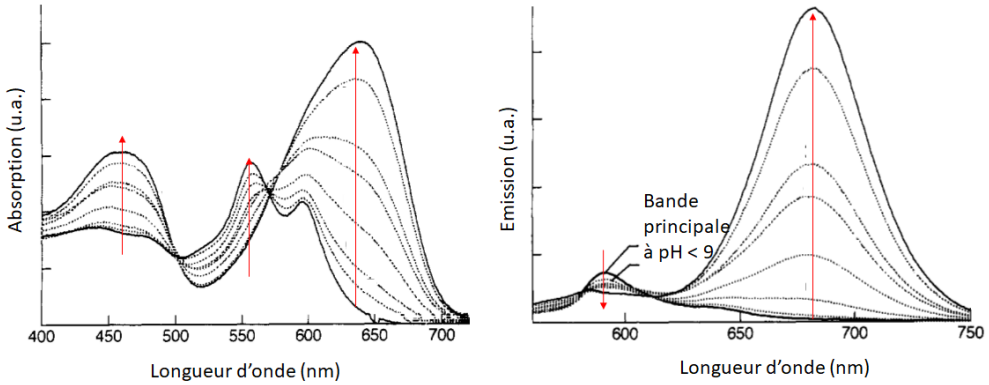


Figure 70 : Influence d'une augmentation de pH (de 9.9 à 12.7) sur les propriétés d'absorption et d'émission (excitation à 570 nm) d'une solution d'hypéricine **46** dans 6% éthanol/H_2O.[108]

Il a été montré que l'hypéricine **46** était très affine des cellules tumorales impliquées dans les cancers de la peau. Des cellules tumorales ont ainsi été transfectées avec des protéines fluorescentes, ceci afin de visualiser par microscopie confocale de fluorescence les différents organites, et mises en présence d'hypéricine **46**. Cette dernière a pu ainsi être observée comme co-localisant partiellement avec le *reticulum* endoplasmiques, les mitochondries, lysosomes et mélanosomes de ces cellules. L'excitation de l'hypéricine **46** à 561 nm au sein de ces cellules induit alors plusieurs phénomènes conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, sous irradiation, les organites des cellules co-localisant l'hypéricine **46** sont détruits (Figure 71), les phosphatidylsérines qui sont des marqueurs membranaires caractéristiques de

[108] Yamazaki, T., Ohta, N., Yamazaki, I., Song, P. S. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 7870-7875.

l'apoptose apparaissent de manière concomitante avec une réduction de la taille de la cellule, avant la perte d'intégrité de la membrane plasmique qui marque la nécrose cellulaire.[109]

Le rôle de photosensibilisateur de l'hypéricine est ici mis en évidence : sous activation lumineuse, cette molécule est capable de générer des espèces réactives de l'oxygène (en anglais « Reactive Oxygene Species » ou ROS) en présence d'oxygène moléculaire. Les ROS ont une durée de vie très courte et n'existent donc qu'au voisinage immédiat du photosensibilisateur, ce sont cependant des espèces très cytotoxiques. L'utilisation de telles molécules pour traiter des maladies, telles que le cancer, délimite le cadre de la thérapie photodynamique et est actuellement en plein essor.

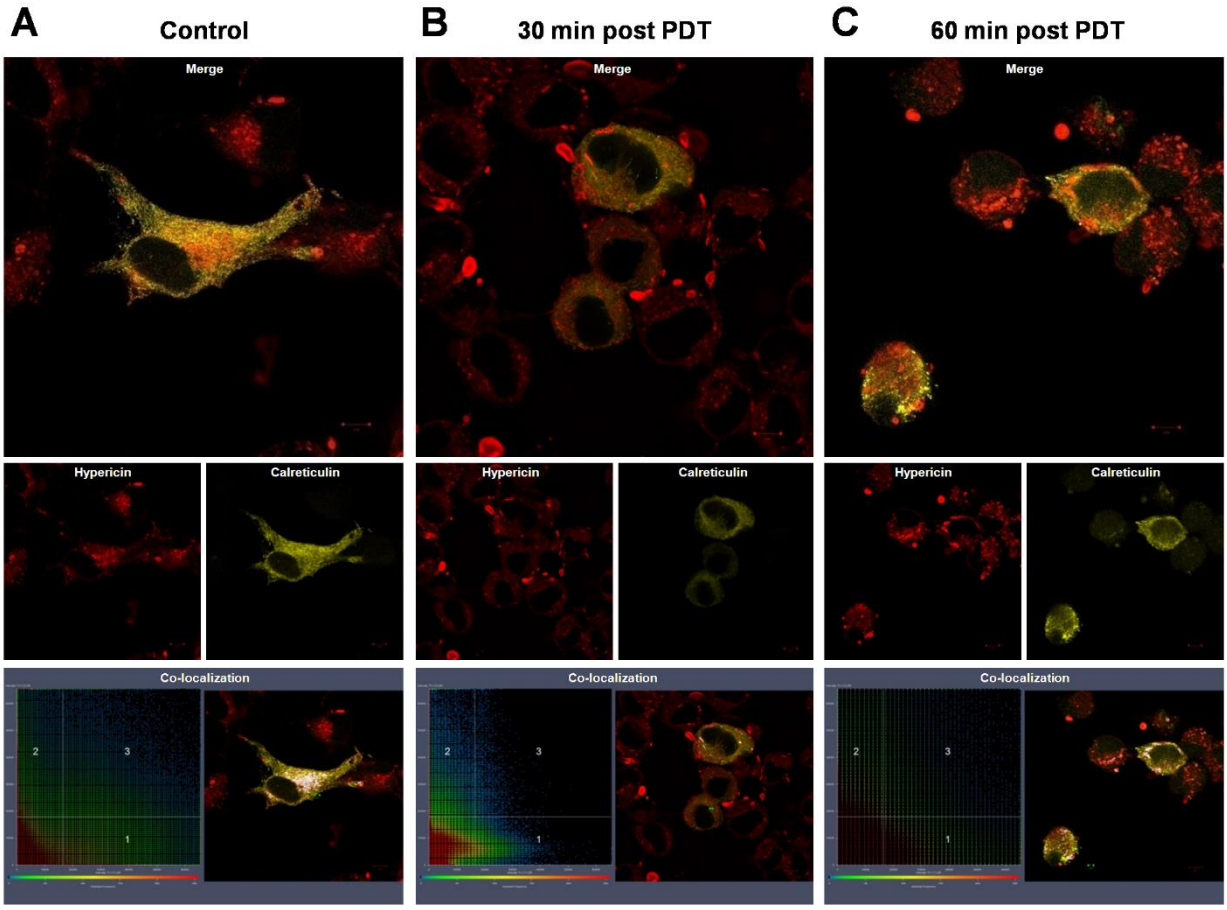


Figure 71 : Destruction du *reticulum* endoplasmique de cellules cancéreuses transfectées avec la calreticuline-YFP (protéine fluorescente spécifique du *reticulum* endoplasmique) par photothérapie dynamique à l'hypéricine. Les courbes de co-localisation indiquent par intensité variables de couleur la précision de la co-localisation de la calreticuline et l'hypéricine.

Une tumeur est divisée en trois zones distinctes : une zone nécrosée, une zone viable et une zone médiane séparant ces deux dernières, dite zone péri-nécrotique. La région viable est la zone de la tumeur hautement vascularisée où une mitose intense des cellules cancéreuses a lieu. Les zones nécrotiques sont quant à elles formées à la suite de la coagulation d'une hémorragie qui a fait cesser la vascularisation dans cette région de la tumeur. Les zones péri-nécrotiques sont des régions à l'aspect intermédiaire où les vaisseaux sanguins sont inflammés, elles dégénèreront à terme en zones nécrosées.[110]

L'hypéricine **46** possède une grande affinité pour les zones nécrosées des tumeurs où elle est capable de s'accumuler douze fois plus que dans les tissus sains.[38] Ce mécanisme d'accumulation impliquerait la complexation de l'hypéricine avec les lipoprotéines LDL, ces dernières permettant le transport de la molécule dans les cellules cancéreuses. Cette complexation serait possible grâce à une interaction de

[109] Kleemann, B., Loos, B., Scriba, T. J., Lang, D., Davids, L. M. *PLoS One* **2014**, *9*, 1-20.

[110] van de Putte, M., Ni, Y., de Witte, P. A. M. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 921-926.

l'hypéricine **46** avec le cholestérol présent dans les LDL.[111] Finalement l'hypéricine aurait également une affinité pour les marqueurs membranaires comme la phosphatidyl choline ou la phosphadityl sérine qui sont caractéristiques des cellules des zones nécrosées.[112]

Ces résultats prometteurs ont permis de considérer l'hypéricine **46** comme un bon candidat pour de futures applications cliniques en photothérapie dynamique.

2.4 Molécules à fluorescence pH-dépendante

A de nombreuses reprises dans la partie précédente l'influence du pH du milieu sur la fluorescence a été évoquée en tant que propriété anecdotique. Les molécules dont il sera question maintenant sont exploitée pour cette fluorescence dépendante du pH.

2.4.1 7-hydroxycoumarines

Les coumarines sont un grand groupe de métabolites secondaires (plus de 1400 membres) principalement issus des plantes. De nombreuses coumarines naturelles, comme l'umbelliferone **33** évoquée précédemment (Partie 2.2.3), possèdent un groupe oxygéné en position 7 car étant biosynthétisées à partir de de l'acide 4-hydroxycinnamique **47**. Celui-ci est hydroxylé sélectivement en position 2 pour donner l'acide 2,4 dihydroxycinnamique **48**. Une isomérisation de la double liaison du composé **48** permet de favoriser la lactonisation de la molécule **49** en umbelliferone **33** (Figure 72).[113]

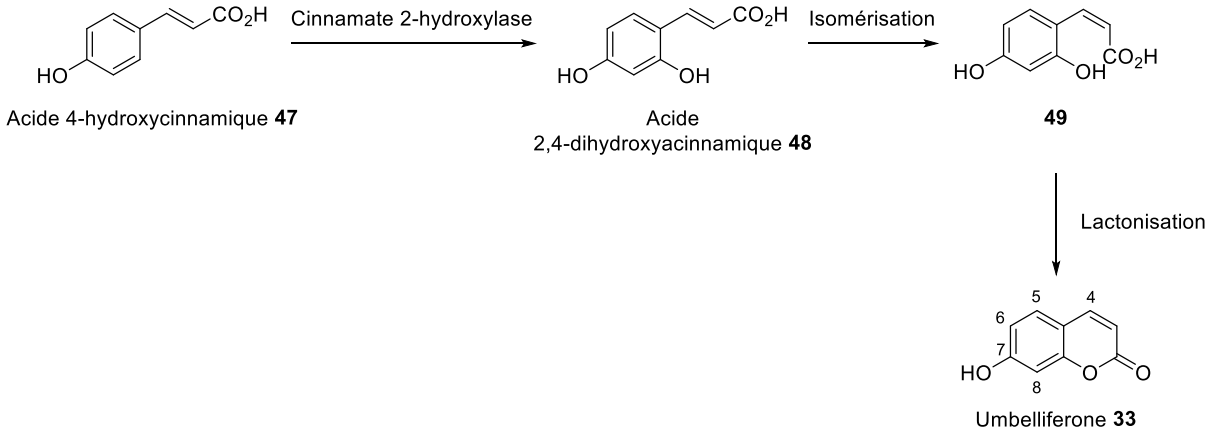


Figure 72 : Structure de l'acide 4-hydroxycinnamique **47** et biosynthèse en umbelliferone **33**.

Ces coumarines oxygénées en position 7 se caractérisent par une émission importante de fluorescence dans la gamme de 400 à 460 nm lorsqu'elles sont irradiées dans les UVA (320 à 380 nm). Cette fluorescence est due à un transfert de charge intramoléculaire à l'état excité (ESICT) entre le noyau phénol, riche en électron, et la partie lactone électrophile.[38]

Du fait de la présence du groupement phénol en position 7 (pKa = 7.5), les 7-hydroxycoumarines possèdent donc une fluorescence dépendant du pH. Ainsi, l'umbelliferone **33** possède une émission dépendante de l'acidité du milieu pour des pH inférieurs à 2.2 lorsque la molécule est excitée à 330 nm puis cette émission reste globalement constante avec l'augmentation du pH.[114] A l'inverse, sous excitation à 370 nm, une augmentation continue de l'absorption et de l'émission à 460 nm est observée jusqu'à pH ≈ 9 (Figure 73).

[111] Ho, Y.-F., Wu, M.-H., Cheng, B.-H., Chen, Y.-W., Shih, M.-C. *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, *1788*, 1287-1295.

[112] Jiang, B., Wang, J., Ni, Y., Chen, F. *Theranostics* **2013**, *3*, 667-676.

[113] Dewick, P. M. Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach, *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2008**, *3*, p 161.

[114] Fink, D. W., Koehler, W. R. *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 990-993.

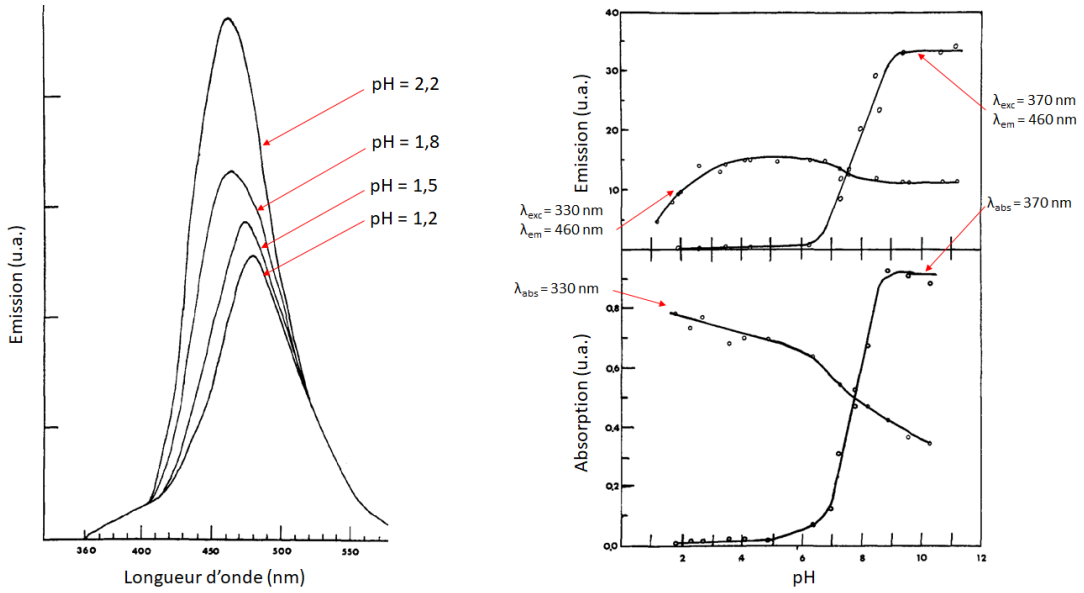
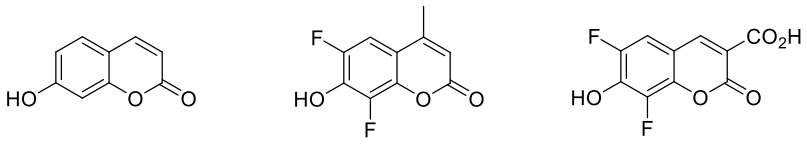


Figure 73 : Influence du pH sur les propriétés spectrales de l'umbelliferone **34** dans l'eau. La partie gauche montre la dépendance de la fluorescence vis-à-vis du pH en milieu acide (excitation à 330 nm). La partie droite montre l'allure des intensités d'absorption relevées respectivement à 330 et 370 nm et des intensités d'émission relevées à 460 nm (excitation respectivement à 330 et 370 nm).[114]

Par ailleurs, l'étude des propriétés spectrales sur une gamme de pH plus large (Figure 73, partie droite) montre que l'absorption et l'émission de fluorescence sont maximales à pH > 9, donc lorsque l'umbelliferone **33** est sous forme anionique.[114] L'introduction d'atomes de fluor et de groupes électroattracteurs sur le squelette coumarinique permet de diminuer la valeur du pKa du phénol et donc de maximiser l'émission de fluorescence à des pH neutres, prérequis indispensable pour des applications d'imagerie cellulaire. Les dérivés baptisés Marina Blue™ **50** et Pacific Blue™ **51** possèdent ainsi des longueurs d'onde d'absorption et d'émission très similaires à l'umbelliferone **33** (Figure 74).



Umbelliferone **33**
pKa = 7.8
λ_{abs} = 360 nm
λ_{em} = 450 nm
ε = 17000
Φ_F = 0.63

Marina Blue™ **50**
pKa = 4.7
λ_{abs} = 358 nm
λ_{em} = 455 nm
ε = 17500
Φ_F = 0.89

Pacific Blue™ **51**
pKa = 3.7
λ_{abs} = 400 nm
λ_{em} = 447 nm
ε = 29500
Φ_F = 0.75

Figure 74 : Comparaison des propriétés spectrales de l'umbelliferone **33** avec deux analogues synthétiques fluorés. Les valeurs ont été obtenues à une concentration de 0.1 M dans le PBS à pH = 10.[115]

Ces dérivés de 7-hydroxycoumarines, ainsi que leurs homologues 7-amino sont très utilisés en tant que marqueur fluorescent conjugués à des biomolécules telles que des protéines ou des acides nucléiques.[116]

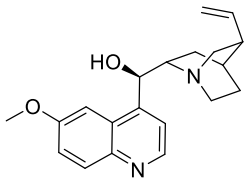
[115] Sun, W.-C., Gee, K. R., Haugland, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.

[116] Khalfan, H., Abuknesha, R., Rand-Weaver, M., Price, R. G., Robinson, D. *Histochem. J.* **1986**, *18*, 497-499.

2.4.2 Quinine

La quinine **52** est un alcaloïde présent principalement des plantes du genre *Cinchona* et est considéré comme le premier fluorophore naturel isolé.[38] Ce composé présente une émission dans le bleu, vers 450 nm sous excitation dans la gamme des UVA (350 nm). L'intensité de fluorescence émise est maximale à pH acide, (Φ_F = 0.55 à pH = 2 dans $H_2SO_{4(aq)}$) lorsque la quinine **52** est sous forme de dication (protonation de l'azote du noyau quinuclidine et du noyau quinoléine), et diminue progressivement avec la basification du milieu pour disparaître à pH = 6.5 (Figure 75). Il est à noter que l'espèce monocationique de la quinine **52** est elle aussi fluorescente (Φ_F = 0.55 à pH = 7) mais la longueur d'onde maximum d'émission de cette forme n'est pas située dans le domaine du visible (λ_{abs} = 331 nm et λ_{em} = 382 nm).[117]

Cette fluorescence caractéristique de la quinine **52** en milieu acide lui vaut de figurer parmi les références utilisées pour calculer les rendements quantiques de fluorescence.[10]



Quinine **52**
pKa_1 = 4.34, pKa_2 = 8.43
λ_{abs} = 347 nm
λ_{em} = 448 nm
ε = 5400
Φ_F = 0.55 à pH = 2

Figure 75 : Structure et propriétés photo-physiques de la quinine **52** (Partie gauche). Visualisation sous irradiation UV de la fluorescence due à la quinine contenue dans le Schweppes® (Partie droite).

La quinine **52** a été l'un des premiers traitements employés contre la malaria même si le mécanisme d'action de ce composé et de ces dérivés envers cette maladie reste mal compris.[38] Très récemment (2012) les propriétés de fluorescence de la quinine **52** ont pu être utilisées pour identifier la localisation de cette molécule au sein de *Plasmodium falciparum*. Etant donnée ses propriétés acido-basiques, les premières hypothèses laissaient supposé que la quinine **52** s'accumulait dans les vésicules acides au sein du parasite, pouvant alors provoquer deux types de perturbations aboutissant à la mort de *P. falciparum* : soit une augmentation du pH intra-vésiculaire ; soit un complexe empêchant la digestion de l'hème par le parasite.[118] L'observation en microscopie de fluorescence de cultures d'hématies contaminées par *P. falciparum* et mises en présence de quinine **52** ont confirmé la présence de celle-ci dans les vacuoles digestives du parasite où elle colocalise sans ambiguïté avec les cristaux d'hémozoïne (pigment caractéristique de la digestion de l'hème par *P. falciparum*). De manière surprenante la quinine **52** ne marque pas la zone acide au sein de la vacuole digestive et la fluorescence observée serait due à la formation d'un complexe quinine-hémozoïne et non liée au pH de l'environnement (Figure 76).[119]

[117] Schulman, S. G., Threatte, R. M., Capomacchia, A. C., Paul, W. L. *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 876-880.

[118] Slater, A. F. G., Cerami, A. *Nature* **1992**, *355*, 167-169.

[119] Bohorquez, E. B., Chua, M., Meshnick, S. R. *Malar. J.* **2012**, *11*, 350-355.

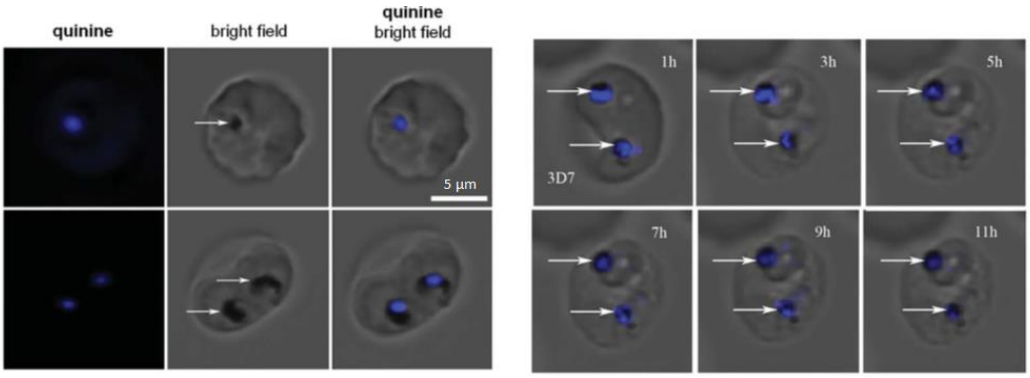


Figure 76 : Visualisation par microscopie de fluorescence de la quinine (1 µM, en bleu) dans des hématies infectées par *P. falciparum*. Les flèches blanches montrent la localisation de l'hémozoïne.[38]

2.4.3 Benzo[c]phénanthridines

Les benzo[c]phénanthridines sont une famille d'alcaloïdes composée de 90 membres. Ces composés existent sous la forme de cations iminium, susceptibles de subir l'addition d'un nucléophile. Cette forme cationique est en équilibre, gouverné par le pH, avec l'aminal correspondant (Figure 77)[38] avec pKa de 8.06.[120]

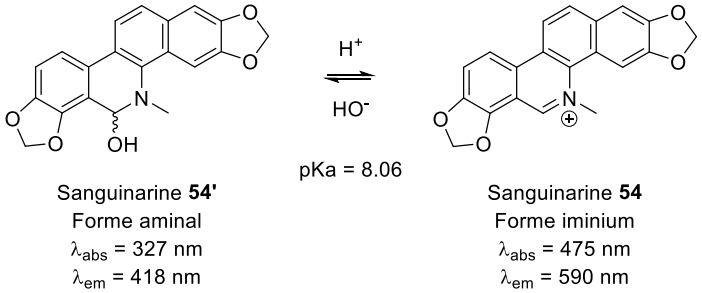


Figure 77 : Equilibre entre les deux formes aminal **54'** et iminium **54** de la sanguinarine.

Ces deux formes possèdent des propriétés spectrales très différentes. La forme aminal émet de la fluorescence à 418 nm sous excitation à 327 nm et cette émission est prépondérante à pH > 6. La forme iminium, quant à elle, émet faiblement vers 590 nm, à pH < 6 (Figure 78).

[120] Janovska, M., Kubala, M., Simanek, V., Ulrichova, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 235-240.

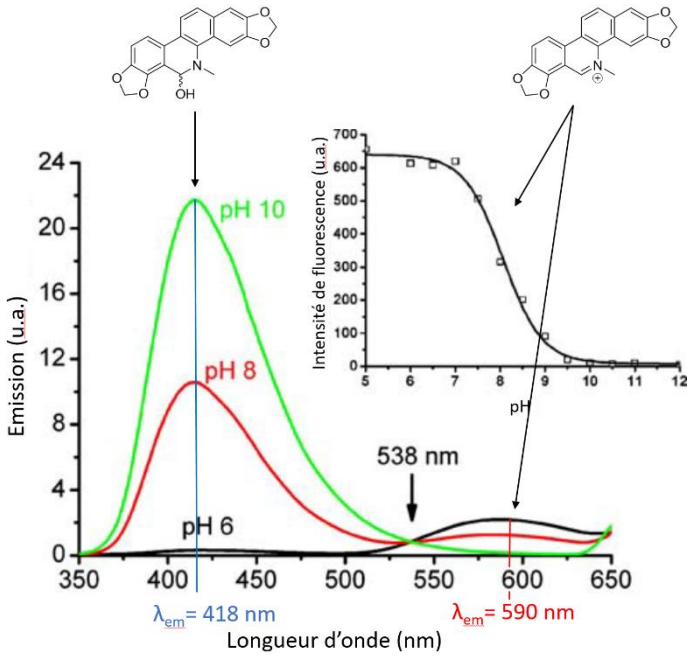


Figure 78 : Emission de fluorescence de la sangarine **54** (excitation à 327 nm) en fonction du pH et variation de l'intensité de fluorescence de la forme iminium (excitation à 475 nm).

Des membres de la famille de la sanguinarine **54** sont capables, lorsqu'ils sont sous forme iminium, de s'intercaler dans l'ADN. Ceci a été étudié sur la chelerythrine **55** qui coexiste également sous deux formes (Figure 79).

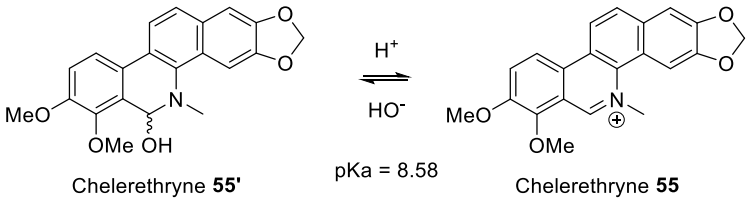


Figure 79 : Structure de la chelerythrine **55**.

En l'absence d'ADN, les propriétés spectrales de la chelerythrine **55** sont similaires à celles de la sanguinarine. La forme iminium **55** est caractérisée par deux bandes d'absorption bien définies respectivement à 267 et 316 nm suivies de deux bandes plus faibles à 338 et 403 nm. Cette forme est faiblement fluorescente avec un maximum d'émission à 551 nm lorsqu'excitée à 338 nm. A l'inverse même si le spectre d'absorption de la forme aminal est très similaire, la forme **55'** est quant à elle très fluorescente avec un maximum à 418 nm (Figure 80).[121] Etant donnée la valeur du pKa, les deux formes **55** et **55'** coexistent à pH neutre.

[121] Basu, P., Bhowmik, D., Suresh Kumar, G. *J. Photochem. Photobiol. B* **2013**, *129*, 57-68.

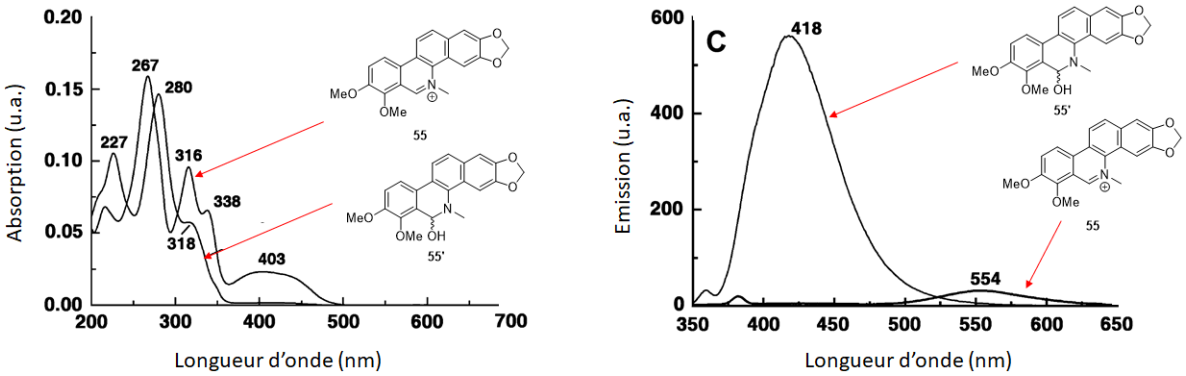


Figure 80 : Spectres d'absorption et d'émission des deux formes de la chelerythrine **55** (enregistrée à pH = 6.1) et **55'** (pH = 10.1).

En présence de concentrations croissantes d'ADN de thymus de veau, un comportement très différent est observé pour les formes **55** et **55'** (Figure 81). Une exaltation de fluorescence est observée pour l'iminium **55**, caractéristique d'une association forte de la chelerythrine avec l'ADN (intercalation). De manière notable cette association n'entraîne aucun déplacement de la longueur d'onde du maximum d'émission, alors qu'un effet hypsochrome est observé pour la berbérine **44** (voir partie 2.3.3). Un phénomène opposé se produit sur la forme **55'** : une décroissance de l'absorbance à 318 nm et de l'intensité de fluorescence à 418 nm est observée. De manière concomitante, une augmentation d'absorption et d'émission est observée aux longueurs d'ondes correspondantes à la forme iminium **55**, très minoritaire au pH des mesures (10.1). A très haute concentration en ADN (supérieure 130 µM) un déplacement de l'équilibre en faveur de la forme **55** est d'ailleurs observé.[121]

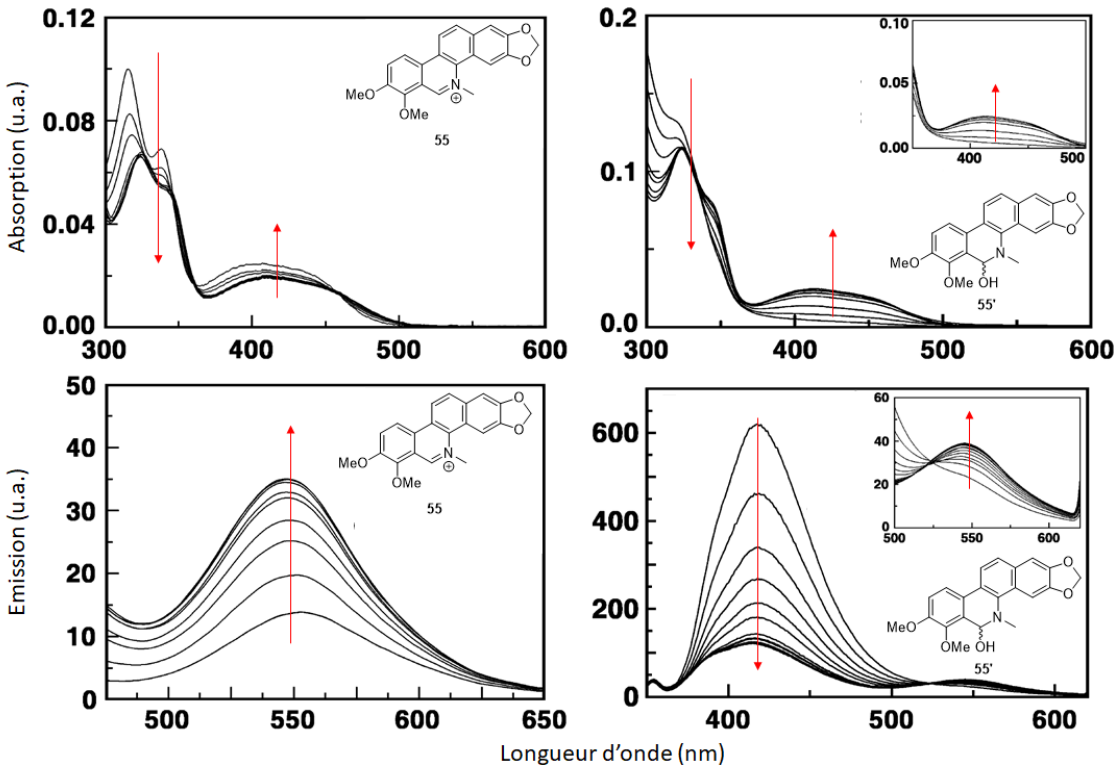


Figure 81 : Evolution des propriétés spectrales de la chelerythrine **55** en fonction de concentrations croissantes en ADN.[121]

Des effets intéressants de spécificité pour certains oligonucléotides existent au sein de la famille des benzo[c]phénanthridines. Par exemple la sanguinarine n'émet pas de fluorescence en présence d'ADN dont les bases sont correctement appariées (ADN dit « Full match ») en milieu légèrement basique (pH = 8.3), mais la présence d'un site abasique (privé de sa base nucléique) entraîne un déclenchement de

fluorescence de la forme iminium **54**.[122] Ceci présente une application directe pour la détection des lésions de l'ADN.

Un déplacement d'équilibre vers la forme aminal peut également être observé en présence de protéines. Des études ont été menées en ce sens sur l'interaction entre la tubuline et la sanguinarine **54**. A concentration croissante de tubuline, la bande d'émission caractéristique de la forme iminium à 590 nm décroit progressivement. Dans le même temps, une exaltation de la fluorescence caractéristique de la forme aminal est observée entre 410 et 430 nm (Figure 82).

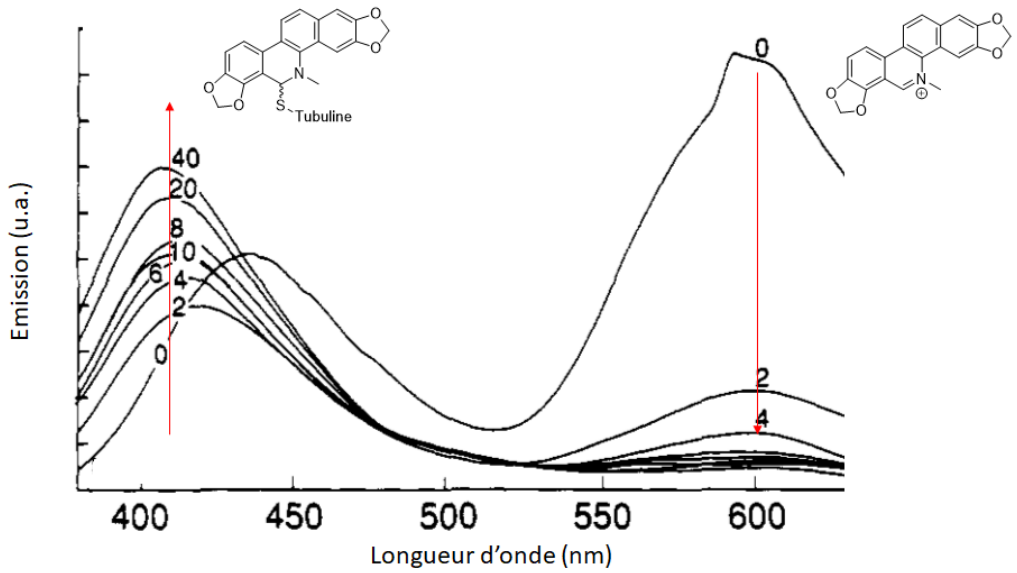


Figure 82 : Evolution des propriétés spectrales de la sanguinarine en présence de concentration croissante de tubuline (les nombres sur les courbes représentent la concentration en tubuline exprimée en µM). Les mesures ont été réalisées à pH = 6.85 en excitant à 327 nm.

Ce déplacement des longueurs d'onde résulte de l'addition nucléophile d'un résidu cystéine sur l'iminium de la sanguinarine **54**. Il est à noter qu'une quantité substoechiométrique de tubuline suffit à inhiber totalement la fluorescence de la forme iminium **54**, ce qui suggérerait que plusieurs résidus cystéine sont réactifs vis-à-vis de la sanguinarine **54**. Tout l'intérêt de cette application réside dans la réversibilité de l'addition en fonction du pH. En traitant en milieu acide (HCl à 20 mM) une solution de sanguinarine incubée avec de la tubuline, la fluorescence de la forme iminium **54** est restaurée.[123]

Cette capacité des benzo[c]phénanthridines à piéger les protéines de manière covalente mais réversible est très intéressante pour des applications de détection et d'identification. Cependant aucun marquage n'est observé, dans les conditions d'études précédentes, avec des protéines ne possédant pas de groupement thiols libres comme la ribonucléase A, l'insuline ou la mercaptalbumine.[123] Un rayonnement d'excitation UV très énergétique est de plus requis, qui accentue la possible détérioration des protéines marquées lors de leur détection par fluorescence après marquage.

[122] Wu, F., Sun, Y., Shao, Y., Xu, S., Liu, G., Peng, J., Liu, L. *PLoS One* **2012**, *7*, e48251.

[123] Wolff, J., Knipling, L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13334-13339.

2.5 Epicocconone

L'epicocconone **56**, isolée d'*Epicoccum nigrum*, appartient à la famille des azaphilones qui regroupe plus de 373 polycétides provenant principalement de champignons terrestres ou aquatiques. Ces molécules se caractérisent par un cœur bicyclique commun pyranoquinone ou dihydropyranoquinone dont l'alcool tertiaire en position 7 est engagé dans une fonction ester, lactone linéaire ou angulaire (Figure 83).

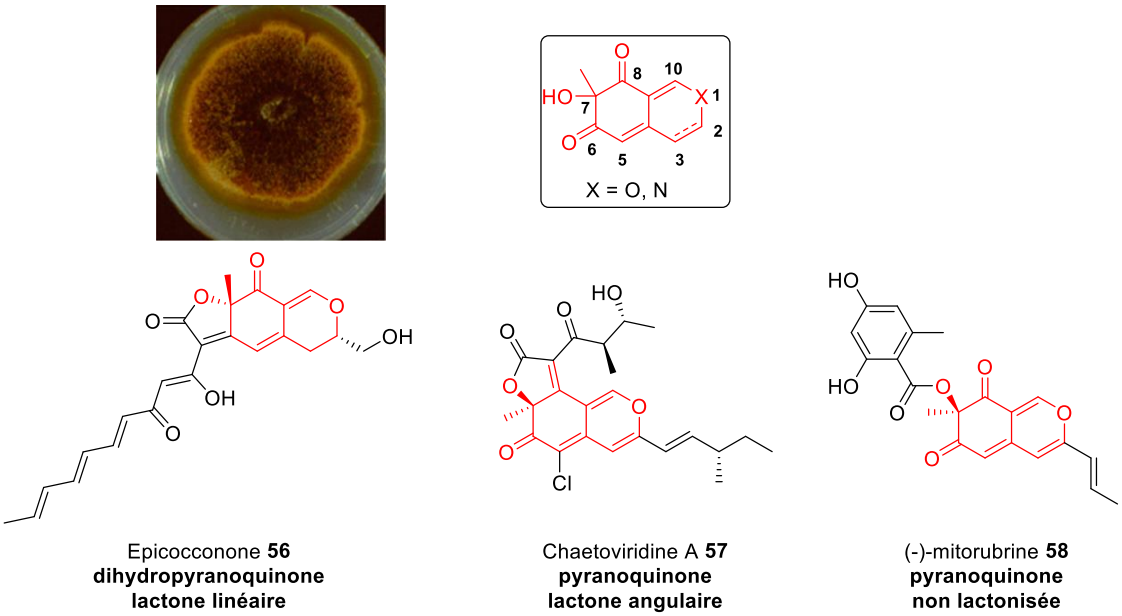


Figure 83 : Photo d'une culture *d'Epicoccum nigrum*, structure générale du cœur azaphilique, de l'epicocconone **56** (configuration relative), de la chaetoviridine A **57** (structure révisée[124]) et de la (-)-mitorubrine **58**.

Les azaphilones ont la particularité de réagir avec les amines primaires (d'où leur nom) entraînant la transformation du cycle pyranoquinone en pyridoquinone correspondant de manière irréversible. Cette propriété permet certainement d'expliquer la grande variété d'activités biologiques (antioxydante, antifongique, antibactérienne, …) qui existe chez cette famille de composés par la modification covalente de protéines nucléophiles (Figure 84).[125]

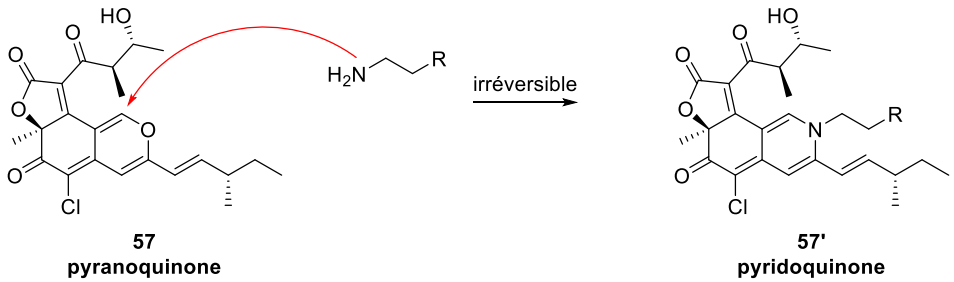


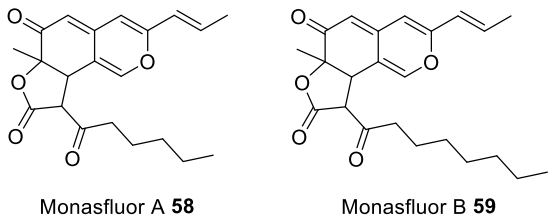
Figure 84 : Mécanisme d'addition irréversible d'amine primaires sur les azaphilones de type pyranoquinone.

Certaines azaphilones sont fluorescentes à une longueur d'onde dépendante de l'étendue du système π et des substituants. C'est par exemple le cas des monasfluors A **58** et B **59** (Figure 85), isolés de

[124] Makrerougras, M., Coffinier, R., Oger, S., Chevalier, A., Sabot, C., Franck, X. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4146-4149.

[125] Gao, J.-M., Yang, S.-X., Qin, J.-C. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4755-4811.

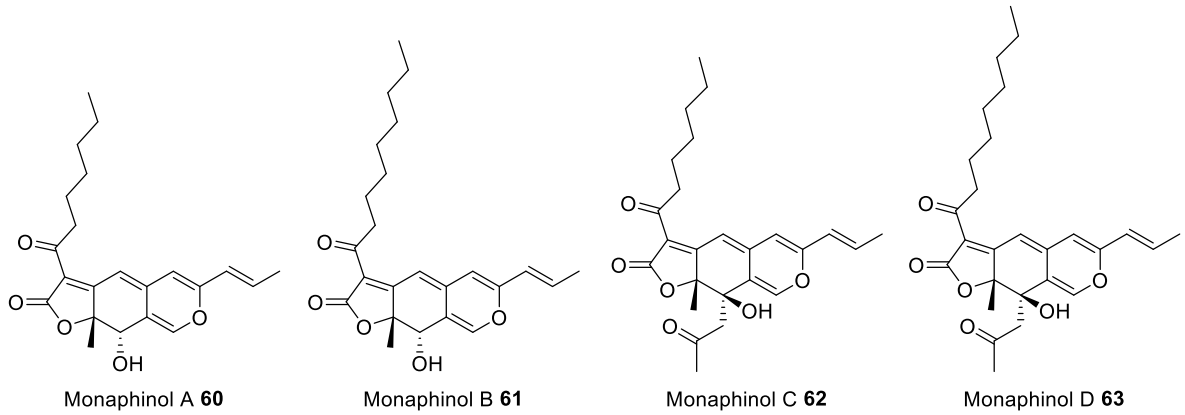
champignons du genre *Monascus*, et qui possèdent tous deux des bandes d'absorption à 386 nm et émettent dans le bleu à 460 nm (excitation à 396 nm).[126]



Monasfluor A **58** Monasfluor B **59**

Figure 85 : Structures des monasfluors A et B.

Quatre autres azaphilones isolées de *Monascus purpureus* sont également fluorescentes dans l'orange. Les monaphinols A **60** et B **61** émettent ainsi à 554 nm (excitation à 438 nm) et les monaphinols C **62** et D **63** à 540 nm (excitation à 480 nm).[127]



Monaphinol A **60** Monaphinol B **61** Monaphinol C **62** Monaphinol D **63**

Figure 86 : Structures des monaphinols A-D.

L'epicocconone **56**, qui possède un cœur dihydropyranoquinone, est une petite molécule hydrosoluble, faiblement fluorescente dans le vert à 520 nm (excitation 420 nm) isolée du champignon *Epicoccum nigrum*.[128] L'aldéhyde masqué de l'epicocconone peut cependant réagir de manière réversible avec les résidus lysine des protéines formant un adduit très fluorescent dans l'orange à 610 nm (excitation à 395 ou 488 nm).[129] Les propriétés spectrales de l'epicocconone **56** sont résumées ci-dessous (Figure 87).

[126] Huang, Z., Xu, Y., Li, L., Li, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 112-118.

[127] Hsu, Y.-W., Hsu, L.-C., Liang, Y.-H., Kuo, Y.-H., Pan, T.-M. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4512-4518.

[128] Bell, P. J. L., Karuso, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9304-9305.

[129] Coghlan, D. R., Mackintosh, J. A., Karuso, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2401-2404.

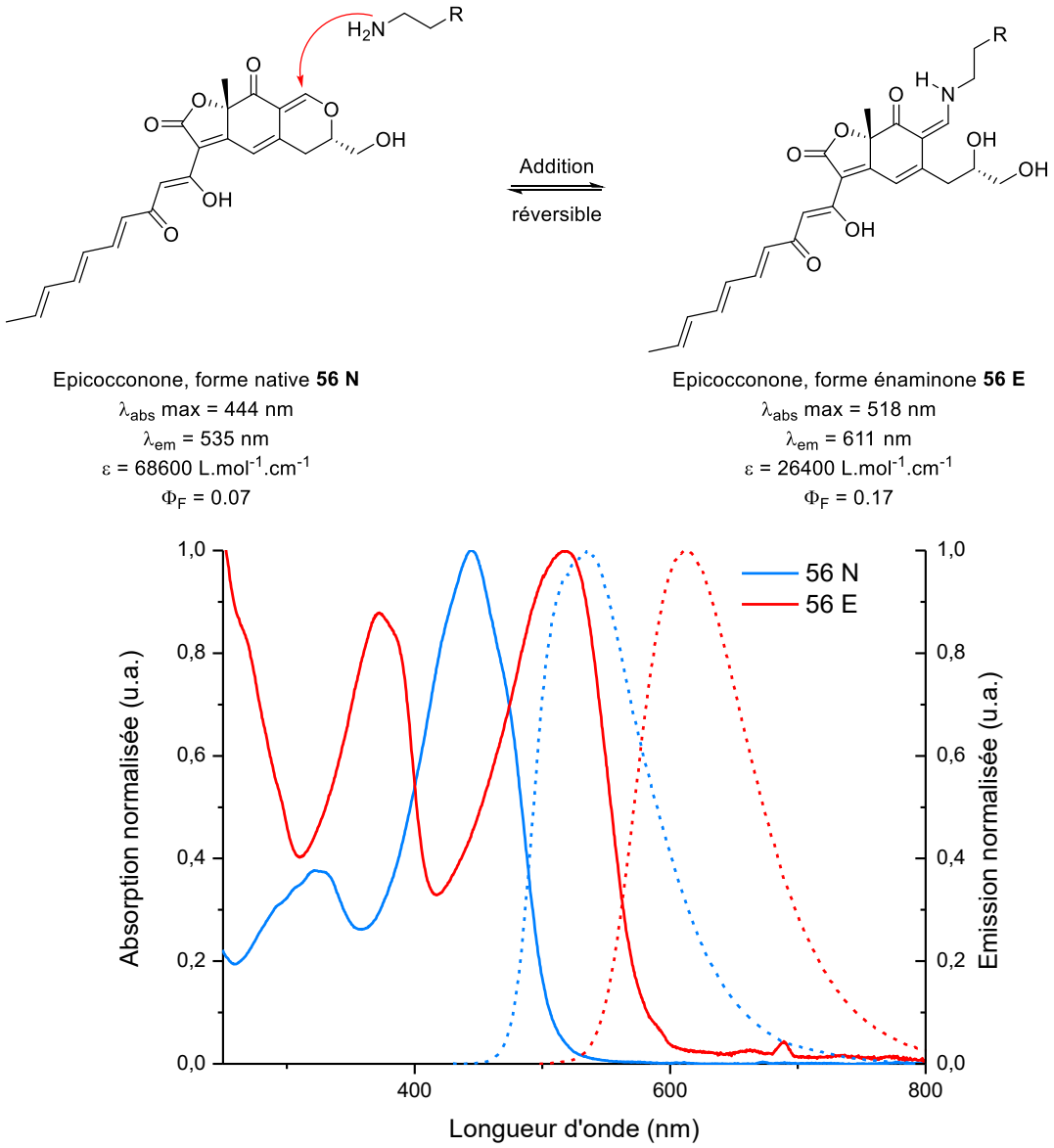


Figure 87 : Réaction d'addition réversible des amines primaires sur l'epicocconone **56**. Spectre d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) normalisés de l'epicocconone **56** sous forme native (**56 N**) (courbes bleues) et sous forme énaminone **56 E**, formée en présence de BSA (Albumine de Sérum Bovin, courbes rouges).

La réversibilité de l'addition de l'amine est gouvernée par le pH et la stabilité de l'énaminone est maximale en milieu acide (pH = 2). Cet effet est dû à la stabilisation par liaison hydrogène sur la forme énaminone **56 E**. A pH supérieur à 4, la fluorescence due à l'énaminone est plus faible du fait d'une réversibilité accrue (Figure 88).[129]

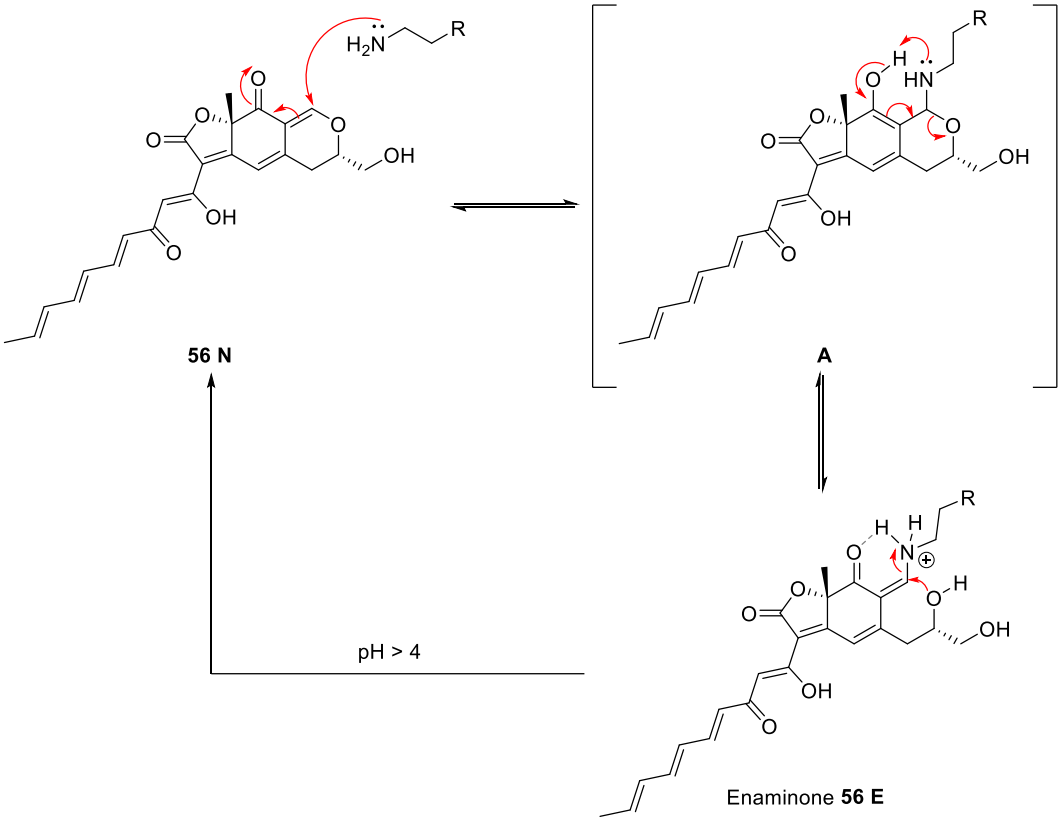
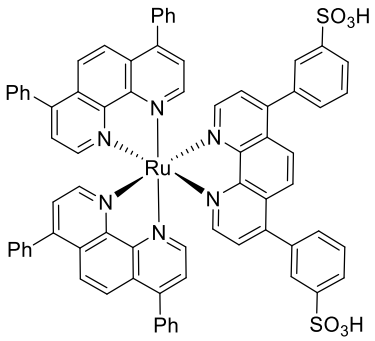


Figure 88 : Dépendance vis-à-vis du pH des formes énaminone **56 E** ou native **56 N** de l'epicocconone.

Ce phénomène de réversibilité en fonction du pH rend possible le clivage de la liaison fluorophore-protéine à façon. Cette propriété s'ajoute à la grande sensibilité de ce composé pour les protéines, la limite de détection de l'epicocconone **56** sur gel d'électrophorèse étant inférieure au nanogramme de protéine par bande.[130] Ceci rend cette molécule plus performante que les révélateurs à base d'argent (nitrate d'argent) ou le SYPRO® Ruby **57** (Figure 89) et a amené sa commercialisation en tant que révélateur de protéines sous les noms Lightning Fast® et Deep Purple®.



SYPRO Ruby **57**

[130] Mackintosh, J. A., Choi, H.-y., Bae, S.-h., Veal, D. A., Bell, P. J., Ferrari, B. C., Van Dyk, D. D., Verrills, N. M., Paik, Y.-k., Karuso, P. *Proteomics* **2003**, *3*, 2273-2288.

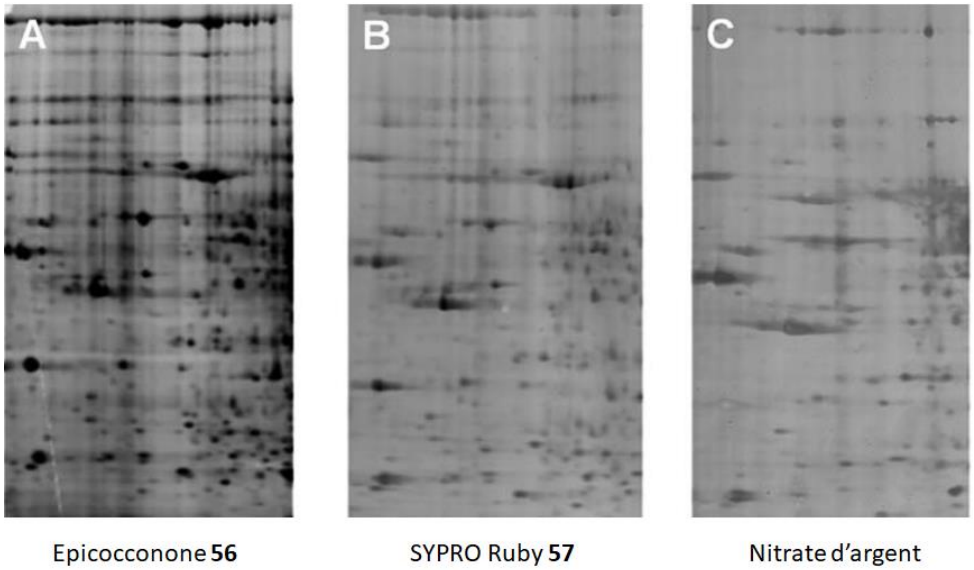


Figure 89 : Structure du SYPRO Ruby et comparaison de marquage sur gel d'électrophorèse de protéines solubles de souris (Gel Sodium Dodécyl Sulfate - PolyAcrylamide) entre l'epicocconone **56**, le SYPRO Ruby **57** et le nitrate d'argent.[38]

L'epicocconone possède de nombreux avantages très recherchés en imagerie *in vivo* :

- La forte exaltation de fluorescence obtenue en présence de protéine et le large déplacement de Stokes assurent un bruit de fond très bas.
- La faible toxicité de ce composé du fait de la réversibilité du marquage des résidus amines des protéines.
- Une pénétration facile dans les cellules.

Cette molécule permet ainsi de visualiser en microscopie de fluorescence les membranes cellulaires et le cytoplasme de cellules fixées ou vivantes (Figure 90).[131]

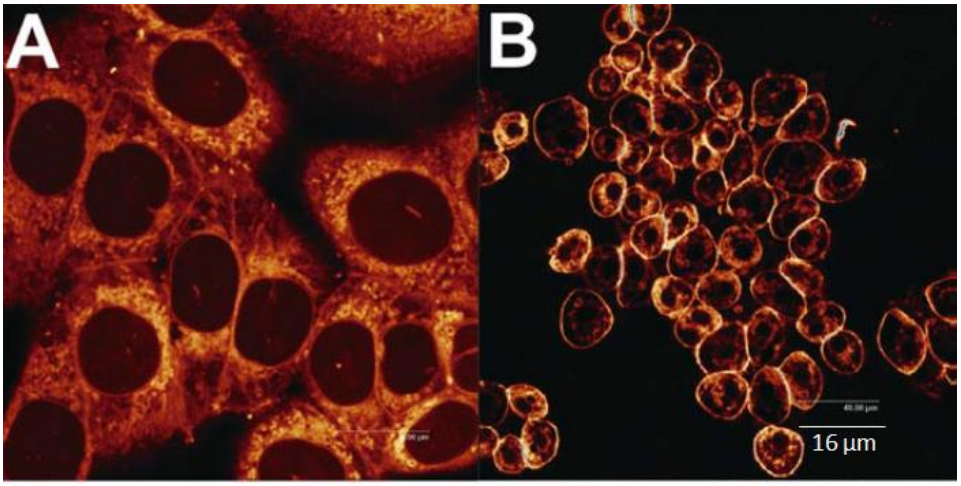


Figure 90 : Marquage par fluorescence de cellules HCT-116 impliquées dans le cancer du côlon (A : cellules fixées, B : cellules vivantes).

Il est à noter ici que l'obtention des images ci-dessus est possible sans lavage de l'excédent de fluorophore du fait des propriétés spectrales de l'epicocconone évoquées précédemment (large déplacement de Stokes et forte exaltation de fluorescence de la forme énaminone). Le marquage se fait plus particulièrement sur les protéines situées dans un environnement lipophile tels que les membranes

[131] Choi, H. Y., Veal, D. A., Karuso, P. *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 475-482.

plasmiques et les organites lipophiles (*Reticulum* Endoplasmique, appareil de Golgi, radeaux lipidiques).[131]

3 Conclusion

La compréhension du phénomène de fluorescence a permis la création d'une interface riche entre la physique, la chimie et la biologie. L'utilisation de techniques d'analyses plus ou moins spécifiques permet d'explorer un nombre important de phénomènes photophysiques et plus particulièrement de comprendre davantage les mécanismes de fluorescence. De plus il existe un nombre important de molécules fluorescentes elles aussi spécifiques qui constituent tout autant d'outils permettant d'aller interroger des phénomènes biologiques complexes. Le développement de nouveaux fluorophores, bien souvent inspirés de ceux trouvés dans la nature, et d'outils d'imagerie toujours plus performants reste un sujet porteur compte tenu du nombre important de publications relatives à ces sujets.

Les travaux développés dans la suite de ce manuscrit s'inscrivent parfaitement dans ce contexte. Ils sont focalisés sur le développement d'analogues de l'epicocconone polyfonctionnels et l'étude de leurs propriétés photo-physiques. Il s'agit également d'ouvrir la voie au développement d'analogues optimisés pour l'absorption à deux photons, puisque la plupart des fluorophores actuellement utilisés en microscopie de fluorescence excitée à deux photons ne sont pas conçus pour cet usage.[132]

[132] Blab, G. A., Lommerse, P. H. M., Cognet, L., Harms, G. S., Schmidt, T. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *350*, 71-77.

Chapitre 1 : Synthèse d'analogues de l'epicocconone et études de leurs propriétés spectrales

1 Travaux antérieurs du laboratoire

L'équipe du Dr. Xavier Franck s'est spécialisée dans la synthèse d'analogues du produit naturel epicocconone **56** afin de répondre aux problèmes suivants :

- La photostabilité de ce composé sous irradiation UV continue à 395 nm : L'énaminone **56'** possède dans de telles conditions un temps de demi-vie (temps au bout duquel l'intensité d'émission est divisée par 2) d'environ 11 minutes.[133]
- L'inexistence à ce jour d'une synthèse totale de cette azaphilone malgré une utilisation abondante en tant que marqueur sur gel d'électrophorèse.

Ces analogues conservent le cœur dihydropyranique de l'epicocconone même si les chaînes latérales diffèrent de la molécule naturelle **56**. Le groupement hydroxyméthylène en position 2 est ainsi remplacé par un groupement gem-diméthyle qui augmente la stabilité de l'énaminone formée grâce à l'encombrement plus important de l'alcool tertiaire comparé au diol 1,2 du produit naturel **56**. La photoisomérisation de la chaîne heptatriène a été identifiée comme un des facteurs contribuant aux désexcitations non radiatives et donc au faible rendement quantique de fluorescence de l'epicocconone. Son remplacement par des groupement aromatiques permet d'éviter ce phénomène.[134] Les différences structurelles entre les analogues **58** et la molécule naturelle **56** sont résumées ci-dessous (Figure 91).

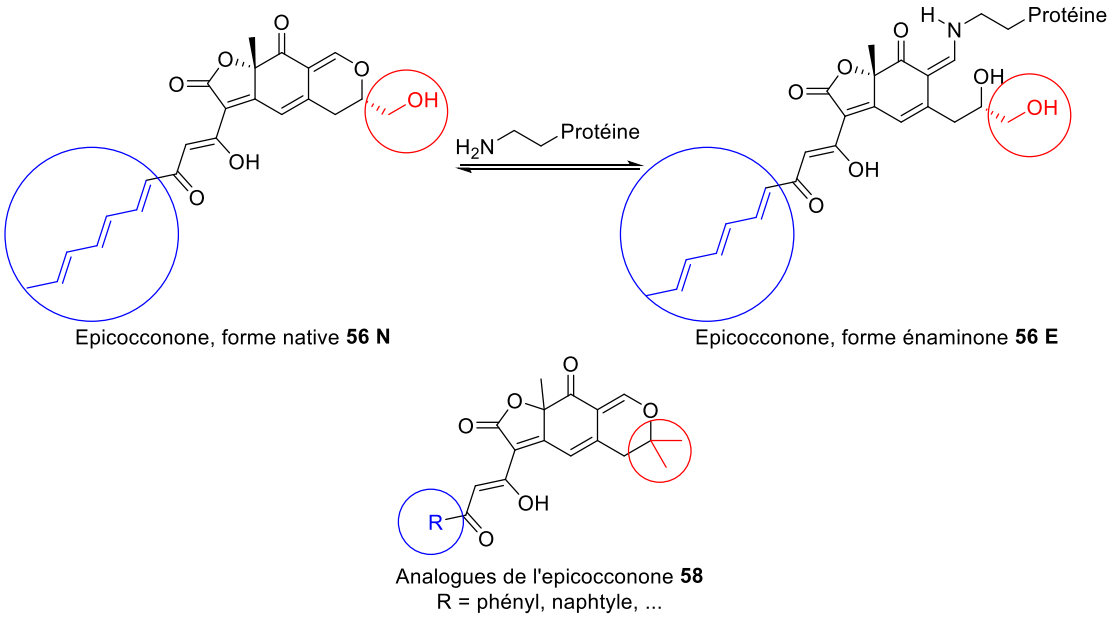
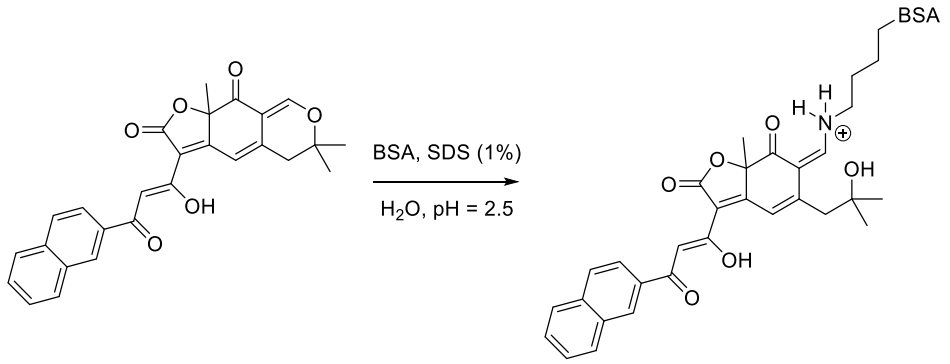


Figure 91 : Structure générale **58** des analogues de l'epicocconone comparée à la molécule naturelle **56**.

Ces premiers travaux ont mis en évidence l'importance du motif β-cétoénol, sans lequel les rendements quantiques de fluorescence chutent de manière importante. Ceci est illustré par la comparaison de deux analogues (Figure 93) possédant une chaîne latérale naphtyle, dont l'un conserve le motif cétoénol du produit naturel (**60**) alors que l'autre possède une simple cétone (**59**). Ces deux composés ont été étudiés sous forme native (N) et mis en présence d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) afin de former l'énaminone (E) correspondante (Figure 92). Le solvant choisi pour effectuer ces mesures est l'eau, à pH = 2.5 et en présence de 0.1% massique de Sodium Dodécyle Sulfate (SDS).

[133] Peixoto, P. A., Boulange, A., Ball, M., Naudin, B., Alle, T., Cosette, P., Karuso, P., Franck, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15248-15256.

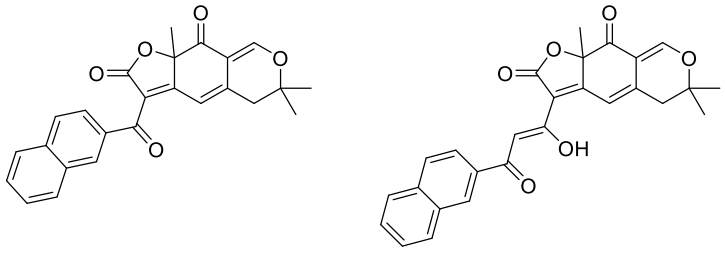
[134] Chatterjee, S., Karuso, P., Boulange, A., Peixoto, P. A., Franck, X., Datta, A. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 14951-14959.



60 N **60 E**

Figure 92 : Réaction de formation de l'énaminone sur l'analogue **60** en présence de BSA dans l'eau/SDS.

L'analogue **60** présente ainsi des propriétés d'absorption et d'émission semblables à celles du produit naturel **56** en présence de BSA, avec un rendement quantique légèrement supérieur (0.21 contre 0.17). La différence la plus notable étant que le composé **60** est fluorescent également sous forme native (0.20 contre 0.07). Les qualités de l'analogue **60** sont cependant très supérieures en termes de photostabilité puisque celui-ci dispose d'un temps de demi-vie d'une trentaine de minutes, soit trois fois plus que l'epicocconone **56** (10 minutes).



59 **60**

Composé	λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
59 N	317, 381	520	139 nm, 7016 cm^{-1}	2200	0.03
59 E	347, 477	587	110 nm, 3929 cm^{-1}	300	0.06
60 N	308, 435	538	103 nm, 4401 cm^{-1}	39200	0.20
60 E	372, 518	613	95 nm, 2992 cm^{-1}	18400	0.21
Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Figure 93 : Structures des analogues de l'epicocconone **59** et **60** et comparaison de leurs propriétés spectrales.[133] Les rendements quantiques ont été déterminés par rapport au Lucifer Yellow (excitation à 420 nm, Φ_F = 0.21 dans l'eau) et à la rhodamine 6G (excitation à 488 nm, Φ_F = 0.91 dans l'éthanol).

Il est important de noter que le motif céto-énol est primordial pour les propriétés de fluorescence des analogues de l'epicocconone, comme l'illustrent les valeurs de rendements quantiques très faibles pour le composé **59** sous forme native et énaminone (Tableau 3).

1.1 Voie de synthèse des analogues de l'epicocconone

La rétrosynthèse conçue pour accéder aux analogues de l'epicocconone, actuellement utilisées au laboratoire, repose sur deux étapes clés que sont une réaction d'acylfuranonisation et une désaromatisation oxydante (Figure 94).

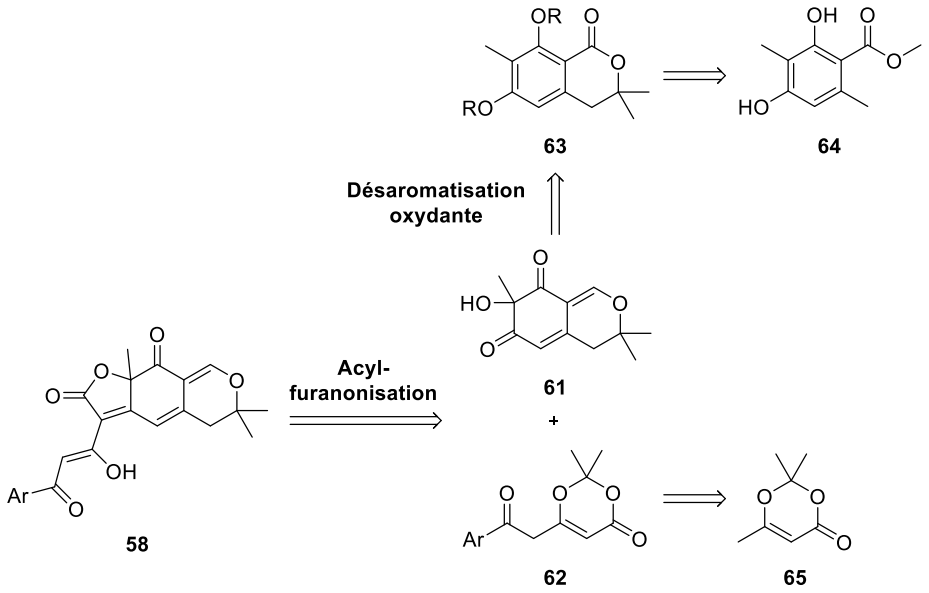


Figure 94 : Analyse rétrosynthétique pour la préparation des analogues de l'epicocconone **58**.

La formation des analogues de l'epicocconone met en jeu deux fragments que sont l'alcool désaromatisé **61** et la dioxinone **62**. La réaction d'acylfuranonisation est précédée par le piégeage d'un β-céto acylcétène **62a** par l'alcool tertiaire **61**, suivi d'une cyclisation de type Knoevenagel. Cet acylcétène peut être généré *in situ* à partir de la fragmentation d'une β-céto dioxinone **62** *via* une réaction de rétro-hétéro Diels-Alder (Figure 95).[135] Ces dioxinones **62** peuvent être obtenues rapidement à partir de la dioxinone méthyle commerciale **65** *via* l'addition nucléophile de cette dernière sur des acides activés. Le partenaire alcool **61** est issu de la désaromatisation oxydante de la lactone **63** (R = H). Celle-ci est obtenue *via* une séquence d'addition nucléophile-cyclisation mettant en jeu de l'acétone sur l'atratate de méthyle commercial **64**.

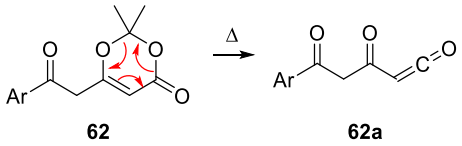


Figure 95 : Génération du β-céto acylcétène **62a** à partir de la β-céto dioxinone **62**.

1.1.1 Synthèse du partenaire alcool désaromatisé

La synthèse de l'alcool désaromatisé **61** débute donc avec l'atratate de méthyle commercial **64** dont les phénols sont protégés sous forme d'acétals MOM. La déprotonation du composé protégé **66** par le LDA génère alors un anion benzylique qui est piégé en présence d'acétone. L'alcoolate ainsi généré peut ensuite cycliser de manière intramoléculaire sur l'ester de méthyle en position ortho pour conduire à la lactone **63**. Cette lactone est ensuite réduite en présence de DiBAl-H en lactol correspondant **67**. La désaromatisation oxydante de ce lactol **67** en milieu acide par l'IBX a été développée au sein du laboratoire[136] et conduit à l'alcool **61** avec un rendement global de 19% sur 4 étapes (Figure 96).

[135] Boeckman, R. K., Jr., Pruitt, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8286-8288.

[136] Boulangé, A., Peixoto, P. A., Franck, X. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10241-10245.

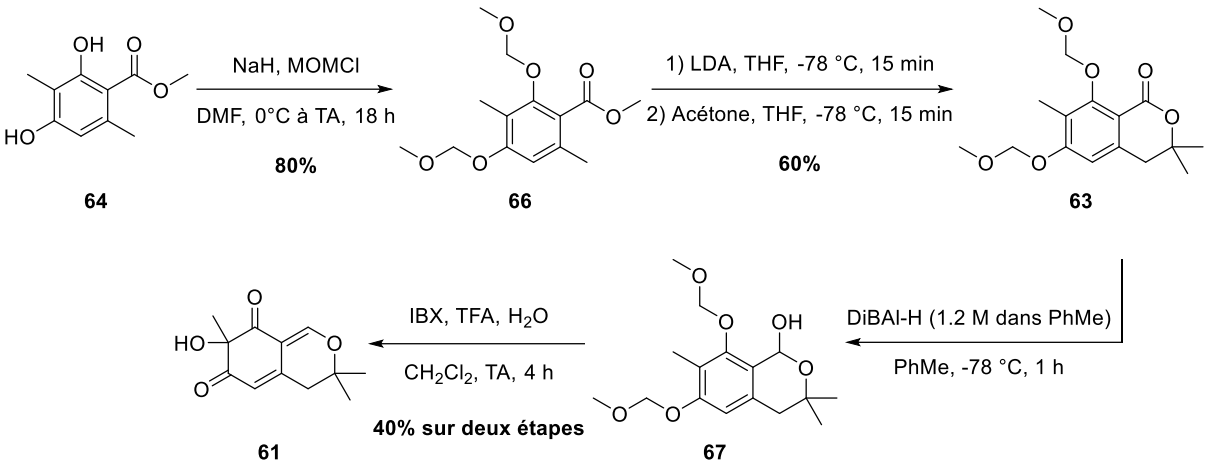


Figure 96 : Voie de synthèse de l'alcool désaromatisé **61**.

Le mécanisme de cette étape clé de désaromatisation procède de la manière suivante : la présence de TFA et d'eau permet la déprotection des groupements MOM et la formation d'un oxonium par élimination d'une molécule d'eau. Un échange de ligand entre l'IBX et le diphénol obtenu **68** permet d'initier la réaction intramoléculaire de désaromatisation oxydante en position ortho de l'intermédiaire **69**. L'hydrolyse du composé **70** conduit à la formation de l'alcool désaromatisé **61** et de l'IBA (Figure 97).

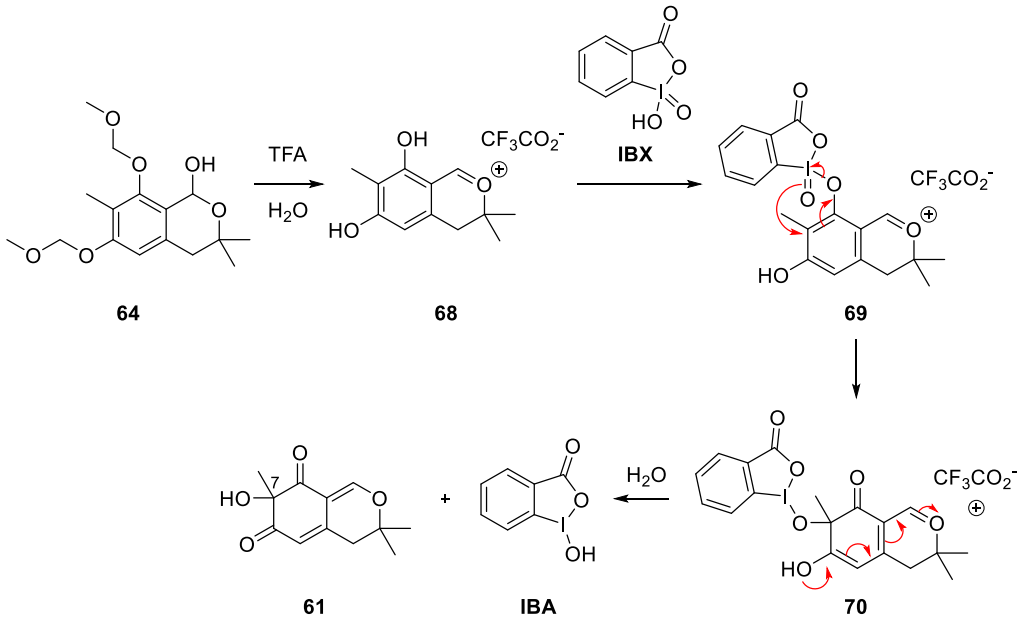


Figure 97 : Mécanisme de l'étape clé de désaromatisation oxydante.

1.1.2 Synthèse des partenaires dioxinones

Les acyl-cétènes sont donc utilisés afin de former le cycle furanone des analogues de l'epicocconone. Ces composés et plus généralement les cétènes sont des espèces électrophiles très réactives et donc souvent formés *in situ*. De ce fait de nombreux précurseurs de cétènes existent dans la bibliographie. Les cétènes peuvent ainsi être générés à partir d'acides activés[137], d'énolates d'ester[138], d'α-diazocétones

[137] a) Douglas, J. J., Churchill, G., Slawin, A. M. Z., Fox, D. J., Smith, A. D. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16354-16358. b) Funk, R. L., Abelman, M. M., Jellison, K. M. *Synlett* **1989**, 36-37.

[138] Sullivan, D. F., Woodbury, R. P., Rathke, M. W. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2038-2039.

(réarrangement de Wolff)[139], de carbènes[140], de cyclobuténones (réarrangement de Moore)[141] et de dioxinones[135] (Figure 98).

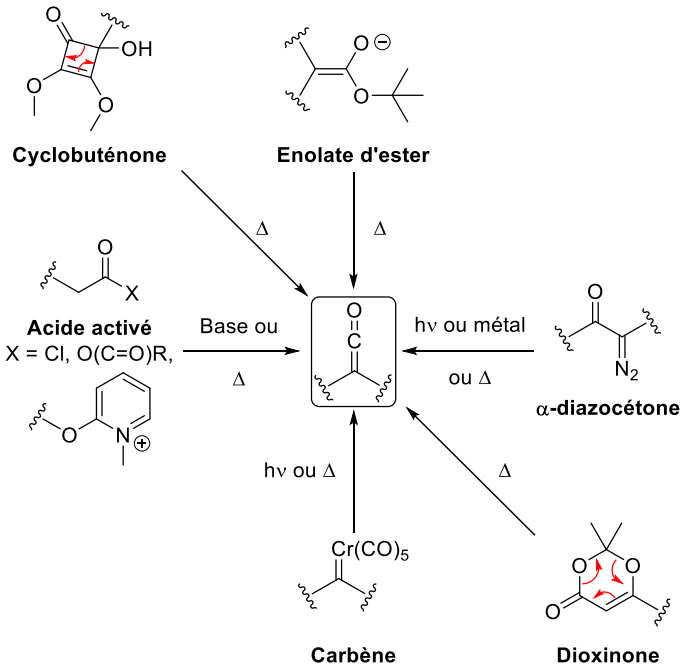


Figure 98 : Principaux précurseurs de cétènes.

Les β-céto dioxinones sont utilisés en tant que précurseurs des β-céto acylcétènes dans la synthèse des analogues de l'epicocconone car elles sont faciles à fonctionnaliser et relativement stables. Ces qualités ont été largement valorisées en synthèse totale.[142] Dans le cas présent, les β-céto dioxinones aromatiques **62** sont obtenues par addition nucléophile de l'anion de la dioxinone méthyle **65**, généré en présence de LiHMDS, sur des acyl-benzotriazoles **71**. Ces acides activés sont obtenus en traitant les acides carboxyliques **72** par le chlorure de thionyle $SOCl_2$ en présence de 1H-benzotriazole **73** (Figure 99).[143]

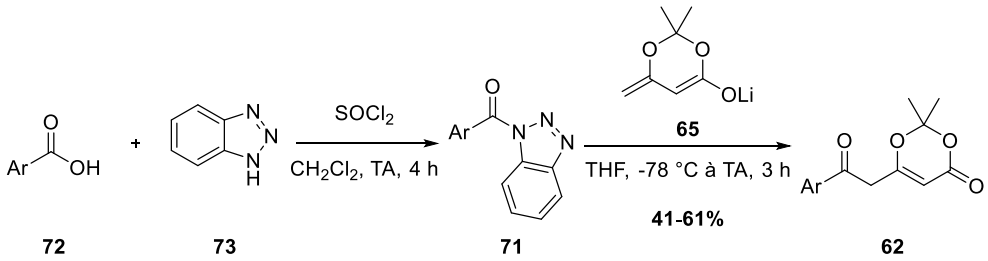


Figure 99 : Synthèse des β-céto dioxinones aromatiques **62**.

1.1.3 Réaction d'acylfuranonisation

Une fois les deux partenaires en main, la deuxième réaction clé d'acylfuranonisation peut être envisagée. Elle permet, en une seule étape, d'obtenir le cycle furanone fonctionnalisé.[144] Dans un premier temps les deux partenaires **61** et **62** sont chauffés au reflux du toluène, ceci permet de fragmenter

[139] Miller, R. D., Theis, W., Heilig, G., Kirchmeyer, S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1453-1463.

[140] Moser, W. H., Hegedus, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7873-7880.

[141] Perri, S. T., Rice, P., Moore, H. W. *Org. Synth.* **1990**, *69*, 220-225.

[142] Cookson, R., Barrett, T. N., Barrett, A. G. M. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 628-642.

[143] Katritzky, A. R., Zhang, Y., Singh, S. K. *Synthesis* **2003**, 2795-2798.

[144] Peixoto, P. A., Boulangé, A., Leleu, S., Franck, X. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3316-3327.

la dioxinone **62** en acylcétène **62a** qui piège alors rapidement l'alcool désaromatisé **61** pour former le β,δ cétoester **74**. La seconde partie de l'étape est la condensation de Knoevenagel intramoléculaire et régiosélective initiée par ajout de la triéthylamine, formant alors le composé lactonisé **75**. La déshydratation en milieu acide de la molécule **75** permet de former le cycle furanonique et d'obtenir l'analogue de l'epicocconone **58** (Figure 100).

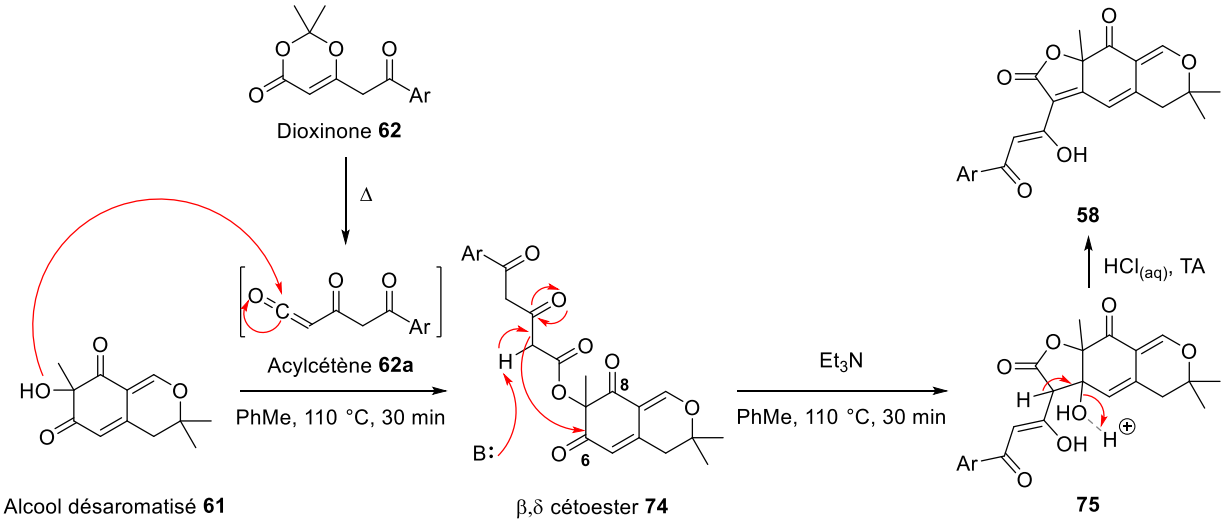


Figure 100 : Mécanisme de la réaction d'acylfuranonisation.

Le mécanisme ci-dessus amène plusieurs observations qui sont les suivantes :

Premièrement le moment d'ajout de la triéthylamine est très important car l'acylcétène **62a** est susceptible de s'autocondenser en milieu basique pour former une 2-pyrone **62b** (Figure 101). Il faut donc introduire la base après la formation du β,δ cétoester **74**.

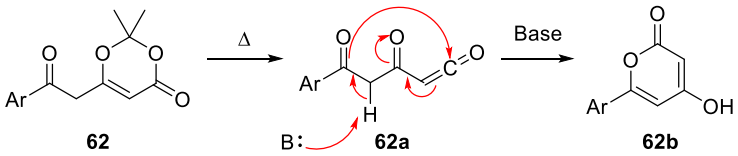


Figure 101 : Réaction secondaire d'autocondensation de l'acylcétène **62a** en milieu basique.

De plus, les cétènes étant des espèces très électrophiles, la présence d'eau est également proscrite. En effet le piègeage de l'acycétène **62a** par une molécule d'eau conduit à l'acide **75** qui décarboxyle rapidement lors de l'ajout de la base pour donner l'acétoacétone **75a** (Figure 102).

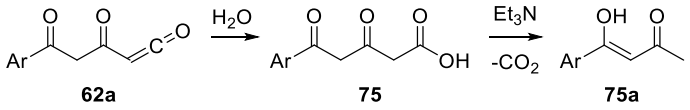


Figure 102 : Réaction secondaire de formation du composé **75a**.

Deuxièmement l'étape de condensation de Knoevenagel se fait exclusivement en position 6 lorsque la chaîne latérale de la dioxinone comporte un groupement aromatique. Dans le cas d'une chaîne aliphatique, un mélange quasi-stoechiométrique de condensation en position 6 et en position 8 est obtenu (Figure 103). Cette différence entre dioxinones aliphatiques et aromatiques serait due à des effets stériques[133]

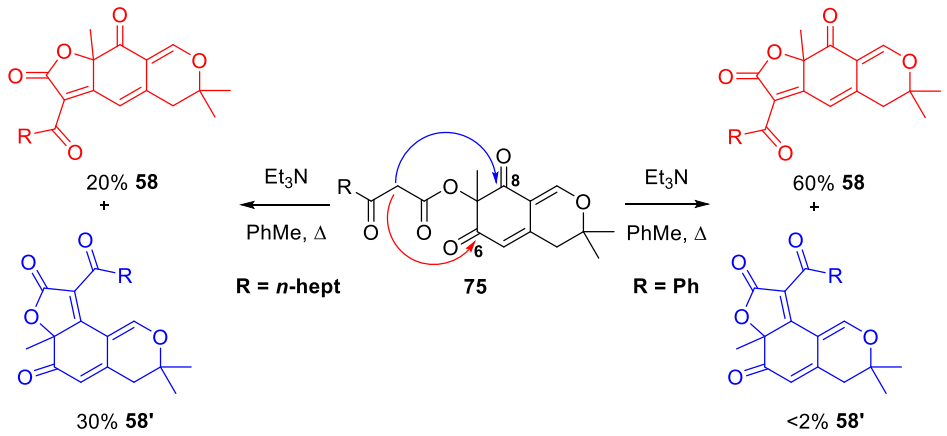


Figure 103 : Régiosélectivité de la réaction de condensation de Knoevenagel dans le cas de chaînes latérales aliphatiques ou aromatiques.

Les travaux du Dr. Thibault Alle sur la régiosélectivité de cette condensation de Knoevenagel montrent que le régioisomère désiré **58** provenant de la cyclisation en position 6 serait le produit thermodynamique de la réaction alors que le composé **58'**, résultant de la cyclisation en position 8 serait le produit cinétique. La réversibilité de la cyclisation en milieu basique a pu être mise en évidence et des conditions opératoires permettant d'obtenir exclusivement l'un ou l'autre des régioisomères ont également été développées (Figure 104).[145]

Il est à noter que ces conditions sont les seules qui permettent de contrôler efficacement la régiosélectivité de la condensation de Knoevenagel lorsque des dioxinones à chaîne latérale aliphatiques sont employées.

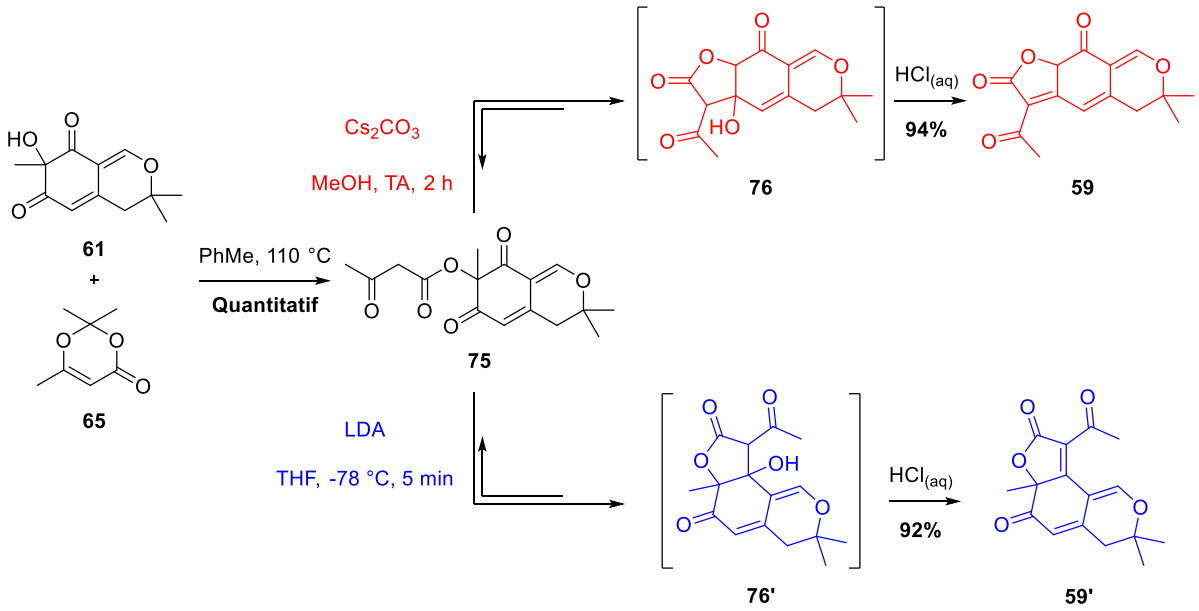


Figure 104 : Conditions de cyclisation permettant la régiosélectivité exclusive en faveur du régioisomère **59** ou **59'**.

Pour conclure sur la synthèse dans sa globalité, cette voie permet d'obtenir plusieurs centaines de milligrammes de composé final même si les rendements de l'étape d'acylfuranonisation ne dépassent pas 30%.

[145] Alle, T. *Epicocconone et analogues : synthèse, études spectroscopiques et marquage de protéines*, Université de Rouen, Thèse de doctorat soutenue en 2015, chapitre 2.

1.2 Synthèse d'analogues polyfonctionnels de l'epicocconone

La non-spécificité du marquage des protéines par l'epicocconone ou ses analogues est requise pour des applications en protéomique où l'ensemble des protéines doit être visualisé. La détection spécifique de protéines d'intérêt est cependant impossible avec de telles molécules, l'idée est donc d'associer ces fluorophores à un agent de reconnaissance permettant de cibler spécifiquement une famille de protéines.

1.2.1 Principe

La conception de sondes fluorescentes pour la « chemical biology » est actuellement en plein essor. Elle repose en général sur la préparation de molécules polyfonctionnelles composées d'un fluorophore pour la visualisation, d'un agent de reconnaissance (ou d'une fonction réactive permettant la création d'un lien covalent) et d'un groupement de séparation sur streptavidine tel que la biotine. L'approche envisagée au sein du laboratoire est l'utilisation de l'epicocconone à la fois comme fluorophore et comme fonction réactive, exploitant la capacité de capture réversible de protéines par cette molécule (Figure 105).

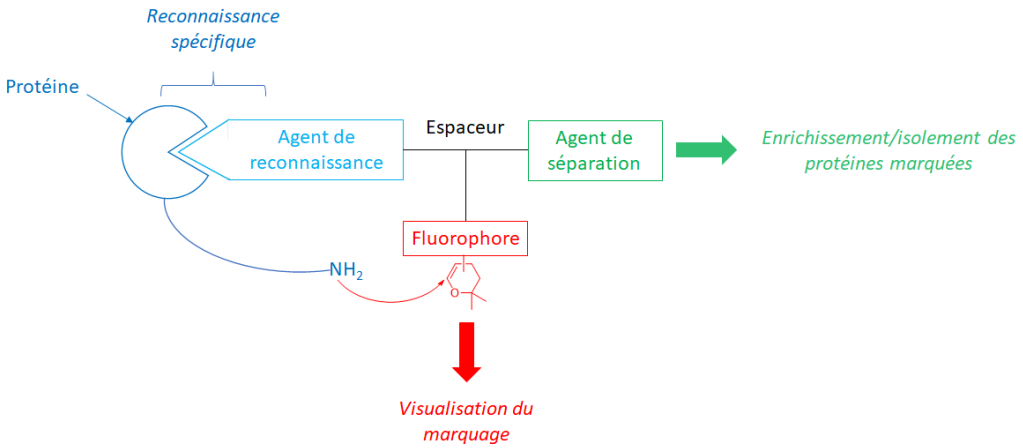


Figure 105 : Principe d'une sonde fluorescente polyfonctionnelle basée sur le squelette de l'epicocconone.

L'analogue de l'epicocconone ayant été choisi comme fluorophore, la liaison covalente et réversible formée est renforcée par la présence de l'agent de reconnaissance. Ce ligand va permettre en effet un enrichissement en protéines ciblées puisqu'il s'agit une structure chimique très affine vis-à-vis de ces protéines.

Les différentes parties composant la sonde sont en général des molécules hautement fonctionnalisées qui sont peu tolérantes chimiquement, de ce fait la manière dont elles seront liées est un point crucial. Un espaceur n'entraînant pas de perte d'affinité de l'agent de reconnaissance pour la protéine cible est également indispensable. Ces prérequis ont donc amené à considérer la réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC) comme moyen de lier les différents constituants de la sonde polyfonctionnelle.

1.2.2 Utilisation de la CuAAC comme étape clé de formation des sondes polyfonctionnelles

Les azotures et les alcynes peuvent être utilisés dans des réactions de cycloaddition [3+2] pour former des triazoles stables. Cependant, cette réaction requiert des conditions de haute pression ou température pour former le produit voulu avec un bon rendement. La catalyse au cuivre (I) de ce type de réaction permet d'en accélérer la cinétique et a permis l'application de la CuAAC à la ligation de biomolécules par formation exclusive du triazole 1,4.[146] Il est à noter que l'utilisation de ligands du cuivre peut également contribuer à accélérer la cinétique de réaction ou à protéger le milieu biologique dans lequel

[146] Yang, M., Li, J., Chen, P. R. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6511-6526.

la réaction peut être effectuée des effets du cuivre.[147] Le mécanisme de cette réaction fait encore l'objet d'études à l'heure actuelle, les dernières études montrant l'existence d'un complexe bis cuivre (I)-alcyne.[148]

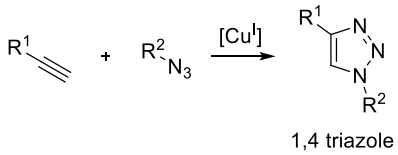


Figure 106 : Formation d'un triazole 1,4 par CuAAC.

La conception de sondes polyfonctionnelles basées sur le squelette de l'epicocconone utilisant la CuAAC a été étudiée par le Dr. Caroline Perraudeau au sein du laboratoire.[149]

La voie de synthèse des analogues de l'epicocconone présentée précédemment a été adaptée pour permettre l'introduction d'une chaîne alcyne terminal sur le squelette. Pour cela, l'anion de l'atratate de méthyle protégé **66** est piégé par le 10-undécénal **77**. L'ajout de DMPU est nécessaire pour désagréger les espèces lithiées en solution et permettre l'addition nucléophile de l'anion benzylique de **66** sur l'aldéhyde **77**. L'alcène terminal de la lactone **78** subit ensuite une ozonolyse réductrice afin de générer l'aldéhyde **79** qui est homologué en alcyne **80** *via* la réaction de Seyfert-Gilbert en présence du réactif d'Ohira-Bestmann. La réduction de la lactone **80** en lactol correspondant suivie de la désaromatisation oxydante à l'IBX conduit à l'alcool **81** avec un rendement global de 11% sur 5 étapes (Figure 107).

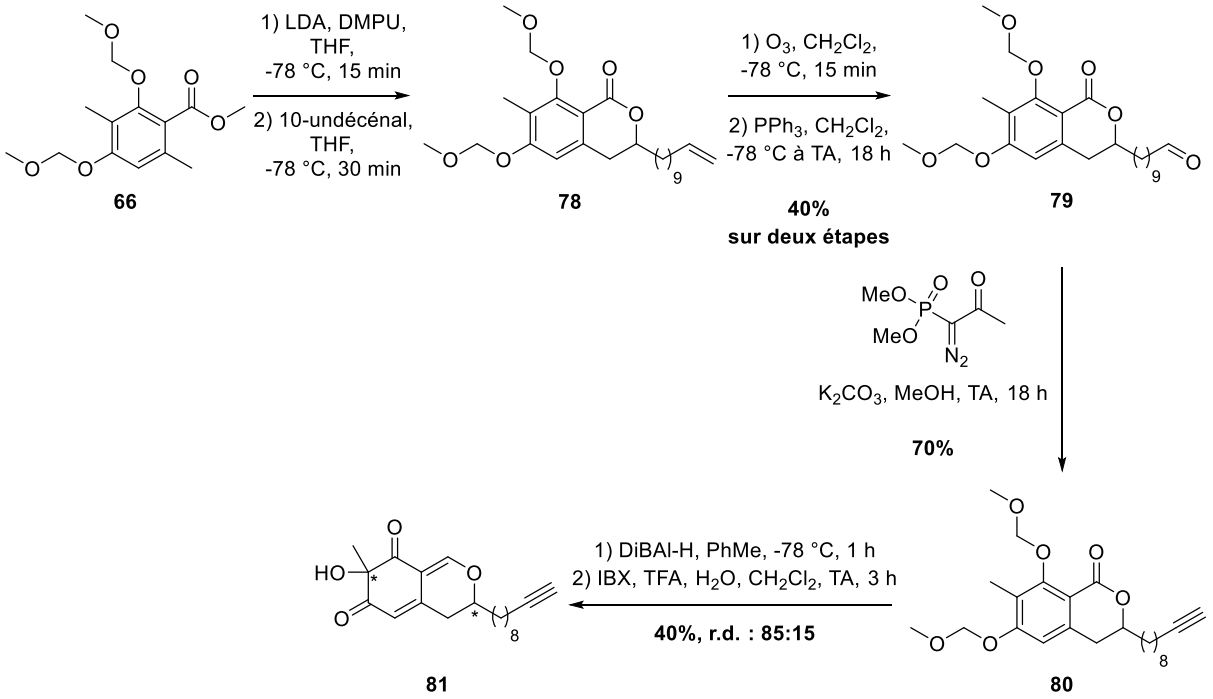


Figure 107 : Synthèse de l'alcool désaromatisé **81** possédant une fonction alcyne terminal.

L'étape d'acylfuranonisation avec la dioxinone **82** portant une chaîne latérale naphtyle permet d'obtenir l'analogue de l'epicocconone **83** qui peut être fonctionnalisé par CuAAC (Figure 108).

---

[147] Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.

[148] a) Worrell, B. T., Malik, J. A., Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*, 457-460. b) Jin, L., Tolentino, D. R., Melaimi, M., Bertrand, G. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, 1-5.

[149] Perraudeau, C. *Synthèse de sondes fluorescentes polyfonctionnelles basées sur le squelette du produit naturel epicocconone*, Université de Rouen, Thèse de doctorat soutenue en 2014.

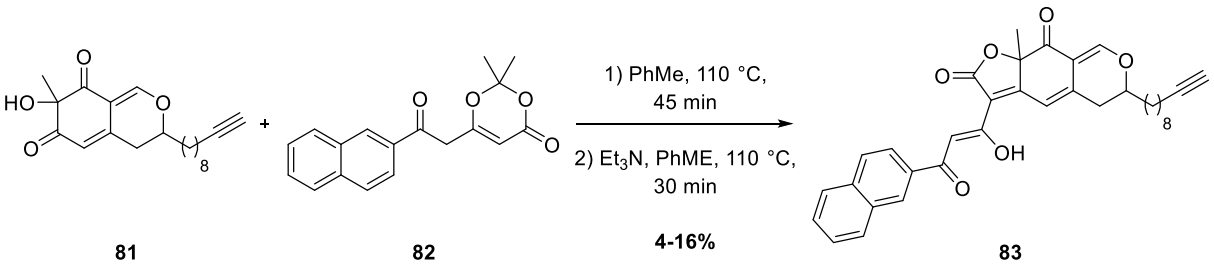


Figure 108 : Formation de l'analogue **83** fonctionnalisable par CuAAC.

Divers groupement azotures ont ensuite été préparés pour être utilisés en tant que partenaires pour la CuAAC et ont permis par exemple l'obtention d'une sonde bifonctionnelle **84** portant un motif biotine et d'une sonde trifonctionnelle **84'** portant en plus une N-homosérine lactone, connue pour être impliquée dans la communication bactérienne.[150]

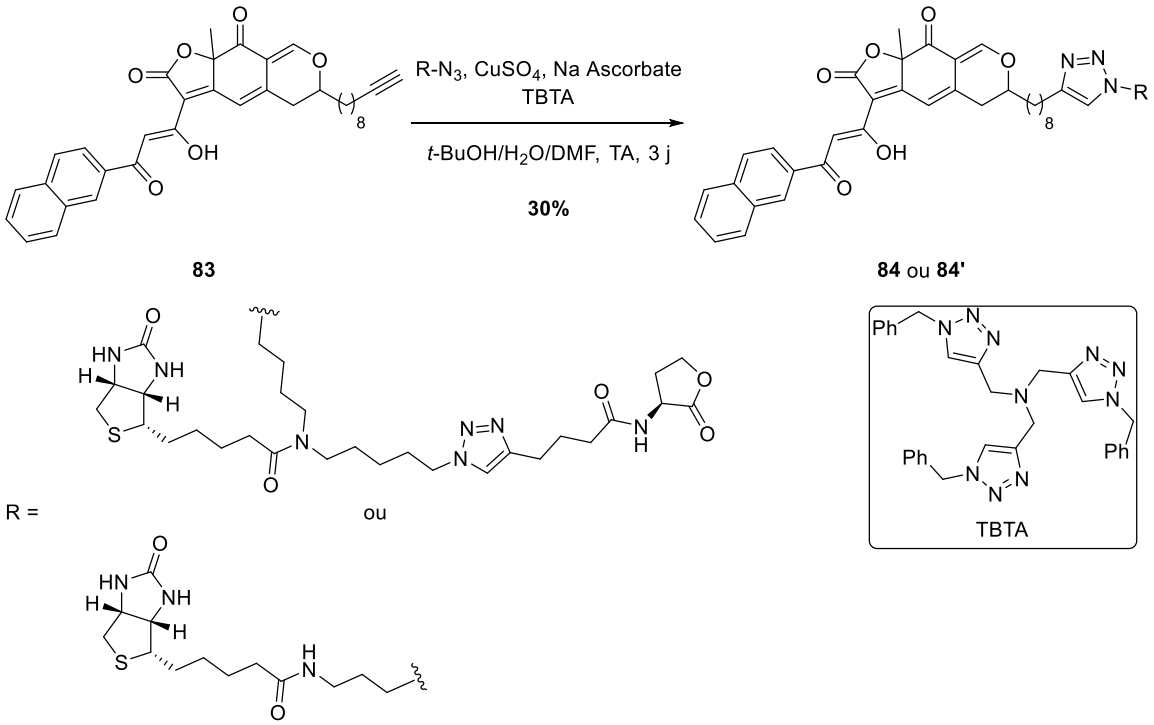


Figure 109 : Exemples de sondes bifonctionnelle et trifonctionnelle synthétisées au sein du laboratoire.

En dépit de leur fonctionnalisation importante, les sondes polyfonctionnelles comme **84** présentent les défauts relatifs au produit naturel **56** à cause de la monosubstitution du cycle dihydropyranique qui entraîne la formation d'une énaminone moins stable en présence d'amines et donc des intensités de fluorescence plus faibles que pour des analogues. De plus les réactions de CuAAC se sont révélées peu reproductibles et présentent des rendements faibles qui ne dépassent pas 30% au bout de trois jours.

[150] Chai, H., Hazawa, M., Shirai, N., Igarashi, J., Takahashi, K., Hosokawa, Y., Suga, H., Kashiwakura, I. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 157-163.

2 Présentation du projet

Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux qui ont abouti au développement des premières sondes polyfonctionnelles basées sur le squelette de l'epicocconone. La quaternarisation du carbone en position 2 est indispensable pour assurer une bonne stabilité de l'énaminone formée. Ce carbone pourrait être utilisé comme point de fonctionnalisation afin d'introduire des groupements azotures ou alcynes afin d'effectuer la réaction de CuAAC (Figure 110, structure **85**).

De plus, l'introduction de ces groupements peut également se faire sur la chaîne latérale aromatique de la dioxinone *via* l'utilisation d'un motif fluorène facilement fonctionnalisable (Figure 110, structure **86**). L'avantage de telles structures est la possibilité d'introduire à façon les groupes azotures ou alcynes, à la différence de l'analogue **83** où l'alcyne terminal est imposé dès le début de la synthèse.

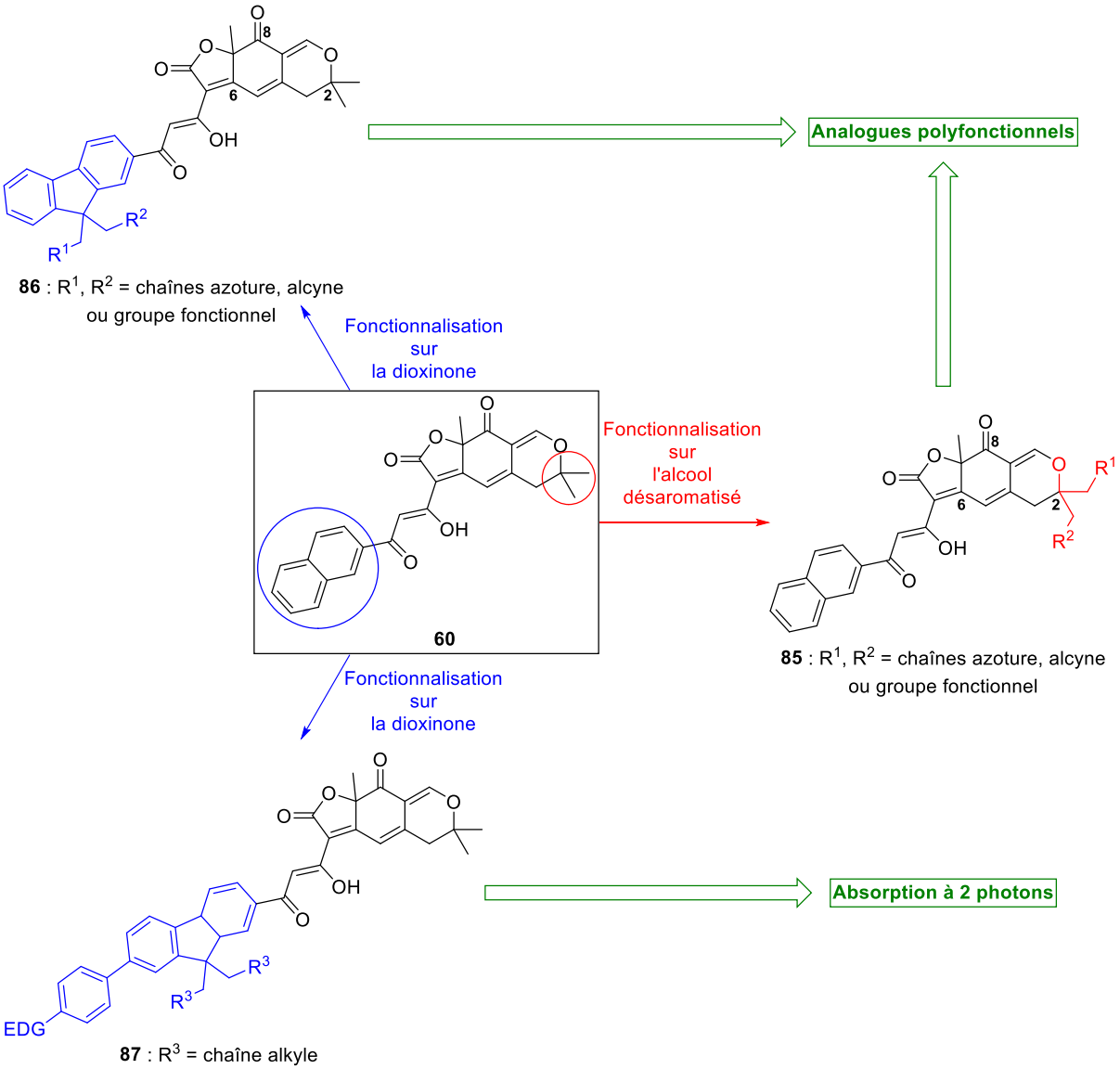


Figure 110 : Structures générales des analogues polyfonctionnels envisagés **85** et **86** et de l'analogue **87**, optimisé pour l'absorption bi-photonique.

La présence d'un noyau fluorène sur les analogues de l'epicocconone permet également d'envisager d'étudier des propriétés d'absorption à deux photons *via* l'introduction de groupements donneurs

d'électrons. Des résultats concluants dans ce domaine ont par ailleurs déjà été obtenus sur l'analogue naphtyle **60** (Figure 110, structure **87**).[151]

3 Résultats et discussion

3.1 Synthèse de nouveaux analogues de l'epicocconone fonctionnalisables par CuAAC

Comme présenté en introduction de cette partie, le point de fonctionnalisation peut être introduit sur le cycle dihydropyranique de l'analogue ou sur le motif dioxinone. Suivant ce choix, la synthèse de l'alcool désaromatisé ou de la dioxinone correspondante sera modifiée.

3.1.1 Introduction du point de fonctionnalisation sur l'alcool désaromatisé

La première stratégie étudiée ici est l'introduction des groupements azotures ou alcynes sur le cycle dihydropyranique des analogues, donc sur l'alcool désaromatisé.

3.1.1.1 Utilisation des 4-pipéridones comme point de fonctionnalisation

Les 4-pipéridones **88** ont été envisagées pour la synthèse de nouveaux alcools désaromatisés fonctionnalisés **90** puisqu'elles possèdent une fonction carbonyle qui peut piéger l'anion benzylique de l'atratate de méthyle **66** et un atome d'azote pouvant être dérivé sous forme d'amide par exemple.

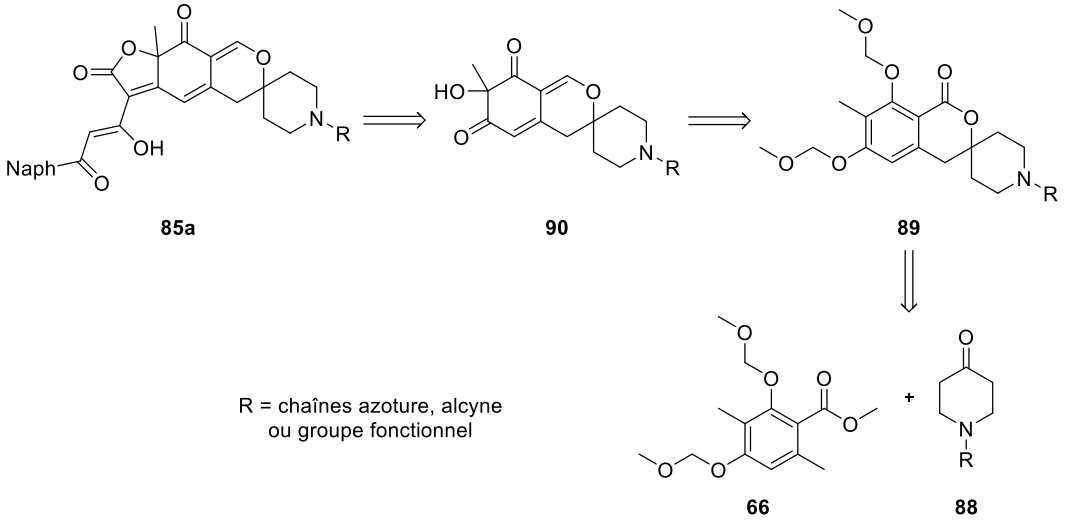
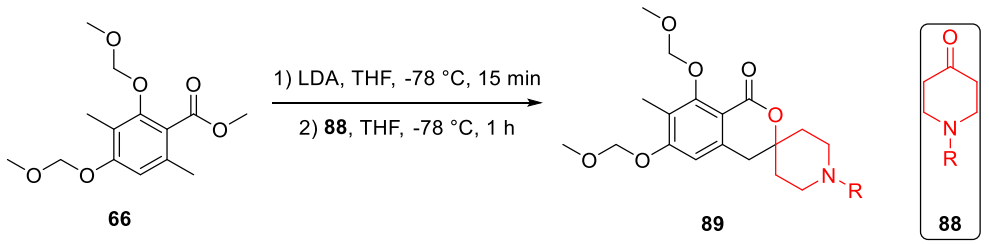


Figure 111 : Rétrosynthèse de l'analogue **85a** *via* l'alcool désaromatisé **90**.

Plusieurs lactones **89** ont pu être synthétisées en utilisant des 4-pipéridones fonctionnalisées différemment, avec des rendements allant de 35 à 65% (Figure 112).

[151] Schapman, D., Perraudeau, C., Benard, M., Gallavardin, T., Boulangé, A., Leleu, S., Lebon, A., Franck, X., Galas, L. *Dyes Pigm.* **2017**, *141*, 394-405.



Lactones avec groupement R = alkyle	Lactones avec groupement R = acyle
89b, R = Bn, **64%**	**89a**, R = Boc, **40%**
89c, R = PMB, **65%**	**89e**, R = $COCH_2Cl$, **n.d.**
89d, R = CH_2Ph_2, **36%**	**89f**, R = $COCH_2N_3$, **n.d.**
89g, R = CH_2PhBr, **34%**	**89h**, R = $CO(CH_2)_3C{\equiv}CTMS$, **37%**

Figure 112 : Synthèses des lactones **89**.

Les lactones **89a** et **89c** ont été synthétisées afin d'étudier la possible introduction des chaînes azoture ou alcyne après l'étape de désaromatisation oxydante, durant laquelle une déprotection de ces groupes devrait se produire. La lactone **89g** a quant à elle été préparée dans l'optique d'une fonctionnalisation *via* un couplage pallado-catalysée.

La réaction de formation de ces lactones ne fonctionne pas lorsque des 4-pipéridones portant des fonctions chloroacétamide (pipéridone **88e**) ou azidoacétamide (pipéridone **88f**) sont utilisées directement. Il est en revanche possible d'introduire directement une chaîne alcyne protégée sur la lactone (composé **89h**) avec un rendement de 37%. Il est également à noter que l'utilisation d'un groupement protecteur très encombré tel que le diphénylméthane provoque une chute importante du rendement (64% pour le benzyle contre 34% pour le diphénylméthane).

L'obtention du composé **89f** possédant un groupe azoture requiert une fonctionnalisation postérieure à l'étape de formation du noyau lactone. Pour cela, l'anion benzylique de l'atratate **66** est piégé par la pipéridone **88b** possédant un groupement benzyle avec rendement de **64%**. L'hydrogénolyse de ce groupement et l'addition nucléophile de l'amine formée sur le chlorure de chloroacétyle permet d'obtenir premièrement la lactone **89e** avec 60% de rendement sur ces deux étapes. La substitution de l'atome de chlore en présence d'azoture de sodium conduit ensuite au composé désiré **89f** (Figure 113).

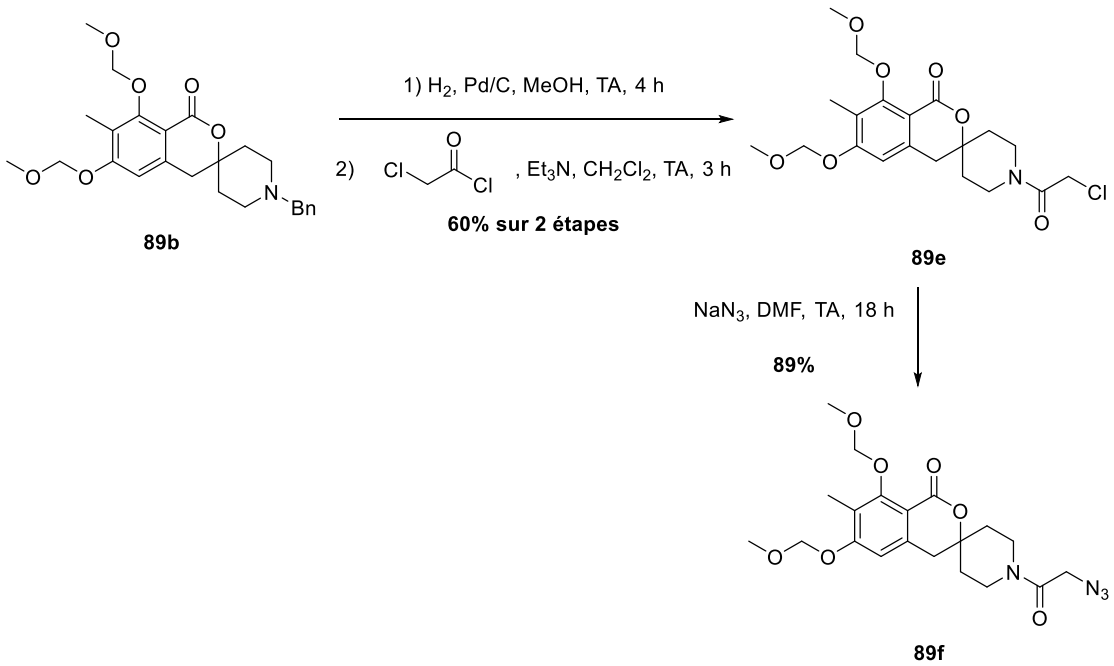


Figure 113 : Obtention des lactones **89e** et **89f** à partir de la lactone **89b**.

Certaines de ces lactones ont ensuite été engagées dans la séquence réactionnelle de réduction puis désaromatisation oxydante. Cependant aucun alcool désaromatisé correspondant n'a pu être isolé (Figure 114).

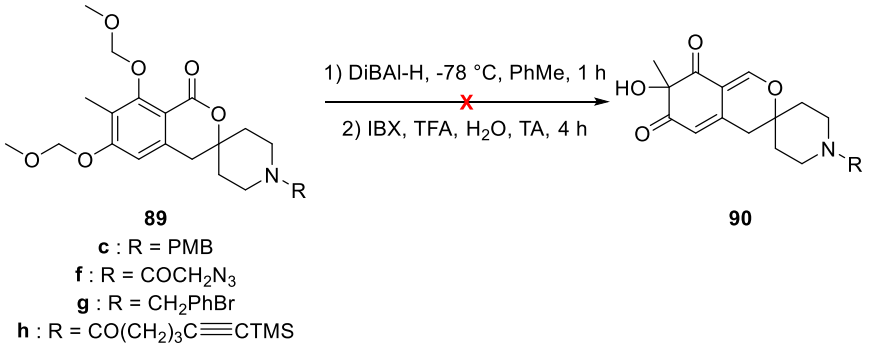


Figure 114 : Essais de réduction puis de désaromatisation oxydante sur les lactones **89**.

Afin de comprendre l'origine de ces échecs, le motif 4-pipéridone a été modélisé à l'aide de la cyclohexanone. L'alcool désaromatisé **91** a cette fois été obtenu avec un rendement de 44% sur 4 étapes et l'analogue **92** a été obtenu avec 18% de rendement en utilisant la dioxinone naphtyle **82** (Figure 115).

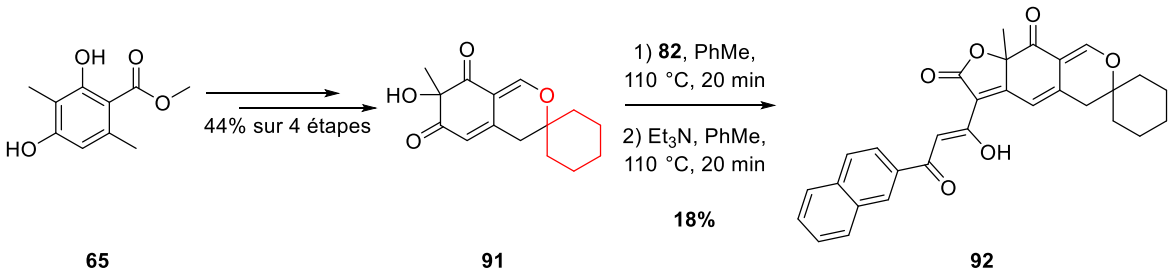
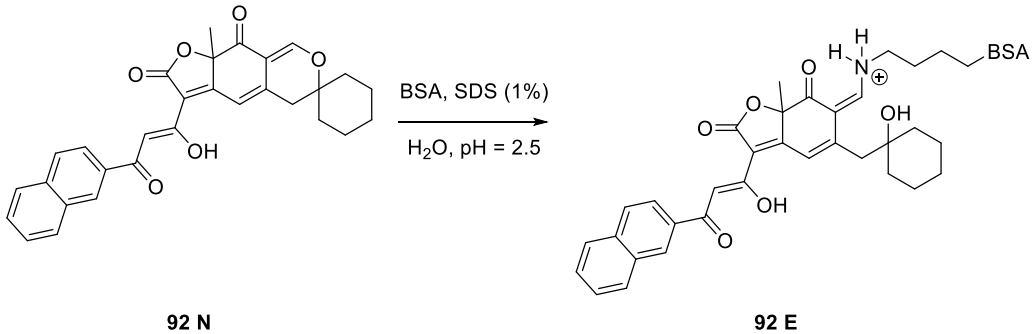


Figure 115 : Synthèse de l'analogue modèle **92**.

Les propriétés spectrales de cet analogue modèle **92** ont pu être évaluée. Les spectres d'absorption et d'émission du composé **92** seul (**92 N**) et en présence de BSA (**92 E**) sont présentées ci-après (Figure 116).



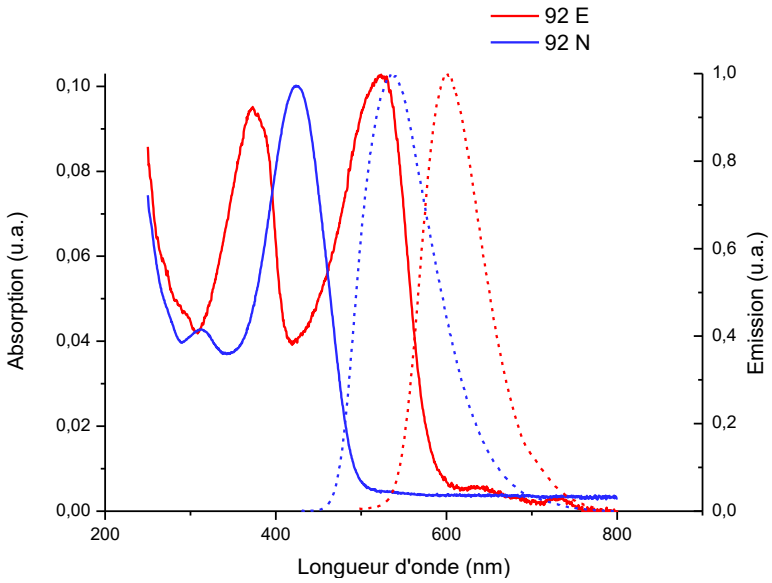


Figure 116 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) de l'analogue **92** natif (N, courbes bleues) et énaminone (E, courbes rouges) dans l'eau/SDS.

Les grandeurs clés obtenues ont également pu être comparée à celle de l'analogue naphtyle **60**, étant données les faibles différences structurales avec celui-ci, des propriétés similaires étaient attendues pour le composé **92** (Tableau 3).

Composé	λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
92 N	424	536	112 nm, 4928 cm^{-1}	10400	0.31
92 E	374, 523	601	78 nm, 2482 cm^{-1}	11300	0.20
60 N	308, 435	538	103 nm, 4401 cm^{-1}	39200	0.20
60 E	372, 518	613	95 nm, 2992 cm^{-1}	18400	0.21
Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Tableau 3 : Comparaison des propriétés spectrales de l'analogue **92** avec l'analogue naphtyle **60**.

Ces résultats encourageants en termes de synthèse et de propriétés spectrales sur le composé **92** ont amené la conclusion suivante : le motif 4-pipéridone ne différant que peu du motif cyclohexanone, les échecs observés à l'étape de désaromatisation oxydante sont probablement dus à la présence de l'atome d'azote, que celui-ci soit engagé dans une liaison amine (composés **90c** et **90g**) ou amide (composés **90f** et **90h**).

La stratégie consistant à introduire les groupes de CuAAC sur l'alcool désaromatisé peut toujours être envisagée en utilisant une cétone acyclique portant ces groupes. Selon cette approche qui mime de plus près la synthèse de l'alcool désaromatisé **61**, qui utilise l'acétone, il a été envisagé d'utiliser des dérivés de 1,3-dihydroxyacétones.

3.1.1.2 Synthèse d'analogues via l'addition nucléophile de l'atratate de méthyle sur les 1,3-dihydroxyacétones

L'utilisation des 1,3-dihydroxyacétones en tant qu'électrophiles dans la synthèse de l'alcool désaromatisé est très avantageux puisqu'il est possible d'incorporer deux groupes fonctionnalisables par CuAAC très rapidement après avoir formé le motif lactone par addition nucléophile de l'atratate de méthyle **66**. La rétrosynthèse ci-dessous peut être envisagée (Figure 117).

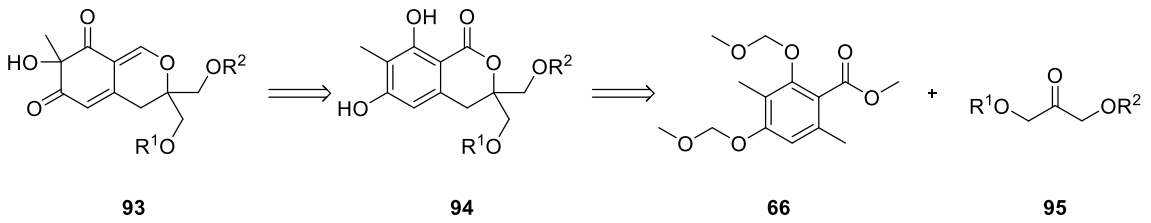


Figure 117 : Analyse rétrosynthétique de l'alcool désaromatisé **93**.

L'alcool désaromatisé **93** peut ainsi être obtenu *via* une séquence de réduction et désaromatisation oxydante de la lactone **94**, elle-même obtenue par addition nucléophile de l'atratate de méthyle **68** sur la 1,3-dihydroxyacétone **95**. De plus des groupements R^1 et R^2 identiques ou différents peuvent être introduits sur le composé **95**.

Dans le sens de la synthèse, il a été envisagé dans un premier temps l'emploi de 1,3-dihydroxyacétones dont les deux alcools sont protégés par des groupements de type acétate **95a**, acétonide **95b**, *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) **95c**, *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) **95d**. Ces groupes protecteurs sont susceptibles de se cliver de manière plus ou moins facile en milieu acide, permettant leur déprotection par le TFA lors de l'étape de désaromatisation oxydante.

Le composé **95b** est obtenu en deux étapes, avec 33% de rendement, à partir de l'aminotriol **96**[152] : dans un premier temps, la protection du 1,3 diol en présence de 2,2 diméthoxypropane sous catalyse acide par l'acide para-toluènesulfonique (APTS) conduit à l'acétonide intermédiaire **97** ; La coupure oxydante du motif α-aminoalcool en présence de periodate de sodium conduit ensuite à la 1,3dihydroxyacétone protégée **95b** (Figure 118).

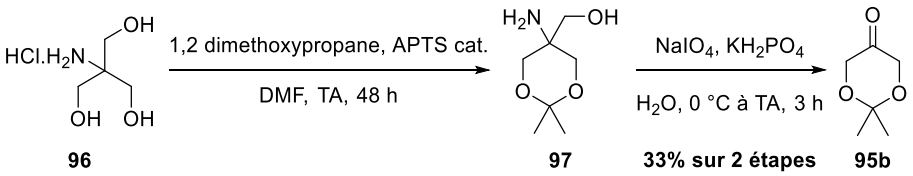


Figure 118 : Synthèse de la 1,3-dihydroxyacétone **95b**.

Les autres composés protégés sont préparés à partir du dimère de dihydroxyacétone commercial **98** en une seule étape avec des rendements allant de 37% pour le composé **95a** à quantitatif pour les dérivés silylés **95c** et **95d** (Figure 119).

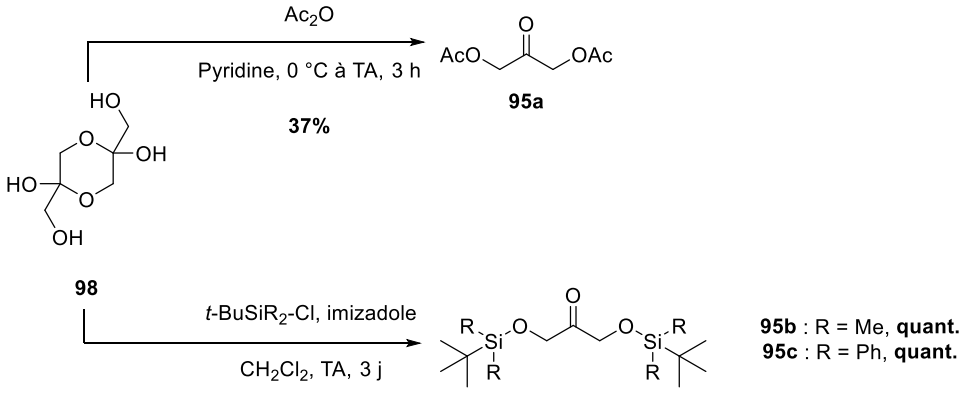
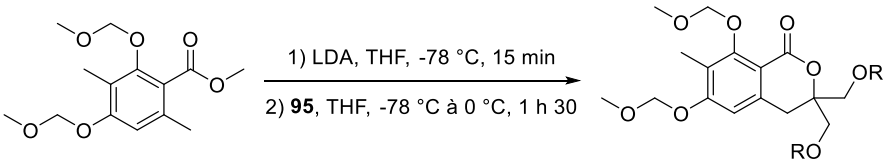


Figure 119 : Synthèses des 1,3-dihydroxyacétones **95a**, **95c** et **95d**.

[152] Fanton, J., Camps, F., Castillo, J. A., Guérard-Hélaine, C., Lemaire, M., Charmantray, F., Hecquet, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 203-210.

Une fois ces quatre cétones en main, la formation des lactones **94** par addition nucléophile de l'anion benzylique de l'atratate de méthyle **66** a pu être étudiée. La lactone **94b**, possédant le groupement acétonide est obtenue avec un rendement de 55% analogue à celui observé avec l'acétone (60%), cependant des conversions et des rendements isolés faibles voire nuls sont obtenus pour les autres dérivés. Ainsi la lactone **94a** n'est pas détectée, celle possédant les groupes TBDMS **94c** est isolée avec un rendement de 16% et le composé **94d**, inséparable par chromatographie de la cétone **95d**, est formé avec une conversion estimée en RMN ^{1}H à 18% (Figure 120).



66 94

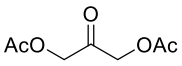
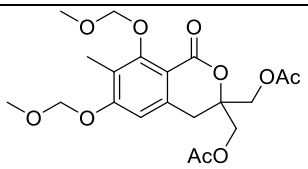
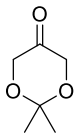
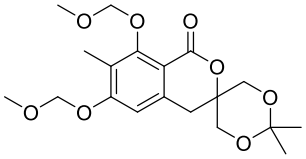
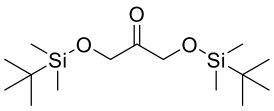
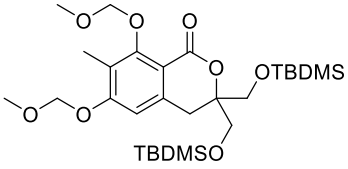
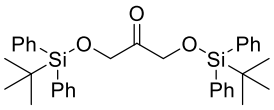
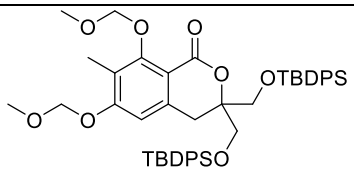
Entrée	Cétone 95	Lactone 94
a		 **n.d.**
b		 **55%**
c		 **16%**
d		 **18% de conversion**

Figure 120 : Addition nucléophile de l'atratate de méthyle **68** sur les 1,3-dihydroxyacétones protégées **95**.

La réactivité particulière de l'anion de l'atratate **66'** a pu être mise en évidence lors de ces réactions en présence des cétones encombrées **95b**, **95c** et **95d**. En effet l'emploi des conditions classiques du laboratoire n'a pas permis dans ces cas d'observer la formation des lactones **94**. Si le milieu réactionnel est maintenu à -78 °C, il est possible d'isoler le produit non cyclisé **100** issu de la protonation de l'alcoolate **99**. En effet, à -78 °C, l'alcoolate est certainement présent sous une forme **99a** où les contraintes stériques induites par les groupements de la dihydroxyacétone sont minimisées, sous cette conformation la cyclisation n'est pas possible de par les positions relatives de l'ester et de l'alcoolate. Un retour à 0 °C permet d'apporter suffisamment d'énergie pour placer l'alcoolate et l'ester dans une conformation favorable à la cyclisation sous la forme **99b** et conduire à la lactone **94** correspondante (Figure 121).

Des études précédentes au laboratoire ont cependant montré que la stabilité de l'anion benzylique de **66** à une température supérieure à -50 °C est quasi nulle. Le cumul de l'effet de l'encombrement induit par les groupes protecteurs avec les conditions de stabilité nécessaire à l'existence de l'anion **66'**

permettent certainement d'expliquer les faibles conversions observées. Ces observations liées à l'encombrement des carbonyles dans cette réaction sont à mettre en perspective avec les résultats obtenus dans la synthèse de l'analogue modèle **92** où la cyclohexanone, de structure proche du composé **95b**, a été utilisée et où aucun problème de formation de la lactone n'est survenu.

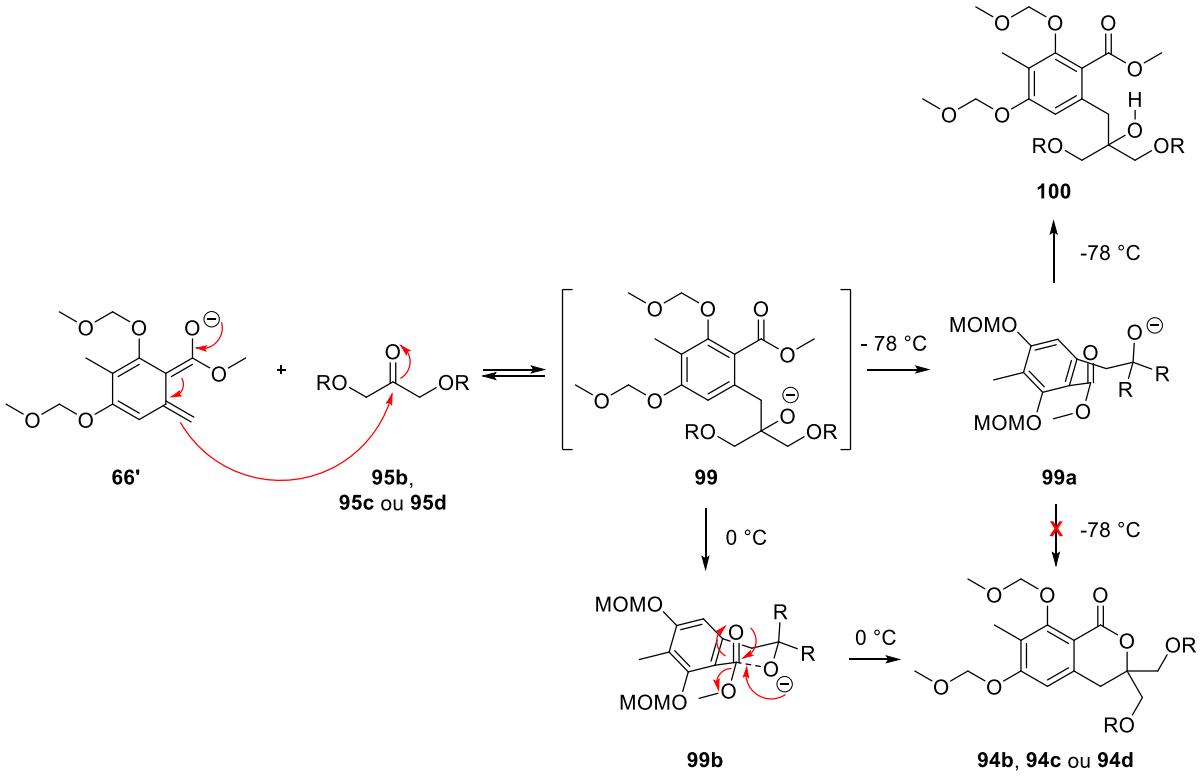


Figure 121 : Formation de l'intermédiaire acyclique **100** lors de l'addition nucléophile de l'anion **68'** sur une cétone encombrée **95b**, **95c** ou **95d**.

Malgré les faibles rendements pour les lactones silylées **94c** et **94d**, celles-ci ont été testées tout comme la lactone **94b** en séquence de réduction puis désaromatisation oxydante. Aucun de de ces trois composés n'a conduit à l'alcool désaromatisé **101** correspondant, ce qui peut être attribué à des réactions secondaires d'oxydation sur les alcools primaires déprotégés par le TFA durant l'étape de désaromatisation oxydante ou à une trop grande polarité de ce composé qui empêche sa récupération lors de l'extraction de la phase aqueuse (Figure 122).

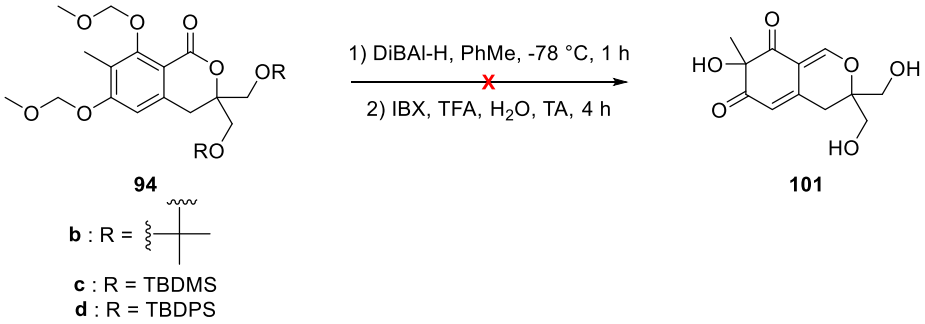


Figure 122 : Essais de réduction et désaromatisation oxydante sur les lactones **94b**, **94c** et **94d**.

Ces résultats négatifs impliquent donc qu'il faut introduire en amont de l'étape de désaromatisation le ou les groupements alcynes (le groupement azoture n'est pas compatible avec les conditions de formation des lactones comme illustré dans la partie 3.1.1.1, Figure 112). Dans ce cadre la stratégie employant les 1,3-dihydroxyacétones reste pertinente même si les carbones acétyléniques doivent être protégés. Le choix d'un groupement silylé acido-labile pouvant se déprotéger dans les conditions de désaromatisation reste ici intéressant.

L'addition nucléophile d'un alcool propargylique **102** sur l'épichlorhydrine **103** permet d'accéder, suivant les conditions opératoires, à l'époxyde **104**[153] ou au triol fonctionnalisé **105**[154]. Cette dualité permet d'envisager des dérivés de 1,3-dihydroxyacétone symétriques qui seraient obtenus à partir du composé **105** mais aussi asymétriques, obtenus par ouverture de l'époxyde **104** par un autre alcool (Figure 123).

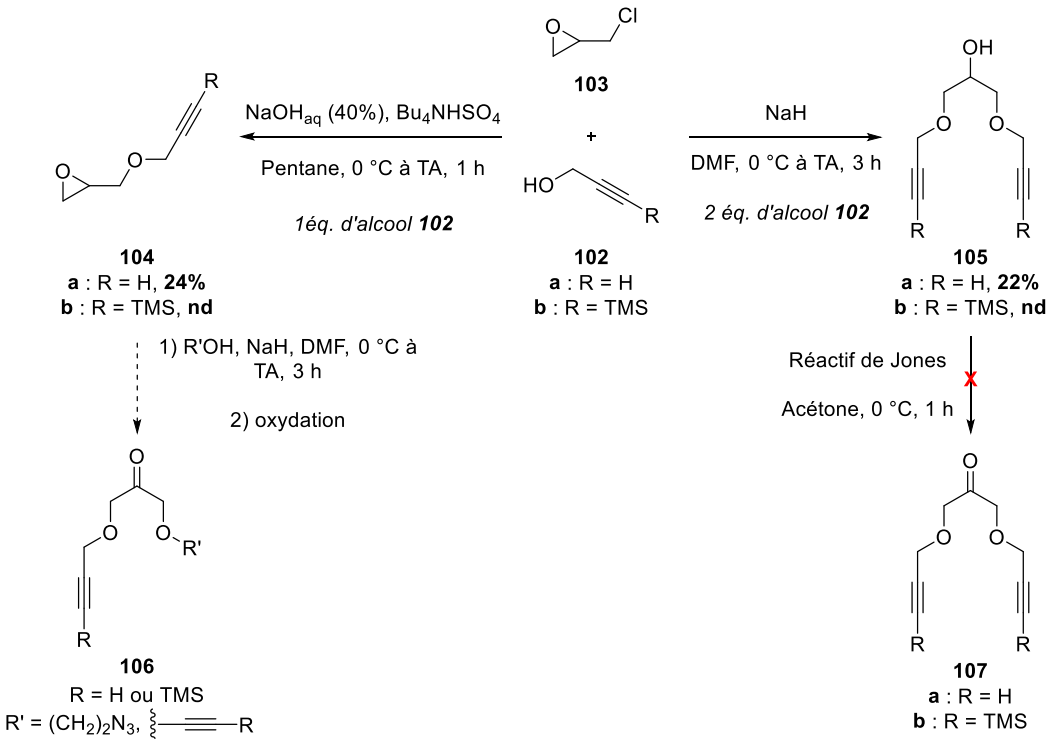


Figure 123 : Voie de synthèse vers des 1,3-dihydroxyacétones symétriques **107** et dissymétriques **106**.

Cependant, si l'alcool propargylique **102a** donne dans les deux cas le produit d'addition nucléophile attendu **104** ou **105**, la réaction avec son homologue silylé **102b** ne fonctionne plus et les réactifs de départ son récupérés dans chaque cas. De plus la réaction de formation de l'alcool **105a** se révèle peu reproductible, tout particulièrement sur une échelle importante. L'oxydation de la fonction alcool secondaire du composé **105a** n'a d'ailleurs pas permis d'accéder à la dihydroxyacétone **107a**. L'échec de la formation de l'époxyde **104b** peut certainement être attribué aux conditions basiques aqueuses nécessaire à la réaction et connues pour déprotéger les carbones acétyléniques silylés sur des temps néanmoins plus longs (plusieurs heures).[155]

L'ensemble des résultats négatifs obtenus avec les 1,3-dihydroxyacétones protégées ainsi que la complexité de la synthèse nécessaire à l'obtention seule du partenaire cétone font douter de la viabilité de cette stratégie pour l'obtention de la lactone fonctionnalisée **93**. De plus à la vue des échecs en désaromatisation oxydante des composés protégés, des travaux plus persévérants pour l'obtention de lactones **94** fonctionnalisées ne permettent pas d'assurer l'obtention de l'alcool désaromatisé correspondant, indispensable pour la suite du travail.

[153] Barnes, J. C., Ehrlich, D. J. C., Gao, A. X., Leibfarth, F. A., Jiang, Y., Zhou, E., Jamison, T. F., Johnson, J. A. *Nat Chem* **2015**, *7*, 810-815.

[154] Tyagi, M., Taxak, N., Bharatam, P. V., Kartha, K. P. R. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 11366-11371.

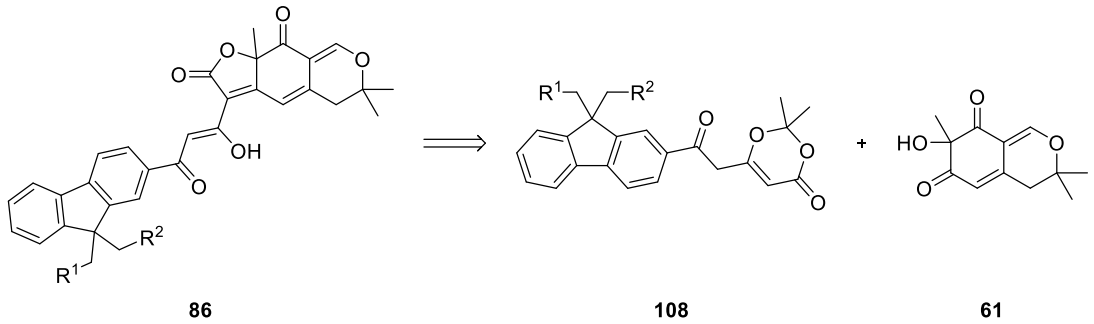
[155] Alabugin, I. V., Timokhin, V. I., Abrams, J. N., Manoharan, M., Abrams, R., Ghiviriga, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10984-10995.

3.1.1.3 Conclusion sur la stratégie de fonctionnalisation de l'alcool désaromatisé pour la CuAAC

Malgré un début de synthèse prometteur et l'obtention d'un analogue modèle **92**, la stratégie fonctionnalisation de l'alcool désaromatisé, calquée sur les travaux antérieurs au laboratoire (voir partie 1.2.2), est jalonnée de difficultés synthétiques pour l'obtention de la lactone ou pour la formation de l'alcool désaromatisé. Il importait ici de pouvoir former un alcool désaromatisé fonctionnalisable avec un nombre d'étape comparable à celui de l'alcool **91**, aux étapes d'introduction des groupes alcynes ou azotures près. Etant donné l'impossibilité d'obtenir cet alcool désaromatisé à partir des 4-pipéridones, le nombre important d'étapes de synthèse et les difficultés à former des lactones en utilisant les 1,3-dihydroxyacétones, la stratégie développée dans cette partie est pour l'heure abandonnée. Dans la suite de ce manuscrit, l'utilisation de l'alcool désaromatisé **61** a été préférée et les efforts de synthèse ont été concentrés sur la fonctionnalisation du partenaire dioxinone en introduisant les fonctionnalités sur un motif aromatique tel que le fluorène.

3.1.2 Introduction du point de fonctionnalisation sur la dioxinone

Comme développé en introduction de cette partie, la stratégie de fonctionnalisation de la dioxinone repose sur l'utilisation d'un motif fluorène, celui-ci possède en effet deux protons faiblement acides (pKa = 22.3 dans le DMSO).[156] Des réactions d'alkylations sont donc envisageables pour l'introduction des groupements azotures et alcynes sur ce noyau (Figure 124).



R^1, R^2 = groupement azoture ou alcyne

Figure 124 : Rappel de la structure de l'analogue cible **86** et de ses deux précurseurs que sont l'alcool désaromatisé **61** et la dioxinone **108**.

Dans le but de valider le choix de ce noyau aromatique inédit dans la synthèse des dioxinones et surtout de vérifier les propriétés spectrales des analogues correspondants, la synthèse d'un analogue modèle a été envisagée en alkylant le noyau fluorène avec 2 chaînes méthyle.

La synthèse envisagée pour le partenaire dioxinone utilise les mêmes étapes clés que celles précédemment évoquées (passage par un acide activé puis addition nucléophile de l'anion de la méthyle dioxinone **65**). L'alkylation par l'iodure de méthyle du 2-bromofluorène commercial **109** en présence de *tert*-butylate de potassium (*t*-BuOK) conduit au dérivé diméthylé correspondant **110** avec un rendement de 90%. L'acide **111** obtenu par échange brome-lithium en présence de *n*-butyllithium puis par piégeage carboxylant, a été activé par le 1H-benzotriazole **74** pour donner l'acyl-benzotriazole **112** avec un rendement global de 52% sur ces trois étapes. La dioxinone **113** est obtenue avec 40% de rendement par addition nucléophile de la méthyle dioxinone **65** sur l'acide activé **112** selon les conditions classiques développées au laboratoire utilisant le LiHMDS comme base. Finalement la réaction d'acylfuranonisation réalisée entre les partenaires alcool **61** et dioxinone **113** conduit à l'analogue **114** avec un rendement global et non optimisé de 4% sur 5 étapes (Figure 125).

[156] Bordwell, F. G. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456-463.

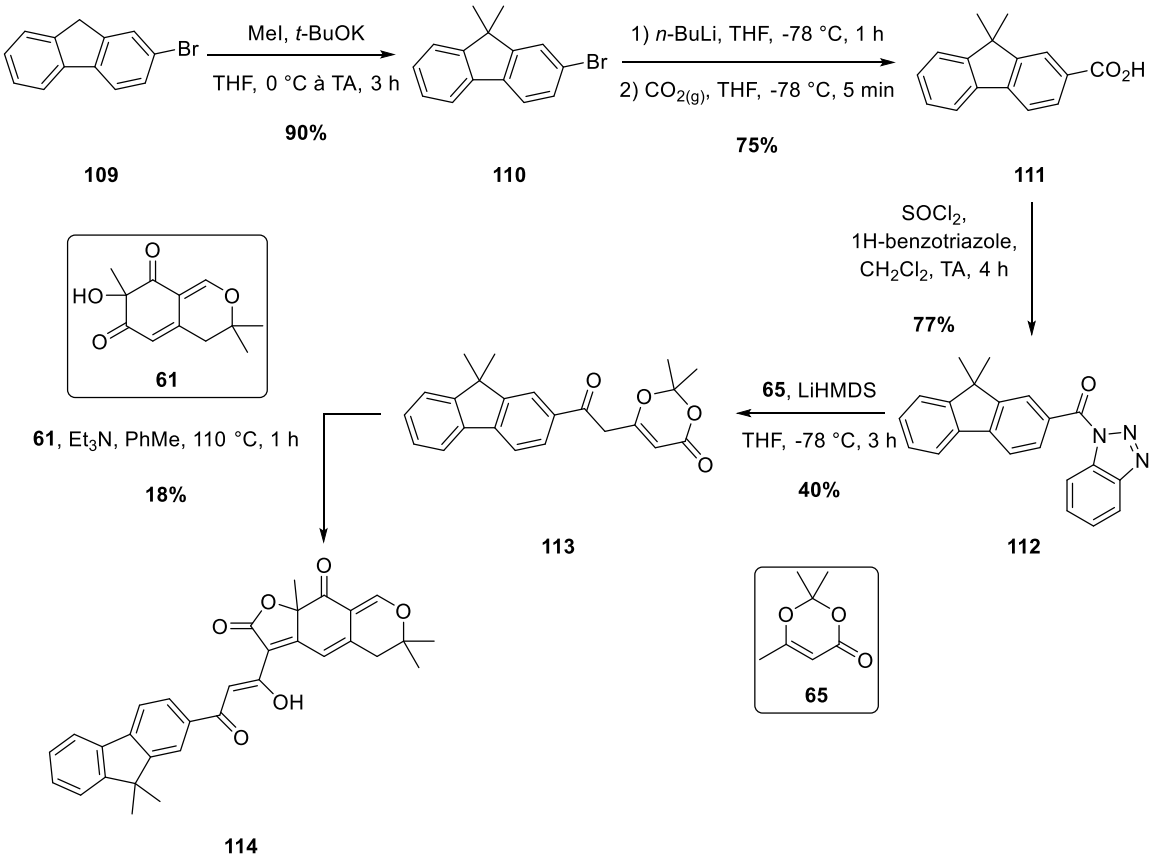
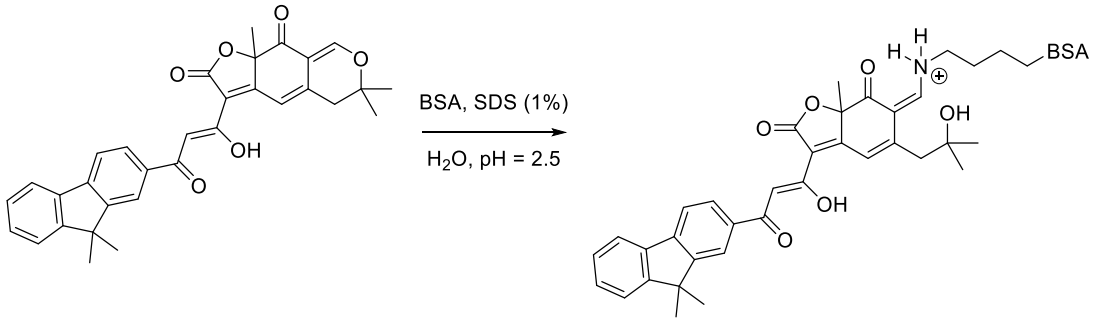


Figure 125 : Synthèse de l'analogue fluorène **114**.

Une fois la synthèse validée, les propriétés spectrales de l'analogue **114** ont été évaluées dans les conditions déjà évoquées précédemment. Elles sont résumées ci-après (Figure 126 et Tableau 4).



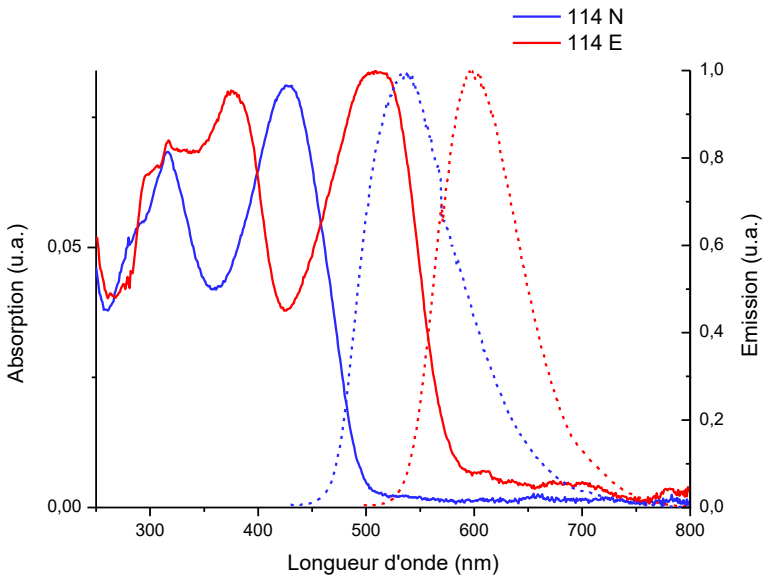


Figure 126 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) de l'analogue **114** sous forme native (N, courbes bleues) et énaminone (E, courbes rouges) dans l'eau/SDS.

Composé	λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
114 N	315, 427	536	109 nm, 4762 cm^{-1}	10800	0.12
114 E	378, 509	597	88 nm, 2896 cm^{-1}	15900	0.17
60 N	308, 435	538	103 nm, 4401 cm^{-1}	39200	0.20
60 E	372, 518	613	95 nm, 2992 cm^{-1}	18400	0.21
Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

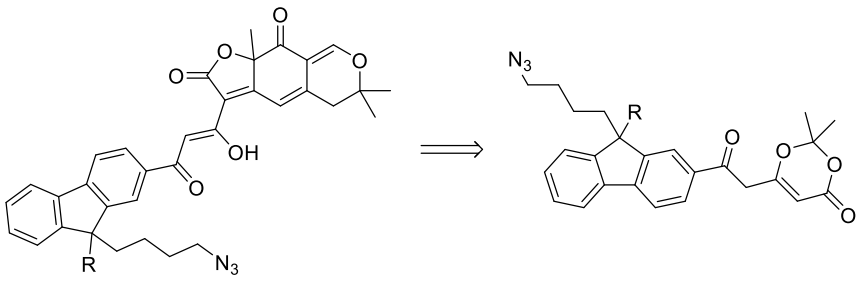
Tableau 4 : Propriétés spectrales de l'analogue **114** comparées à l'analogue naphtyle **60**.

Il est intéressant de noter ici que contrairement aux analogues présentés précédemment au laboratoire, l'analogue fluorène **114** est moins fluorescent à l'état natif (première ligne du tableau) que sous forme énaminone (deuxième ligne du tableau). Cette propriété est très intéressante dans la mesure où l'epicocconone **56** est elle aussi très peu fluorescente sous forme native. Cependant les rendements quantiques de fluorescence de l'analogue **114** sont légèrement inférieurs à ceux de l'analogue naphtyle **60**, néanmoins ces résultats préliminaires encouragent l'étude du noyau fluorène pour la conception d'analogue de l'epicocconone.

Le travail de synthèse développé ci-après sera articulé autour de la synthèse de partenaires dioxinones possédant un noyau fluorène conduisant à des analogues fonctionnalisables par CuAAC, donc portant des fonctions azotures ou alcynes.

3.1.2.1 Synthèses de dioxinones portant des fonctions azotures ou alcynes – utilisation du noyau fluorène

Etant donné que le fluorène possède deux protons acides, la préparation d'analogues possédant un ou deux groupements réactifs en CuAAC est envisageable. Les efforts de synthèses ont été concentrés sur la préparation de deux analogues **115** et **116** et donc des dioxinones correspondantes **117** et **118** (Figure 127).

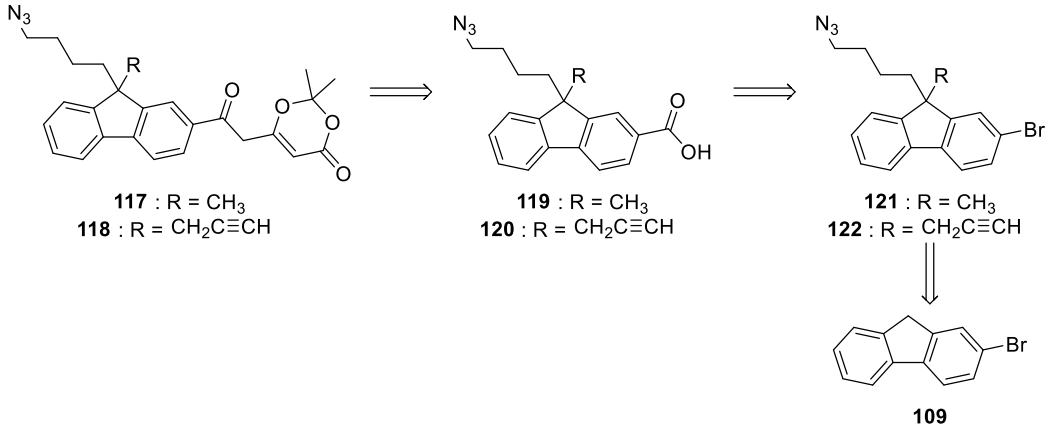


115 : R = CH_3
116 : R = $CH_2C{\equiv}CH$

117 : R = CH_3
118 : R = $CH_2C{\equiv}CH$

Figure 127 : Structures des analogues envisagés **115** et **116** ainsi que des dioxinones correspondantes **117** et **118**.

La synthèse des dioxinones **117** et **118** peut être envisagée de deux manières. Il est en effet possible de reprendre la même voie de synthèse que pour l'analogue **114**, donc d'utiliser le 2-bromofluorène **109** comme réactif de départ et d'introduire l'acide carboxylique sur le fluorène *via* un échange brome-lithium (Figure 128).



117 : R = CH_3
118 : R = $CH_2C{\equiv}CH$

119 : R = CH_3
120 : R = $CH_2C{\equiv}CH$

121 : R = CH_3
122 : R = $CH_2C{\equiv}CH$

109

Figure 128 : Stratégie de synthèse pour l'obtention des dioxinones **117** et **118**.

La première stratégie considérée utilise la voie de synthèse développée pour l'analogue **114** commençant par l'alkylation séquentielle du 2-bromofluorène **109** par le bromure de propargyle **127** puis l'azoture de 1-bromobutyle **129**, en présence de LDA, conduisant au dérivé di-substitué **122** avec un rendement global de 27% sur ces deux étapes. Cette deuxième alkylation peut être réalisée sans protection de l'alcyne terminal mais deux équivalents de LDA sont alors nécessaires. Des essais de réaction « one-pot » où les deux étapes d'alkylation sont réalisées par ajout successifs des deux électrophiles n'ont pas permis d'isoler le composé **122** de manière satisfaisante. Cependant la réaction d'échange lithium-brome en présence de *n*-butyllithium suivie de la carboxylation par le CO_2 ne forment l'acide **120** mais conduisent à la dégradation du composé **122** en un mélange complexe de produits non identifiés. Des tentatives de protection de l'alcyne terminal du dérivé **122**, considéré comme le principal suspect dans les échecs de formation de l'acide **120**, par un groupement triméthylsilyle n'ont pas conduit à des résultats satisfaisants pour poursuivre la synthèse avec cette voie. (Figure 129).

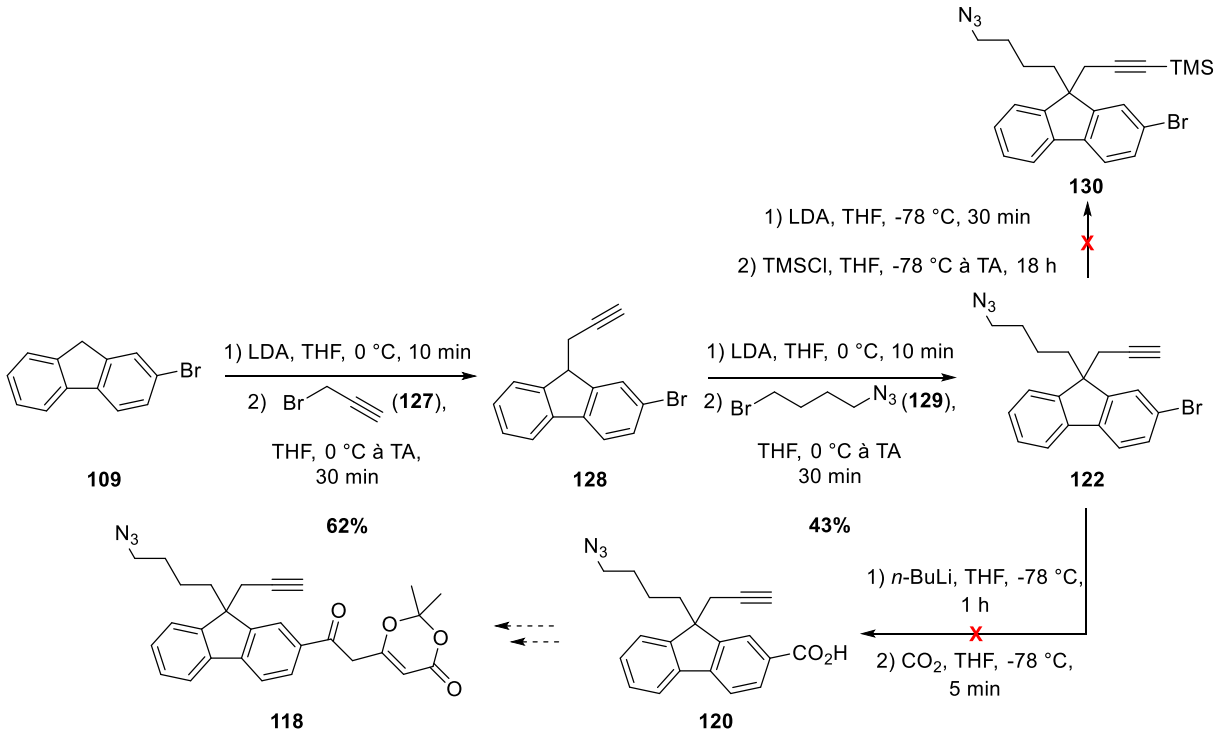


Figure 129 : Première stratégie de synthèse de la dioxinone **118**.

Malgré l'échec de cette première stratégie, il a pu être vérifié expérimentalement que les chaînes azoture et alcyne ne pouvaient réagir spontanément un triazole par cycloaddition de Huisgen en condition thermique[157], ce qui pouvait se produire lors de la formation de l'acylcétène à partir de la dioxinone **118**. En effet, les longueurs de chaînes ont été choisies afin de défavoriser les réactions de cycloaddition intramoléculaires mais rien n'empêchait une réaction intermoléculaire dans ces conditions. Après 1 heure à 110 °C dans le toluène, dans les concentrations usuelles (0.1 M) pour ce type de réaction, le composé **122** est récupéré intact (Figure 130).

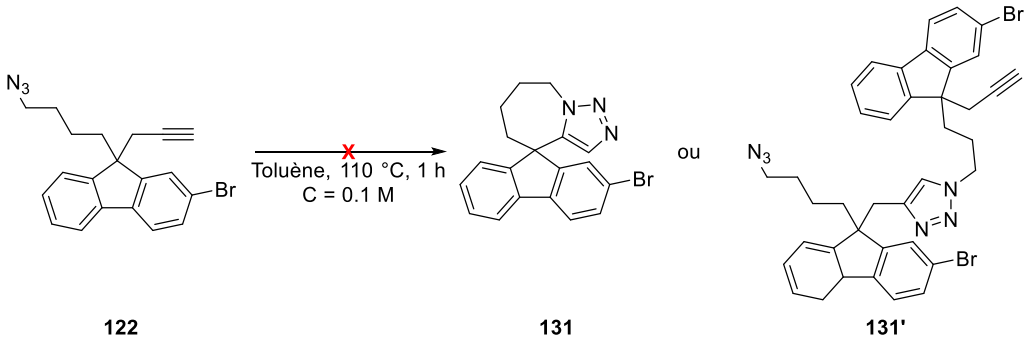


Figure 130 : Test de cycloaddition de Huisgen sur le composé **120** dans les conditions de génération d'un acylcétène à partir d'une dioxinone.

Devant l'échec de la stratégie partant du 2-bromofluorène **109**, la stratégie impliquant l'ester **123** a été utilisée. Cette deuxième voie consiste donc à introduire une fonction ester, précurseur du groupement acide carboxylique, en position 2 du noyau fluorène en amont de l'alkylation du fluorène (Figure 131).

[157] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

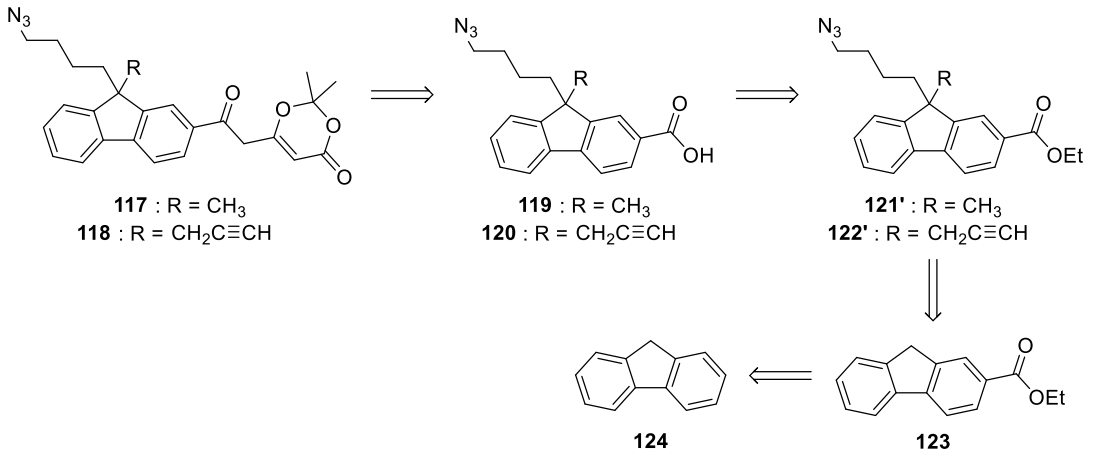


Figure 131 : Deuxième stratégie de synthèse pour l'obtention des dioxinones **117** et **118**.

Ainsi, en partant cette fois-ci du fluorène **124**, une acylation de Friedel-Craft conduit au dérivé N,N-diméthylamide **133** avec 90% de rendement. Cet amide peut être converti en ester d'éthyle **123** en présence du sel de Meerwein (Et_3OBF_4) avec un rendement de 87%.[158] Une fois cet ester en main l'introduction de la chaîne alcyne ou du groupement méthyle peuvent être réalisées et les fluorènes monosubstitués **134** et **135** sont obtenus avec des rendements respectifs de 63% et 47% (Figure 132).

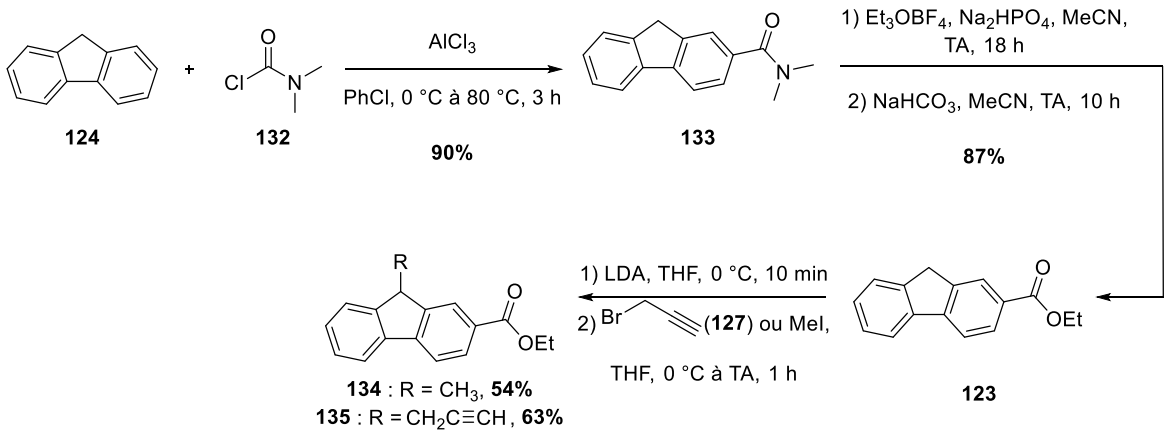


Figure 132 : Obtention des dérivés fluorènes monosubstitués **134** et **135**.

Cependant la seconde alkylation dans les mêmes conditions du composé **135** par l'azoture de 1-bromobutyle **129** ne permet pas l'obtention du fluorène disubstitué **122'** mais conduit à un mélange complexe de produit de dégradation. Des conditions impliquant une base forte comme le LDA et des temps de réaction similaires à ceux utilisés pour la synthèse du fluorène disubstitué **122** semblaient adaptés. En effet la présence d'un groupement électroattracteur ester sur le fluorène laissait présager une plus faible réactivité de l'anion du composé **135**. Un criblage a permis de déterminer des conditions réactionnelles optimales impliquant l'utilisation du *t*-BuOK dans le THF à 0 °C et une méthode d'ajout similaire à la réaction de Barbier : une solution de base est ajoutée directement sur le mélange des deux réactifs à 0 °C. En moins de 15 minutes le réactif **135** est consommé et le dérivé disubstitué **122'** est isolé avec 41% de rendement de manière reproductible. De la même manière, la chaîne azoture est introduite sur le fluorène **134** portant le groupement méthyle avec un rendement de 47% (Figure 133).

[158] Keck, G. E., McLaws, M. D., Wager, T. T. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9875-9883.

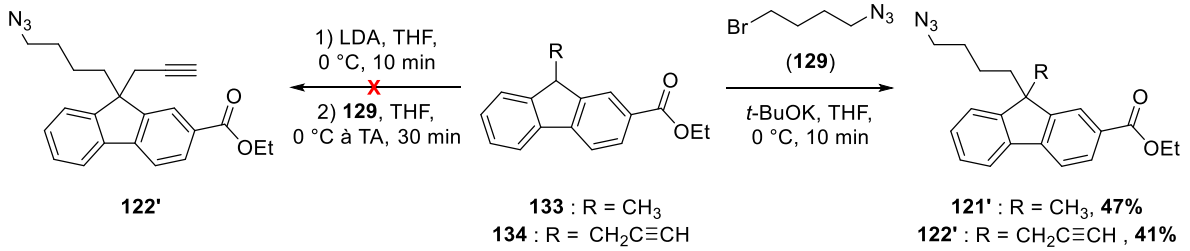


Figure 133 : Optimisation de la deuxième étape d'alkylation pour obtenir les dérivés dialkylés **121'** et **122'**.

Une fois les esters **121'** et **122'** en main, la saponification de ceux-ci conduit aux acides carboxyliques correspondants, qui n'avaient pu être formés précédemment, de manière quasi quantitative (Figure 134). Il faut donc compter 5 étapes avec un rendement global de 19% pour accéder à l'acide **119** et de 20% pour l'acide **120**.

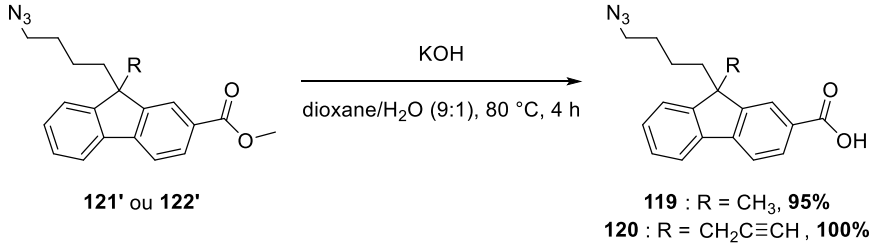


Figure 134 : Obtention des acides carboxyliques **119** et **120** par la deuxième stratégie de synthèse.

A ce stade, il a été décidé de ne poursuivre la synthèse que pour le composé **119** pour obtenir la dioxinone **117** afin de tester la réaction de CuAAC sur l'analogue **115**, ne possédant qu'une fonction réactive.

L'acide **119** est activé sous forme d'acyl-benzotriazole **135** en présence de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane avec 87% de rendement. L'addition nucléophile de l'anion de la dioxinone **65**, formé en présence de LiHMDS, sur cet acide activé conduit à la β-céto dioxinone **117** avec un rendement de 70%. Il est à noter que la réaction d'addition nucléophile sur les dérivés du fluorène est plus difficile que sur les autres aromatiques et qu'elle nécessite un retour à température ambiante pour obtenir une bonne conversion ainsi que des temps de réaction plus longs. Finalement la réaction d'acylfuranonisation entre la dioxinone **117** et l'alcool désaromatisé **61** permet d'isoler l'analogue **115** avec 13% de rendement soit un rendement global de 2% sur 8 étapes en partant du fluorène **126** (Figure 135).

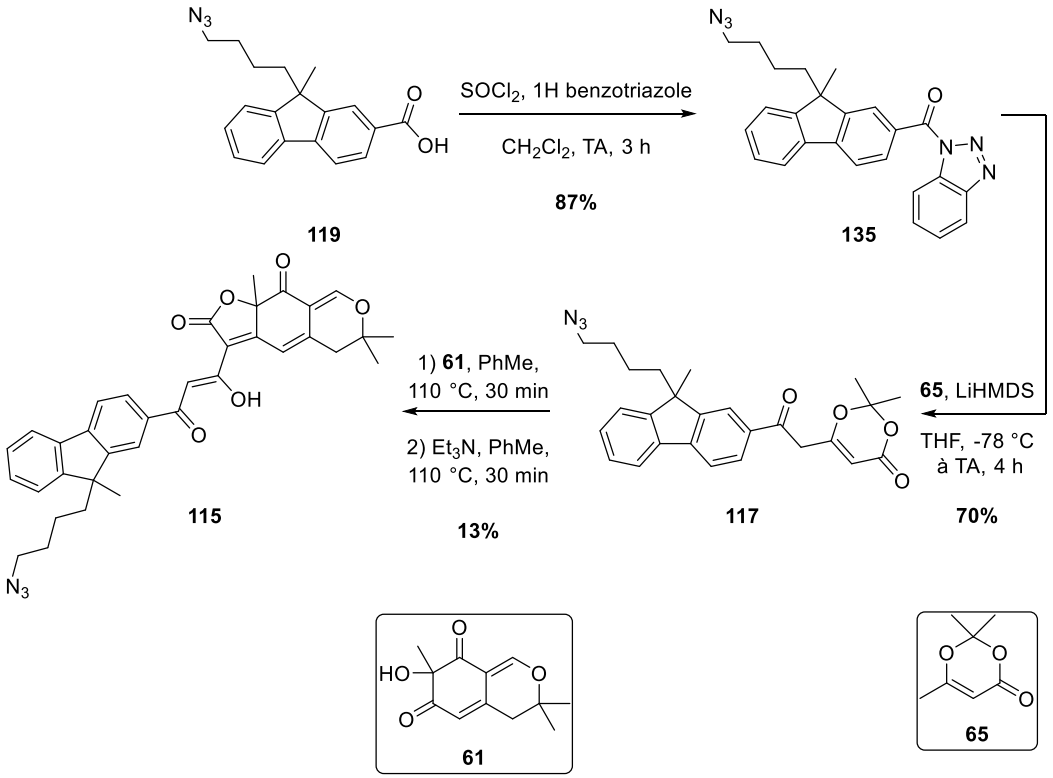


Figure 135 : Synthèse de l'analogue **115** monofonctionnalisable par CuAAC.

Une fois ce premier analogue en possession, l'optimisation de la réaction de CuAAC a été préférée dans un premier temps à la poursuite de la synthèse de la dioxinone **116**. La molécule choisie en tant que partenaire alcyne pour cette réaction est un dérivé de la SN-38 **136**, appartenant à la famille de la camptothécine **137**, connues pour leurs activités biologiques[159] (Figure 136).

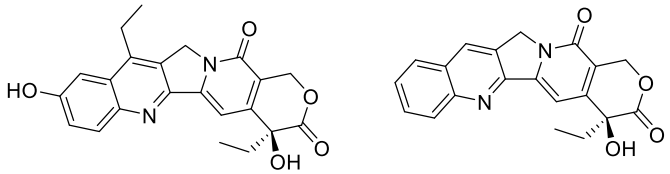


Figure 136 : Structure de la SN-38 et de la camptothécine.

[159] Dallavalle, S., Merlini, L. Modern Alkaloids. Structure, Isolation, Synthesis and Biology, **2008**, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, *16*, p 503-520.

3.1.3 Réaction de CuAAC entre un analogue de l'epicocconone et un partenaire biologiquement actif : la SN-38

Cette partie introduira succinctement les propriétés de la camptothécine et de ses dérivés avant une présentation des résultats obtenus en CuAAC sur l'analogue **115**.

3.1.3.1 Eléments bibliographiques sur la camptothécine et ses dérivés

La camptothécine **137** est un alcaloïde pentacyclique isolé pour la première fois de l'écorce et des tiges de *Camptotheca acuminata* en 1966.[160] Des tests *in vitro* ont montré l'activité d'extraits de *C. acuminata* vis-à-vis des cellules leucémiques de souris L210 venant appuyer son utilisation dans la médecine traditionnelle chinoise comme remède contre le cancer.[160] La substance responsable de l'activité biologique de ces extraits est la camptothécine **137**, un inhibiteur des topoisomérases Top 1, des enzymes impliquées dans les processus de réplication, transcription (synthèse de l'ARN à partir de l'ADN) et réparation de l'ADN. Les topoisomérases Top 1 sont présentes en quantité très supérieure à la normale dans les cellules cancéreuses.[161]

Les topoisomérases se complexent à l'ADN de manière covalente et coupent transitoirement l'un des deux brins (toposiomérases I) ou les deux (topoisomérases II), par des réactions de transestérification d'un résidu tyrosine du site actif sur le squelette phoshodiester de l'ADN. Ceci permet le déroulement de la double hélice (passage d'un ADN dit « condensé » à un ADN « relaxé ») nécessaire pour les processus de transcription et de réplication de l'ADN. L'exemple ci-dessous illustre le fonctionnement des topoisomérases de type IB, famille de la Top 1, qui relaxent l'ADN par rotation du brin coupé (Figure 137).[162]

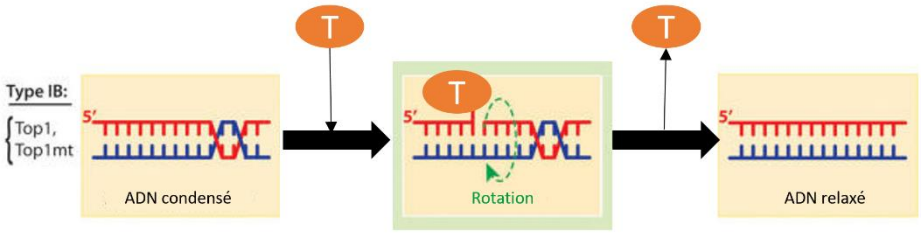


Figure 137 : Fonctionnement des topoisomérases de type IB (T représente l'enzyme).

Dans des conditions normales, le processus de coupure par l'enzyme Top 1 d'un des brins d'ADN est suivi d'une très rapide reformation de la liaison coupée, ainsi Top 1 est capable de réaliser jusqu'à 6000 cycles coupure-fermeture par minute.[162] En revanche, lorsque la camptothécine **137** est présente, elle se lie de manière réversible à l'interface du complexe Top 1-ADN, formant une structure ternaire qui déplace l'équilibre, normalement en faveur de l'enzyme libre, vers la formation de ce complexe ternaire et donc inhibe l'activité enzymatique.

Etant donnée cette activité anticancéreuse, de nombreux dérivés hydrosolubles ont été synthétisés tels que le topotecan (commercialisé sous le nom Hymcatin®) **138** et l'irinotecan (commercialisé sous les noms Camptostar® et Campto®) **139**. Ils sont prescrits respectivement contre le cancer des ovaires et le cancer du poumon pour le topotecan et contre les cancers touchant le système digestif pour l'irinotecan. Il est à noter que ce dernier est une prodrogue dont le métabolite actif est la SN-38 **136** qui est formé par hydrolyse du motif carbamate sous l'action d'une enzyme de type carboxylestérase (Figure 138).[162]

---

[160] Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., McPhail, A. T., Sim, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888-3890.

[161] Martino, E., Della Volpe, S., Terribile, E., Benetti, E., Sakaj, M., Centamore, A., Sala, A., Collina, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 701-707.

[162] Pommier, Y. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 82-95.

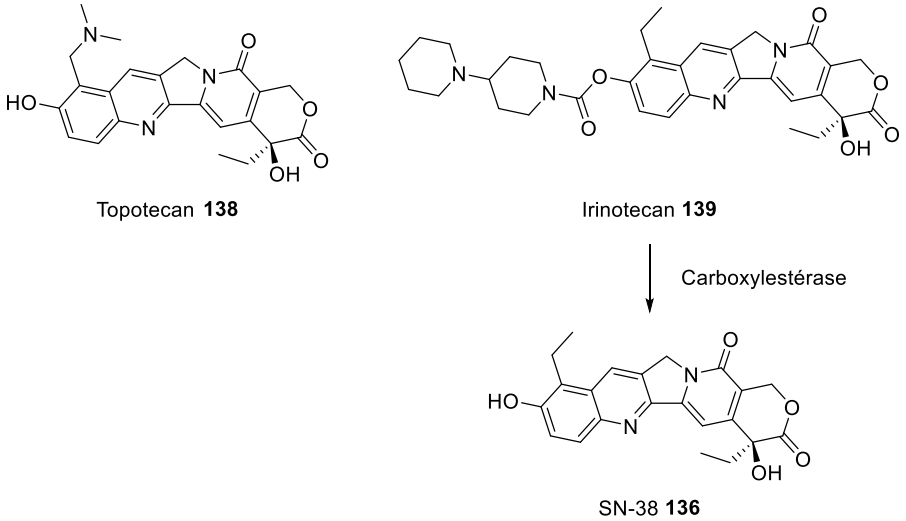


Figure 138 : Structures du topotecan **138** et de l'irinotecan **139**.

Malgré ces activités biologiques et les efforts de synthèse pour développer des dérivés de la camptothécine utilisables dans le traitement des cancers, leur grande toxicité et leur faible stabilité chimique limitent leur utilisation thérapeutique. En effet le cycle α-hydroxylactone, indispensable pour l'interaction de la camptothécine **137** avec le complexe Top 1-ADN, s'hydrolyse spontanément à pH physiologique en quelques minutes en carboxylate correspondant **137'** (Figure 139). Cette ouverture du cycle est irréversible en milieu biologique puisque la forme carboxylate **137'** est très affine du sérum d'albumine.[162] La vitesses de réaction peut d'ailleurs être évaluée en utilisant les propriétés de fluorescence de ces deux formes.[163]

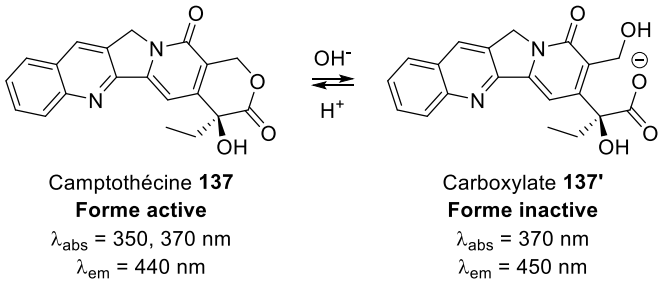
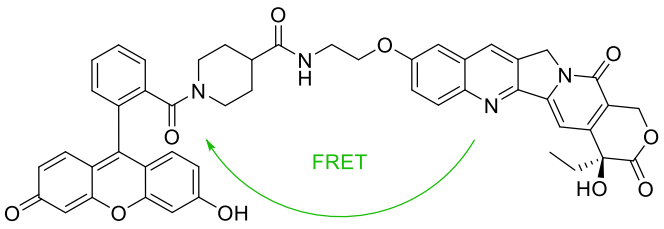


Figure 139 : Hydrolyse de la camptothécine **137** en carboxylate **137'** sans activité biologique. Les maxima d'absorption et d'émission (excitation à 370 nm) ont été mesurés dans le tampon PBS à pH = 7.4.

Cette famille de molécule continue nénamoins de susciter l'attention des groupes de recherche. Récemment, l'équipe du Prof. Pierre-Yves Renard a reporté la synthèse du premier composé conjugué fluorescéine-camptothécine **140** (Figure 140) permettant un suivi par microscopie de fluorescence des effets anticancéreux du dérivé de camptothécine **142** sur des lignées de cellules cancéreuses *in vivo* grâce au transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET pour Förster Resonance Energy Transfer) entre la partie fluorescéine (accepteur) et la partie camptothécine (donneur).[164]

[163] Ziomkowska, B., Kruszewski, S., Siuda, R., Cyrankiewicz, M. *Opt. Appl.* **2006**, *36*, 137-146.

[164] Chevalier, A., Dubois, M., Le Joncour, V., Dautrey, S., Lecointre, C., Romieu, A., Renard, P.-Y., Castel, H., Sabot, C. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1119-1133.



140

λ_{abs} = 265, 378, 502 nm

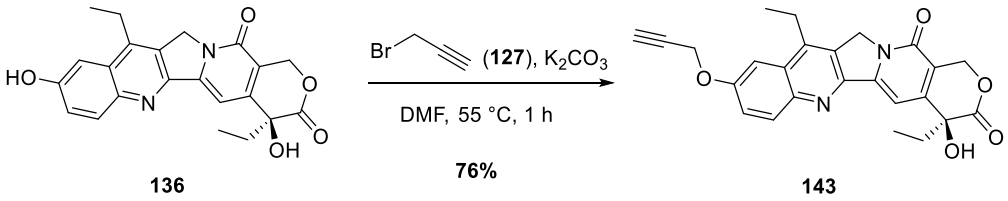
λ_{em} = 424, 524 nm

ε = 21550, 17500, 28835 L.mol^{-1}.cm^{-1}

Φ_F = 37%[a]

Figure 140 : Structure de la sonde FRET **140** ([a] déterminé à 499 nm par rapport à la fluorescéine : Φ_F = 0.9 dans une solution de $NaOH_{(aq)}$ à 0.1 M, λ_{exc} = 360 nm).

L'utilisation de la SN-38 **136** pour la réaction de CuAAC a été envisagée puisque la fonctionnalisation du phénol du noyau quinoléine du composé **136** est relativement simple et se fait sans perte importante de l'activité biologique.[164] L'alkylation du phénol de la SN-38 **136** par le bromure de propargyle **127** en présence de carbonate de potassium conduit au dérivé **143** avec un rendement de 74% (Figure 141). L'utilisation de la camptothécine modifiée **143** est d'autant plus pertinente que des réactions de CuAAC ont déjà été décrite sur ce composé.[165]



136 **76%** **143**

Figure 141 : Formation de la camptothécine fonctionnalisée **143** à partir de la SN-38 **136**.

3.1.3.2 Etude de la réaction de CuAAC entre l'analogue de l'epicocconone 115 et le dérivé de camptothécine 143

Les premières expériences entreprises sur la réaction de CuAAC ont consisté à réutiliser les conditions optimisées au laboratoire sur les premiers analogues polyfonctionnels de l'epicocconone (voir partie 1.2.2) à savoir l'utilisation de 10 mol% d'un système $CuSO_4$/Ascorbate de sodium/TBTA, sans succès. La faible solubilité du composé **143** dans le mélange de DMF, *tert*-butanol et eau est probablement à l'origine de l'absence de réaction observée (Figure 142).

[165] Guerrant, W., Patil, V., Canzoneri, J. C., Yao, L.-P., Hood, R., Oyelere, A. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3283-3287.

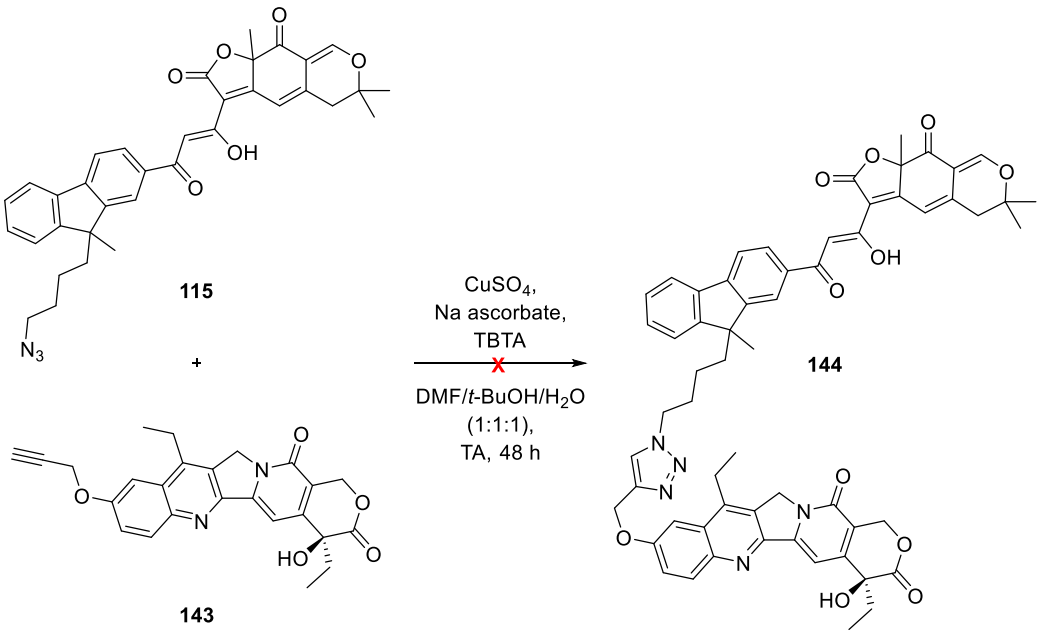


Figure 142 : Première tentative de CuAAC entre les composés **115** et **143**.

L'emploi d'un système de solvant plus simple composé de 50% de DMF et d'eau dans lequel les deux partenaires sont solubles ainsi que l'emploi de quantités plus importante du système $CuSO_4$/ascorbate de sodium/TBTA (1, 2 ou 3 équivalents) n'ont cependant pas permis d'isoler le triazole désiré **144**. Avec des quantités importantes de cuivre et des temps longs, la dégradation des réactifs de départ est également observée lors du suivi en HPLC analytique (Tableau 5).

Entrée	Cuivre	Ascorbate	TBTA	Solvant	Temps	Résultat
1	$CuSO_4$ 10 mol%	10 mol %	10 mol%	DMF/H_2O	24 h	Pas de réaction
2	$CuSO_4$ 1 équiv.	1 équiv.	1 équiv.	DMF/H_2O	24 h	Pas de réaction
3	$CuSO_4$ 2 équiv.	2 équiv.	2 équiv.	DMF/H_2O	48 h	Dégradation
4	$CuSO_4$ 3 équiv.	3 équiv.	3 équiv.	DMF/H_2O	96 h	Dégradation

Tableau 5 : Essais de réaction de CuAAC entre l'analogue **135** et la camptothécine **143**.

Une source de cuivre (I) supportée sur une résine Amberlyst® a également été testée. Le catalyseur est préparé par séchage de l'Amberlyst® A-21 qui est ensuite mise en présence de CuI dans l'acétonitrile à l'obscurité selon une procédure décrite par le groupe du Dr. Christian Girard.[166] Une résine avec une charge catalytique en CuI de 0.816 $mmol.g^{-1}$ est ainsi obtenue. La catalyse supportée présente ici les avantages de pouvoir réaliser les réactions de CuAAC en milieu totalement organique dans lequel les sels de cuivre sont rarement solubles[167] et d'éliminer facilement le catalyseur du milieu réactionnel par filtration. Pour la réaction de CuAAC, la résine constitue également une matrice stabilisant le cuivre(I) permettant le recyclage du catalyseur.

Cependant dans le cas de la réaction entre les composés **115** et **143**, réalisée dans le DMF pour des raisons de solubilité de la camptothécine **143** et en présence d'une quantité stoechiométrique de cuivre(I), aucune réaction n'est observée après 24 h (Figure 143).

[166] Slimi, R., Kalhor-Monfared, S., Plancq, B., Girard, C. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4339-4344.

[167] Girard, C., Önen, E., Aufort, M., Beauvière, S., Samson, E., Herscovici, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1689-1692.

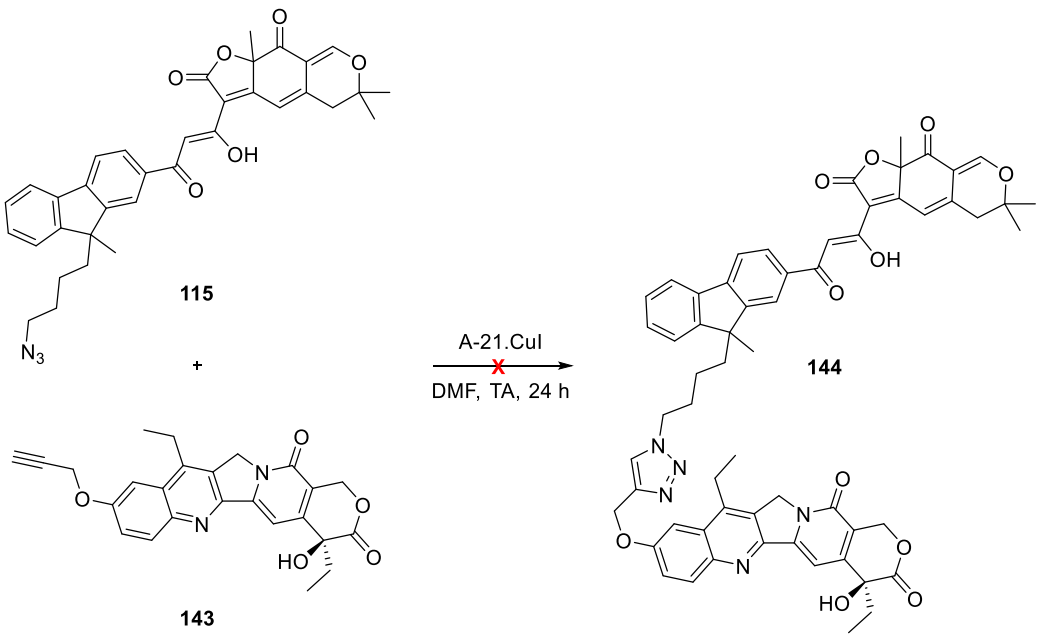


Figure 143 : Tentative de CuAAC utilisant un catalyseur supporté.

Finalement la réaction de CuAAC a été tentée en présence de CuI dans le DMF avec activation au micro-ondes à 40 °C. Après deux heures, les réactifs de départ sont totalement dégradés et aucune trace du produit désiré n'a pu être détectée par RMN ou spectrométrie de masse.

Plusieurs hypothèses ont été émises afin de comprendre ces échecs :

- Le motif céto-énol de l'analogue **135** est également susceptible de chélater le cuivre, malgré la présence du TBTA. Les polytriazoles sont en effet connus comme ligand du cuivre (I) permettant non seulement de le protéger de l'oxydation et de la dismutation en cuivre (II) et en cuivre (0)[168] mais aussi d'accélérer la vitesse de réaction.[169] Cependant une quantité sur-stoechiométrique de cuivre devrait suffire à compenser ce phénomène de chélation et permettre à la réaction d'avoir lieu.
- Le cuivre (II) peut également être utilisé dans la réaction de CuAAC sans additif réducteur, moyennant l'emploi d'un solvant alcoolique.[170] C'est l'oxydation du solvant ou l'homocouplage de l'alcyne qui génère alors le cuivre (I) qui est l'espèce catalytique. Dans le cadre de la réaction entre les composés **135** et **143**, l'alcool primaire généré par l'hydrolyse du motif lactone de la camptothécine **143** pourrait être oxydé par les traces de cuivre (II) et conduire à la dégradation de la molécule **143** sur des temps de réaction trop longs.

L'origine des problèmes de réactivités étant ainsi en grande partie attribués au cuivre, un essai de cycloaddition azoture-alcyne spontanée (SpAAC) impliquant un alcyne contraint, le cyclooctyne **145**, a été entrepris. Le triazole **146** correspondant a pu être observé en HPLC analytique et en spectrométrie de masse avec une conversion quantitative en 3 heures (Figure 144).

[168] Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.

[169] Rodionov, V. O., Presolski, S. I., Díaz Díaz, D., Fokin, V. V., Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12705-12712.

[170] Brotherton, W. S., Michaels, H. A., Simmons, J. T., Clark, R. J., Dalal, N. S., Zhu, L. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4954-4957.

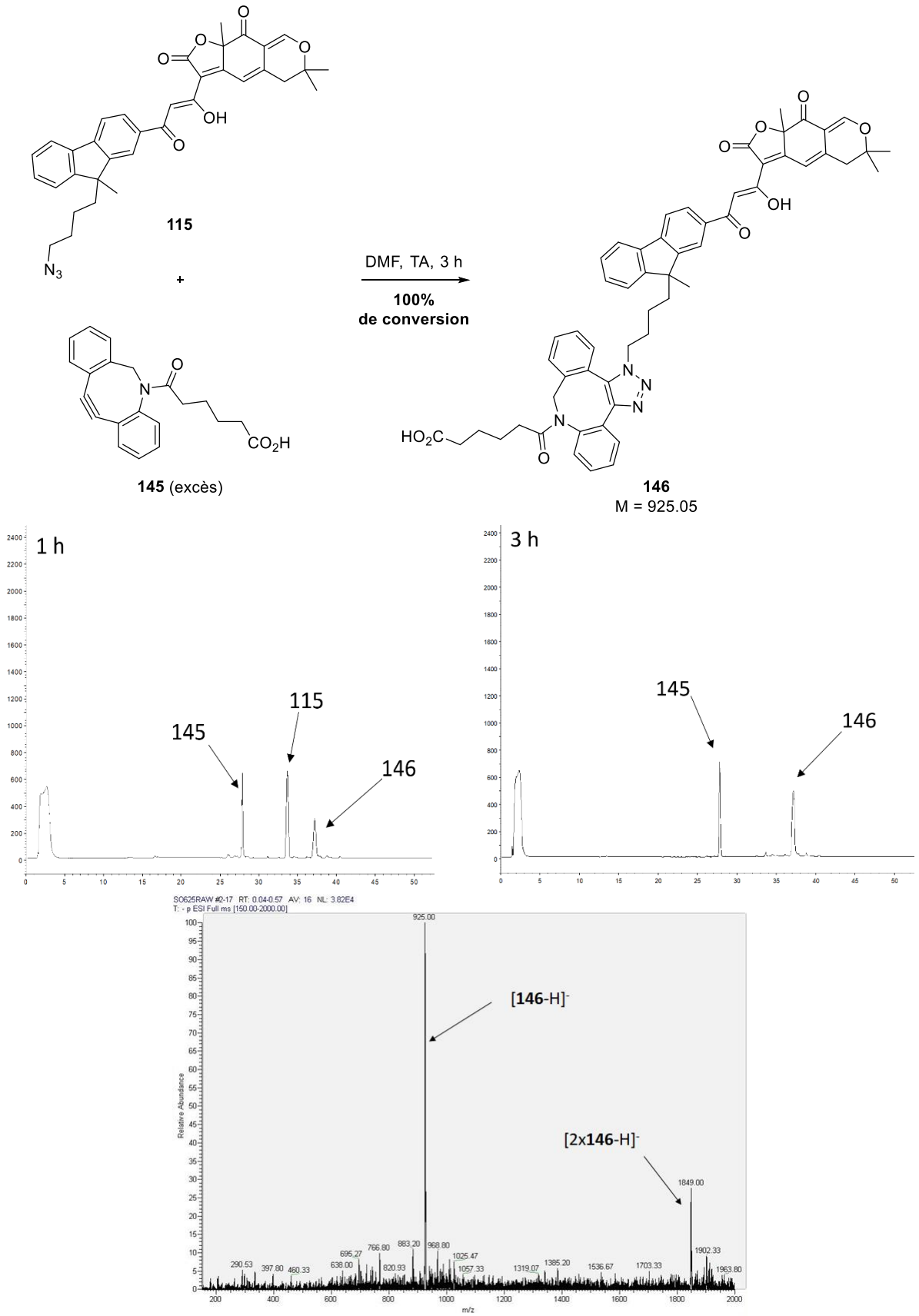
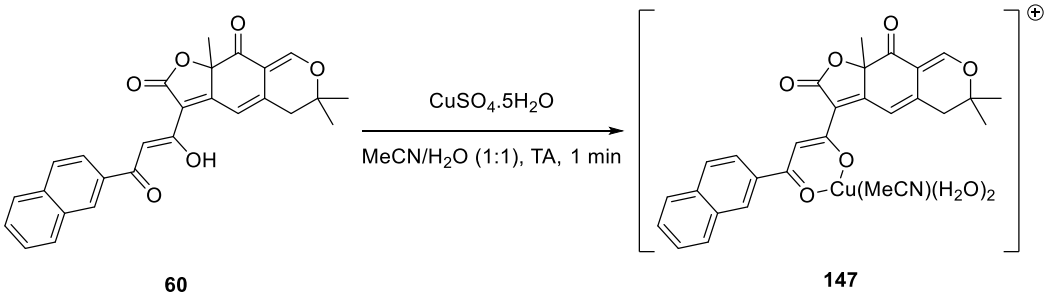


Figure 144 : Réaction de SPAAC entre l'analogue **115** et le cyclooctyne **145** (le pic résiduel de **145** est expliqué par l'excès de cyclooctyne utilisé). Les chromatogrammes HPLC au bout d'une heure et de trois heure de réaction ainsi que le spectre de masse basse résolution (ESI^-) du mélange réactionnel sont également donnés.

Des expériences complémentaires sont à mener pour comprendre la nature des interactions des analogues de l'epicoconone avec les sources de cuivre utilisées en CuAAC. Des observations préliminaires montrent l'existence et la formation très rapide d'une espèce complexe lorsque l'analogue naphtyle **60**, utilisé en tant que modèle, est mis en présence de 2 équivalents de sulfate de cuivre (II) $CuSO_4$ dans un mélange d'acétonitrile/eau (1 pour 1). En effet l'analyse en spectrométrie de masse de ce mélange révèle un adduit majoritaire à 584 Da, pouvant correspondre à $[M+Cu+MeCN+2H_2O]^+$ (Figure 145).



60 **147**

Figure 145 : Possible formation d'un complexe entre l'analogue naphtyle **60** et le sulfate de cuivre (II).

3.1.4 Conclusion sur la réaction de CuAAC appliquée aux analogues de l'epicocconone

L'introduction de points de fonctionnalisation pour la réaction de CuAAC sur les analogues de l'epicocconone était envisageable selon deux stratégies : les groupements réactifs peuvent en effet être introduits soit sur la partie alcool désaromatisé, soit sur la partie dioxinone (Figure 146).

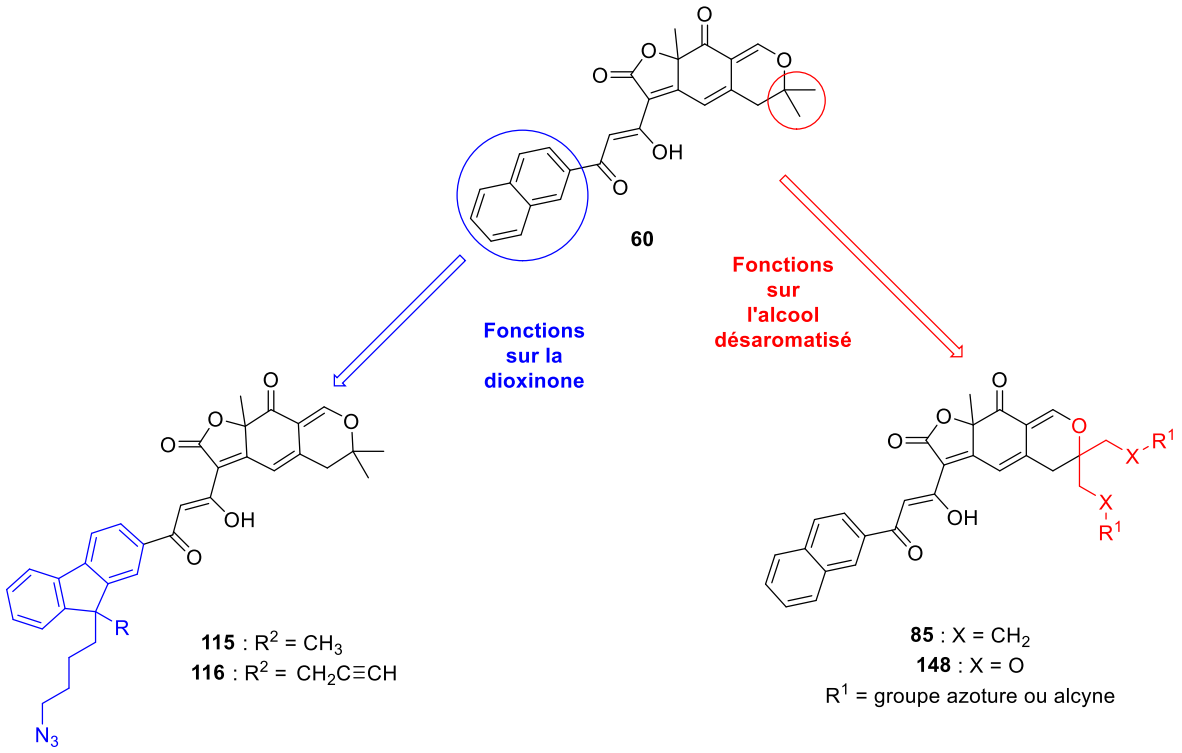


Figure 146 : Récapitulatif des 2 différentes stratégies envisagées pour la fonctionnalisation des analogues de l'epicocconone par CuAAC.

Tous les essais impliquant la fonctionnalisation de l'alcool désaromatisé reposaient sur l'introduction des groupements azotures ou alcynes lors de la formation de la lactone ou après la réaction de désaromatisation oxydante. Malheureusement cette étape clé, qui souffre d'un manque important de

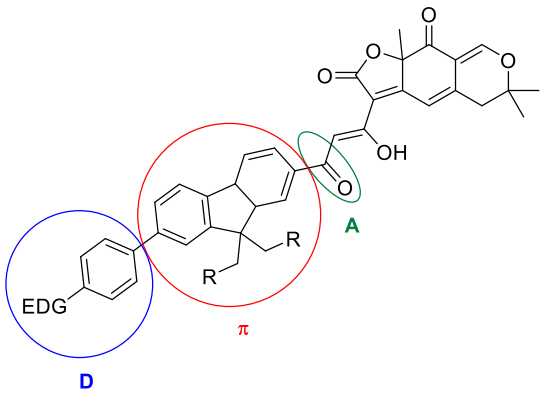
tolérance fonctionnelle, n'a jusqu'alors pas permis d'obtenir un alcool désaromatisé susceptible d'être utilisé pour la suite de la synthèse d'analogues.

En revanche la stratégie consistant à introduire les groupements fonctionnels sur la dioxinone a permis d'étudier le motif fluorène comme nouveau noyau aromatique de dioxinone et d'obtenir un analogue **115** portant un groupement azoture avec un rendement global de 2% sur 8 étapes. La méthodologie développée permet également d'accéder à des analogues bifonctionnels mais la synthèse n'a pas été menée jusqu'à son terme. En effet la réaction de CuAAC entre la camptothécine **143** et l'analogue **115** n'a pour l'heure pas donné de résultat concluant, ceci est principalement dû à des interactions entre les sources de cuivre utilisées et les réactifs. Ces observations sont renforcées par le succès d'un test de cyclooaddition spontanée entre l'analogue **115** et un alcyne contraint **145** qui n'utilise pas de métaux. Etant donnée l'absence de résultats sur la réaction de CuAAC, la synthèse de l'analogue bifonctionnel **116** n'a à ce jour pas été poursuivie.

La compréhension de ces phénomènes reste la clé pour développer une méthode efficace de réaction de CuAAC.

3.2 Synthèses d'analogues de l'epicocconone pour la spectroscopie de fluorescence à excitation bi-photonique

Comme présenté en introduction, le motif fluorène est classiquement utilisé en tant que cœur central rigide sur les molécules conçues pour l'absorption à deux photons. Une méthodologie de synthèse ayant été développée pour construire des analogues de l'epicocconone portant un motif fluorène, il était logique de s'intéresser à la conception d'analogues optimisés pour l'absorption bi-photonique. Des structures polarisées de type D-π-A (D pour Donneur et A pour accepteur) ont ainsi été envisagées sur lesquelles la partie céto-énol de l'epicocconone pourrait jouer le rôle d'accepteur (Figure 147). Cette étude est d'autant plus pertinente que l'analogue naphtyle **60** présente déjà des propriétés utilisables en microscopie de fluorescence à excitation bi-photonique.[151] La conception d'analogues optimisés pour l'absorption à deux photons permettrait donc des applications en imagerie.



149, R = alkyl

Figure 147 : Structure générale des analogues **149** envisagés pour l'absorption à deux photons. EDG = groupe donneur d'électron.

L'introduction du groupement donneur d'électrons porté par le fluorène a été envisagé ici avant la réaction d'acylfuranonisation *via* un couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura. Cette approche s'appuie sur une méthodologie en cours de développement au laboratoire sur la fonctionnalisation de la dioxinone **150** par un couplage de Suzuki à température ambiante,[171] afin de ne pas générer l'acylcétène correspondant **151** par fragmentation thermique. Ces conditions particulières requièrent l'utilisation d'acétate de palladium $Pd(OAc)_2$, de carbonate de potassium K_2CO_3 dans un mélange éthanol/eau (1 pour 1) à l'air et permettent d'obtenir des dioxinones fonctionnalisées par des groupements donneurs

[171] a) Liu, C., Ni, Q., Hu, P., Qiu, J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1054-1060. b) Sarmah, G., Mondal, M., Bora, U. *Appl. Organomet. Chem.* **2015**, *29*, 495-498.

d'électrons comme la dioxinone **153**, portant le groupement triarylamine, avec un rendement de 50%, non optimisé, en quelques heures (Figure 148).

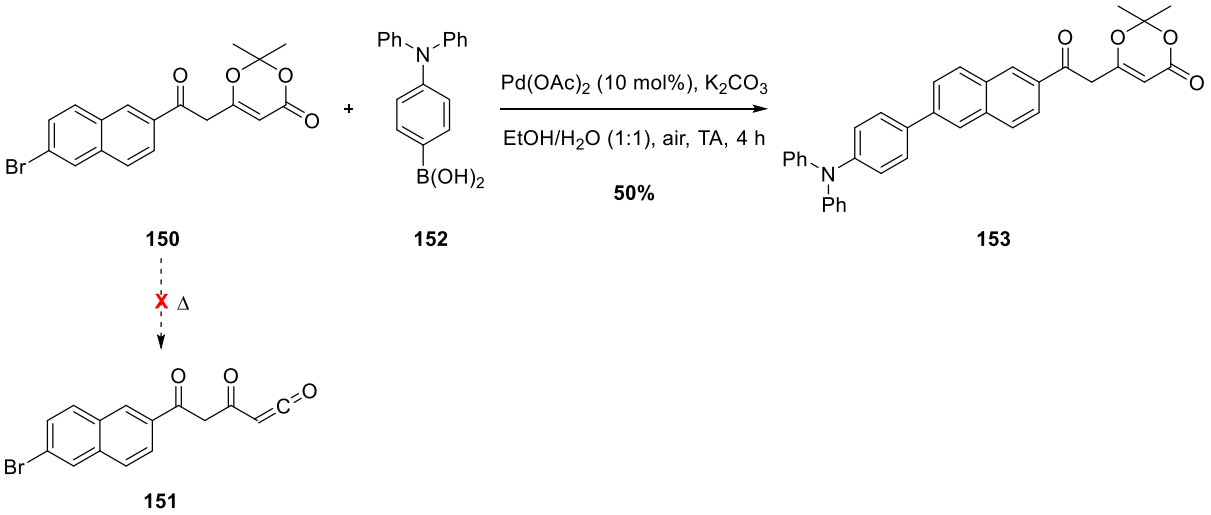


Figure 148 : Réaction de Suzuki à température ambiante sur la dioxinone **150**.

Le mécanisme de ce type de couplage fait encore à l'heure actuelle l'objet d'études. La réaction repose sur la génération de nanoparticules de palladium (0) soit par oxydation du solvant alcoolique (Figure 149, chemin orange)[172], soit par homocouplage de l'acide boronique utilisé (Figure 149, chemin rouge).[173] L'oxygène de l'air permettrait ici, grâce à son adsorption à la surface des nanoparticules, d'éviter leur agrégation et de maintenir l'activité catalytique.[172]

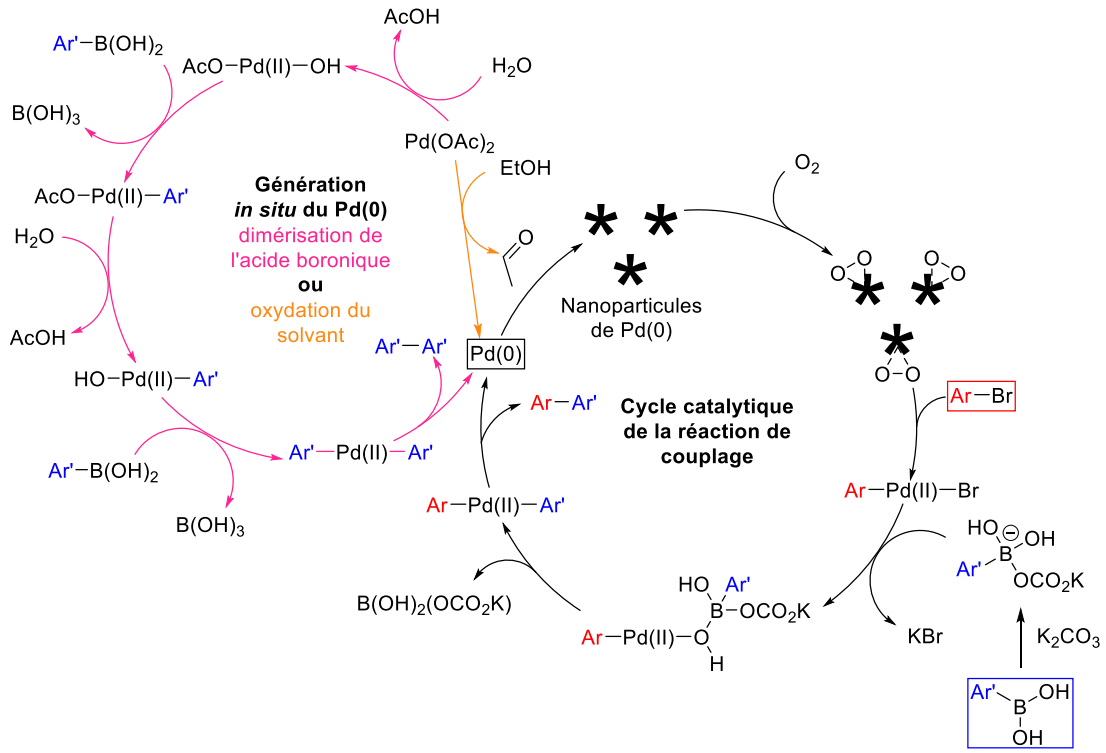


Figure 149 : Cycle catalytique possible pour la réaction de Suzuki en conditions aérobique.

[172] Han, W., Liu, C., Jin, Z.-L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4005-4007.

[173] Adrio, L. A., Nguyen, B. N., Guilera, G., Livingston, A. G., Hii, K. K. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 316-323.

L'utilisation de cette voie de synthèse requiert donc de préparer la dioxinone bromée **154** suivant la stratégie de synthèse décrite précédemment pour les dioxinones fluorènes (voir 3.1.2), c'est-à-dire *via* l'acide carboxylique **156**. Cet acide serait obtenu comme précédemment par échange brome-lithium suivi d'une carboxylation sur le dibromofluorène **157**, lui-même obtenu par dibromation et alkylation du fluorène **124** (Figure 150). Le choix des chaînes utilisées pour l'étape d'alkylation a été arbitrairement fixé à quatre carbones et sera discuté plus loin.

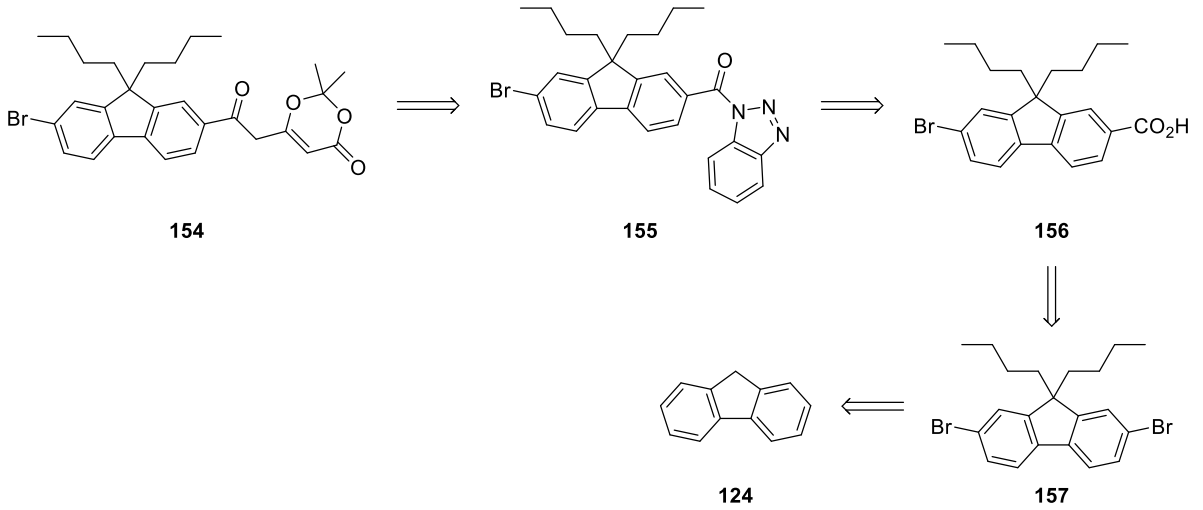


Figure 150 : Rétrosynthèse envisagée pour la dioxinone bromée **154**.

Trois groupes électrodonneurs ont été choisis pour être introduits sur la dioxinone **154**, à savoir le 4-méthoxyphényle, le 4-diméthylaminophényle et le 4-diphénylaminophényl. Les acides boroniques correspondants seront donc utilisés en couplage de Suzuki (Figure 151). Afin d'achever l'étude, la dioxinone sans groupement donneur a été synthétisée de manière à obtenir un analogue de référence pour les mesures d'absorption à deux photons.

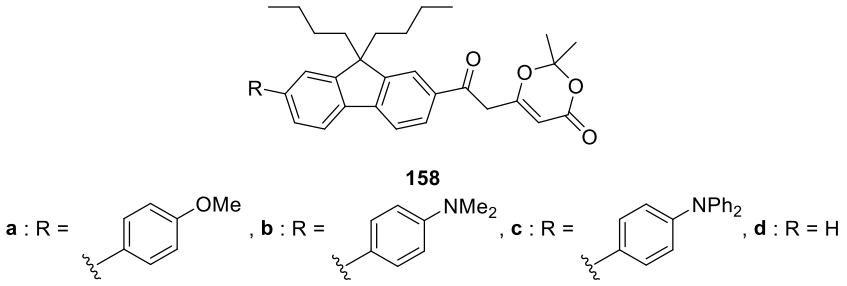


Figure 151 : Structure des dioxinones **158** envisagées.

3.2.1 Synthèses de dioxinones fluorènes sans groupement donneur

Dans un premier temps la synthèse des dioxinones **155d**, possédant des chaînes latérales à 4 carbones et **159**, possédant des chaînes latérales à 8 carbones a été entreprise. Cette variation sur la longueur des chaînes aliphatiques avait pour objectif d'étudier l'influence de chaînes longues sur la réaction d'acylfuranonisation et sur les propriétés de fluorescence. La synthèse de ces deux dioxinones et des analogues correspondants reprend exactement les mêmes étapes que celle de l'analogue fluorène **114**, dont le noyau fluorène a été substitué par deux chaînes méthyle. Les analogues **163a** et **163b** sont obtenus avec des rendements respectifs de 0.7 et 2% sur 5 étapes (Figure 152).

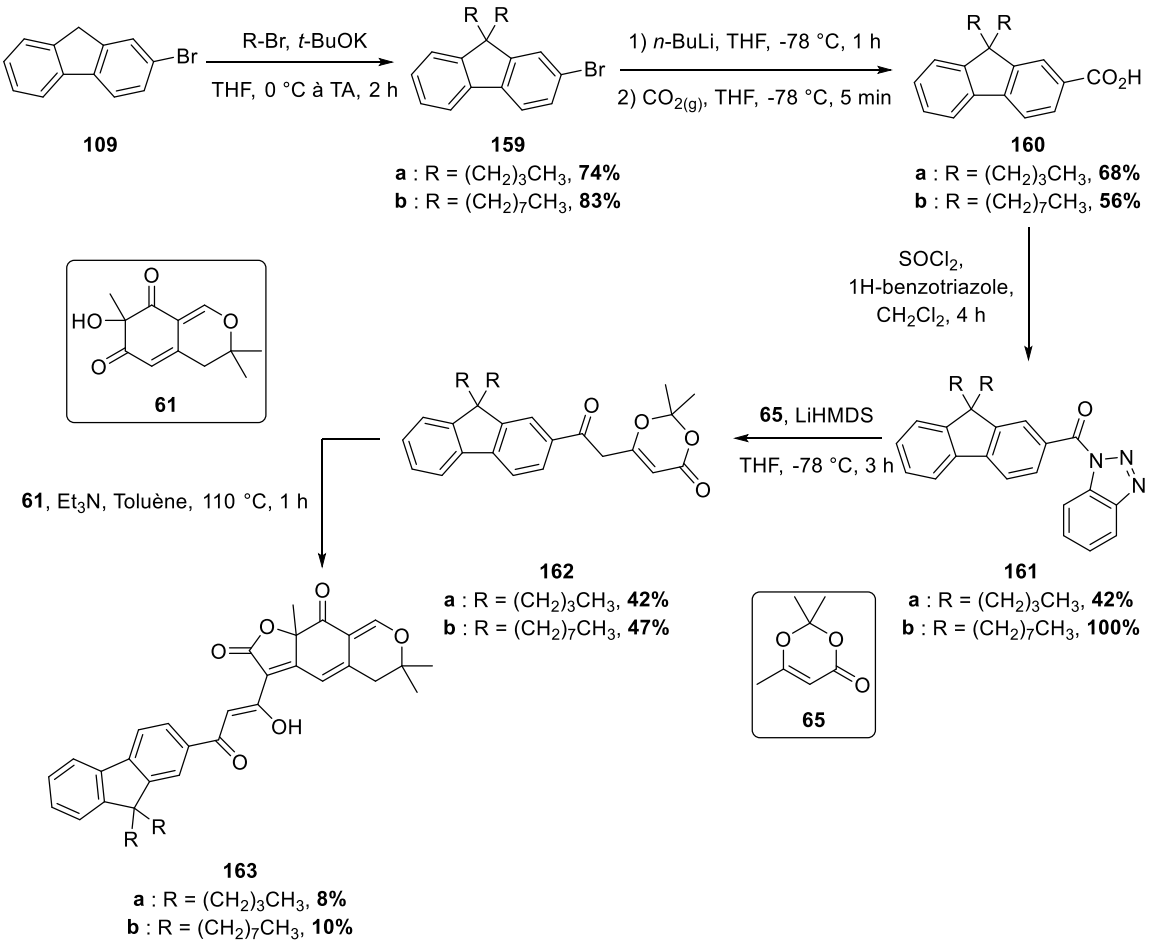
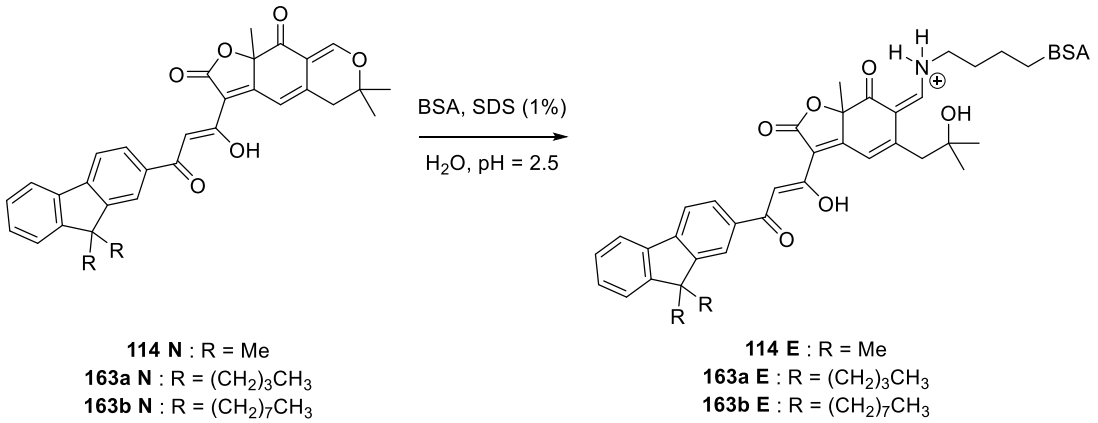


Figure 152 : Synthèses des analogues **163a** et **163b**.

Les réactions mises en jeu lors de la synthèse de ces analogues, notamment l'étape d'acylfuranonisation, semblent peu perturbées par la longueur des chaînes aliphatiques introduites sur le fluorène. Les propriétés spectroscopiques de ces analogues ont également été évaluées comme précédemment (Figure 153, Figure 154 et Tableau 6).



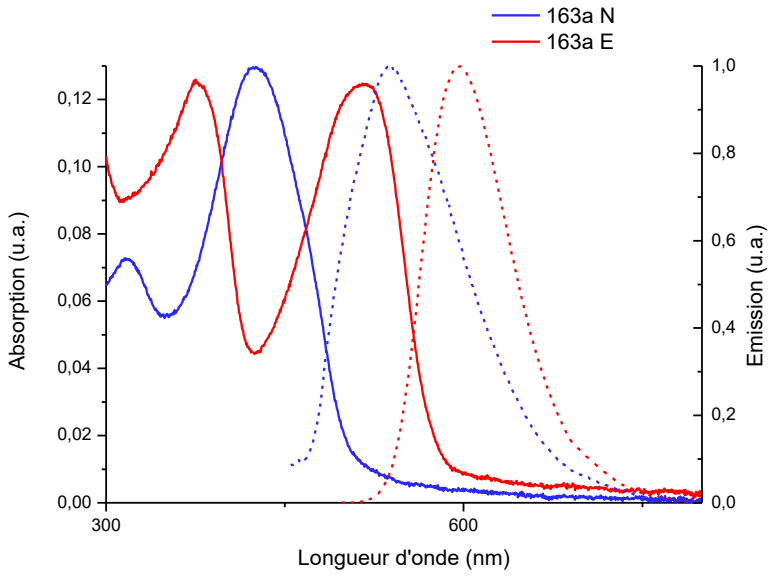


Figure 153 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) de l'analogue **163a** sous forme native (N, courbes bleues) et énaminone (E, courbes rouges) dans l'eau/SDS.

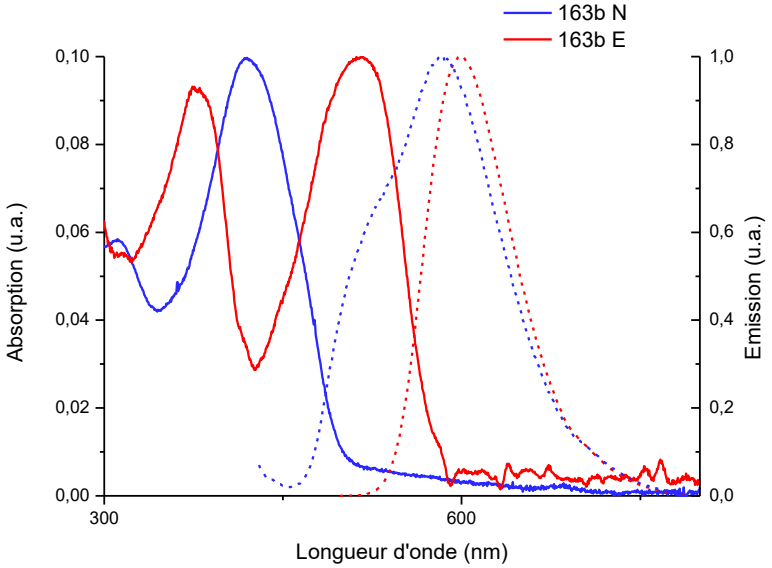


Figure 154 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) de l'analogue **163b** sous forme native (N, courbes bleues) et énaminone (E, courbes rouges) dans l'eau/SDS.

Composé		λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
C_4	**163a N**	319, 424	539	115 nm, 5032 cm^{-1}	39000	0.11
	163a E	377, 517	597	80 nm, 2592 cm^{-1}	12000	0.22
C_8	**163b N**	317, 458	570	112 nm, 4290 cm^{-1}	21000	0.11
	163b E	378, 516	600	84 nm, 2713 cm^{-1}	16700	0.21
C_1	**114 N**	315, 427	536	109 nm, 4762 cm^{-1}	10800	0.12
	114 E	378, 509	597	88 nm, 2896 cm^{-1}	15900	0.17
Naphtyle	**60 N**	308, 435	538	103 nm, 4401 cm^{-1}	39200	0.20
	60 E	372, 518	613	95 nm, 2992 cm^{-1}	18400	0.21
Epico	**56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
	56 E	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Tableau 6 : Propriétés spectrales des analogues **163a** et **163b** comparée aux analogues **114**, **60** et à l'epicocconone naturelle **56**.

Une fois encore, les analogues **163a** (C_4) et **163b** (C_8) se révèlent un peu moins fluorescents à l'état natif que sous forme énaminone. Les maxima respectifs d'absorption et d'émission sont très proches pour les composés **114** et **163a**, à ceci près que l'analogue **163a** est plus fluorescent sous forme énaminone. Cette observation a donc permis de fixer une longueur optimale de la chaîne aliphatique latérale à quatre carbones, qui sera utilisé pour les synthèses suivantes.

Le composé **163b** présente en revanche une longueur d'onde d'émission sous forme native plus élevée que les autres composés présentés ci-dessus (Tableau 6). Il existe en effet un faible décalage de longueur d'onde entre l'émission de la forme native **163b N** et de la forme énaminone **163b E**, de 30 nm ou 880 cm^{-1} contre 75 nm ou 2300 cm^{-1} pour l'analogue naphtyle **60**. Il sera par conséquent très difficile de distinguer les protéines marquées par l'analogue **163b** du fluorophore n'ayant pas réagi. Les protéines comme la BSA étant des architectures très hydrophobes, une exaltation de fluorescence importante aurait pu être attendue pour un composé lipophile comme l'analogue **163b** sous forme énaminone comparée à la forme native. D'autres effets comme la taille de la molécule **163b**, plus imposante que l'analogue naphtyle **60**, sont probablement responsables des valeurs similaires observées pour les analogues **163a** et **163b**.

3.2.2 Optimisation de la synthèse de la dioxinone bromée 154

Cette partie présente deux voies de synthèses étudiées afin d'obtenir la dioxinone bromée **154**. La stratégie classiquement utilisée jusqu'à présent consiste à préparer un acyl-benzotriazole a d'abord été envisagée, puis une méthode plus concise impliquant un couplage carbonylant pallado-catalysé a été développée.

3.2.2.1 Addition nucléophile de la dioxinone méthyle 65 sur un acide activé

La synthèse de la dioxinone bromée **154** débute donc par la dibromation du fluorène **124** en présence de dibrome Br_2 dans le chloroforme à l'obscurité permettant d'obtenir le dérivé dibromé **164** avec 85% de rendement. L'alkylation du composé **164** par le bromobutane dans les conditions optimisées précédemment conduit au fluorène **157** avec 70% de rendement. Malheureusement, la carboxylation du lithien, obtenu par échange brome-lithium sur le dérivé **157** en présence d'un équivalent de *n*-BuLi, ne permet d'isoler l'acide carboxylique **156** qu'à hauteur de 10% et de manière peu reproductible. Des problèmes de réactivité apparaissent également à l'étape d'activation de l'acide **156**, celui-ci étant totalement insoluble dans le dichlorométhane (Figure 155).

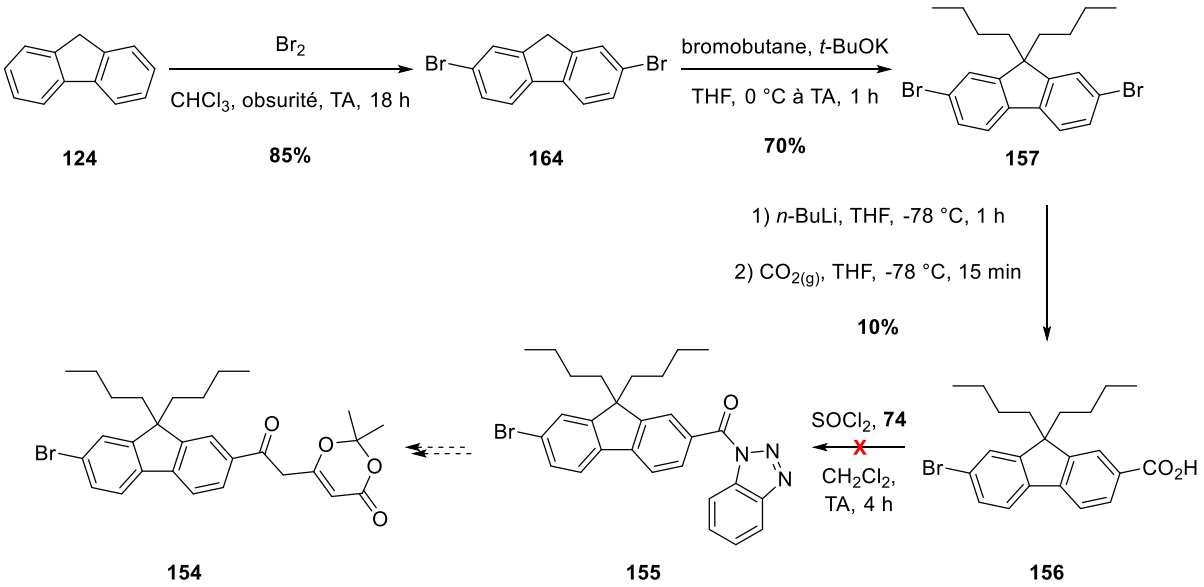


Figure 155 : Première voie de synthèse de la dioxinone bromée **154**.

L'insolubilité de l'acide **156** est visiblement due à la présence de l'atome de brome, puisque le composé équivalent **160a** qui ne possède pas cet halogène est soluble dans les conditions d'activation. Un essai de couplage de Suzuki entre le composé dibromé **157** et un équivalent de l'acide 4-méthoxyboronique **165** a été entrepris, sacrifiant la convergence de la synthèse proposée initialement, afin de vérifier si la réaction pouvait avoir lieu sur un seul atome de brome. Malheureusement un mélange inséparable de produits de mono- et de di-couplage est obtenu (Figure 156).

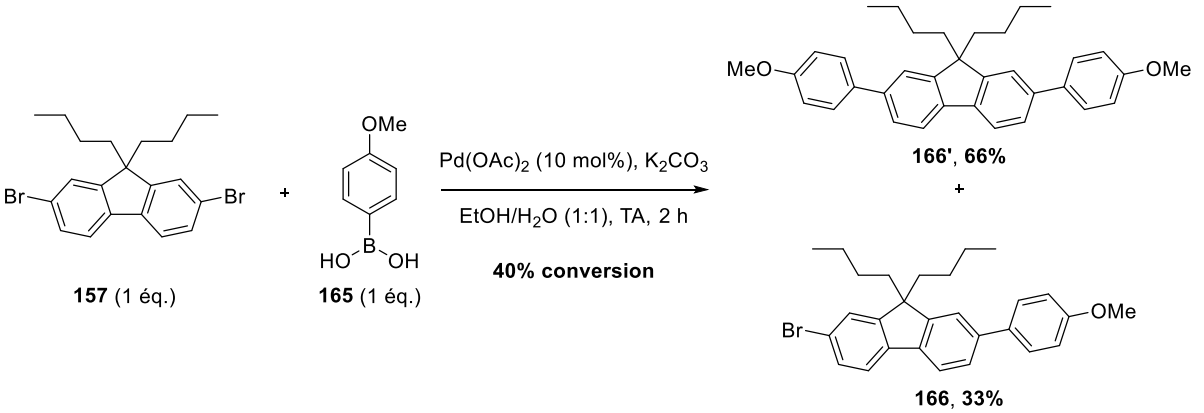


Figure 156 : Tentative de couplage de Suzuki sur le dérivé dibromé **157**.

Devant l'impossibilité d'introduire efficacement l'acide carboxylique ou un groupement donneur sur le dérivé dibromé **157**, une synthèse alternative a été envisagée en introduisant cette fois une fonction aldéhyde. Cet aldéhyde **167** pourrait être utilisé comme électrophile vis-à-vis de l'anion de la dioxinone méthyle **65** et conduirait à la dioxnone bromée **154** après oxydation de l'alcool secondaire **168**[174] (Figure 158).

[174] Dong, Y., Nakagawa-Goto, K., Lai, C.-Y., Morris-Natschke, S. L., Bastow, K. F., Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2341-2344.

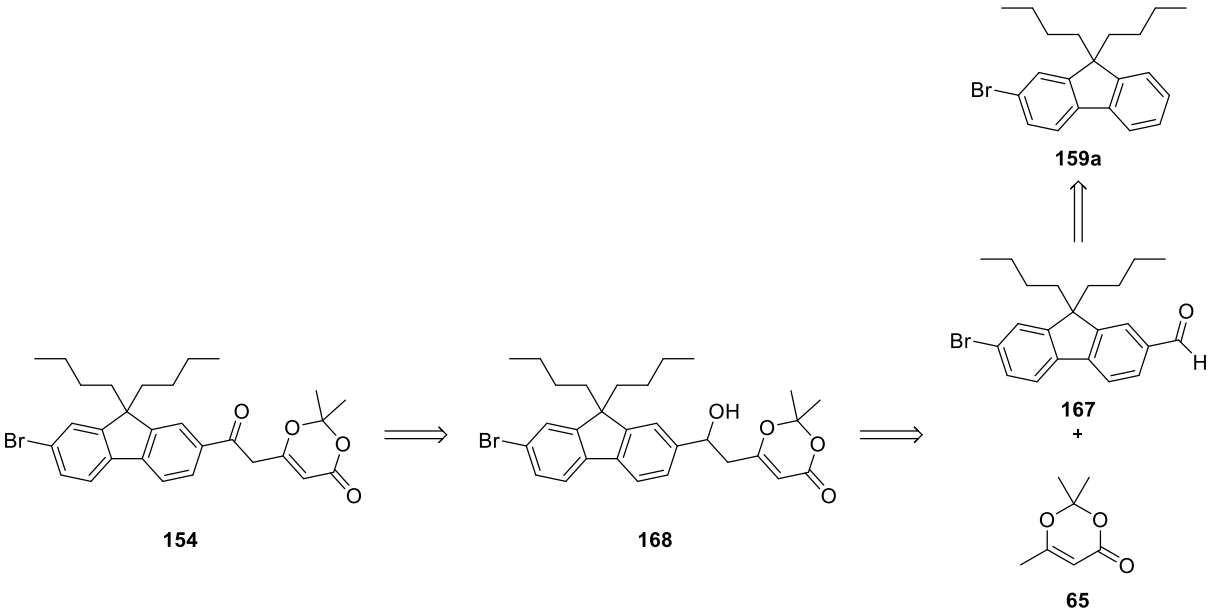
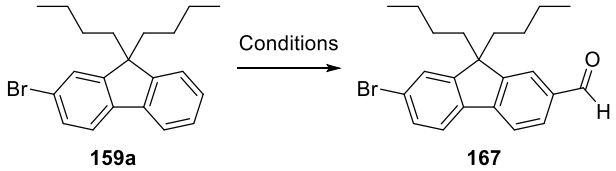


Figure 157 : Deuxième voie de synthèse de la dioxinone bromée **154**.

Afin d'obtenir l'aldéhyde désiré, des tentatives de formylation du composé **159a** *via* la réaction de Vilsmeier-Haack ou des conditions de type Friedel-Crafts[175], sans permettre d'isoler l'aldéhyde correspondant **168** (Tableau 7).



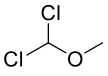
Entrée	Conditions	Température	Temps	Résultat
1	$POCl_3$, DMF	0 °C à TA	6 h	Pas de réaction
2	$POCl_3$, DMF	TA à 100 °C	12 h	Pas de réaction
3	$TiCl_4$, 	0 °C à TA	18 h	Dégradation

Tableau 7 : Tentatives de réaction de formylation sur le composé **159a**.

Finalement l'aldéhyde **168** est obtenu à partir du composé **157** par un échange lithium-brome suivi du piégeage par le DMF de l'organolithien généré avec un rendement de 60% bien supérieur à celui obtenu précédemment en utilisant le CO_2 comme électrophile. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée récemment par le groupe du Prof. Alain Burger pour synthétiser des fluorènes de type D-π-A (Donneur-π-Accepteur) dont l'accepteur est un aldéhyde.[176] L'addition nucléophile de la dioxinone méthyle **65** sur l'aldéhyde **168** en présence de LiHMDS permet de former l'alcool **168** avec une conversion non optimisée de l'ordre de 20%. Le composé **168** se révèle par ailleurs inséparable de la dioxinone **65** n'ayant pas réagi (Figure 158).

[175] Chiang, C.-L., Shu, C.-F., Chen, C.-T. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3717-3720.

[176] Shaya, J., Fontaine-Vive, F., Michel, B. Y., Burger, A. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 10627-10637.

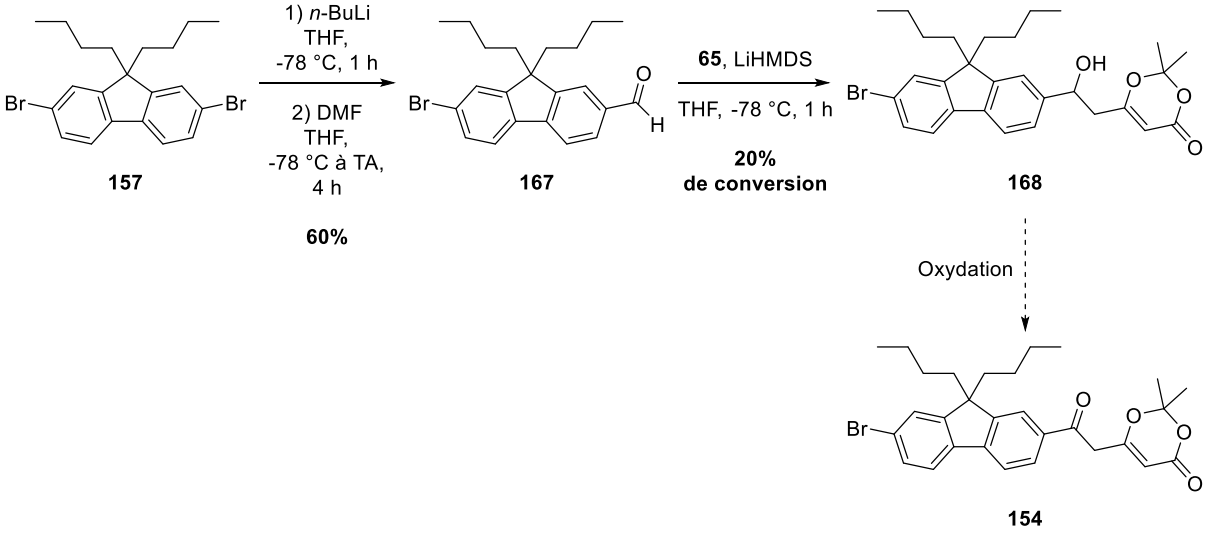


Figure 158 : Tentative d'obtention de l'alcool **168** à partir du composé dibromé **157**.

Ces nombreuses difficultés de synthèse ont remis en cause la stratégie usuellement utilisée au laboratoire consistant à l'addition nucléophile de l'anion de la dioxinone **65** sur un acide activé.

3.2.2.2 Formation directe du motif β-céto dioxinone par couplage carbonylant pallado-catalysé

L'équipe du Prof. Skrydstrup s'est récemment intéressée au couplage carbonylant pallado-catalysé entre des composés iodo-vinyliques ou iodo-aromatiques et des énolates vinylogues (ou diénolates), dont l'anion de la dioxinone méthyle **65** fait partie.[177] Ce type de couplage pallado-catalysé représente un défi synthétique important puisqu'outre l'utilisation ou la génération *in situ* du monoxyde de carbone CO, très toxique, la sélectivité de l'arylation est cruciale. En effet deux complexes de palladium sont envisageables sur les positions α et γ du diénolate, conduisant respectivement au produit d'arylation en α **172** et en γ **173** (Figure 159).[178]

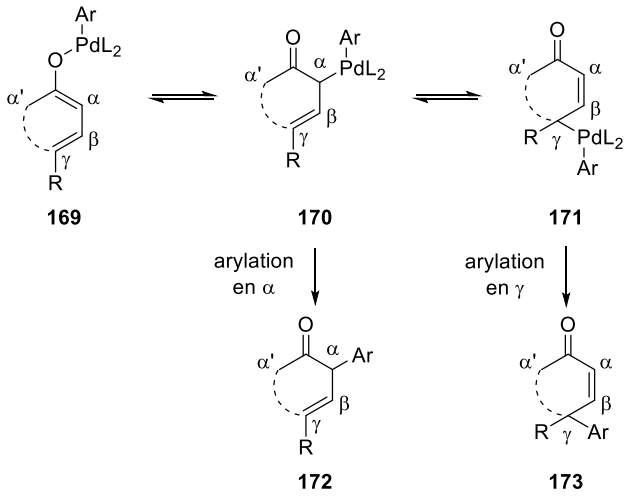


Figure 159 : Arylation en α ou en γ de diénolates par couplage pallado-catalysé.

[177] Makarov, I. S., Kuwahara, T., Jusseau, X., Ryu, I., Lindhardt, A. T., Skrydstrup, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14043-14046.

[178] Hyde, A. M., Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 177-180.

Ce type de réaction est très intéressante pour la synthèse de β-céto dioxinones puisqu'elle se fait sélectivement en position γ de la dioxinone méthyle **65** et permet l'introduction de ce motif en une seule étape sur un iodure d'aryle (Figure 160).

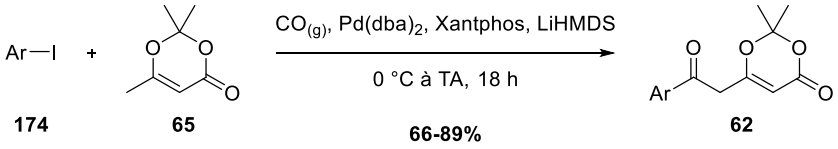


Figure 160 : Synthèse de β-cétodioxinones développée par le groupe du Prof. Skrydstrup.

La particularité de cette réaction réside dans le procédé de génération du CO. Celui-ci est généré *in situ* à partir d'un acide silanecarboxylique **175** en présence de fluorure de césium CsF. La réaction s'initie entre le composé **175** et le CsF à température ambiante en générant, *via* le carboxylate **176**, le fluorosilane **177** ainsi que du monoxyde de carbone et un ion hydroxyde. Ces ions hydroxyde ainsi générés peuvent à leur tour catalyser un réarrangement de Brook 1,2[179] sur l'acide **174**, formant alors le silanol **178** et du monoxyde de carbone (Figure 161).

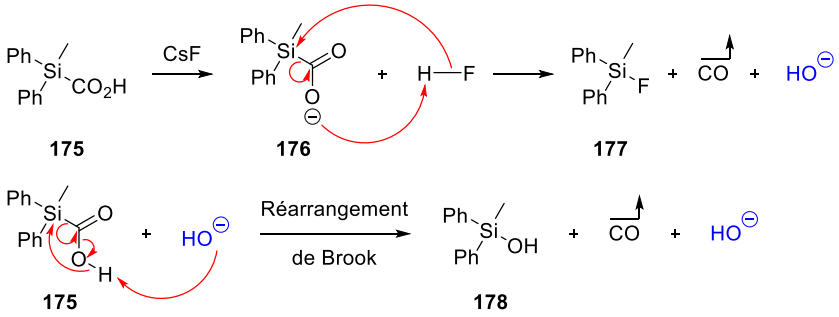


Figure 161 : Génération de CO grâce à l'acide silanecarboxylique **175**.

Le découplage de la réaction pallado-catalysée et de la génération de CO est réalisé grâce à un réacteur à double chambre. Ainsi le monoxyde de carbone généré dans une chambre peut diffuser directement dans la réaction de couplage située dans l'autre chambre (Figure 162).

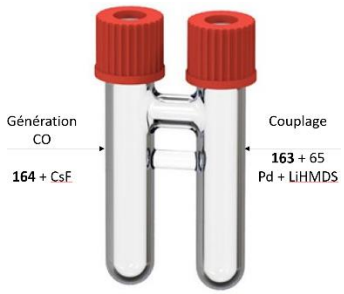


Figure 162 : Montage à double chambre utilisé pour la réaction de carbo-palladation.

Des études mécanistiques[180] ont montré que l'insertion oxydante du palladium dans la liaison C-I est ici précédée d'une étape d'activation du palladium (0) par l'énolate de la dioxinone méthyle **65** conduisant au complexe anionique **I**. Ce complexe est suffisamment réactif pour permettre alors cette étape d'insertion oxydante formant l'intermédiaire **II**. L'insertion de CO à partir du complexe **III** peut alors procéder *via* les intermédiaires **IV**ou **IV'**, conduisant après élimination réductrice à la β-cétodioxinone **62** et à la régénération du palladium (0) (Figure 163).

[179] Friis, S. D., Taaning, R. H., Lindhardt, A. T., Skrydstrup, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18114-18117.

[180] Nielsen, D. U., Lescot, C., Gogsig, T. M., Lindhardt, A. T., Skrydstrup, T. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17926-17938.

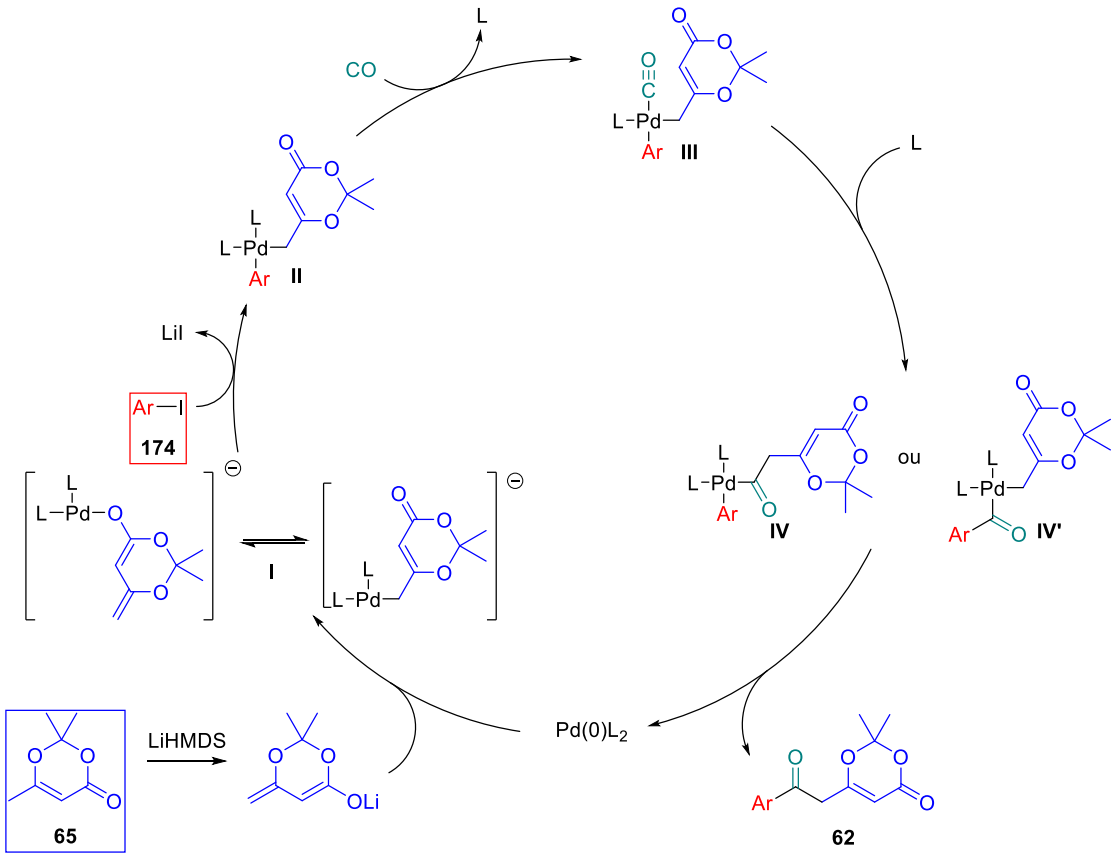


Figure 163 : Cycle catalytique proposé pour la formation des β-cétodioxinones par couplage carbonylant pallado-catalysé.

Une synthèse utilisant ce type de couplage en tant qu'étape clé a donc été envisagée pour la préparation de la dioxinone bromée **154**. Le 2-bromofluorène **109** est ainsi iodé en position 7 pour conduire au 2-bromo,7-iodofluorène **179** avec 68% de rendement. Il est à noter que contrairement à la plupart des étapes d'halogénation de fluorène décrite ici, une purification à l'issue de cette étape n'est pas requise. Le fluorène **179** est ensuite di-alkylé par le bromobutane en présence de *t*-BuOK conduisant au dérivé **180** avec un rendement de 70%. C'est sur le composé **180** qu'est effectuée le couplage carbonylant pallado-catalysé, conduisant de manière totalement sélective à la dioxinone bromée **154**, isolée avec 80% de rendement, soit 38% sur 3 étapes (Figure 164).

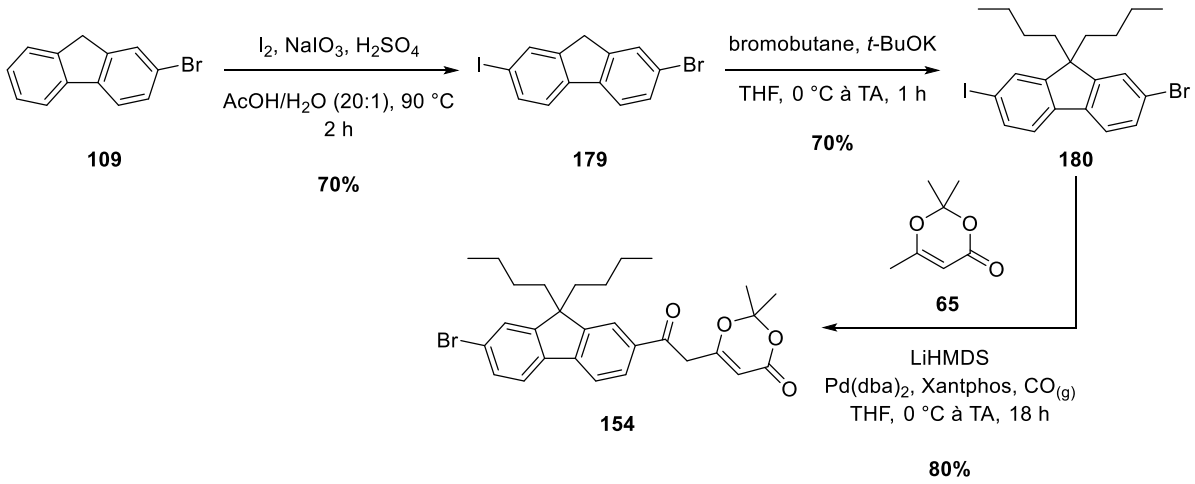
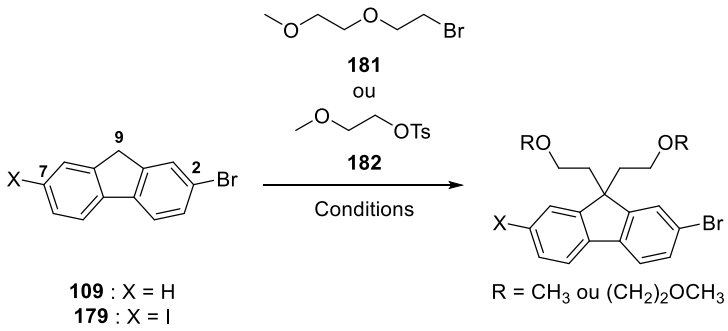


Figure 164 : Synthèse de la dioxinone bromée **154**.

3.2.2.3 Variation des chaînes alkyles en position 9 du fluorène

Afin d'étudier l'influence de la nature des chaînes introduites en position 9 du noyau fluorène sur la solubilité en milieu aqueux, la synthèse de dioxinones substituées par des chaînes plus polaires de type 1-methoxypropyle et 1-(2-méthoxyéthoxy)propyle a été envisagée. Il a en effet été montré que la présence de chaînes oxygénées sur cette position du noyau fluorène influençait peu la distribution des électrons π au sein de ces structures, en faisant ainsi une position de choix pour la modification des propriétés de solvatation sans influence sur les propriétés d'absorption à deux photons.[181]

Cependant l'utilisation d'électrophiles oxygénés tels que les composés **181** et **182** pour l'alkylation du fluorène **179** ne permet pas d'isoler le composé dialkylé correspondant mais conduit à un mélange complexe de produits de dégradation. De plus, la modification des conditions réactionnelles n'a pas permis d'obtenir les fluorènes dialkylés correspondants à partir des dérivé **179** ou **109** (Tableau 8).



Entrée	X	Conditions	Température	Temps	Résultat
1	I	*t*-BuOK, THF	0 °C à TA	18 h	Dégradation
2	I	*t*-BuOK, DMF	0 °C à TA	18 h	Pas de réaction
3	I	$NaOH_{(aq)}$ (50%), TBAB, PhMe	80 °C	24 h	Dégradation
4	I	LDA, THF	0 °C à TA	4 h	Monoalkylation
5	I	KOH, KI, DMSO	TA	24 h	Dégradation
6	H	$NaOH_{(aq)}$ (50%), TBAI, PhMe	80 °C	24 h	Oxydation en 9-fluorènone
7	H	KOH, KI, DMSO	TA	18 h	Dégradation

Tableau 8 : Tentatives d'alkylation directe des composés **109** et **179**.

Même si certaines de ces conditions ont été décrites sur des composés similaires,[182] aucun résultat positif n'a été obtenu sur les dérivés du fluorène **109** et **179**. Afin de pallier ce problème, l'étape d'alkylation doit être réalisée sur le fluorène **124** en amont des réactions d'halogénation électrophiles.[183] Avec ce nouvel ordre des étapes de synthèse, la réaction d'alkylation permet d'obtenir les composés souhaités **183** et **184** avec des rendements respectifs de 32% et 22% sur trois étapes. Les dioxinones bromées **189** et **190** sont finalement obtenues avec 54% et 40% de rendement (Figure 165).

[181] Morales, A. R., Luchita, G., Yanez, C. O., Bondar, M. V., Przhonska, O. V., Belfield, K. D. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2600-2608.

[182] a) Nguyen, D. M., Frazer, A., Rodriguez, L., Belfield, K. D. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 3472-3481. b) Choi, H., Jeong, B.-S., Do, K., Ju, M. J., Song, K., Ko, J. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 329-336.

[183] Holmes, A. B., Park, T. *Electroactive polyarylamine-type compositions* WO2002051958A1, **2002**.

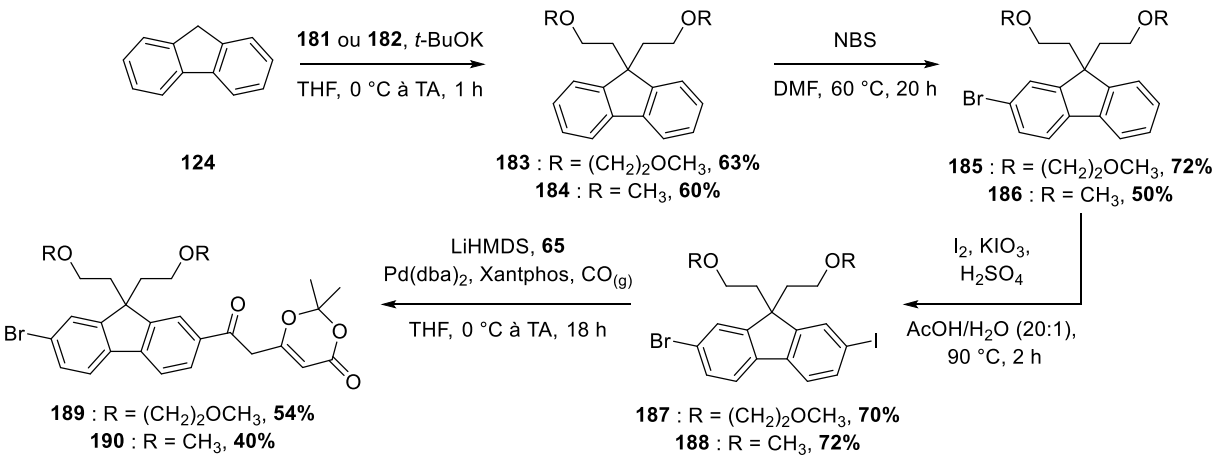


Figure 165 : Synthèses des dioxinones bromées **178** et **179**.

De même que précédemment, les dioxinones **193** et **194**, équivalentes aux composés **189** et **190** mais ne possédant pas d'atome de brome en position 7 du fluorène, ont également été préparées pour permettre d'étudier l'influence des groupements donneurs sur les propriétés spectrales des analogues correspondants (Figure 166).

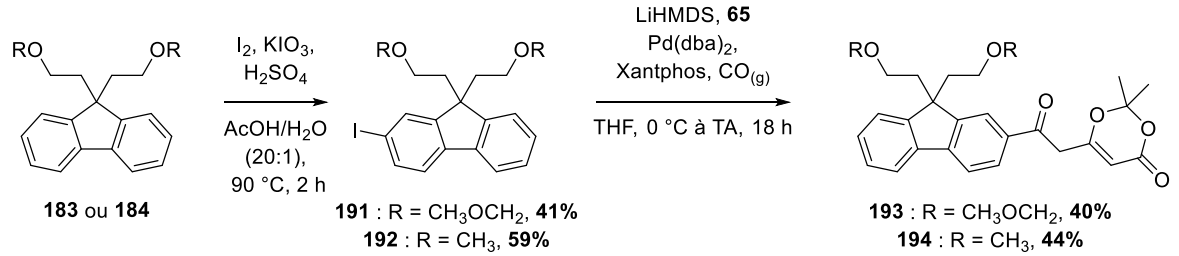


Figure 166 : Synthèse des dioxinones **193** et **194** ne possédant pas d'atome de brome en position 7.

3.2.3 Couplage de Suzuki – Introduction des groupements donneurs sur la dioxinone

Une fois les différentes dioxinones bromées préparées, l'introduction des différents groupements donneurs envisagés par couplage de Suzuki est possible. La dioxinone bromée **154** a d'abord été utilisée comme substrat, permettant d'isoler les produits de couplages avec l'acide 4-méthoxyphényleboronique **165** et l'acide 4-diméthylaminophényleboronique **195** avec des rendements respectifs de 80% et 47%. Dans ce dernier cas, la réaction s'avère très peu reproductible, pouvant même conduire à la dégradation des dioxinones **154** et **197** lorsque les temps de réaction sont supérieurs à 20 h (Figure 167).

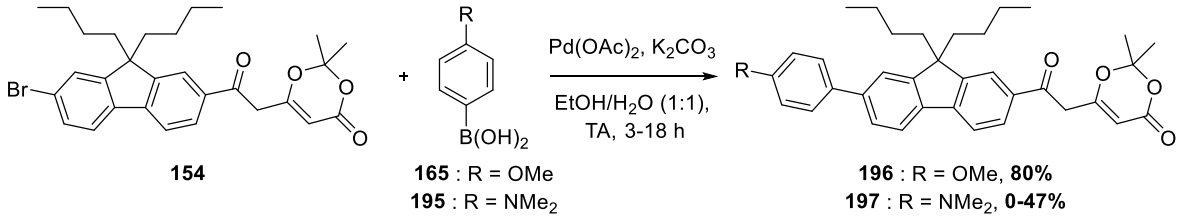


Figure 167 : Couplages de Suzuki sur la dioxinone **154**.

L'utilisation d'autres sources de palladium permet d'augmenter légèrement le rendement du couplage avec l'acide boronique **195**, mais la réaction reste limitée par les problèmes de dégradation et de séparation des composés **154** et **197**. L'utilisation de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ ou de Pd(SPhos) permet ainsi d'obtenir les composés **197** et **199** avec des rendements respectifs de 55% et 43% (Figure 168).

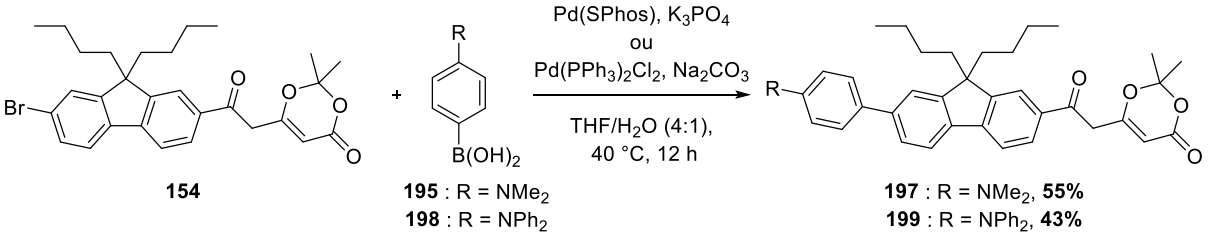
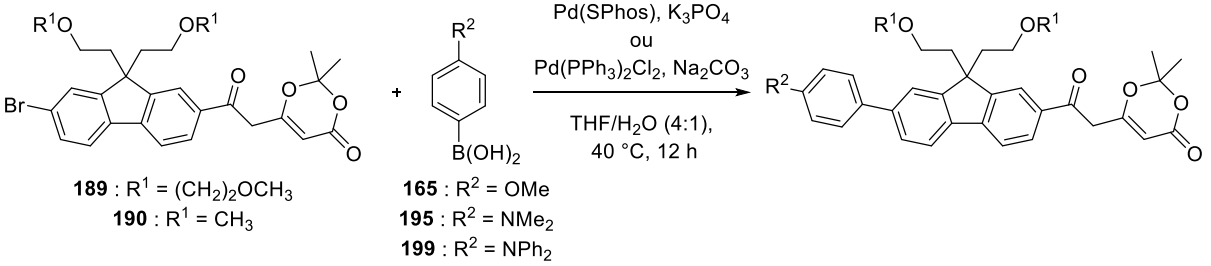


Figure 168 : Conditions alternatives pour le couplage de Suzuki sur la dioxinone **154**.

Ces nouvelles conditions ont également été appliquées sur les dioxinones bromées **193** et **194**. Dans le cas des couplages impliquant les acides 4-méthoxyphénylboronique **165** ou 4-diphénylaminophénylboronique **198**, les dioxinones désirées sont isolées avec des rendements allant de 41% à 62%. Cependant il n'a pas été possible d'isoler le produit de couplage avec l'acide 4-diméthylaminophénylboronique **195**, dans chaque cas la réaction se révèle très lente et toute tentative d'accroissement de la charge catalytique ou des temps de réaction entraîne la dégradation des dioxinones (Figure 169).



Composé	R^1	R^2	Conditions	Rendement
200	CH_3	OMe	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$, Na_2CO_3	**62%**
201a	CH_3	NMe_2	Pd(SPhos), K_3PO_4	**n.d.**
201b	$(CH_2)OCH_3$	NMe_2	Pd(SPhos), K_3PO_4	**n.d.**
202a	CH_3	NPh_2	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$, Na_2CO_3	**41%**
202b	$(CH_2)_2OCH_3$	NPh_2	Pd(SPhos), K_3PO_4	**44%**

Figure 169 : Couplage de Suzuki sur les dioxinones **189** et **190**.

Afin d'identifier l'origine des échecs des couplages de Suzuki avec l'acide boronique **195** et de vérifier la stabilité du motif dioxinone en présence de cet acide boronique dans ces conditions, ce dernier a été mis en présence de la dioxinone naphtyle **82** en conditions de couplage. Etant donnée l'absence d'halogène sur le noyau naphtyle, de l'acide borique $B(OH)_3$ a également été ajouté pour simuler le déroulement du couplage. Dans ces conditions, la dioxinone **82** est majoritairement récupérée intacte mais un produit totalement inattendu **203**, dont la formation n'est pour l'heure pas expliquée, est également isolé avec 20% de rendement (Figure 170). Il est à noter que la structure proposée pour le composé **203** n'est qu'hypothétique mais demeure à l'heure actuelle la plus compatible avec les données analytiques effectuées. Il est à noter que les essais subsidiaires effectués pour comprendre la formation de ce produit n'ont pour l'instant pas permis d'apporter des indices quant à un mécanisme plausible de formation du composé **203**.

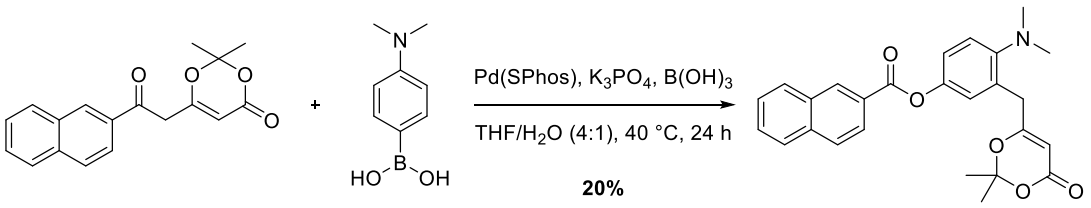


Figure 170 : Formation d'un produit secondaire **203** en conditions de couplage de Suzuki.

Les dioxinones ainsi préparée ont pu alors être mises en réaction d'acylfuranonisation avec l'alcool désaromatisé **61**.

3.2.4 Formation des analogues de l'epicocconone optimisés pour l'absorption bi-photonique

Dans cette partie les réactions de formation des différents analogues correspondants aux dioxinones synthétisées seront présentés. Les propriétés spectrales de ces analogues seront également discutées.

3.2.4.1 Réaction d'acylfuranonisation entre l'alcool désaromatisé 61 et les β-céto dioxinones fluorène

Il est possible d'effectuer la réaction d'acylfuranonisation en utilisant deux types de conditions, comme cela a été présenté en introduction. Dans les deux cas, la dioxinone et l'alcool désaromatisé sont mis en réaction au reflux du toluène afin de former le β,δ cétoester **74**. La condensation de Knoevenagel peut ensuite s'effectuer en présence de triéthylamine au reflux du toluène, mais également en utilisant le carbonate de césium dans le méthanol à température ambiante (Figure 171).

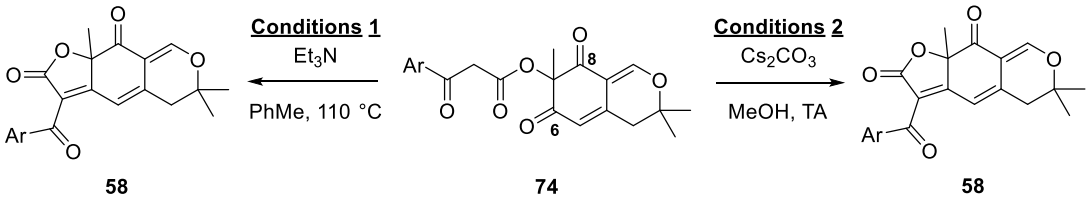
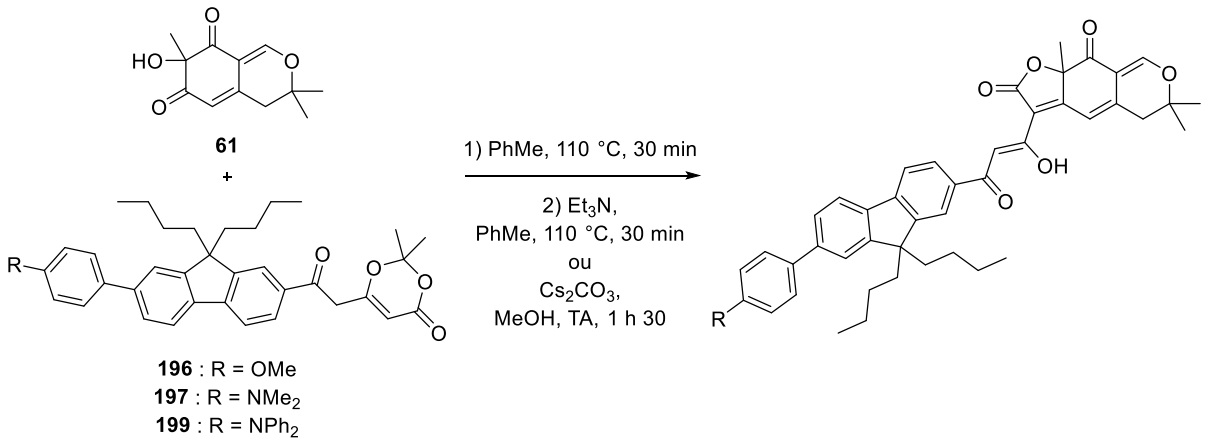


Figure 171 : Conditions de condensation de Knoevenagel pour la formation des analogues de l'epicocconone.

Le choix des conditions opératoires est essentiellement pratique, en effet les bruts réactionnels obtenus sont plus faciles à analyser dans les conditions à température ambiante mais des problèmes de solubilité du composé **74** dans le méthanol ont déjà été observés. Dans la suite, les conditions utilisant la triéthylamine seront privilégiées dès que possible.

Les premières réactions d'acylfuranonisations ont été réalisées sur les dioxinones **196**, **197** et **199**. Les analogues **206** et **208** possédant les groupements 4-méthoxyphényle et 4-diphénylaminophényle sont obtenus avec des rendements respectifs de 11% et 10%. Cependant, aucune réaction n'est observée avec la dioxinone **197**, malgré sa consommation totale en suivi CCM, et seul le produit résultant de la dégradation de la dioxinone en acétoacétone est observé, quelles que soient les conditions de condensation de Knoevenagel utilisées (Figure 172).

Les conditions en présence de triéthylamine impliquant le chauffage à 110 °C du milieu, les conditions plus douces au carbonate de césium ont été initalement préférées pour la formation de l'analogue **208** qui a été obtenu malgré des soucis de solubilité du β,δ cétoester intermédiaire dans le méthanol, renforçant encore l'utilisation de la triéthylamine dans la suite des expériences.



Composé	R	Conditions de Knoevenagel	Rendement
206	OMe	Et_3N, PhMe, 110 °C, 30 min	**11%**
207	NMe_2	Et_3N, PhMe, 110 °C, 30 min ou Cs_2CO_3, MeOH, TA, 1 h 30	**n.d.**
208	NPh_2	Cs_2CO_3, MeOH, TA, 1 h 30	**10%**

Figure 172 : Réactions d'acylfuranonisations pour l'obtention des analogues **206**, **207** et **208**.

La réaction a ensuite été tentée, sans succès, sur les dioxinones **193** et **202b**. Là encore aucune trace de produit de cyclisation n'est observée après ajout de la base et seuls les acétoacétones provenant des dioxinones sont isolées (Figure 173).

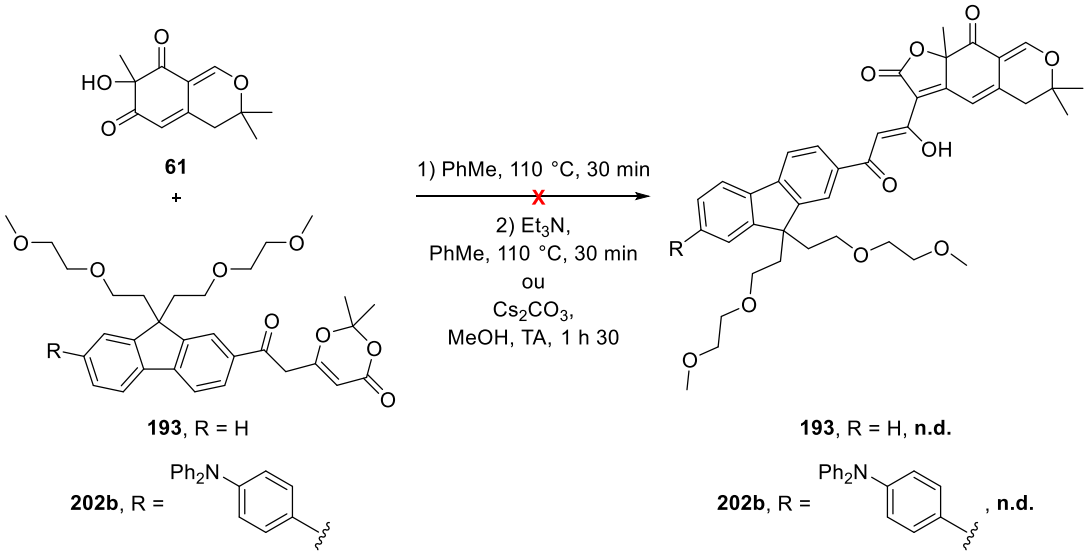


Figure 173 : Tentatives de réaction d'acylfuranonisation entre l'alcool désaromatisé **61** et les dioxinones **193** et **202b**.

Au contraire, les réactions entre l'alcool **61** et les dioxinones **194**, **200** et **202a** conduisent aux analogues de l'epicocconone correspondants **211**, **212** et **213** avec des rendements respectifs de 9%, 6% et 5% (Figure 174).

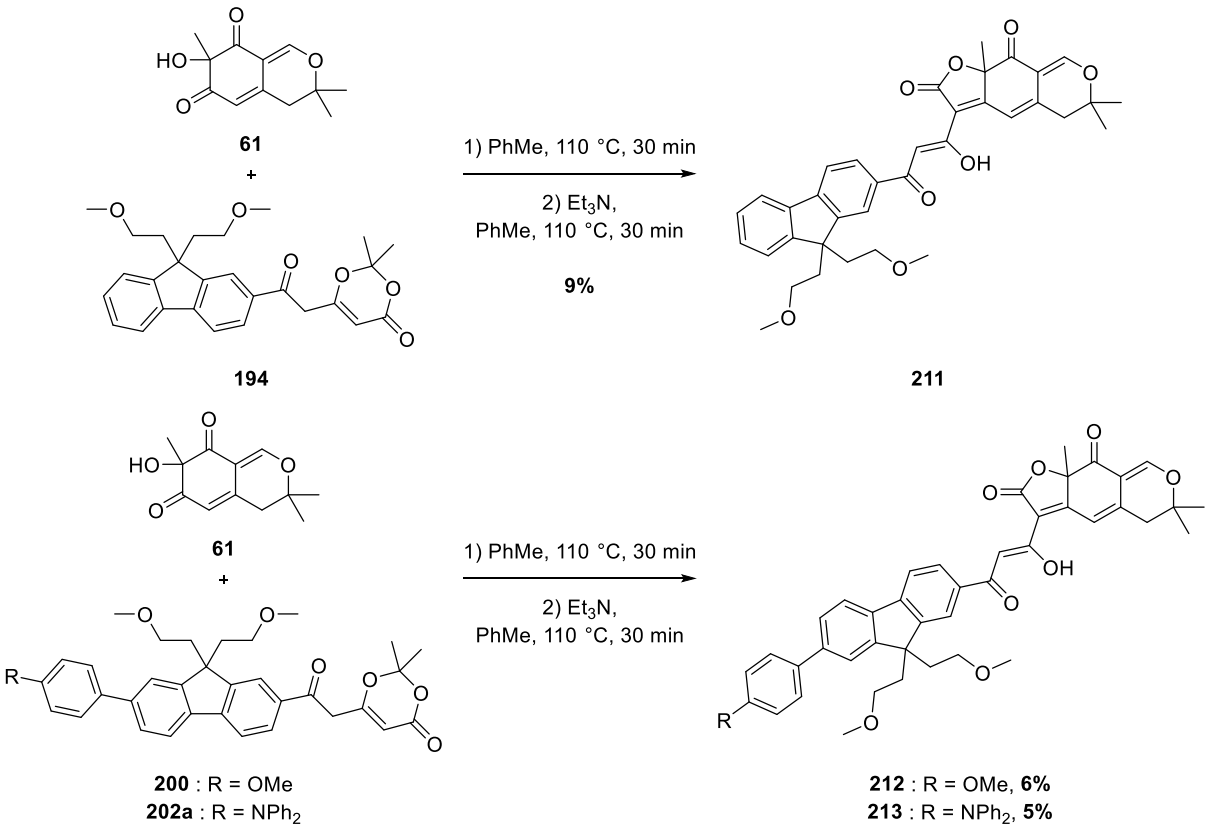


Figure 174 : Réaction d'acylfuranonisation entre l'alcool désaromatisé **61** et les dioxinones **194**, **200**, **202a**.

Il demeure délicat d'expliquer les échecs de la réaction d'acylfuranonisation avec certaines dioxinones. Le fait que l'acétoacétone résultant de l'hydratation/décarboxylation de l'acylcétène (voir Figure 102) soit isolée dans ces cas implique que le β,δ cétoester intermédiaire ne se forme pas.

3.2.4.2 Propriétés spectrales des analogues de l'epicocconone synthétisés

Les caractéristiques photophysiques des cinq nouveaux analogues obtenus ont été évaluées. Tout d'abord les analogues à chaînes latérales *n*-butyle (composés **163a**, **206** et **208**) d'une part et les analogues portant des chaînes latérales 1-méthoxypropyle (composés **211**, **212** et **213**) d'autre part seront comparés entre eux afin de discuter l'influence de l'introduction des groupements donneurs. Dans un deuxième temps, l'impact de la nature des chaînes introduites sur le fluorène (*n*-butyle et 1-méthoxypropyle) sera étudié.

3.2.4.2.1 Mesures des propriétés photophysiques relatives à l'absorption à un photon

Les propriétés spectrales des analogues ont tout d'abord été étudiées dans un solvant organique simple, le dichlorométhane (Figure 175 et Figure 176). Etant donné ce choix, l'utilisation d'une amine primaire organique telle que la *n*-butylamine est nécessaire pour des raisons de solubilité. Les résultats sont résumés ci-dessous (Figure 175, Figure 176 et Tableau 9).

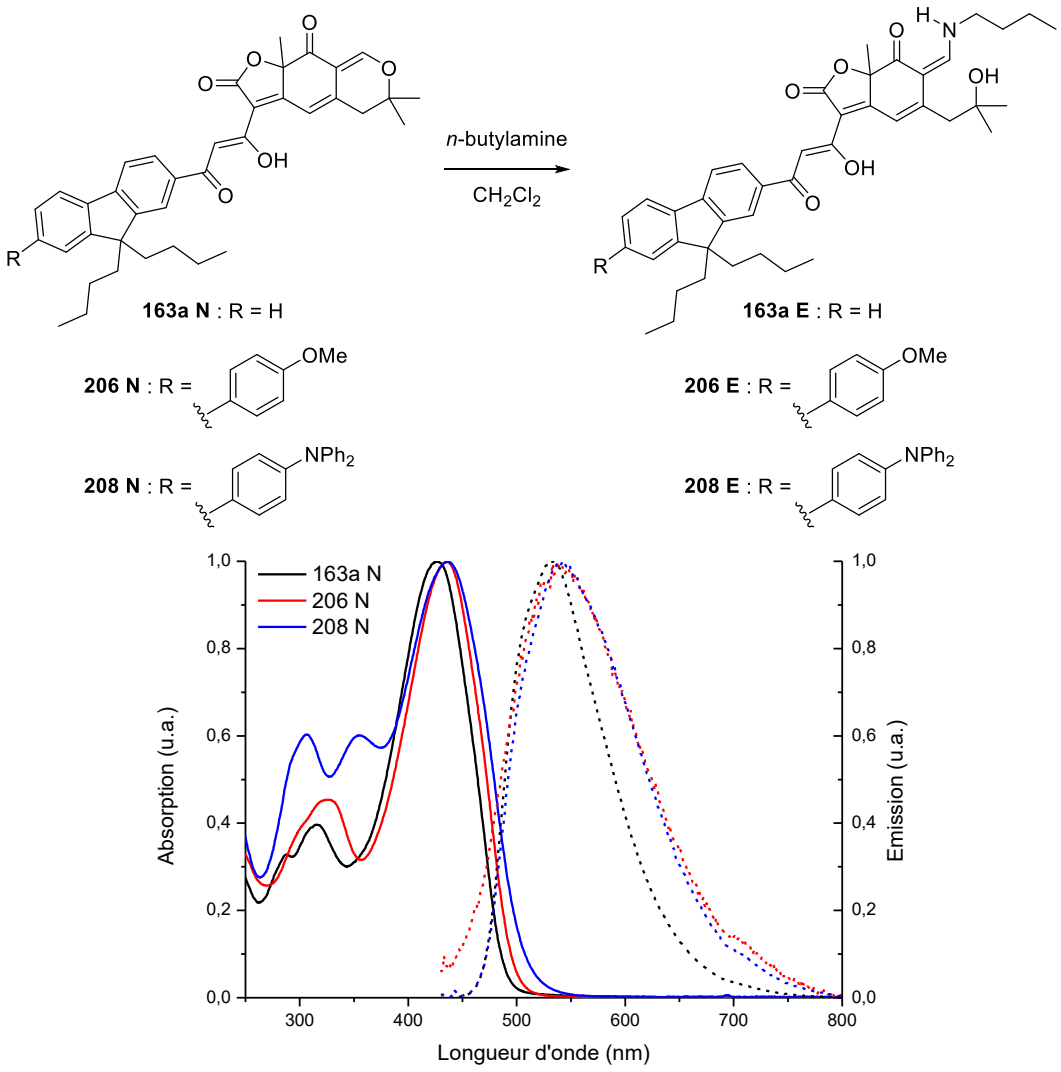


Figure 175 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des composés **163a**, **206** et **208** sous forme native (N) dans le dichlorométhane.

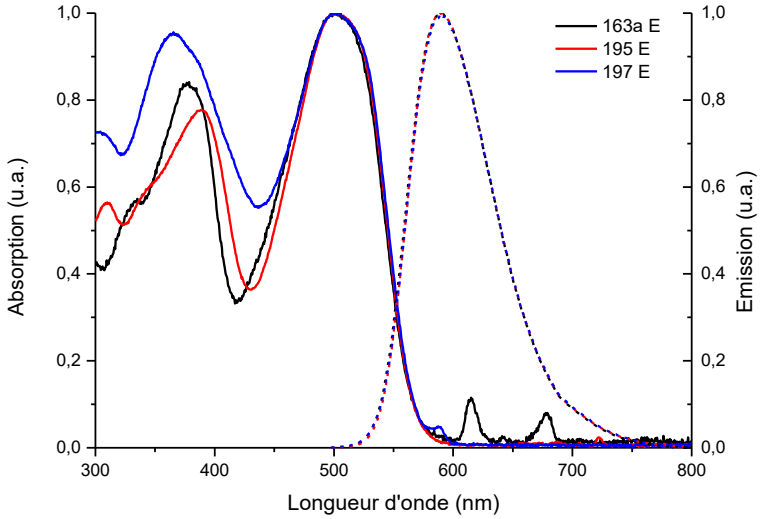


Figure 176 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (pointillés) des analogues **163a**, **206** et **208** sous forme énaminone (E) dans le dichlorométhane.

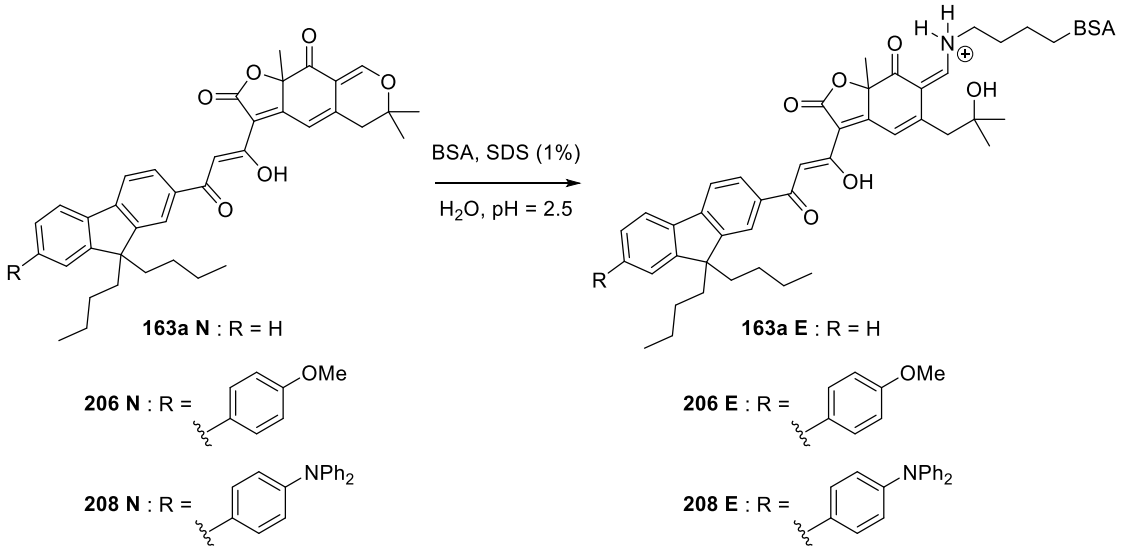
Composé		λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
H	**163a N**	315, 424	531	107 nm, 4753 cm^{-1}	53500	0.22
	163a E	377, 501	589	88 nm, 2982 cm^{-1}	64600	0.48
pOMe	**206 N**	325, 436	540	112 nm, 4290 cm^{-1}	44800	0.01
	206 E	388, 505	590	85 nm, 2853 cm^{-1}	31900	0.5
Ph_3N	**208 N**	355, 436	540	104 nm, 4417 cm^{-1}	48400	0.03
	208 N	378, 509	597	88 nm, 2896 cm^{-1}	32200	0.04
Epico[a]	Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
	Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Tableau 9 : Propriétés spectrales des analogues **163a**, **206** et **208** mesurées dans le dichlorométhane.
[a]Mesures effectuées en présence de BSA à pH = 2.5 dans l'eau/SDS.

Il est intéressant de souligner l'effet « off-on » observé sur l'analogue **206** possédant le groupement donneur 4-méthoxyphényle (pOMe) : sous forme native (**206 N**) ce composé est très peu fluorescent (rendement quantique de 0.01) mais en présence de la *n*-butylamine une grande exaltation de fluorescence est observée (rendement quantique de 0.5 pour **206 E**). Cet effet, comparable à celui observé pour l'epicocconone naturelle **56**, est très intéressant pour des applications de marquage et d'imagerie.

D'autre part, le composé **208** possédant le groupement donneur triphénylamine (Ph_3N) est très peu fluorescent sous les forme native (rendement quantique de 0.03 pour **208 N**) et énaminone (rendement quantique de 0.04 pour **208 E**).

Afin de confirmer ces résultats prometteurs pour l'analogue **206** et dans l'optique d'applications en imagerie, les études photophysiques sur ces analogues ont également été réalisées dans les conditions classiques de mesure : en milieu aqueux et en présence de BSA (Figure 177, Figure 178 et Tableau 10).



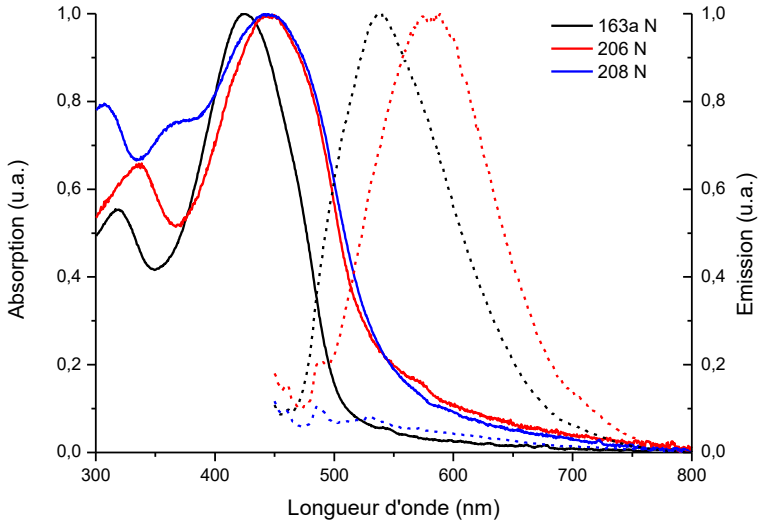


Figure 177 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillés) des analogues **163a**, **206** et **208** sous forme native (N) dans l'eau/SDS.

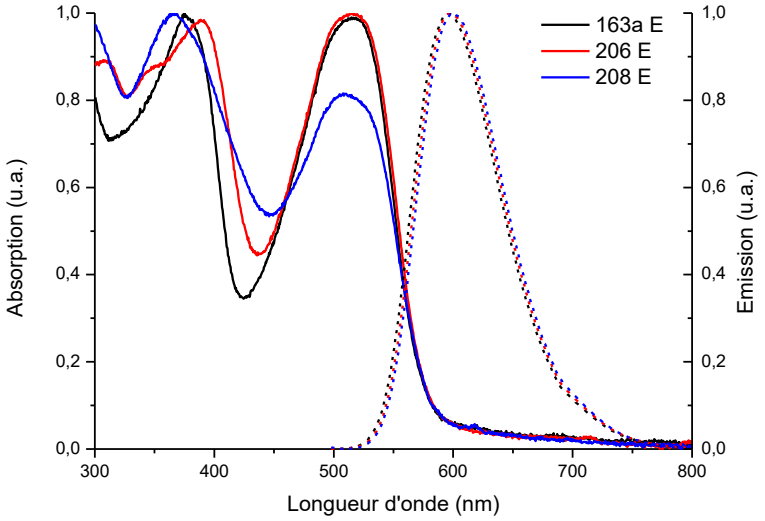


Figure 178 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillés) des analogues **163a**, **206** et **208** sous forme énaminone (E) obtenus dans l'eau/SDS.

Composé		**λ_{abs} max (nm)**	**λ_{em} max (nm)**	**Déplacement de Stokes**	**ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})**	**Φ_F**
H	**163a N**	319, 424	539	115 nm, 5032 cm^{-1}	39000	0.11
	163a E	377, 517	597	80 nm, 2592 cm^{-1}	12000	0.22
pOMe	**206 N**	337, 447	575	128 nm, 4980 cm^{-1}	13600	0.1
	206 E	389, 515	597	82 nm, 2667 cm^{-1}	17000	0.21
Ph_3N	**208 N**	370, 446	540	94 nm, 3903 cm^{-1}	27150	0.02
	208 N	366, 515	600	85 nm, 2751 cm^{-1}	18600	0.10
Epico	Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
	Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Tableau 10 : Propriétés spectrales des analogues **163a**, **206** et **208** mesurées dans l'eau/SDS en présence de BSA.

De même que précédemment, l'analogue **206** présente une exaltation de fluorescence lorsqu'il est mis en présence de BSA (rendement quantique de 0.1 pour **206 N** contre 0.21 pour **206 E**), cependant ce phénomène est moins marqué que dans le dichlorométhane.

Contrairement aux observations en solvant organique, l'analogue **208** présente ici une légère fluorescence sous forme énaminone (rendement quantique de 0.1 pour **208 E**) alors qu'il n'est pas fluorescent sous forme native (rendement quantique de 0.02 pour **208 N**).

De plus l'analogue **206** présente, dans l'eau/SDS sous forme native (**206 N**), une émission de fluorescence décalée vers le rouge à 575 nm alors qu'une valeur aux alentours de 540 nm pouvait être attendue comme pour les analogues **163a** et **208**.

Une représentation alternative des rendements quantiques de fluorescence de ces différents composés pour les milieux organique et aqueux est donnée ci-dessous sous forme d'histogramme (Figure 179).

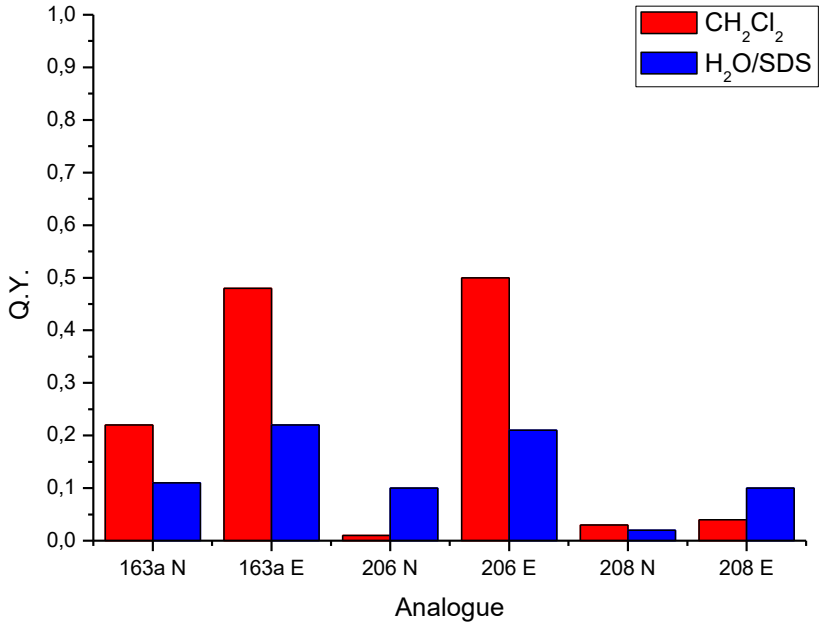


Figure 179 : Comparaison des rendements quantiques de fluorescence des analogues **163a**, **206** et **208**, sous forme native (N) et sous forme énaminone (E), obtenus dans le dichlorométhane et en milieu aqueux.

L'analogue sans groupement donneur **163a** est donc plus fluorescent en milieu organique qu'en milieu aqueux, et cela sous forme native (rendement quantique de 0.22 dans le dichlorométhane contre 0.11 dans l'eau/SDS pour **163a N**) comme sous forme énaminone (rendement quantique de 0.48 dans le dichlorométhane contre 0.22 dans l'eau/SDS pour **163a E**). Les résultats sont plus nuancés en ce qui concerne les analogues **206** et **208** possédant un donneur puisque la nature de ce donneur et l'interaction des fluorophores avec les micelles de SDS ont une grande influence sur les propriétés de fluorescence. Ainsi l'analogue **208**, très peu fluorescent dans le dichlorométhane, présente une émission plus importante dans le système eau/SDS. La relative apolarité de la BSA et des micelles de SDS changeant l'environnement local du fluorophore peut expliquer de telles différences.

Afin de confirmer cet effet de la polarité du solvant, des mesures photophysiques ont également été effectuées dans le toluène, en milieu organique apolaire (Figure 180, Figure 181 et Tableau 11).

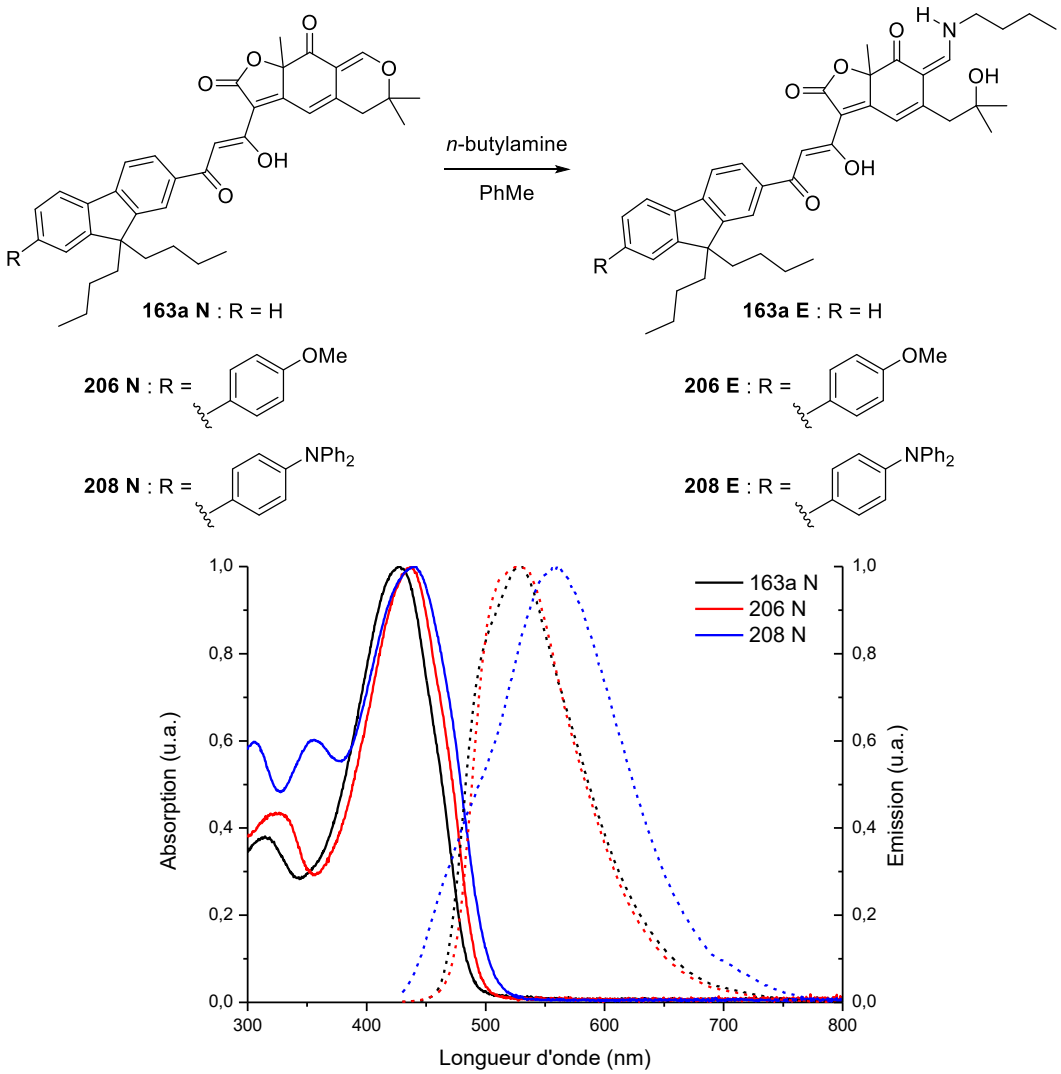


Figure 180 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des analogues **163a**, **206** et **208** sous forme native (N) dans le toluène.

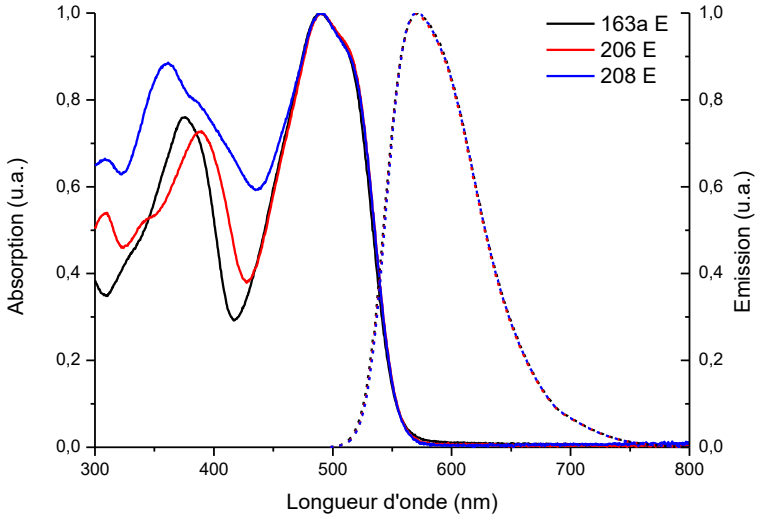


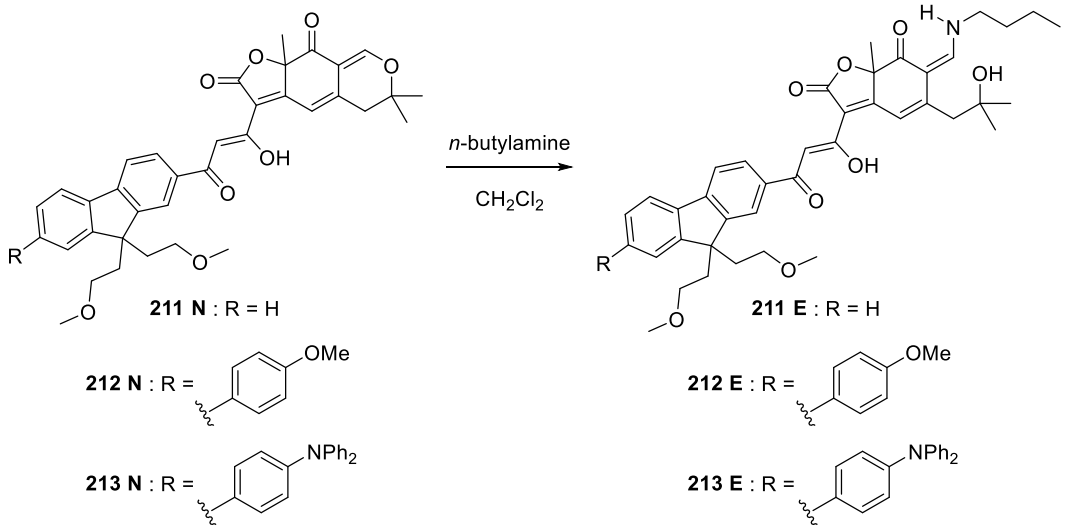
Figure 181 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des analogues **163a**, **206** et **208** sous forme énaminone (E) dans le toluène.

Composé		λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
H	**163a N**	314, 427	529	102 nm, 4516 cm^{-1}	39000	0.99
	163a E	374, 490	571	81 nm, 2895 cm^{-1}	29000	0.48
pOMe	**206 N**	326, 437	527	90 nm, 3908 cm^{-1}	50250	1
	206 E	389, 490	570	80 nm, 2864 cm^{-1}	37800	0.61
Ph_3N	**208 N**	356, 439	559	120 nm, 4890 cm^{-1}	39600	0.61
	208 N	362, 491	571	80 nm, 2853 cm^{-1}	34500	0.78
Epico[a]	Epicocconone **56 N**	314, 427	529	102 nm, 4516 cm^{-1}	39000	0.99
	Epicocconone **56 E**	374, 490	571	81 nm, 2895 cm^{-1}	29000	0.48

Tableau 11 : Propriétés spectrales des analogues **163a**, **206** et **208** mesurées dans le toluène. [a]Mesures effectuées en présence de BSA dans l'eau/SDS.

Dans ce solvant organique, les analogues sont tous fluorescents aussi bien sous forme native que sous forme énaminone. Un déplacement des longueurs d'onde d'émission vers le bleu dans ce solvant est observé pour les formes natives des analogues **163a** et **206**, ainsi que pour l'ensemble des formes énaminones. Au contraire, un déplacement vers le rouge de l'émission du composé **208**, sous forme native, est observé.

Des mesures similaires ont été réalisées sur la série des analogues possédant les chaînes 1-méthoxypropyle **211**, **212** et **213**, cependant les quantités de composés obtenues étant plus faible, une étude dans le dichlorométhane et dans l'eau/SDS a uniquement été menée. Les données photophysiques dans le dichlorométhane sont résumées ci-après (Figure 182, Figure 183 et Tableau 12).



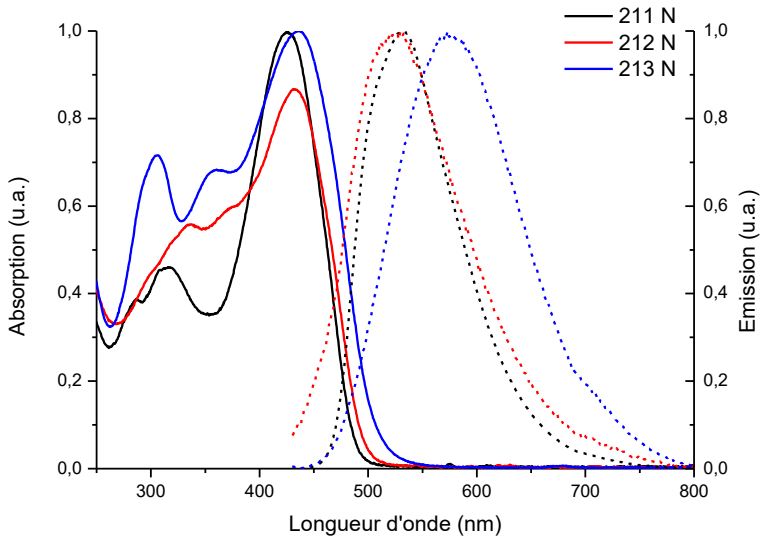


Figure 182 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des analogues **211**, **212** et **213** sous forme native (N) dans le dichlorométhane.

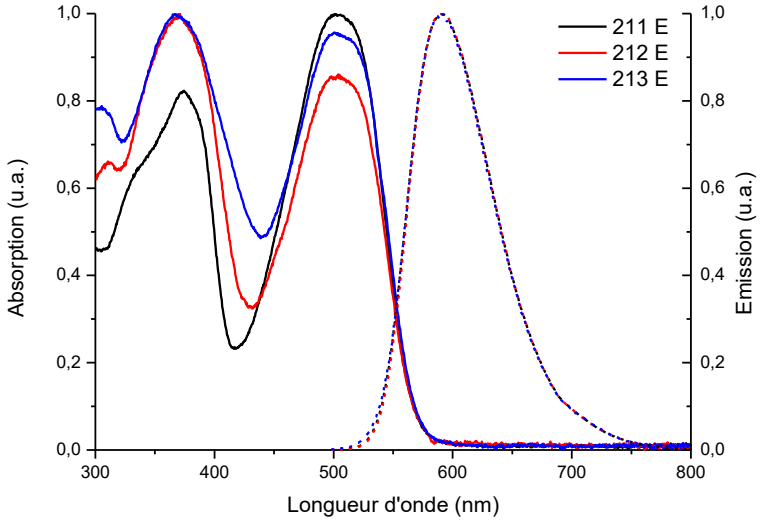


Figure 183 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des analogues **211**, **212** et **213** sous forme énaminone (E) dans le dichlorométhane.

Composé		λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
H	**211 N**	314, 426	532	106 nm, 4677 cm^{-1}	32350	0.27
	211 E	373, 505	591	86 nm, 2882 cm^{-1}	64600	0.5
pOMe	**212 N**	322, 413	506	93 nm, 4450 cm^{-1}	23300	0.02
	212 E	369, 505	591	86 nm, 2882 cm^{-1}	31900	0.49
Ph_3N	**213 N**	362, 436	577	141 nm, 5605 cm^{-1}	29600	0.03
	213 E	367, 503	590	87 nm, 2932 cm^{-1}	92200	0.02
Epico[a]	Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
	Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Tableau 12 : Propriétés spectrales des analogues **211**, **212** et **213** dans le dichlorométhane. [a]Mesures effectuées en présence de BSA dans l'eau/SDS.

En termes de rendement quantique, les mêmes tendances sont observées pour ces analogues et notamment sur le composé **213** possédant le groupement donneur triphénylamine qui n'est que très faiblement fluorescent dans le dichlorométhane. Il en est de même pour l'analogue 4-méthoxyphényl **212**, qui présente un effet « off-on » lors de l'ajout de butylamine (passage d'un rendement quantique de 0.02 pour la forme **212 N** à 0.49 pour la forme **212 E**). Des écarts de longueurs d'onde d'émission entre les maxima respectifs des différentes formes natives (N) sont également observés. L'analogue **211** sans donneur émet ainsi sous forme native (**211 N**) à 532 nm, ce qui est comparable aux émissions relevées pour les composés natifs précédents (voir Tableau 9). Au contraire, un décalage de l'émission vers le bleu est observé pour la forme native de l'analogue 4-méthoxyphényl **212 N** (émission à 506 nm) et un décalage vers le rouge peut être remarqué sur la forme native de l'analogue triphénylamine **213 N** (émission à 577 nm).

Les mesures de ces analogues ont ensuite été réalisées dans le milieu eau/SDS en présence de BSA. Ces composés étant plus polaires que leurs homologues **163a**, **206** et **208**, qui possèdent des chaînes alkyles relativement lipophiles, des résultats supérieurs en termes d'émission de fluorescence pouvaient être attendus (Figure 184, Figure 185 et Tableau 13).

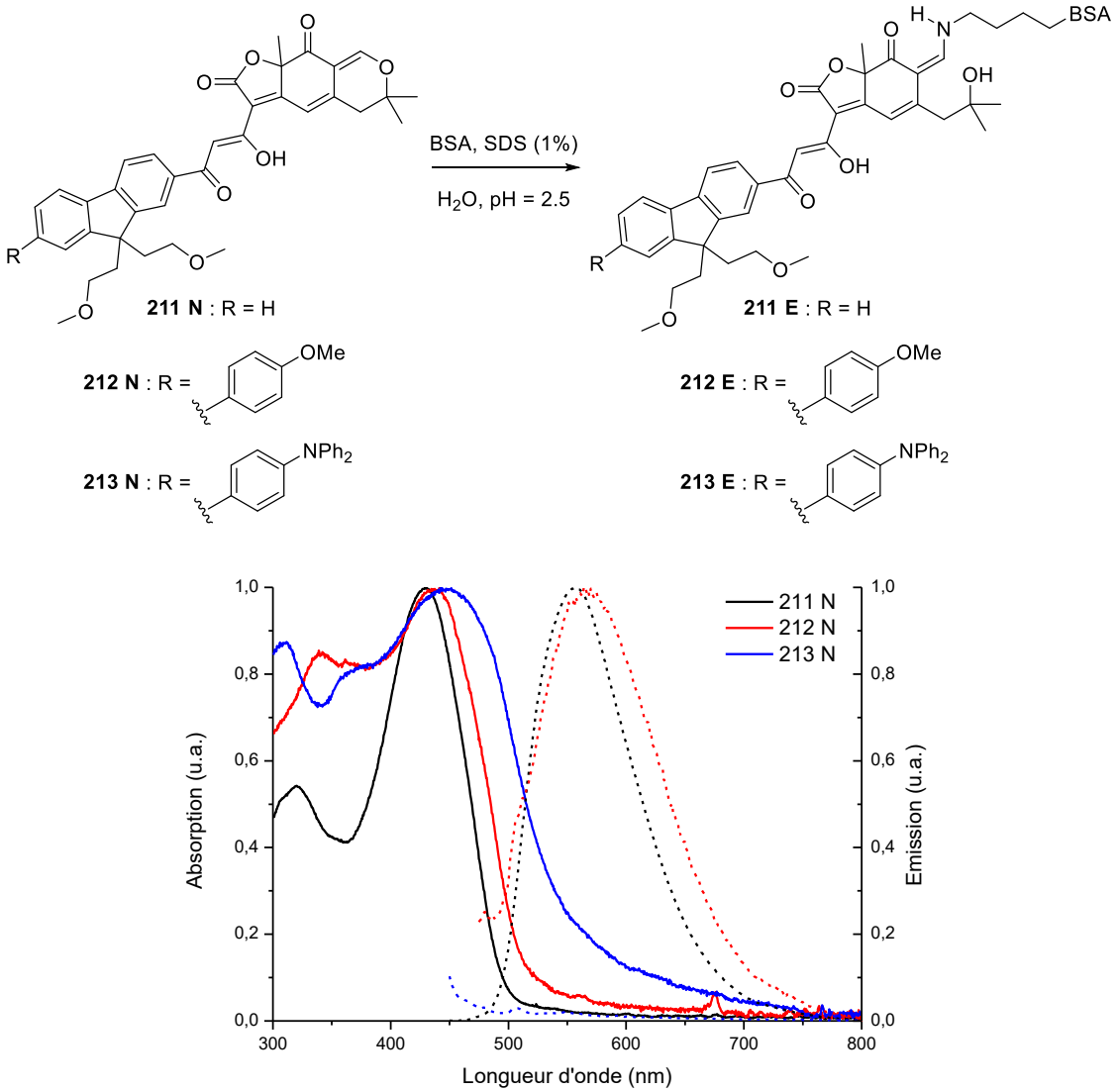


Figure 184 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des analogues **211**, **212** et **213** sous forme native (N) dans l'eau SDS.

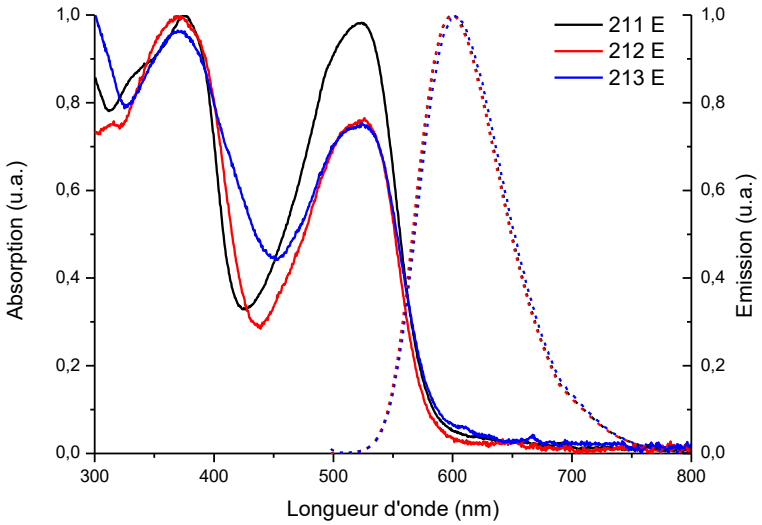


Figure 185 : Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (trait pointillé) des analogues **211**, **212** et **213** sous forme énaminone (E) dans l'eau/SDS.

Composé		λ_{abs} max (nm)	λ_{em} max (nm)	Déplacement de Stokes	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	Φ_F
H	**211 N**	321, 431	537	106 nm, 4580 cm^{-1}	30600	0.83
	211 E	374, 523	600	77 nm, 2454 cm^{-1}	25550	0.34
pOMe	**212 N**	340, 438	524	86 nm, 3747 cm^{-1}	10500	0.02
	212 E	372, 524	600	76 nm, 2417 cm^{-1}	9000	0.33
Ph_3N	**213 N**	369, 449	520	71 nm, 3041 cm^{-1}	14200	0.02
	213 E	372, 524	602	78 nm, 2473 cm^{-1}	12100	0.09
Epico	Epicocconone **56 N**	319, 444	535	91 nm, 3831 cm^{-1}	68600	0.07
	Epicocconone **56 E**	370, 518	611	93 nm, 2938 cm^{-1}	26400	0.17

Tableau 13 : Propriétés spectrales des analogues **211**, **212** et **213** dans l'eau/SDS.

Les propriétés spectroscopiques des analogues **211**, **212** et **213** sont comparables à celles obtenues pour leurs équivalents **163a**, **206** et **208**. Une fois encore l'analogue **212** possédant le donneur 4-méthoxyphényle présente une exaltation de fluorescence très intéressante en présence de BSA (rendement quantique de la forme native **212 N** de 0.02 contre 0.33 pour la forme énaminone correspondante **212 E**), à nuancer par des valeurs de coefficient d'extinction molaire, donc de brillance, plus faible que dans le dichlorométhane. De même l'analogue triphénylamine **213** présente aussi une légère augmentation de fluorescence sous forme énaminone **213 E** qui était également visible dans ces mêmes conditions de solvant sur le composé lipophile correspondant **208**. Finalement, le rendement quantique très important du composé **211** sous forme native peut être souligné, dénotant l'influence des chaînes 1-méthoxypropyle.

Les rendements quantiques sont résumés sous forme d'histogramme de la même manière que précédemment ci-après (Figure 186).

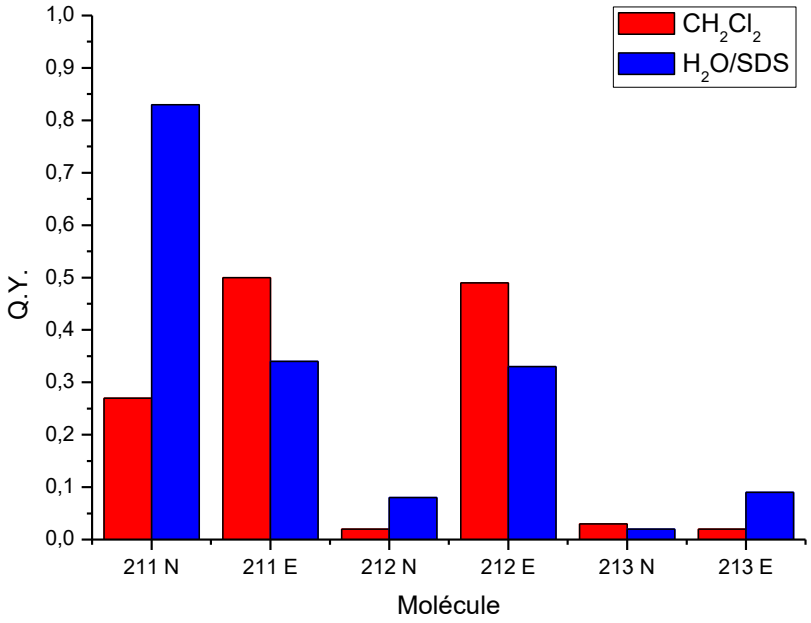
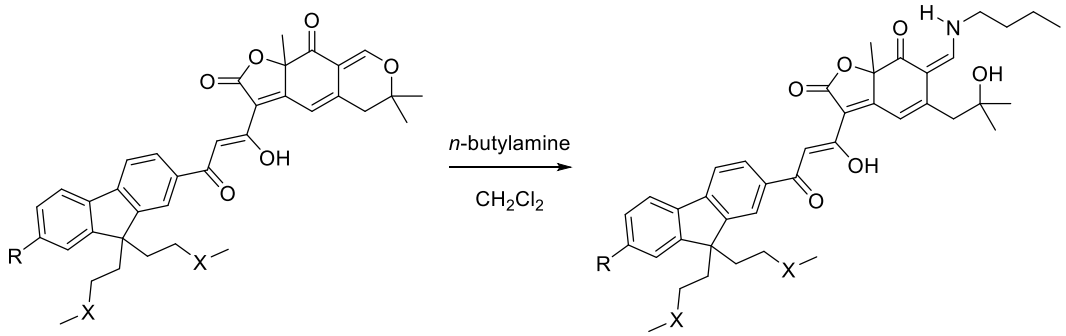
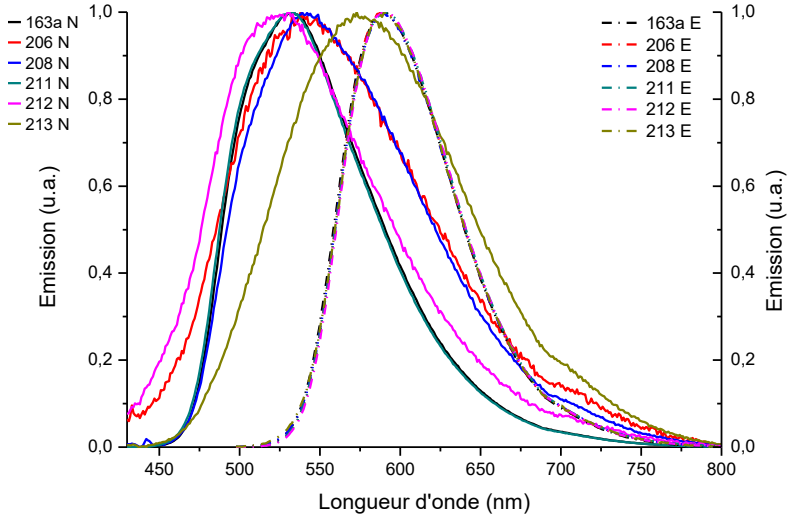


Figure 186 : Comparaison des rendements quantiques de fluorescence des analogues **211**, **212** et **213**, sous forme native (N) et sous forme énaminone (E), obtenus dans le dichlorométhane et en milieu aqueux.

Afin de déterminer l'analogue le plus intéressant pour des applications en marquage de protéines, les éléments suivants peuvent être examinés :

- La différence entre les maxima d'émission des formes natives et énaminone doit être la plus grande possible, ceci permettant de diminuer le bruit de fond associé à du fluorophore n'ayant pas réagi sur des protéines. La superposition des spectres d'émission des différents analogues dans le dichlorométhane (Figure 187) et dans l'eau/SDS (Figure 188) sont données ci-dessous.





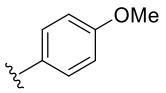
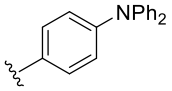
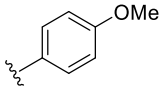
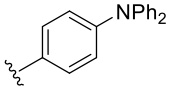
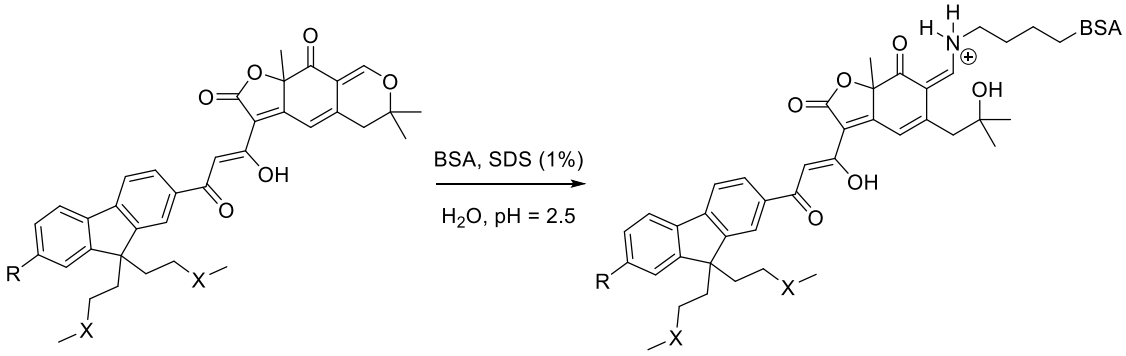
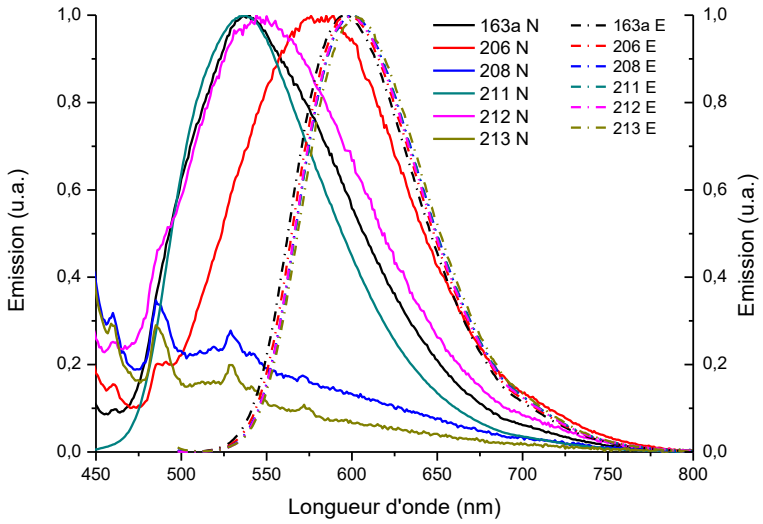
Composé	R	X	λ_{em}max N (nm)	λ_{em}max E (nm)
163a	H	CH_2	531	589
206		CH_2	532	591
208		CH_2	540	590
211	H	O	506	591
212		O	540	597
213		O	577	590

Figure 187 : Spectres d'émission des formes natives (N) et énaminones (E) dans le dichlorométhane des analogues synthétisés. Le tableau reprend les valeurs des longueurs d'onde maximales d'émission lues sur le graphique.





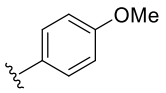
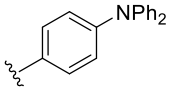
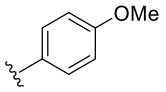
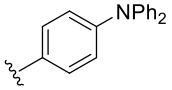
Composé	R	X	λ_{em}max N (nm)	λ_{em}max E (nm)
163a	H	CH_2	539	597
206		CH_2	537	600
208		CH_2	575	597
211	H	O	524	600
212		O	540	600
213		O	520	602

Figure 188 : Spectres d'émission des formes natives (N) et énaminones (E) dans l'eau/SDS des analogues synthétisés. Le tableau reprend les valeurs des longueurs d'onde maximales d'émission lues sur le graphique.

- Le rendement quantique et le coefficient d'extinction molaire de la forme énaminone doivent également être les plus grands possibles afin de maximiser la brillance donc la détection des protéines marquées. A cela, il peut également être ajouté les propriétés inverses pour la forme native de l'analogue, ce qui garantit également une meilleure résolution en imagerie. Afin d'estimer le fluorophore répondant le mieux à ces critères, il peut être intéressant de calculer le rapport entre les rendements quantiques de la forme énaminone (E) et de la forme native (N), en effet plus ce quotient sera grand et plus l'exaltation de fluorescence en présence de protéine sera importante permettant donc une meilleure sensibilité de détection d'un fluorophore ayant marqué une protéine par rapport à un fluorophore natif (Figure 189).

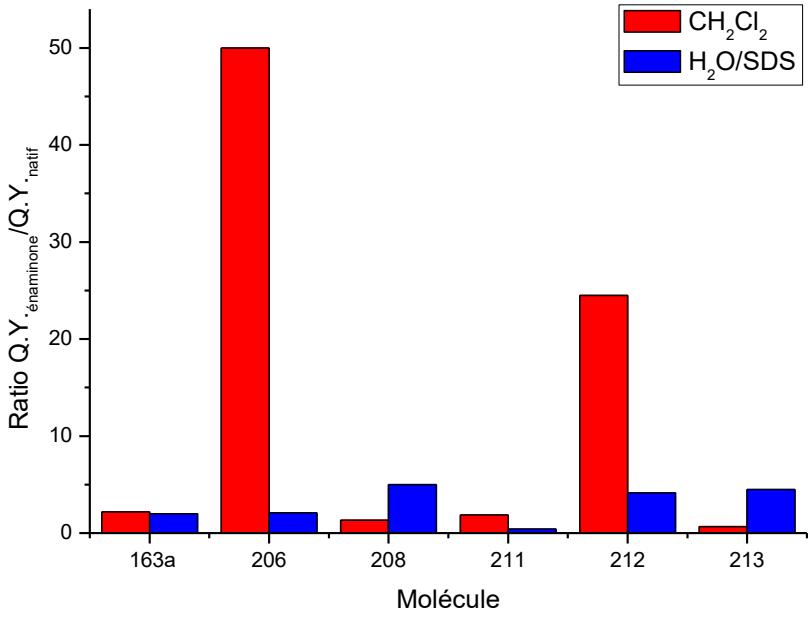


Figure 189 : Rapport entre les rendements quantiques de la forme énaminone et de la forme native dans le dichlorométhane et dans l'eau/SDS.

Cette analyse met en avant le composé **212** dans l'eau/SDS, puisqu'il possède un rapport rendement quantique de fluorescence sous forme énaminone/rendement quantique sous forme native relativement élevé (4.13) pour un rendement quantique sous forme énaminone relativement important (0.33) ainsi qu'une différence entre les longueurs d'ondes d'émission forme native/énaminone de 76 nm.

Le phénomène « off-on » sur les analogues **206** et **212** ou l'inhibition totale de fluorescence sur les analogues **208** et **213** pourrait trouver sa source dans un phénomène de transfert d'électron photo-induit. Ce type de phénomène est en effet couramment rencontré sur les molécules possédant des motifs triarylamines, relativement riches en électrons et susceptibles de donner des électrons.[184]

3.2.4.2.2 Etude électrochimique sur l'analogue **208** – Hypothèse d'une inhibition de la fluorescence par transfert d'électron photo-induit

Le phénomène de transfert d'électron photo-induit (PeT) résulte d'un transfert d'électron à l'état excité d'un donneur vers un accepteur, aboutissant à un état où le donneur est sous forme de radical-cation et l'accepteur sous forme de radical-anion (état dit « à charges séparées »). Ce phénomène peut se produire de manière intra ou intermoléculaire et est gouverné par les propriétés oxydantes ou réductrices du donneur et de l'accepteur à l'état excité, [185] suivant deux mécanismes distincts (Figure 190).

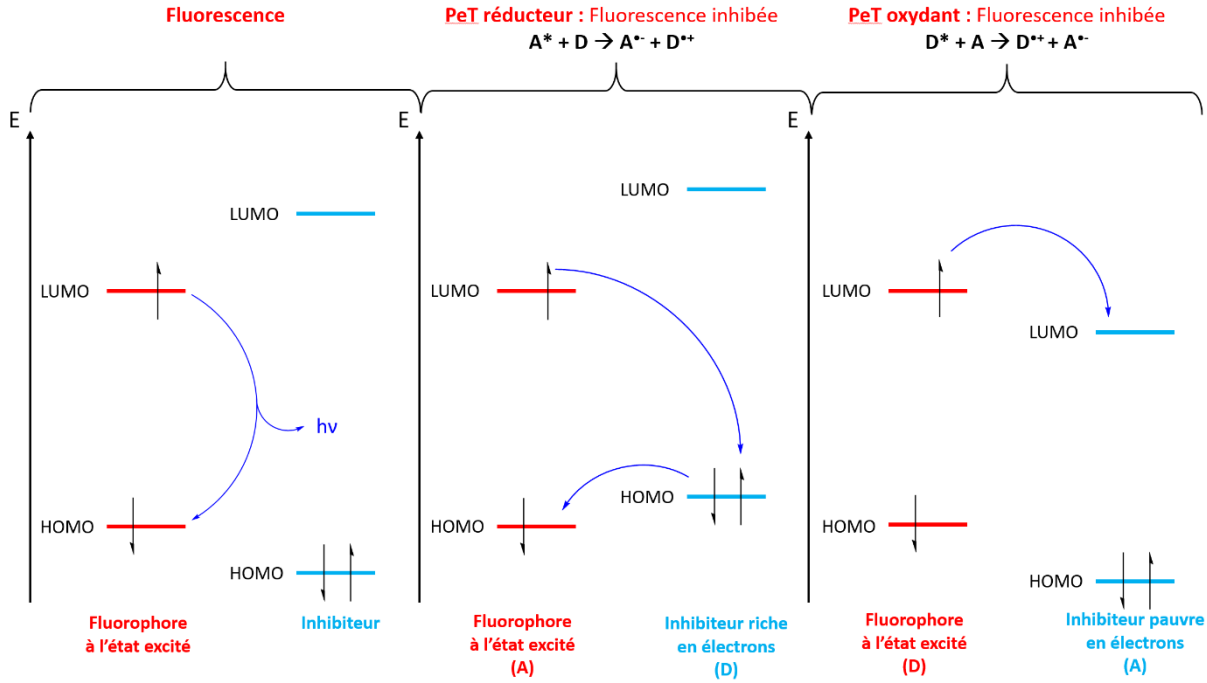


Figure 190 : Mécanisme de fluorescence (gauche), de PeT réducteur (centre) et de PeT oxydant (droite).

Dans le cas d'un mécanisme de PeT réducteur, le fluorophore à l'état excité joue le rôle d'accepteur (Figure 190, partie centrale). Un électron provenant de l'orbitale haute occupée (HOMO) de l'inhibiteur vient alors combler la lacune électronique dans la HOMO du fluorophore, empêchant ainsi le retour de l'électron de l'orbitale basse vacante (LUMO) du fluorophore vers sa HOMO et donc l'émission de fluorescence

A l'inverse dans le cas d'un mécanisme de PeT oxydant, c'est le fluorophore excité qui joue le rôle de donneur, transférant un électron de sa LUMO vers la LUMO de l'inhibiteur et inhibant une fois encore la fluorescence.

C'est la détection de ces espèces ioniques radicalaires résultant de ces mécanismes qui permet de justifier de l'existence du PeT. Une méthode comme la photolyse par flash laser, qui fournit un spectre d'absorption transitoire sur lequel peuvent être identifiées des bandes relatives à ces espèces radicalaires chargées, ou la résonance paramagnétique des électrons permettent d'apporter des preuves

[184] Wang, J., Liu, K., Ma, L., Zhan, X. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14675-14725.

[185] Escudero, D. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1816-1824.

expérimentales pour étayer l'hypothèse d'un mécanisme de PeT.[186] Le détail du principe de ces méthodes spectroscopiques ne sera pas exposé ici.

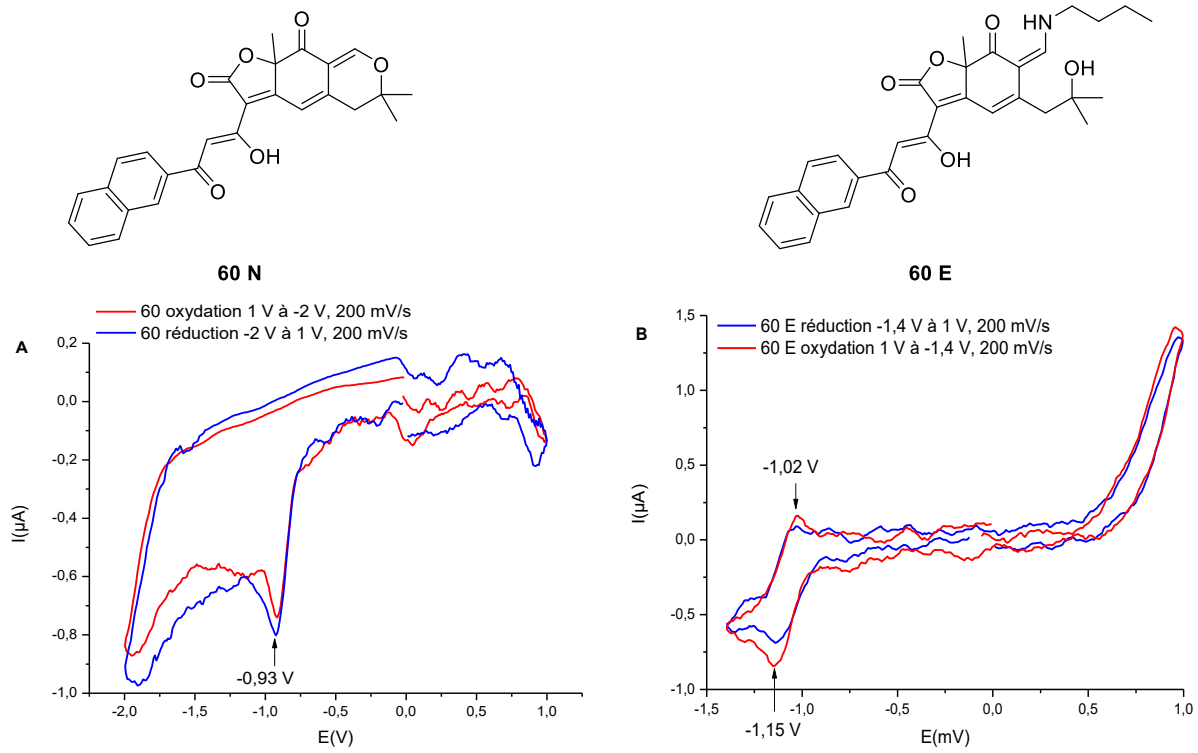
L'étude de la faisabilité du PeT d'un point de vue thermodynamique peut être décrite par la théorie de Rehm et Weller. Cette théorie a débouché sur l'équation dite de Rehm-Weller qui lie la variation d'enthalpie libre ΔG lors d'un phénomène de PeT aux potentiels d'oxydation du donneur $E_{ox}(D)$ et de réduction de l'accepteur $E_{red}(A)$, ainsi qu'à l'énergie de l'état excité E^* (c'est-à-dire la différence entre l'énergie du plus bas niveau de l'état excité et l'énergie de l'état fondamental de l'espèce excitée). Cette équation n'est valable telle qu'elle en phase gaz, en solution deux termes doivent être ajoutés pour tenir compte de l'effet de solvatation (enthalpie ΔH_{solv}) sur le phénomène de PeT et de l'interaction coulombienne de la paire d'ion formée (ce terme dépend de la constante diélectrique ε_{sol} du solvant et de la distance r entre les deux ions) (Équation 7).[187]

$$\Delta G = E_{ox}(D) - E_{red}(A) - E^* - \Delta H_{solv} - \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_{sol} r}$$

Équation 7 : Equation de Rehm-Weller régissant le transfert d'électron photo-induit.

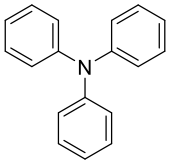
Un phénomène de type PeT intramoléculaire peut être suspecté sur les formes natives des analogues **206** et **212** ainsi que sur les analogues **208** et **213** du fait de la présence de groupements donneurs triphénylamine et 4-méthoxyphényle sur le squelette du fluorophore, qui sont connus comme donneurs d'électrons engendrant des phénomènes de PeT.[187] De plus, le fait que la fluorescence soit inhibée dans un solvant polaire tel que le dichlorométhane mais pas dans un milieu apolaire comme le toluène, où les paires d'ions sont déstabilisées, vient renforcer ces présomptions.

Les hypothèses consistent à considérer le motif epicocconone comme l'accepteur d'électron et la partie triphénylamine comme le donneur. Les courbes de voltamétrie cyclique en oxydation et en réduction de l'analogue **60** sous forme native (**60 N**) et énaminone (**60 E**), ainsi que de la triphénylamine **214** dans l'acétonitrile sont données ci-après (Figure 191).



[186] Miura, T., Urano, Y., Tanaka, K., Nagano, T., Ohkubo, K., Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8666-8671.

[187] Valeur, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications, **2001**, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, page 92.



214

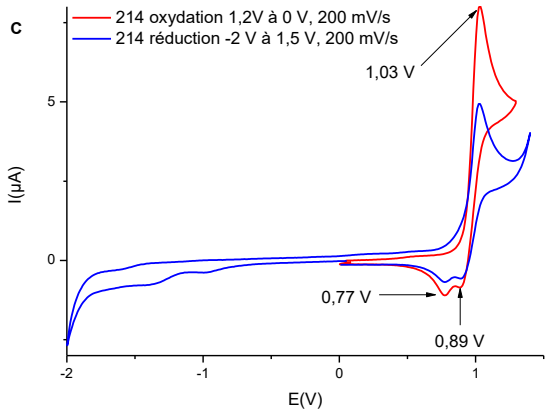


Figure 191 : Courbes de voltamétrie cyclique de l'analogue naphtyle **60** (forme native N : courbes A et énaminone E : courbes B) et de la triphénylamine **214** (courbes C).

Ces courbes permettent de visualiser les valeurs des potentiels relatifs à la réduction du composé **60** sur la cathode et à l'oxydation de la triphénylamine **214** sur l'anode. L'existence de tels potentiels confirme de manière qualitative la capacité des analogues de l'epicocconone à accepter des électrons. Il est également intéressant de comparer les potentiels de pics cathodiques du composé **60** sous forme native **60 N** et sous forme énaminone **60 E** (graphiques A et B) : plus la valeur du potentiel de pic cathodique tend vers zéro, et plus la réaction de réduction du composé ayant lieu sur cette électrode est facile. L'analogue **60** sous forme native possède ainsi un potentiel de pic cathodique de -0.93 V contre une valeur de -1.15 V pour la forme énaminone, ce qui indique donc que l'analogue sous sa forme native peut accepter plus facilement un électron.

Un pic anodique important au potentiel de 1.03 V est également observé sur les courbes voltamétrie de la triphénylamine **214** marquant l'oxydation de ce composé, donc sa capacité à céder des électrons. Les pics de potentiel cathodique observés à 0.89 V et 0.77 V peuvent correspondre à une réduction des espèces oxydées précédemment sur l'anode au potentiel de 1.03 V.

Ces observations sont compatibles avec l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition de la fluorescence par PeT des analogues de l'epicocconone portant un groupement donneur : dans le cas des analogues **206** et **212** la fluorescence sous forme énaminone n'est pas inhibée, le transfert d'électron du donneur 4-méthoxyphényle vers le motif epicocconone accepteur est moins favorisé. A l'inverse, le motif triphénylamine étant un meilleur donneur d'électron, le transfert pourrait être possible à la fois sous forme native et sous forme énaminone.

L'analyse des courbes de voltamétrie cyclique sur les deux parties supposées impliquées dans le transfert d'électron ayant été réalisée, les mêmes expériences ont été menée sur l'analogue **208** sous forme native et sous forme énaminone en présence de butylamine (Figure 192).

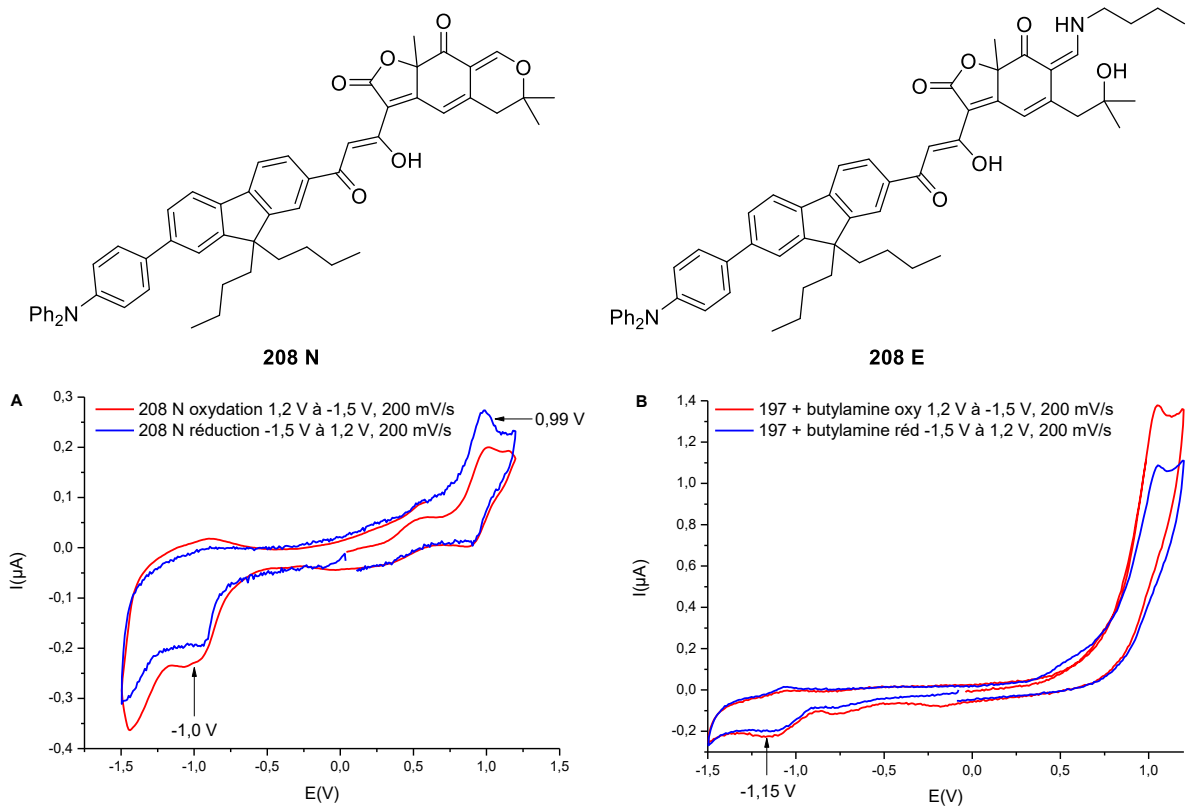


Figure 192 : Courbes de voltamétrie cyclique de l'analogue **208** sous forme native (courbes A) et énaminone (courbes B).

Les courbes obtenues sont très intéressantes, notamment sur le graphique A, où le pic cathodique caractéristique du composé **60** natif et le pic anodique caractéristique du composé **214** sont retrouvés à des valeurs de potentiels similaires à celles de la Figure 191. L'ajout de butylamine entraîne également une variation du potentiel de pic cathodique (passage d'une valeur de -1.0 V à l'état natif à -1.15 V sous forme énaminone) déjà observé sur l'analogue **60**, cependant l'ajout de cette amine primaire masque le pic anodique de la partie triphénylamine vers 1.0 V (graphique B).

D'un point de vue électrochimique, l'analogue **208** semble donc bien se comporter comme un système composé d'une partie epicocconone susceptible d'accepter des électrons et d'une partie triphénylamine capable de céder facilement des électrons. Ces éléments apportent du crédit à l'hypothèse du PeT réducteur comme mécanisme d'inhibition de la fluorescence observée pour les analogues de l'epicocconone portant un groupement donneur d'électrons, mais ne sont pas suffisants pour en apporter la preuve.

3.2.4.2.3 Mesures d'absorption à deux photons sur les analogues de l'epicocconone synthétisés

Les expériences de détermination de la section efficace d'absorption à deux photons sur les analogues précédemment synthétisés **163a**, **206**, **208**, **211**, **212**, **213** ainsi que sur l'analogue napthyle **60** ont été réalisées par les Dr. Noëlle Lascoux, chargée de recherche à l'ENS Lyon et le Dr. Thibault Gallavardin, chargé de recherche à l'université de Rouen Normandie, au sein du Plateau Technique d'Imagerie/Microscopie (PLATIM) de Lyon. La méthode de mesure de fluorescence par excitation bi-photonique a été utilisée pour ces expériences, utilisant le laser titane : saphir accordable d'un microscope confocal spectral Zeiss LSM 710 entre 720 et 1050 nm.

Les mesures des analogues sous forme natives (**N**) et sous forme énaminone (**E**), formée en présence de butylamine, ont été réalisées en partageant les analogues en deux groupes. Le toluène a été choisi pour les mesures concernant les analogues **163a**, **206** et **208**, pour des raisons de solubilité mais aussi afin d'assurer une intensité de fluorescence suffisante pour la détection du signal, notamment pour le composé **208** qui ne fluoresce que dans ce solvant sous les formes natives et énaminone. Les analogues **211**, **212** et **213** étant plus polaire, le dichlorométhane a été conservé pour ces composés, bien que les

formes natives des composés **212** et **213** y soient peu fluorescentes. L'analogue naphtyle **60** a également été mesuré dans ce solvant plus polaire, puisqu'il a déjà fait l'objet d'études en absorption bi-photonique.[151]

Les courbes brutes obtenues à l'issue des mesures par la méthode de fluorescence par excitation bi-photonique sont données ci-dessous avec les spectres d'absorption à un photon correspondants après normalisation pour les analogues **163a**, **206** et **208**. Ces données ne permettent pas en l'état de donner la valeur des sections efficaces d'absorption à deux photons, dont les calculs sont actuellement en cours. Ces valeurs nécessitent en effet l'application de paramètres correctifs liés aux conditions expérimentales (corrections sur la puissance du laser, application d'un facteur correctif lié à la concentration, prise en compte des valeurs relatives aux fluorophores de référence utilisés, …). Les spectres d'absorption biphotonique représentés ci-dessous ont été superposés avec les spectres d'absorption monophotonique afin de pouvoir comparer les énergies des états concernés par ces transitions. En effet l'absorption simultanée de deux photons permet de peupler un état d'énergie doublé par rapport à une absorption classique à un photon. En d'autres termes, une absorption biphotonique à 800 nm correspond à une transition à 400 nm par absorption monophotonique (Figure 193).

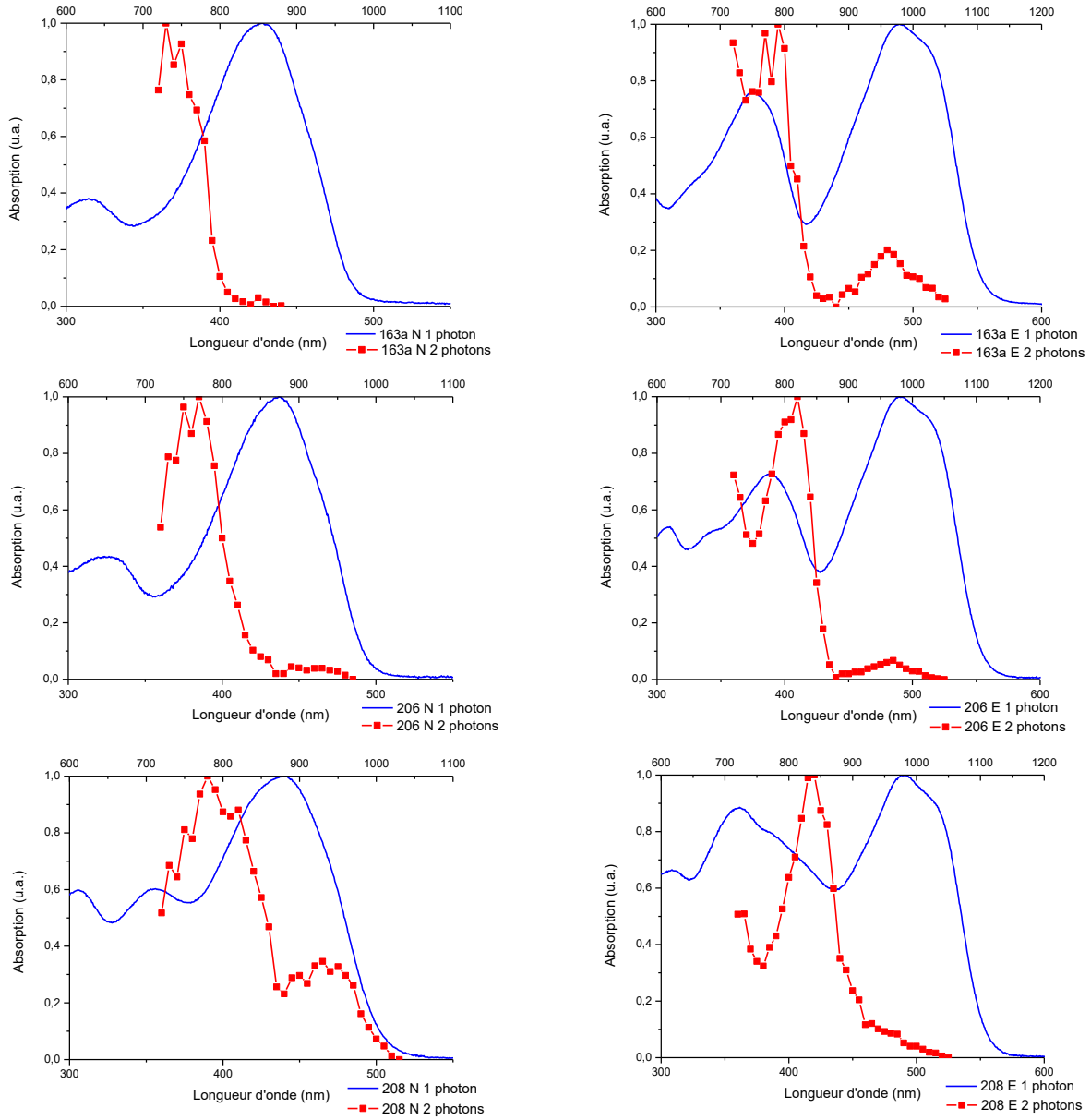
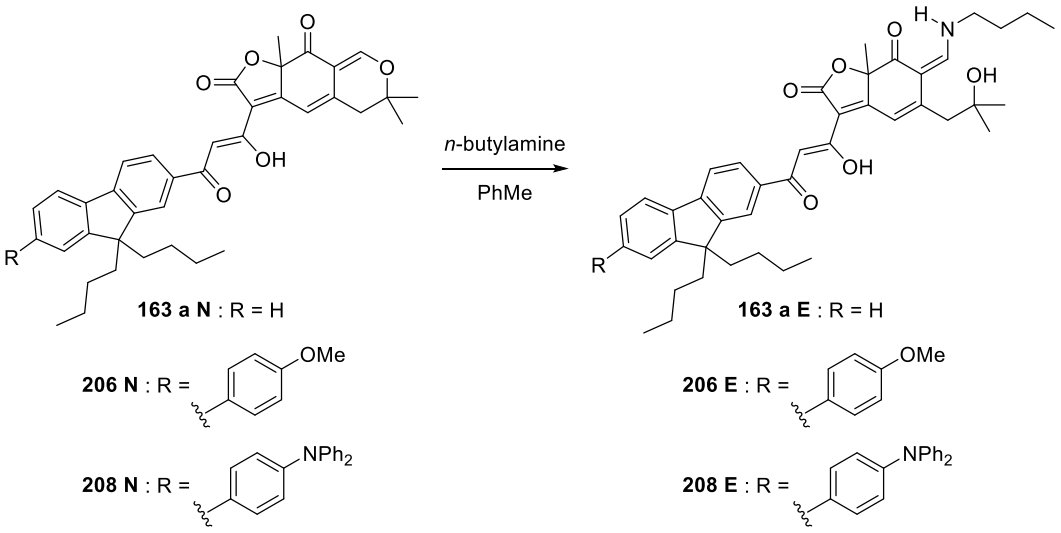


Figure 193 : Superposition des spectres d'absorption normalisés à un photon (courbes bleues, échelle en abscisse du bas) et à deux photons (courbes rouges, échelle en abscisse du haut) mesurées dans le toluène pour les analogues **164a**, **206** et **208** sous forme native (**N**) et énaminone (**E**).

Ces courbes permettent cependant d'avoir une approximation des longueurs d'ondes maximales d'absorption à deux photons. Ces valeurs sont résumées dans le Tableau 14.



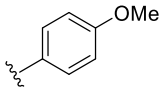
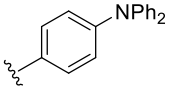
Composé		λ_{abs} max 1 photon (nm)	λ_{abs} max 2 photons (nm)
H	**163a N**	314, 427	742
	163a E	374, 490	781, 963
	**206 N**	326, 437	766, 922
	206 E	389, 490	820, 967
	**208 N**	356, 439	786, 934
	208 E	362, 491	838

Tableau 14 : Valeurs des longueurs d'ondes maximales relatives aux bandes d'absorption mono et bi-photonique pour les analogues **163a**, **206** et **208**.

Ces valeurs confirment que l'introduction d'un groupement donneur sur le noyau fluorène engendre un décalage de la longueur d'onde maximum d'absorption vers le proche infrarouge (effet bathochrome). Ce décalage augmente d'ailleurs avec la force du groupement donneur, en effet la triphénylamine est un meilleur donneur d'électrons que le 4-méthoxyphényle (décalage de 20 nm entre les composé **206** et **208**). De plus les molécules natives (**N**) et les énaminones (**E**) possèdent un comportement totalement différent. En effet l'énergie des transitions à un et deux photons est très différente sur les molécules natives alors qu'il y a un recouvrement sur l'énaminone concernant les deux bandes les plus visible suggérant un caractère beaucoup plus dipolaire des formes énaminones.

De la même manière, les données concernant l'absorption à deux photons des analogues **211**, **212**, **213** et l'analogue naphtyle **60** ont été mesurées dans le dichlorométhane. Certains spectres d'absorption à deux photons sont moins bien définis que ceux présentés précédemment, ceci est dû aux faibles rendements quantiques de fluorescence pour les analogues natifs **212 N** et **213 N** et pour l'analogue sous forme énaminone **213 E** dans le dichlorométhane (Figure 194 et Tableau 15).

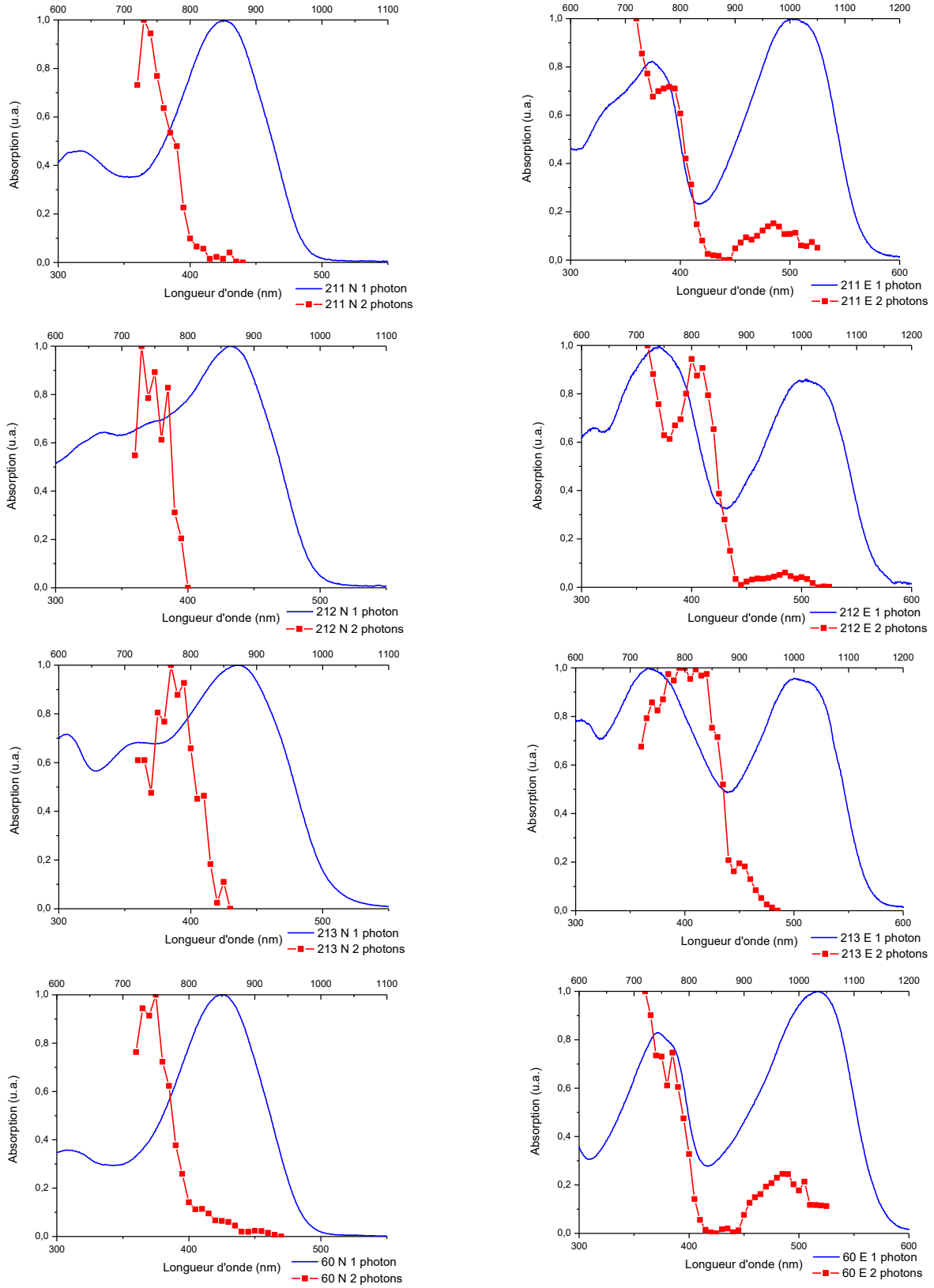
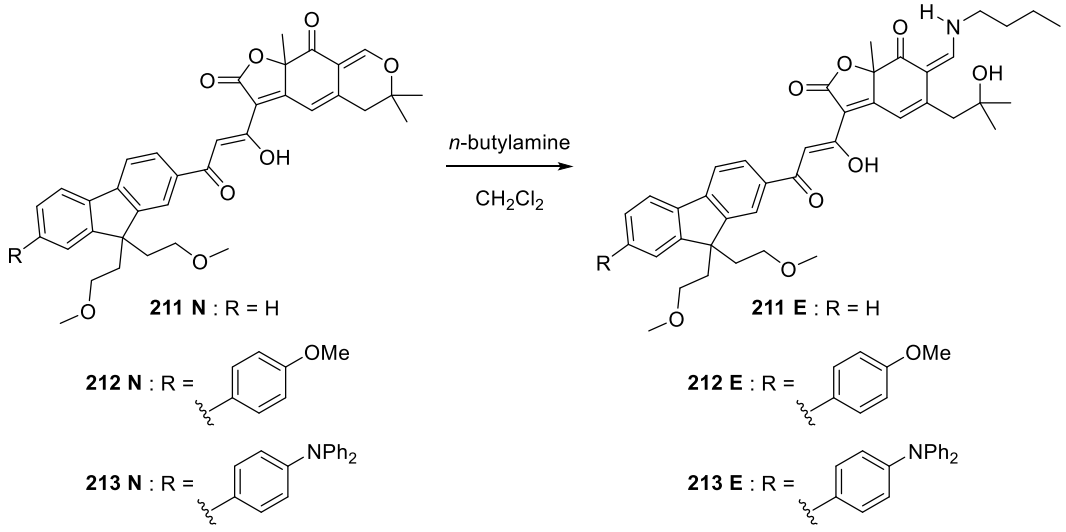


Figure 194 : Superposition des spectres d'absorption normalisés à un photon (courbes bleues, échelle en abscisse du bas) et à deux photons (courbes rouges, échelle en abscisse du haut) mesurées dans le dichlorométhane pour les analogues **211**, **212** et **213** sous forme native (**N**) et énaminone (**E**).



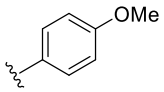
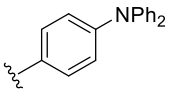
Composé		λ_{abs} max 1 photon (nm)	λ_{abs} max 2 photons (nm)
H	**211 N**	314, 426	733
	211 E	373, 505	781, 973
	**212 N**	322, 413	747
	212 E	369, 505	809, 969
	**213N**	362, 436	779
	213 E	367, 503	814, 910
Analogue naphtyle	**60 N**	306, 424	748
	60 E	371, 517	724, 976

Tableau 15 : Valeurs des longueurs d'ondes maximales relatives aux bandes d'absorption mono et bi-photonique pour les analogues **211**, **212**, **213** et **60**.

Comme précédemment, il est possible de corréler l'effet bathochrome observé sur les longueurs d'ondes maximales d'absorption à deux photons avec la force du donneur d'électrons introduit sur le motif fluorène.

A l'heure actuelle sans disposer des valeurs de section efficace d'absorption à deux photons, il est néanmoins possible de remarquer que l'analogue **212** semble le plus intéressant. Ce choix est dû à la profluorescence de ce composé dans l'eau/SDS où les composés triphénylamines **208** et **213**, plus optimisés pour l'absorption à deux photons, ne sont que faiblement fluorescents mais également motivé par la possibilité d'une application en imagerie, actuellement en cours.

4 Conclusion et perspectives

Ce chapitre présente les avancées réalisées sur la synthèse d'analogues polyfonctionnels de l'epicocconone utilisables en tant que sondes fluorescentes.

Dans un premier temps, la réalisation de nouvelles structures pouvant être fonctionnalisées par réaction de CuAAC a été envisagée. Ce premier volet s'inscrit dans la continuité des travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur la synthèse de sondes polyfonctionnelles obtenues *via* cette stratégie. L'introduction des groupes réactifs pour la CuAAC a été considérée sur les deux parties réagissant lors de l'étape d'acylfuranonisation, c'est-à-dire l'alcool désaromatisé ou la dioxinone. (Figure 195).

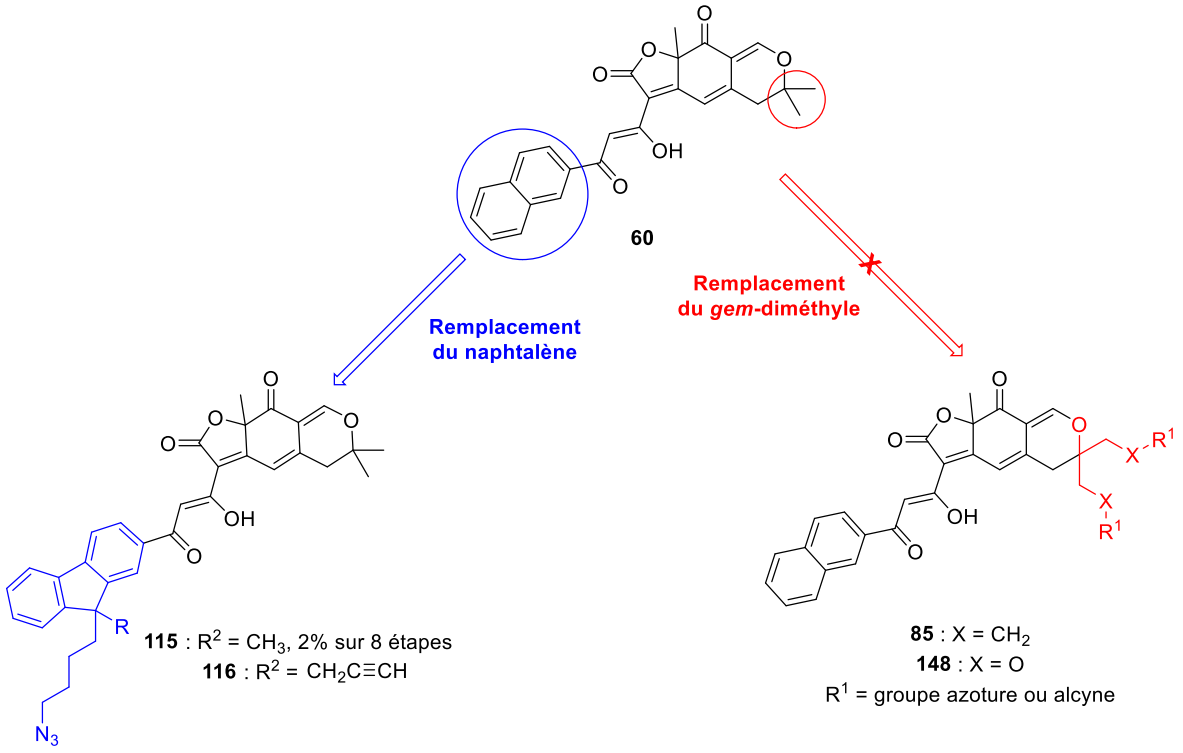


Figure 195 : Stratégies envisagées pour l'introduction des groupements réactifs en CuAAC.

Sur ces deux approches, l'introduction des groupements réactifs sur la dioxinone a permis l'obtention d'un analogue **115** avec un rendement de 2% sur 8 étapes et la possibilité d'obtenir un analogue **116** possédant une fonction azoture et une fonction alcyne. Une fois l'analogue **115** préparé, la réaction de CuAAC en présence d'un dérivé de camptothécine SN 38 **143** a été étudiée. Malgré de nombreux essais, une incompatibilité entre les sels de cuivre (I) et les analogues de l'epicocconone semble exister, inhibant le bon déroulement de la réaction. L'étude des interactions entre le cuivre et les analogues permettra sans doute d'éclairer cet aspect. Une réaction de SPAAC entre l'analogue **115** et le cyclooctyne **145** a cependant permis de détecter le produit désiré renforçant encore les suspicions quant à l'effet délétère du cuivre sur les réactions impliquant les analogues de l'epicocconone (Figure 196).

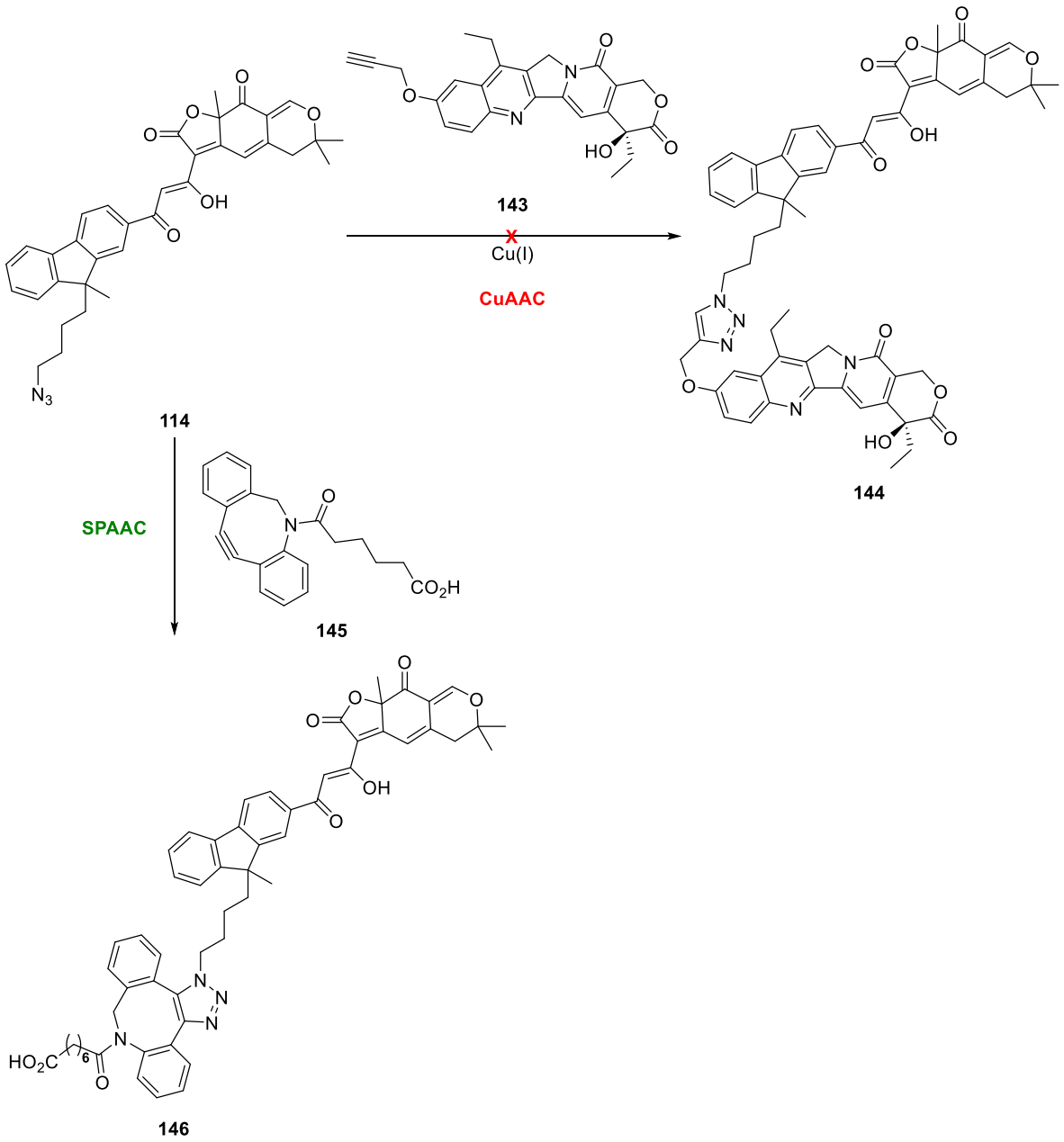


Figure 196 : Résumé des résultats obtenus en réaction de cycloaddition azoture-alcyne.

Ce résultat ouvre des perspectives quant à l'utilisation de la SPAAC pour introduire les agents de reconnaissance sur les analogues de l'epicocconone. Il est envisageable de fonctionnaliser le cyclooctyne **146** avec des agents de reconnaissance (**A**), grâce à la formation d'un lien amide par exemple, puis d'effectuer une réaction de SPAAC pour former la sonde finale (Figure 197).[188]

[188] Canalle, L. A., van der Knaap, M., Overhand, M., van Hest, J. C. M. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 203-208.

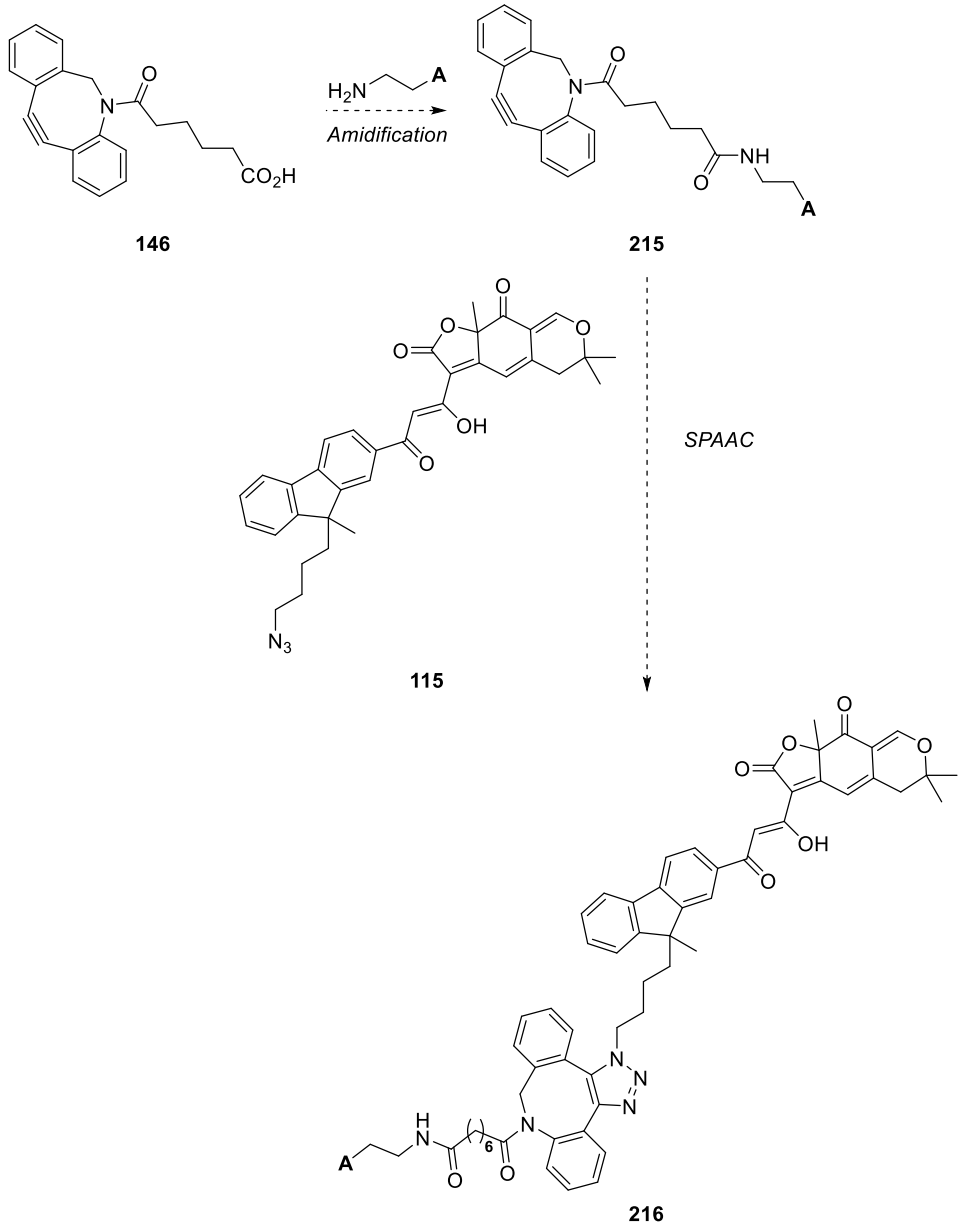


Figure 197 : Stratégie possible pour l'obtention de sondes bi-fonctionnelles **216** portant un agent de reconnaissance (**A**).

Malgré qu'aucune sonde polyfonctionnelle n'ait été obtenue par réaction de CuAAC, la méthodologie développée pour la synthèse de dioxinones fluorène a pu être utilisée et améliorée notamment grâce à l'utilisation d'un couplage carbonylant pallado-catalysé (Figure 198).

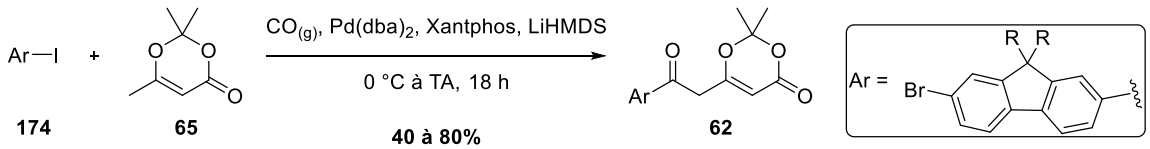


Figure 198 : Réaction de couplage carbonylant pallado-catalysé.

La stratégie initiale permettait l'obtention des β-céto dioxinones avec des rendements de l'ordre de 9% sur 4 étapes au minimum et ne permettait pas l'accès à la dioxinone **154** bromée en position 9 du fluorène (Figure 199, ancienne synthèse), tandis que la nouvelle voie développée a permis d'obtenir des rendements au moins équivalents, en un nombre d'étapes similaire et des dioxinones bromées en position 9 du noyau fluorène (Figure 199, nouvelle synthèse).

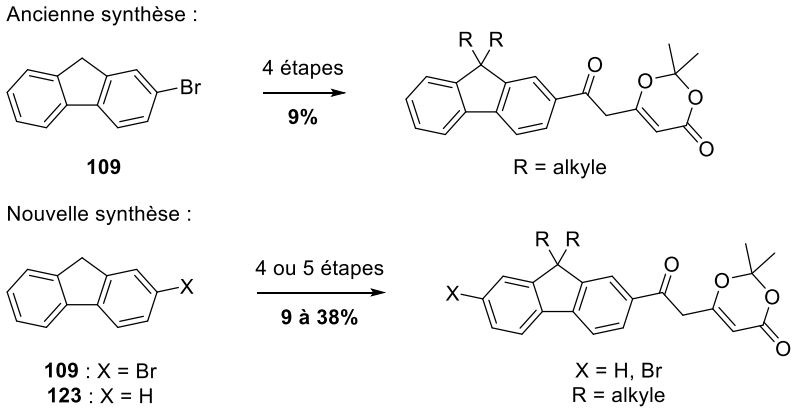
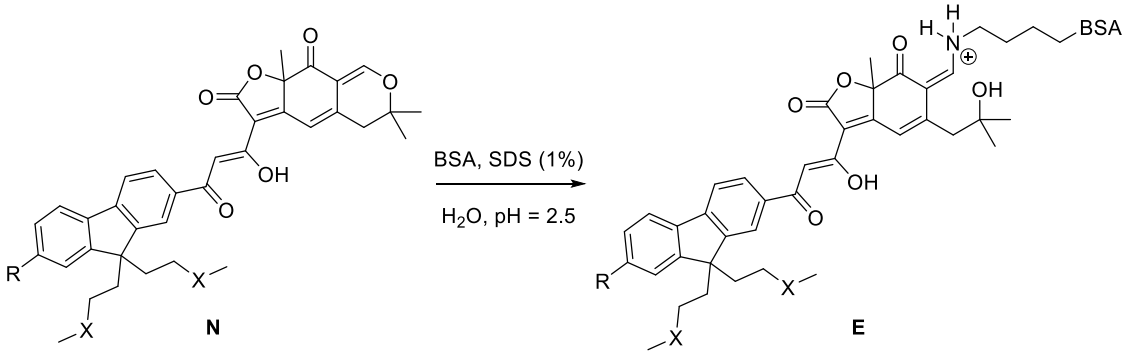


Figure 199 : Comparaison des deux voies de synthèse de dioxinones fluorène développées au cours de ce projet.

Cette nouvelle voie de synthèse a permis d'obtenir cinq nouveaux analogues de l'epicocconone, dont quatre sont optimisés pour l'absorption à deux photons. Parmi ces molécules, l'analogue **212** possédant un groupement donneur 4-méthoxyphényle se révèle très intéressant puisqu'un effet « off-on » est observé entre la forme native **212 N** et la formes énaminone correspondante **212 E** (Tableau 16). Un effet comparable est observé pour l'analogue **206** mais uniquement dans le dichlorométhane.



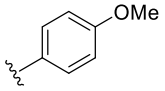
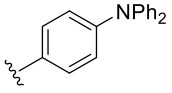
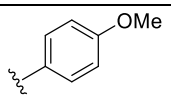
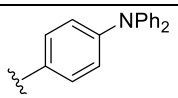
Composé			λ_{em}max (nm)	Φ_F
R	**X**	**Référence**		
H	CH_2	**163a[a] N**	539	0.11
		163a[a] E	597	0.22
	CH_2	**206 N**	537	0.1
		206 E	600	0.21
	CH_2	**208 N**	575	0.02
		208 E	597	0.10
H	O	**211 N**	524	0.83
		211 E	600	0.34
	O	**212 N**	540	0.02
		212 E	600	0.33
	O	**213 N**	520	0.02
		213 E	602	0.09

Tableau 16 : Résumé des propriétés de fluorescence dans l'eau/SDS, en présence de BSA, des analogues fluorène synthétisés. ([a] analogue obtenu par la voie de synthèse classique).

Ces résultats, accompagnés d'expériences d'électrochimie, soutiennent l'existence d'un phénomène de transfert d'électron photoinduit (PeT) réductif de la partie donneuse d'électron vers le motif epicocconone. Ce phénomène inhiberait seulement la fluorescence des formes natives **206 N**, **212 N** et les deux formes (natives et énaminone) des analogues **208** et **213** du fait du plus grand pouvoir réducteur (ou donneur d'électron) du motif triphénylamine par rapport au 4-méthoxyphényle (Figure 200).

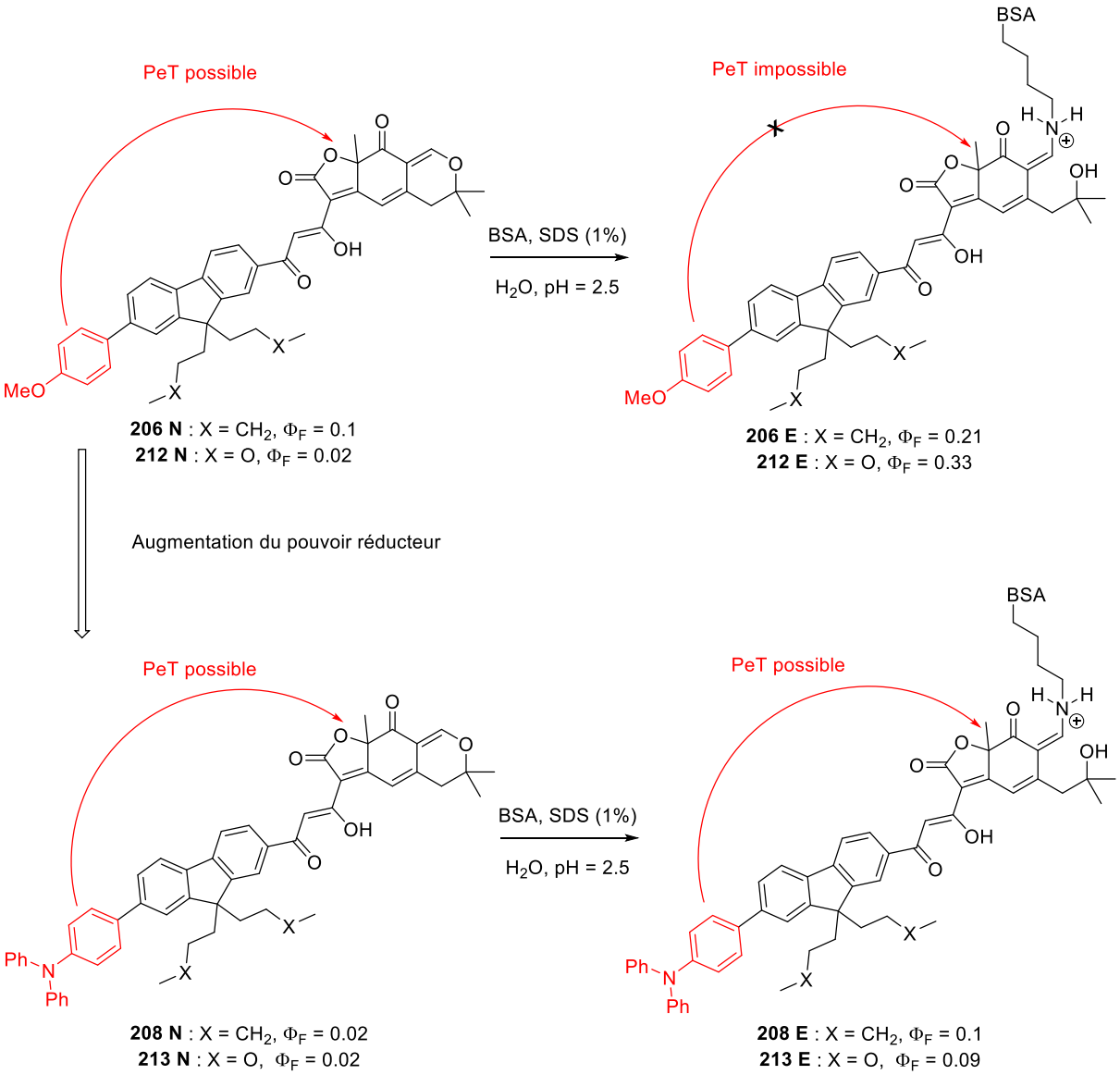
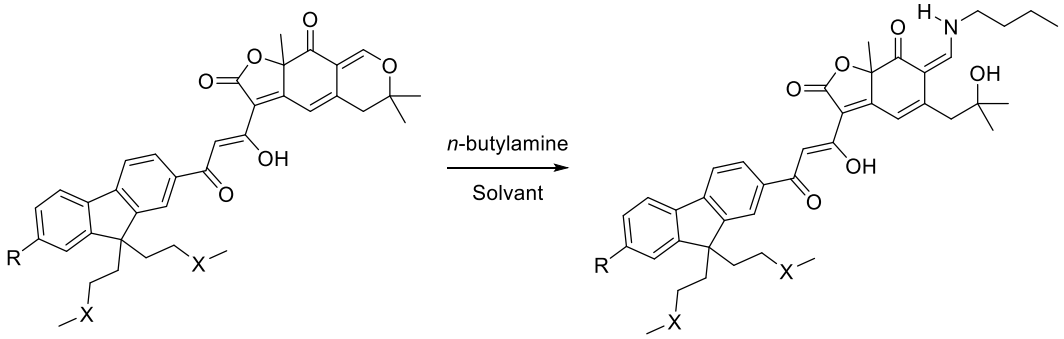


Figure 200 : Analogues supposés subir une inhibition de fluorescence par PeT réducteur. La partie donneuse est mise en évidence (rouge).

L'absorption à deux photons de ces analogues a ensuite été mesurée. La présence d'un groupement donneur d'électron sur les analogues **206**, **208**, **212** et **213** entraîne un effet bathochrome sur le maximum d'absorption à deux photons par rapport aux composés sans ces groupements **163a** et **211** (Tableau 17).



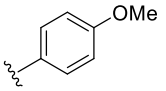
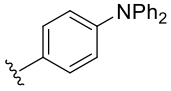
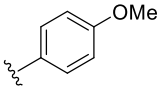
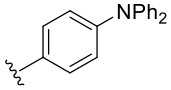
R	**Composé** (solvant)	X	λ_{abs} **max 1 photon (nm)**	λ_{abs} **max 2 photons (nm)**	Φ_F
H	**163a N** (Toluène)	CH_2	314, 427	742	0.99
	163a E (Toluène)		374, 490	781, 963	0.48
	**206 N** (Toluène)	CH_2	326, 437	766, 922	1
	206 E (Toluène)		389, 490	820, 967	0.61
	**208 N** (Toluène)	CH_2	356, 439	786, 934	0.61
	208 E (Toluène)		362, 491	838	0.78
H	**211 N** (Dichlorométhane)	O	314, 426	733	0.27
	211 E (Dichlorométhane)		373, 505	781, 973	0.5
	**212 N** (Dichlorométhane)	O	322, 413	747	0.02
	212 E (Dichlorométhane)		369, 505	809, 969	0.49
	**213 N** (Dichlorométhane)	O	362, 436	779	0.03
	213 E (Dichlorométhane)		367, 503	814, 910	0.02

Tableau 17 : Longueurs d'ondes maximales d'absorption à un photon et à deux photons des analogues synthétisés.

Ces mesures ont permis d'identifier l'analogue **212** comme présentant les propriétés les plus intéressantes pour d'éventuelles applications en imagerie, du fait de ses propriétés d'absorption à deux photons et son rendement quantique sous forme énaminone beaucoup plus important que sous forme native.

Chapitre 2 : Synthèse de sondes pour l'identification de composés azaphiles présents dans des extraits biologiques

Chapitre 2 : Synthèse de sondes pour l'identification de composés azaphiles présents dans des extraits biologiques

1 Introduction bibliographique : méthodes de découverte et d'identification de produits naturels

Les produits naturels constituent une grande famille d'entités chimiques possédant un large spectre d'activités biologiques. La définition usuelle de produit naturel exclut en général les macromolécules naturelles telles que l'ADN, l'ARN et les protéines, et les espèces intermédiaires entrant dans leur biosynthèse (désignés sous l'appellation de métabolites primaires), pour se focaliser sur les métabolites secondaires : des molécules qui ne sont pas essentielles à la survie de l'organisme mais qui lui procurent néanmoins un avantage dans son environnement naturel. Les produits naturels ont rapidement trouvé de nombreuses utilisations notamment en médecine et dans l'agriculture.[189]

Les produits naturels connus dans la littérature sont principalement isolés du taxon (un groupe d'organismes, souvent reliés par un ancêtre commun, ayant des caractéristiques communes qui les distinguent d'autres groupes similaires[190]) des plantes. Les microorganismes sont cependant caractérisés par un plus grand nombre de produits naturels bioactifs (ayant une activité biologique connue) par rapport au nombre de produits naturels connus qu'ils produisent (Tableau 18).

Origine des produits naturels	Nombre de produits naturels connus	Nombre de produits naturels bioactifs
Microorganismes	60000 à 80000	32000 à 34000
Dont :		
Actinobactéries	20000	12000
Fungi	30000	15000
Bactéries unicellulaires	20000	7000
Plantes inférieures	50000 à 60000	6000
Plantes supérieures	300000 à 350000	25000
Invertébrés marins	25000 à 30000	10000
Animaux terrestres	4000 à 5000	200

Tableau 18 : Distribution des produits naturels au sein du vivant.[191]

L'activité biologique des produits naturels est liée à leur interaction avec une ou plusieurs cibles biologiques. Ces interactions peuvent être de nature covalente ou non covalente, entraînant la formation d'un complexe molécule-cible biologique. La présence de nombreux centres nucléophiles sur les protéines (apportés par les résidus sérine[192], thréonine[193], cystéine[194] et lysine[195] pour les plus fréquemment reportés) ou l'ADN[196] explique le caractère électrophile de nombreux produits naturels, qui de par ce caractère présentent des activités biologiques. La connaissance des cibles biologiques des molécules naturelles est un outil précieux puisqu'elle renseigne sur leur réactivité et *vice versa*. Ainsi la

[189] Katz, L., Baltz, R. H. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43*, 155-176.

[190] Glossaire de l'*International Code of Zoological Nomenclature*, **1999**.

[191] Berdy, J. *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 385-395.

[192] Böttcher, T., Sieber, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14400-14401.

[193] Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J., Schreiber, S. L. *Science* **1995**, *268*, 726-731.

[194] Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M., Hanada, K. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198.

[195] Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., Panayotou, G. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1722-1733.

[196] Armstrong, R. W., Salvati, M. E., Nguyen, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3144-3145.

découverte de nouvelles substances naturelles est un enjeu très important pour l'ensemble des domaines liés au vivant.

Dans cette partie, les différentes approches pour la découverte de produits naturels seront abordées. D'une manière générale, deux grandes stratégies sont utilisées : soit les activités biologiques des molécules naturelles sont mises à profit pour orienter la recherche de substances ayant une activité biologique, soit la présence de fonctions chimiques particulières sur ces molécules complexes est utilisée pour faciliter leur identification. Un accent sera mis plus particulièrement sur cette dernière stratégie.

1.1 Méthodes basées sur l'activité biologique

Les produits naturels demeurent la source principale de médicaments potentiels : en 2013, 40% des nouvelles entités chimiques approuvées par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (en anglais « Food and Drug Administration ») étaient des substances naturelles ou bien des dérivés de produits naturels.[189] La recherche de nouvelles molécules naturelles biologiquement actives (de l'anglais « drug discovery ») consiste en l'identification de ces molécules et de la cible biologique avec laquelle elles interagissent. Pour cela deux approches sont possibles :

- La méthode la plus ancienne (1940) est l'approche basée sur le phénotype (qui désigne l'ensemble des traits observables d'un individu qui résultent de son interaction avec l'environnement). Cette approche consiste à isoler les molécules naturelles à partir de microorganismes ou d'extraits naturels, puis à déterminer la réponse d'une culture cellulaire cible (bactéries, levures, tissus, ...) engendrée par l'extrait ou la substance isolée. En général la réponse recherchée pour une molécule d'intérêt est une inhibition de la prolifération ou la mort cellulaire. Dans cette méthode le mode d'action de la substance naturelle n'est donc pas connu, au mieux supposé.
- Plus récemment (1980), les avancées dans le domaine de la génétique ont amélioré grandement la compréhension des mécanismes biologiques relatifs à certaines pathologies. La ou les cibles biologiques impliquée dans des maladies peuvent ainsi être identifiées en amont du criblage des molécules dans le but de trouver la substance la plus active vis-à-vis de la cible biologique choisie. La connaissance de la cible biologique et éventuellement de son rôle au sein de l'organisme permet d'orienter le choix sur les molécules naturelles susceptibles d'engendrer l'effet pharmacologique recherché. Cette méthode porte la dénomination d'approche contrôlée par la cible.

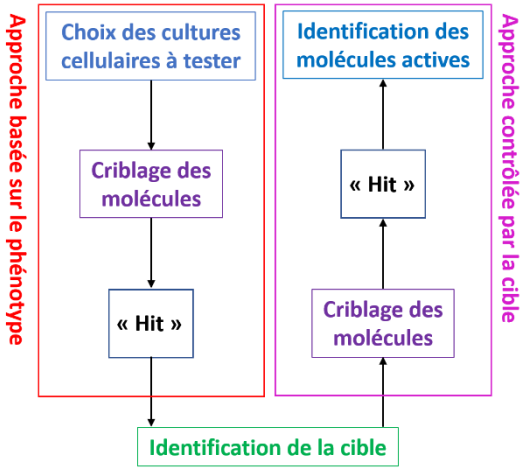


Figure 201 : Schéma de principe simplifié de l'approche basée sur le phénotype et de l'approche contrôlée par la cible pour la découverte de nouvelles substances naturelles biologiquement actives.

Grâce à ces deux approches, de nombreuses molécules naturelles possédant des activités antibactériennes (tétracycline **217**), antifongiques (amphotéricine B **218**), antiparasitaires (artémisine **219**) ou anticancéreuses (paclitaxel **220**) ont pu être découvertes (Figure 202).

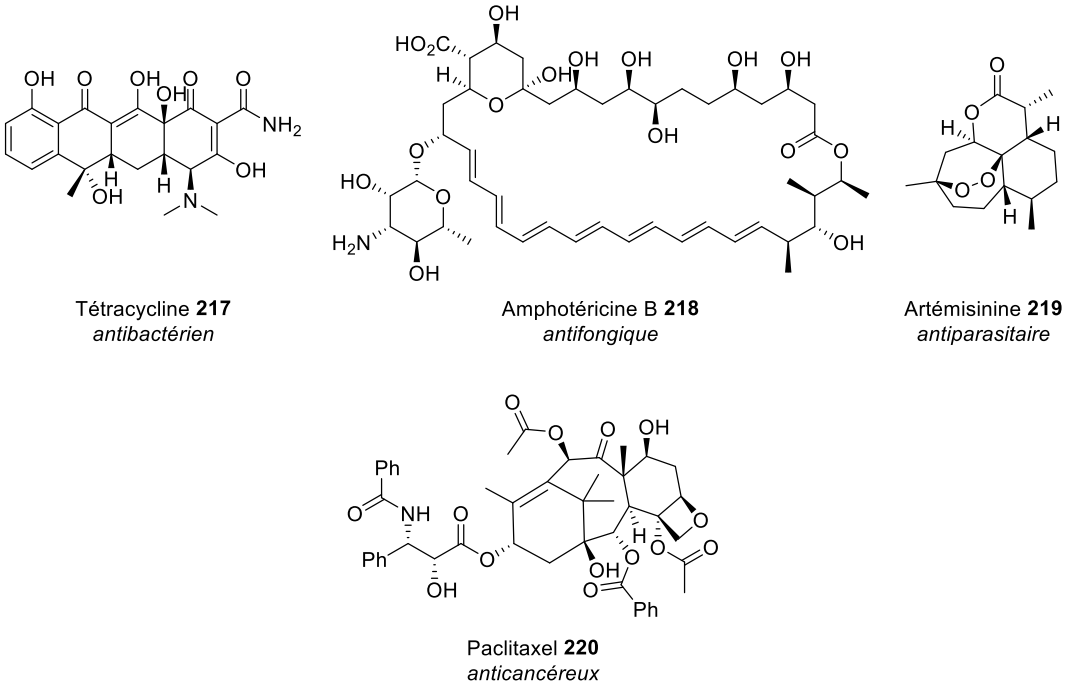


Figure 202 : Exemples de produits naturels possédant une activité biologique.

Quelle que soit la méthode employée, une étape cruciale dans la recherche de substances naturelles est l'isolement de la molécule des extraits biologiques. Bien que de très nombreuses techniques existent, notamment basées sur l'extraction ou la chromatographie,[197] elles demeurent souvent coûteuses de par leur nombre et leur durée vis-à-vis des quelques dixièmes de milligrammes de composés obtenus. Ceci s'explique par la complexité des extraits biologiques qui contiennent des composés possédant une large gamme de propriétés physico-chimiques (solubilité, polarité, …) et requièrent donc souvent la mise en œuvre d'une nouvelle procédure de séparation dépendant de leur composition.

Afin d'accéder plus rapidement à des molécules naturelles de structures similaires présentes dans un extrait, une alternative aux seules méthodes de purification a été développée. Il s'agit alors d'utiliser les fonctions réactives spécifiques présentes sur les produits naturels afin de les discriminer les uns des autres et de faciliter le processus de séparation classique en particulier si les composés sont présents en faibles quantité. Cette méthode a été baptisée approche basée sur la réactivité.

1.2 Approche basée sur la réactivité

L'approche basée sur la réactivité (de l'anglais « Reactivity Based Screening ») est un concept introduit en 2007 par le Prof. Cravatt.[198] Ces travaux s'inspirent de méthodes développées pour la protéomique, dont le but est de déterminer de manière systématique la fonction des protéines encodées dans le génome des organismes (constituant le protéome). Du fait de la grande diversité et du nombre important de protéines existantes, il est apparu indispensable de regrouper les enzymes par activités catalytiques. Pour cela, des méthodes d'enrichissement basées sur le marquage de leurs subtrats ont été développées,[199] la chimie bioorthogonale ayant ensuite étendu ce concept à l'ensemble du protéome. En plus de venir compléter les méthodes basées sur l'activité biologique, notamment sur l'isolement et l'identification des molécules naturelles actives, l'approche basée sur la réactivité est également une technique qui peut se suffire à elle-même pour la découverte de nouveaux produits naturels.

[197] Sticher, O. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 517-554.

[198] a) Carlson, E. E., Cravatt, B. F. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 429-435. b) Carlson, E. E., Cravatt, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15780-15782.

[199] Speers, A. E., Cravatt, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018-10019.

1.2.1 Utilisation de résines d'affinité pour l'enrichissement en produits naturels

Le postulat de l'équipe du Prof. Cravatt est que ce principe d'enrichissement peut également être appliqué au métabolome (ensemble des métabolites). Dans cette approche initiale, la stratégie consiste à introduire un groupe réactif vis-à-vis d'une fonction chimique spécifique (acide carboxylique, amine, cétone et aldéhyde, thiol) et à relier ce groupe à une résine par un lien clivable, permettant de restituer la substance capturée dans les conditions de coupure. Afin de ne pas dégrader ces substances naturelles, des conditions de clivage enzymatique utilisant la trypsine ont été choisies, imposant par conséquent le choix d'un lien peptidique contenant une arginine (ou une lysine) (Figure 203).

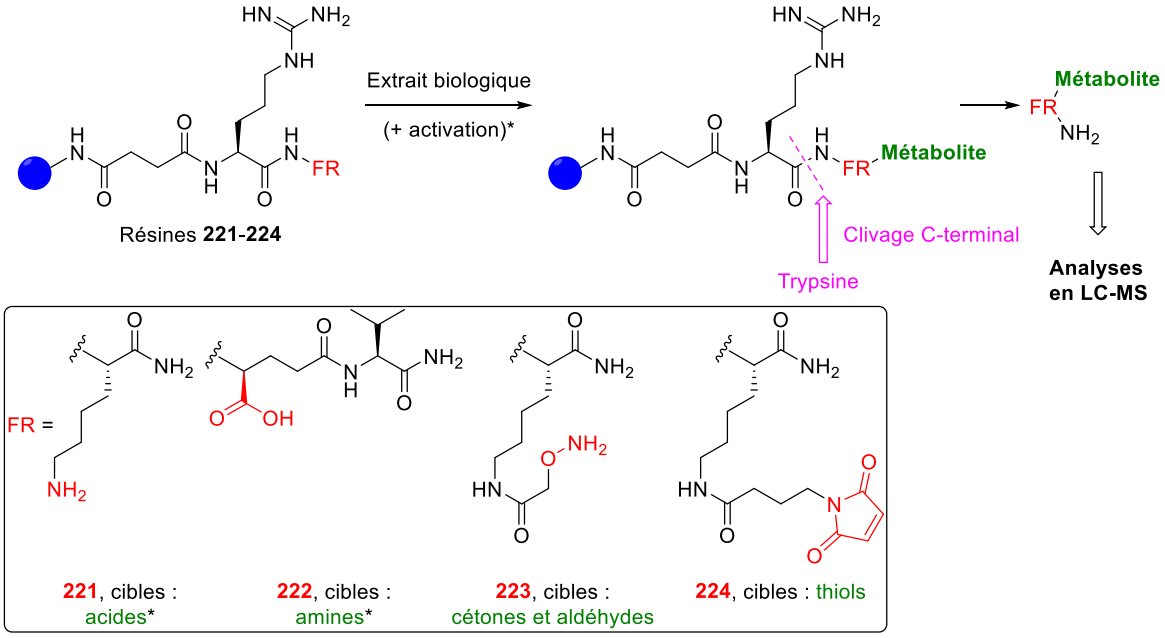


Figure 203 : Résines marquant chimiosélectivement une fonction chimique développées par le groupe du Prof. Cravatt.[198a)]

Il est à noter que dans le cas de la résine visant les acides ou les amines, l'ajout d'additifs permettant d'activer le groupe réactif est nécessaire : l'ester de 1-hydroxybenzotriazole des composés naturels est formé préalablement à l'addition de la résine **221** et l'ester de N-hydroxysuccinimide doit être formé sur la résine **222** avant addition de l'extrait naturel. Néanmoins ces quatre résines ont permis l'analyse globale du métabolome de cellules tumorales impliquées dans le cancer du sein chez l'humain (lignée MDA-MB-231) et l'influence d'un traitement avec un antioxydant (N-acétyl-L-cystéine) sur le métabolome de cette lignée cellulaire.[198a)]

L'incorporation d'un résidu 4-chlorophénylalanine en aval du lien clivable (Figure 204) permet d'observer le pic isotopique caractéristique relatif à l'atome de chlore en spectrométrie de masse (rapport isotopique de 3.1 pour 1 entre le ^{35}Cl et le ^{37}Cl), ce qui lui vaut l'appellation de marqueur de masse. Une telle caractéristique permet d'attribuer sans ambiguïté les signaux relatifs au marquage d'un composé par la résine mais aussi d'automatiser l'analyse des données de spectrométrie de masse par informatique.[198b)]

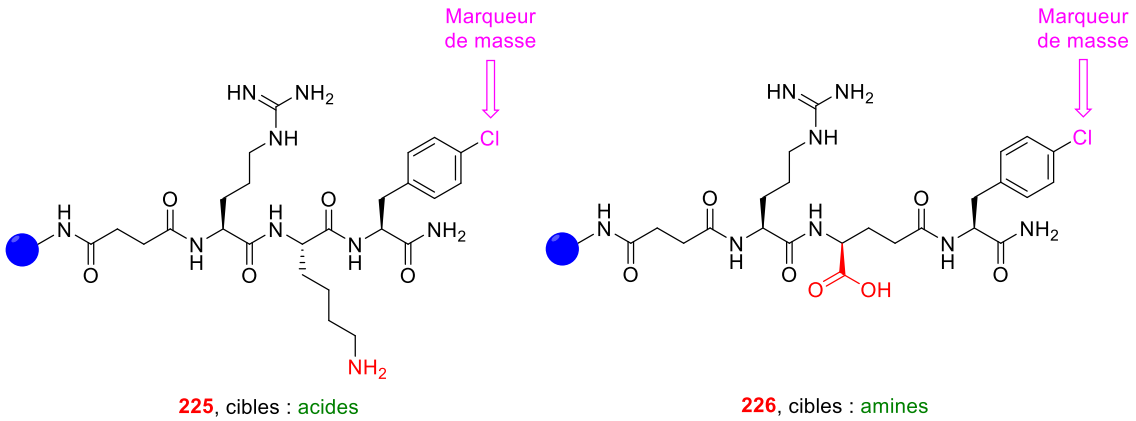


Figure 204 : Résines spécifiques des acides (**225**) et des amines (**226**) possédant un marqueur de masse (atome de chlore).

Outre ce motif isotopique, l'ajout de la 4-chlorophénylalanine permet également d'apporter de la lipophilie au résidu obtenu après clivage enzymatique, ce qui autorise alors une meilleure résolution des composés naturels très polaires des extraits, plus particulièrement ceux possédant une fonction acide carboxylique.[198b)]

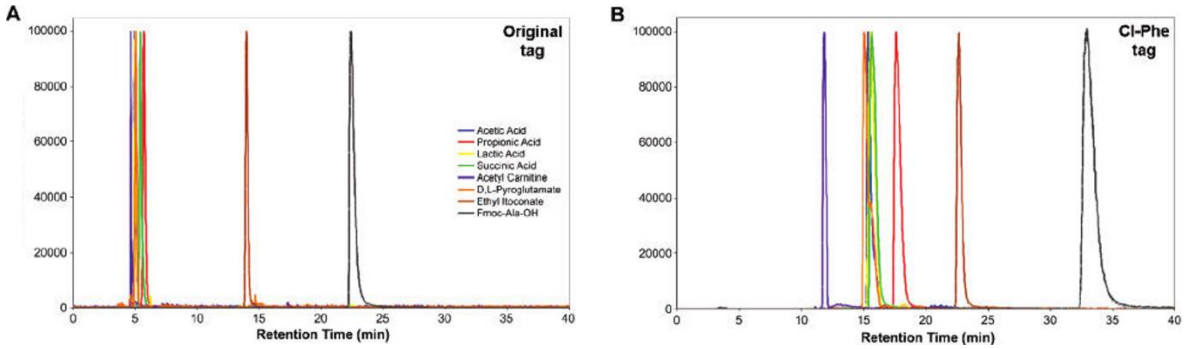


Figure 205 : Comparaison entre les profils chromatographiques des ions extraits (EIC) obtenus en LC-MS après marquage et relargage de huit métabolites acides par les résines **221** (chromatogramme A) et **225** (chromatogramme B).

Se basant sur ces travaux, le groupe du Dr. Carlson a également envisagé une approche similaire d'enrichissement, par formation d'une liaison covalente, utilisant une résine affine des fonctions alcools ou acides en rajoutant toutefois une exigence supplémentaire : lors de l'étape de libération du composé naturel de la résine, celui-ci doit être récupéré intact.[200]

Le développement de telles résines permettant de piéger puis de libérer les produits naturels portant des fonctions alcools, quelle que soit leur classe, a été envisagé par l'utilisation de groupements réactifs silylés en position benzylique portant un chlore en tant que groupe partant (Figure 206).

[200] Odendaal, A. Y., Trader, D. J., Carlson, E. E. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 760-764.

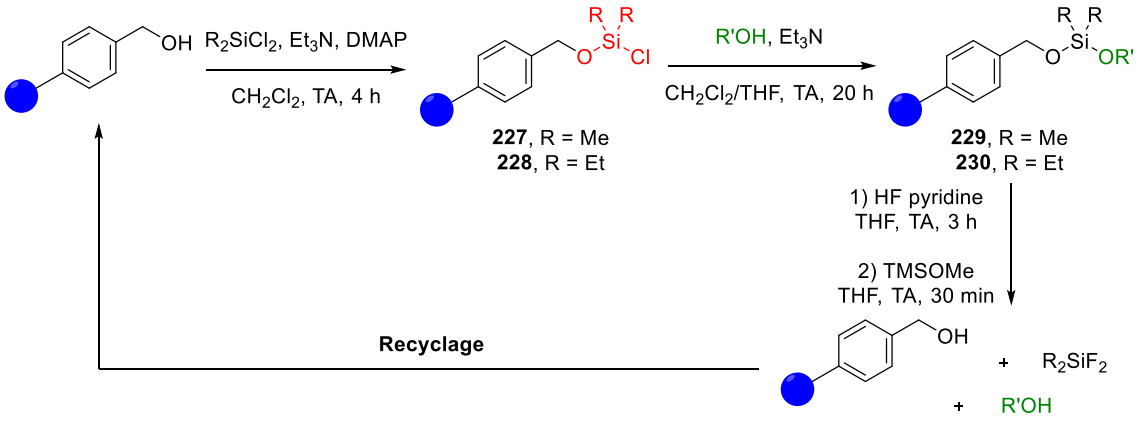


Figure 206 : Formation des résines affines des alcools.

Les groupements alcools benzyliques de la résine polystyrène sont activés par le diméthyl ou diéthylchlorosilane. Ces résines activées **227** et **228** peuvent ensuite être utilisées pour piéger les produits naturels possédant des fonctions alcools en présence d'une base faible (triéthylamine). Le clivage des siloxanes **229** et **230** obtenus est réalisé en présence de HF pyridine, permettant de libérer l'alcool naturel. Le traitement subsidiaire au méthoxytriméthylsilane sert ici à éliminer l'excédent de fluorure nécessaire à la déprotection.

Il est intéressant de constater que les résines **227** et **228** se montrent complémentaires au niveau des alcools marqués (Tableau 19). La résine **227** étant moins encombrée, un enrichissement plus important sur des alcools tertiaires est ainsi observé (entrée 3). En revanche l'enrichissement de certains alcools primaires peu encombrés avec cette même résine est difficile (entrée 1 et 2). Ceci est expliqué par la trop grande sensibilité de la résine **227** et du siloxane **229** à l'hydrolyse lors des étapes de lavage. La compétition des effets d'encombrement stérique et de stabilité explique donc les différences de sélectivité observées entre les résines **227** et **228**.

Les valeurs d'enrichissement sont déterminées par comparaison entre le chromatogramme d'un échantillon enrichi par les résines activées **227** ou **228** et celui d'un échantillon traité par la résine non activée. C'est le calcul du rapport entre les aires des pics normalisées d'un même composé dans ces deux cas qui conduit aux valeurs données dans le Tableau 19.

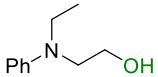
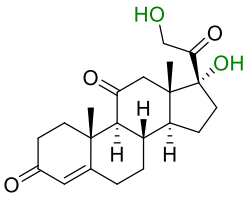
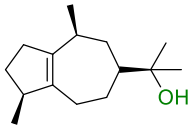
Entrée	Standard alcool	Enrichissement résine 227	Enrichissement résine 228
1	 **229a**	0%	14%
2	 **229b**	0% (hydrolyse du siloxane)	62%
3	 **229c**	53%	0% (alcool tertiaire trop encombré)

Tableau 19 : Comparaison des sélectivités d'enrichissement entre les résines activées **227** et **228**.

Un extrait naturel provenant de *Streptomyces griseolus* a également fait l'objet d'une étude d'enrichissement avec la résine **228**. Cette souche bactérienne est connue pour produire l'anisomycine

230, une substance naturelle capable d'inhiber la biosynthèse de protéines.[200] Le traitement de l'extrait de *S. griseolus* par la résine **228** a permis d'identifier le composé **230** ainsi que la cortisone **229b** et la *trans*-androstérone **231** avec des rendements d'enrichissement respectifs de 82%, 51% et 53% (Figure 207).

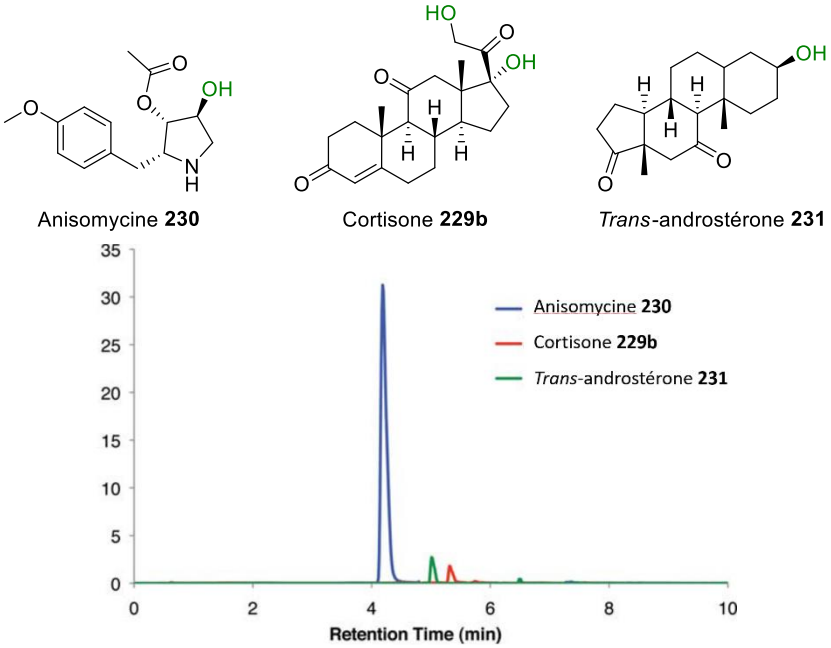


Figure 207 : Structures des composés **230**, **229b**, **231** et chromatogramme des ions extraits (EIC pour Extracted Ion Chromatogram) obtenu en LC-MS après enrichissement de l'extrait de *S. griseolus* par la résine **228**.

Des modifications structurales de cette résine, tout en conservant le même type de groupement réactif ainsi que les mêmes conditions d'activation et de clivage, ont permis le développement d'une méthode d'enrichissement en composés naturels portant des fonctions acides carboxyliques par la formation d'un motif de type ester de siloxyle. Des études sur la nature du groupe partant présent sur l'atome de silicium ont montré que la résine activée **232** possédant un groupement 3-dichloro-2-propoxyle présentait la meilleure sélectivité vis-à-vis des acides carboxyliques (Figure 208).[201]

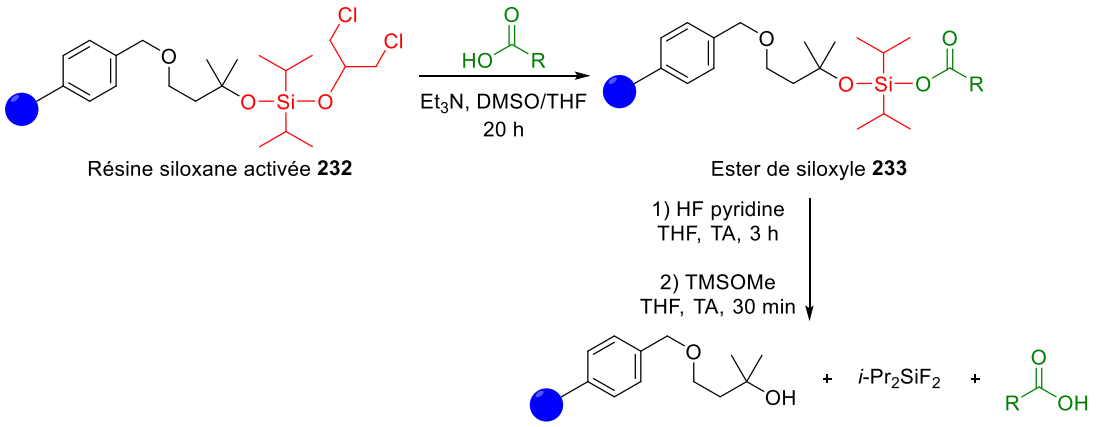


Figure 208 : Piégeage d'acides carboxyliques à l'aide de la résine activé **232** *via* formation d'un ester de siloxyle **233** pouvant être clivé en présence de fluorures.

[201] Trader, D. J., Carlson, E. E. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5652-5655.

L'utilisation de cette résine sur un extrait brut de *Streptomyces cinnamonensis* a permis notamment la capture de l'antibiotique monensin **234** biosynthétisé par cette bactérie avec un rendement de 64%.

Le piégeage de composés comportant un acide carboxylique, qu'ils soient naturellement présents dans l'extrait ou bien qu'ils aient été rajoutés avant enrichissement, se fait de manière totalement sélective vis-à-vis d'autres molécules possédant des fonctions amines, thiols ou alcool également ajoutées à l'extrait (Figure 209).

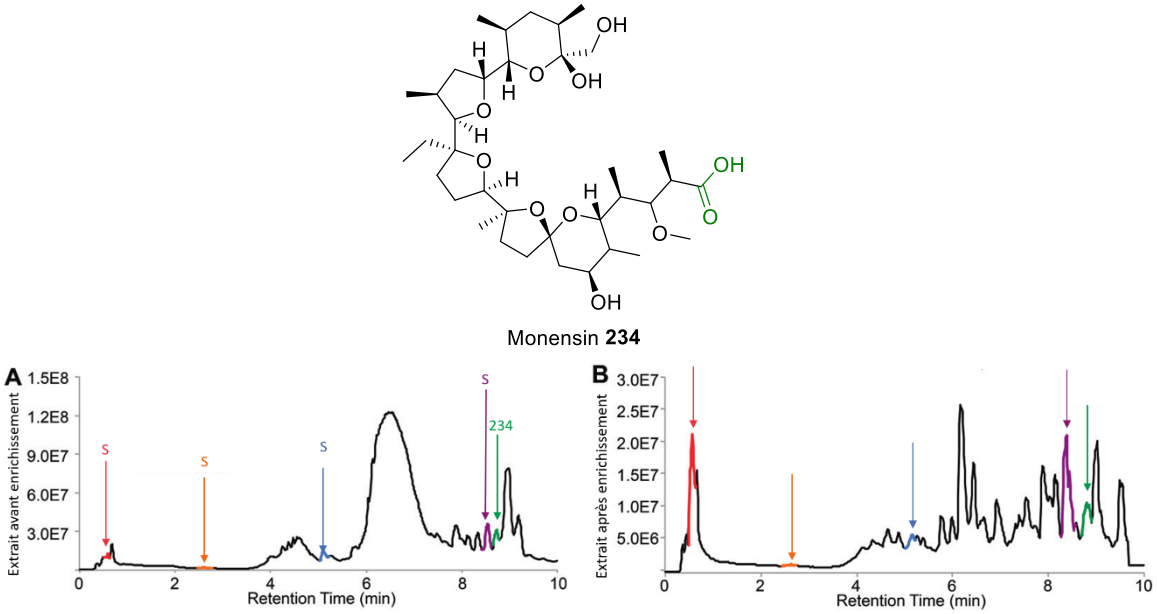


Figure 209 : Structure de l'antibiotique monensin B **234** (flèche verte) et chromatogramme TIC (Total Ion Chromatogram) de l'extrait de *S. cinnamosensis* auquel ont été ajoutés quatre standards acide carboxylique (S et autres flèches colorées) obtenu avant (A) et après enrichissement (B) par la résine **232**.

Cette stratégie est très intéressante puisque peu de réactions sont capables d'être sélectives des acides carboxyliques.[201] Plus généralement, les résines siloxanes présentent des avantages majeurs :

- Le relargage des alcools ou acides piégés par la résine se fait sans ajout d'un résidu sur le composé naturel, permettant l'analyse directe de celui-ci.
- Après clivage de la résine, celle-ci peut être recyclée pour être à nouveau activée sans perte notable de capacité de capture.

Cependant, ces avantages sont nuancés par de nombreuses contraintes et limitations :

- Les alcools les moins encombrés sont difficilement marqués du fait de la faible stabilité du lien siloxane formé, par conséquent le piégeage systématique de tous les composés naturels est difficilement envisageable et la résine activée doit être utilisée rapidement, sous peine de perdre son activité.
- Le procédé de marquage requiert dans tous les cas l'utilisation de solvants secs et d'une base.
- Le clivage de la résine se fait dans des conditions chimiques impliquant l'utilisation de HF pyridine en excès.

Finalement, une dernière approche utilisant un support solide a été développée plus récemment (2015), se basant sur les réactions orthogonales et notamment la cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC).[202] L'originalité de cette stratégie envisagée par l'équipe du Prof. Kim repose sur l'utilisation d'une coumarine azoture profluorescente : en présence de cuivre (I) et des fonctions alcynes terminales présentes sur les produits naturels ciblés, la réaction de CuAAC peut avoir lieu, permettant alors l'apparition de la fluorescence.[203] Cette coumarine est reliée à la résine par un lien clivable en

[202] Jeon, H., Lim, C., Lee, J. M., Kim, S. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2806-2811.

[203] Sivakumar, K., Xie, F., Cash, B. M., Long, S., Barnhill, H. N., Wang, Q. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.

présence de fluorure permettant ainsi des analyse en HPLC couplée à la spectrométrie de masse du résidu coumarinique **236** obtenu après clivage (Figure 210).

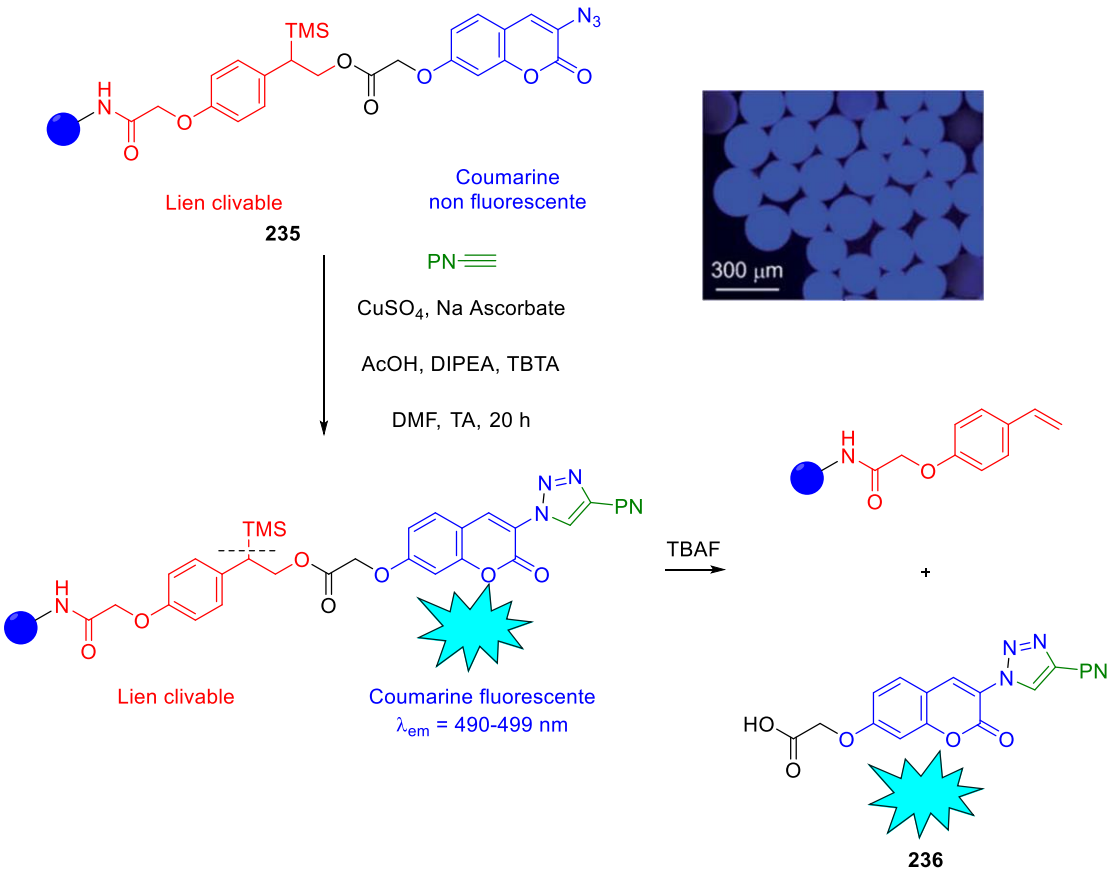


Figure 210 : Principe du marquage de produits naturels (PN) possédant une fonction alcyne entraînant l'apparition de fluorescence. L'image montre les billes de résine **235** ayant réagi avec un alcyne et avant clivage.

Cette méthode a ensuite été testée sur un extrait méthanolique de *Litsea japonica* dont les feuilles sont connues pour contenir des produits naturels possédant des fonctions alcyne terminal comme l'hamabiwalactone **237a**, les litsenolides **237b** et **237c** ou la litsealactone B **237d** (Figure 211).[202]

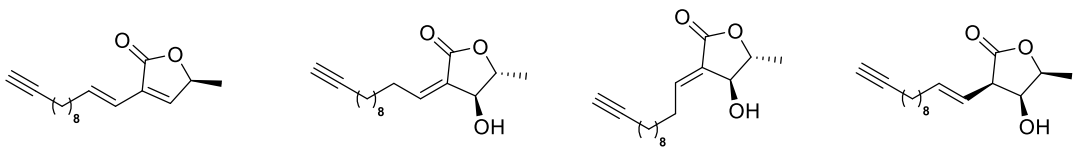


Figure 211 : Structures des produits naturels connus comme étant produits par *L. japonica*.

Cette expérience a pu confirmer l'applicabilité de la méthode au marquage de produits naturels possédant une fonction alcyne puisque les différents composés adduits coumariniques correspondants ont pu être détectés en spectrométrie de masse et par fluorescence (Figure 212).

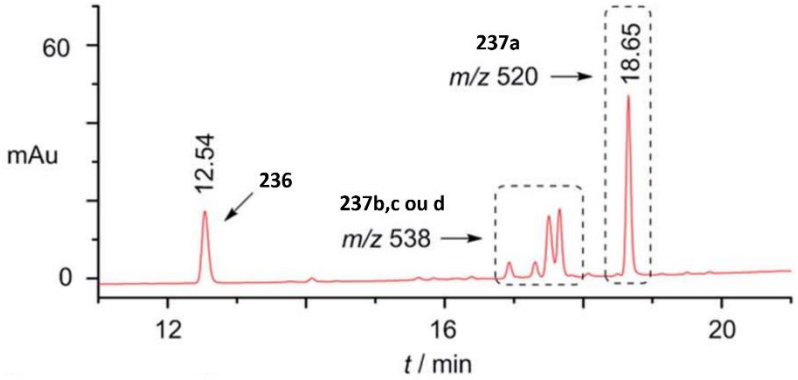
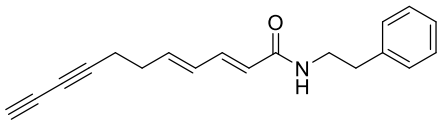


Figure 212 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *L. japonica* après traitement par la résine **235** et clivage.

L'utilisation de la résine **235** dans des conditions réelles a ensuite été envisagée, pour cela, de nombreux extraits méthanoliques de différentes plantes ont été analysés. Cette analyse est d'autant plus facilitée que l'apparition de fluorescence lors de l'ajout de la résine **235** et du cuivre (I) permet de confirmer rapidement la présence ou non de produits naturels ciblés dans l'extrait étudié. Le criblage d'échantillons d'extraits peut donc être envisagé de manière simultanée sur de nombreux échantillons d'une plaque multipuits. Cette méthodologie de criblage a ainsi permis d'identifier *Chrysanthemum morifolium* comme nouveau producteur du diyne **238** (Figure 213).



238

Figure 213 : Structure du diyne **238** identifié dans l'extrait de *C. morifolium*.

Cette stratégie reposant sur la fluorescence est très utile pour le processus de criblage et d'isolement des produits naturels. En effet, le signal de fluorescence peut être détecté de manière plus sensible que par absorbance par exemple, permettant une identification rapide des extraits contenant les produits naturels cibles. Durant les différentes étapes d'extraction des solvants organiques de polarité différentes sont utilisés afin d'effectuer une première séparation des produits naturels suivant leur polarité, ici les composés marqués peuvent être suivis par fluorescence durant ce processus afin d'éliminer les phases organiques dans lesquelles ils ont peu d'affinité. Le marqueur fluorescent peut ensuite être utilisé lors de la purification pour détecter les fractions contenant les produits naturels ciblés (Figure 214). Ces étapes doivent cependant être réalisées sur des échantillons de l'extrait et une purification de l'extrait natif reste nécessaire pour la détermination structurale des composés d'intérêt du fait de la modification irréversible des produits naturels par le marqueur fluorescent.

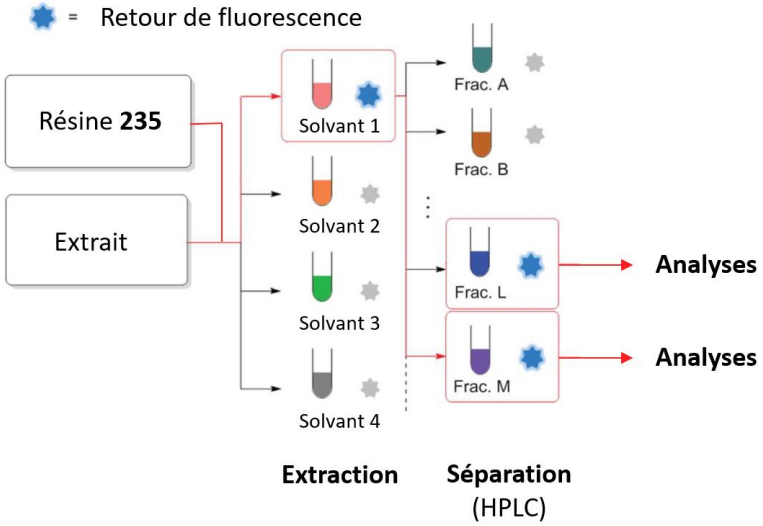


Figure 214 : Utilisation de la résine **235** pour l'isolement de produits naturels possédant des fonctions alcyne terminal.

Cette méthode présente donc l'avantage d'une très bonne sensibilité de détection grâce à la fluorescence. Cependant, la nature irréversible du lien formé entre le marqueur fluorescent et la molécule naturelle reste un défaut majeur qui oblige à n'utiliser la résine **235** qu'en tant que test de présence des produits naturels ciblés.

Dans les approches développées ici, l'idée était d'enrichir l'extrait biologique en composés naturels désiré pour caractériser le métabolome d'un organisme ou vérifier la présence d'un composé naturel connu. Pour cela, les molécules naturelles possédant la fonction chimique cible sont transitoirement piégés par un groupement réactif lié à un support solide. Il s'agit donc d'améliorer les processus de séparation des différents constituants de l'extrait en utilisant comme discriminant la présence ou non de certaines fonctions chimiques sur les molécules naturelles. Ici le travail après marquage demeure conséquent de par la présence de la résine qu'il faut éliminer avant d'effectuer les analyses en HPLC couplée à la spectrométrie de masse.

Une alternative est de s'affranchir de tout support solide pour se concentrer sur la détection des produits naturels qui ont réagi avec le groupement réactif discriminant. Dans ce cas, une molécule organique portant ce groupement suffit à jouer le rôle de sonde.

1.2.2 Utilisation de molécules organiques en tant que sondes à produits naturels

L'utilisation de techniques spectroscopiques pour identifier des produits naturels déjà décrits afin de s'affranchir de leur isolement et de pouvoir s'intéresser exclusivement à des molécules nouvelles est appelé processus de déréplication. Déterminer si des données analytiques sont dues à un produit naturel déjà découvert ou non requiert donc, en plus de techniques d'analyses très résolutives de par la complexité des échantillons et des structures étudiées, de comparer ces données à celles des produits naturels déjà découverts. Pour cela l'utilisation d'outils informatiques et notamment de bases de données est indispensable mais demeure limité par la taille de celles-ci (Tableau 20).

Base de données	Nombre d'entrées	Contenu
Super Natural II	355000	Structures 2D, propriétés physico-chimiques, vendeurs
Universal Natural Product Database	197200	Structures 2D et 3D, propriétés physico-chimiques, activités biologiques
Chinese Natural Product Database	53000	Regroupement de plusieurs bases de données chinoises
Drug Discovery Portal	40000	Structures 2D et 3D, propriétés physico-chimiques, activités biologiques
iSMART	20000	Composés utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise
DIOS	6700	Structures 3D, activités biologiques
AfroDb	1000	Composés extraits de plantes médicinales africaines
NuBBE	640	Composés extraits de plantes brésiliennes

Tableau 20 : Bases de données de composés naturels utilisés pour la découverte de nouvelles substances biologiquement actives.[204]

La large distribution des quantités de molécules naturelles présentes au sein d'un extrait donné entraîne irrémédiablement une perte d'information lors des analyses du fait de la réponse, souvent plus importante, liée aux composés naturels déjà connus. Afin d'identifier de nouvelles structures, il faut donc pouvoir très rapidement déterminer quels composés naturels de l'extrait sont déjà référencés.

L'approche basée sur la réactivité, en plus de faciliter la lecture de la composition d'un extrait naturel, présente des atouts pour répondre à ce problème croissant de redécouverte de produits naturels. Cibler une fonction chimique caractéristique d'une famille de composés naturels connus peut ainsi contribuer à la découverte de nouveaux membres après déréplication.

1.2.2.1 Marquage des sites électrophiles de produits naturels par addition nucléophile du dithiothréitol

Ce type d'approche utilisant une sonde organique a été initié en 2014 par l'équipe du Prof. Mitchell. Le but était de cibler les résidus acides aminés déshydratés susceptibles de réagir *via* une addition de Michael, tels que la déhydroalanine **239** et la déhydrohomoalanine (ou déhydrobutyrine) **240**. Ces résidus sont fréquemment retrouvés sur les produits naturels dérivés de peptides macrocycliques, comme

[204] Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R. J. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14*, 111-129.

le thiopeptide TP-1161 **241**, produits notamment par des actinobactéries.[205] La sonde choisie pour réaliser l'addition conjuguée sur ces résidus α,β insaturés a été le dithiothréitol (DTT) **242** (Figure 215).

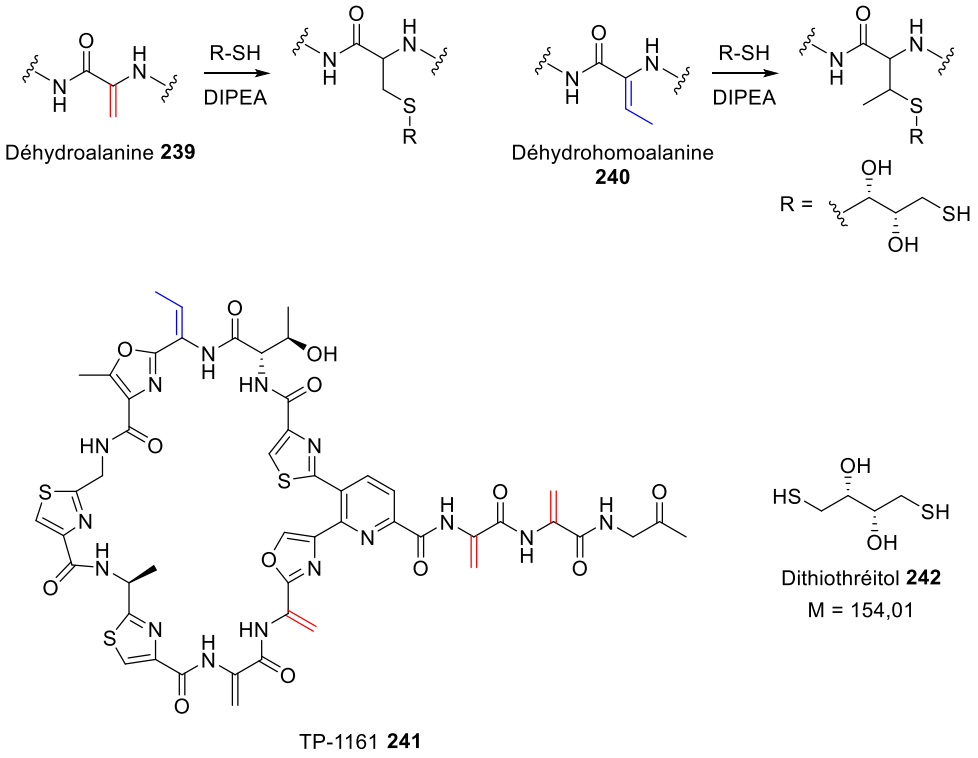


Figure 215 : Structures des résidus déhydroalanine **239** et déhydrohomoalanine **240** ainsi que du thiopeptide TP-1611 **241** et du dithiothréitol **242**. Les alcènes mis en évidence sont susceptibles de réagir avec le DTT.

L'utilisation de la bioinformatique permet de sélectionner les souches bactériennes potentiellement productrices de peptides macrocycliques comportant des résidus acides aminés déshydratés. Il faut pour cela que le génome de la bactérie comporte les gènes codant pour la formation de telles molécules naturelles. La mise en culture des souches sélectionnées puis l'extraction des milieux de culture permet ainsi de maximiser les possibilités d'isoler de nouveaux produits naturels comportant les résidus cibles.

En comparant les spectres de masse de l'extrait biologique seul et en présence de DTT **242**, il est relativement facile d'identifier la présence d'espèces pouvant réagir avec cette sonde puisqu'une augmentation de 154 Da sera observée, caractérisant la formation d'un adduit avec le DTT **242** (Figure 216).

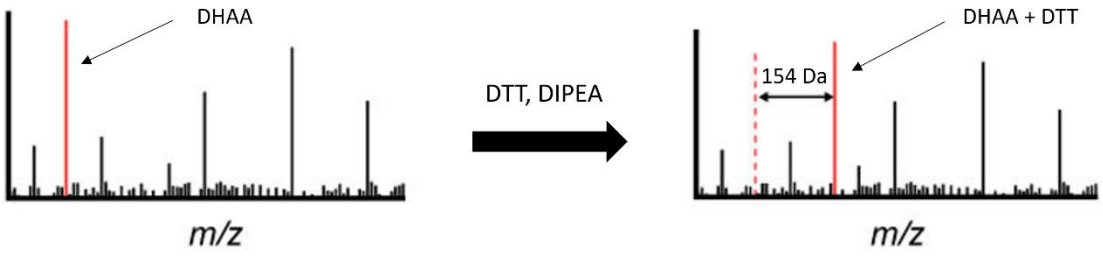


Figure 216 : Principe du marquage des résidus acides aminés déshydratés (DHAA). Le pic rouge symbolise un produit naturel portant une fonction réactive avec le DTT.

L'étude bioinformatique du génome de la souche bactérienne WC-3908 a révélé que celle-ci possédait des gènes pouvant coder pour la synthèse de thiopeptides, bien qu'aucune molécule de ce type

[205] Cox, C. L., Tietz, J. I., Sokolowski, K., Melby, J. O., Doroghazi, J. R., Mitchell, D. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2014-2022.

n'ait été reportée. Le marquage de l'extrait du milieu de culture d'une souche de WC-3908 par le DTT **242** a confirmé cette hypothèse et conduit à la caractérisation d'un nouveau thiopeptide baptisé cyclothiazomycine C (Figure 217).[205]

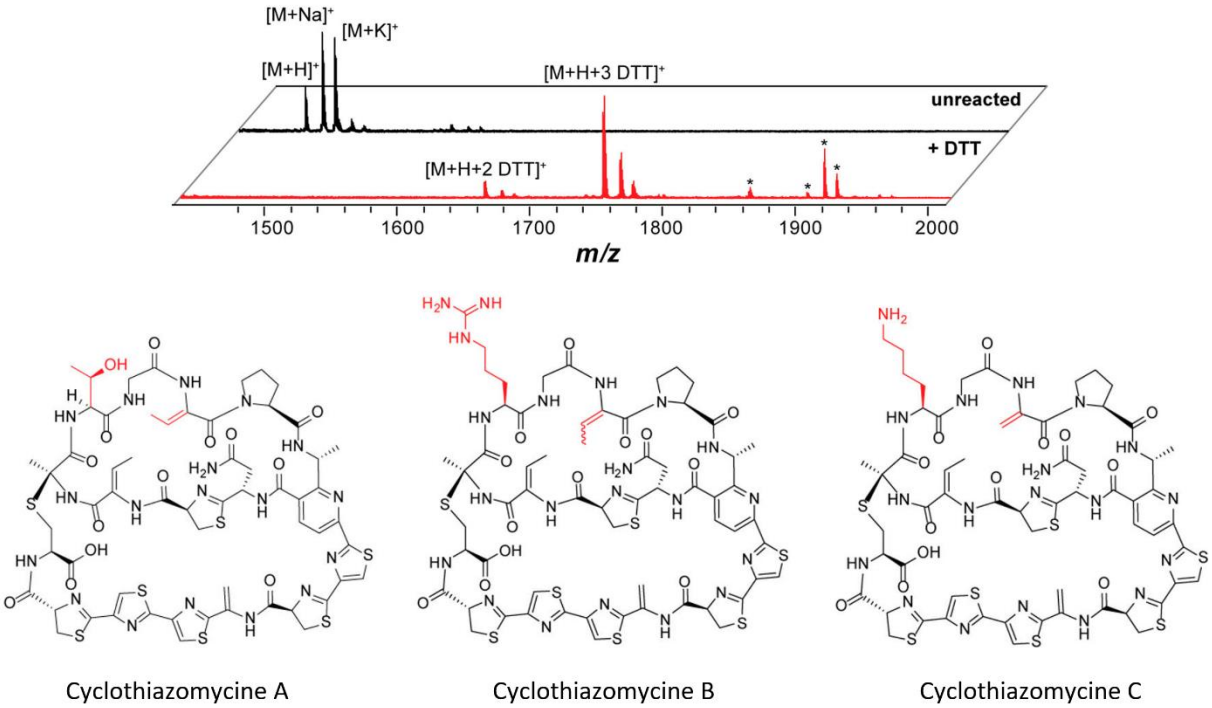


Figure 217 : Partie du spectre de masse de l'extrait de WC-3908 avant et après traitement au DTT **242**. Les structures des cyclothiazomycines A, B et C (les fonctions en rouge correspondent aux différences structurales entre ces trois molécules).

L'exemple ci-dessous montre comment une sélection par la bioinformatique permet la sélection de souches bactériennes possédant des caractéristiques génotypiques favorables à la biosynthèse de produits naturels comportant les fonctions chimiques réactives vis-à-vis de la sonde à molécules naturelles choisie. Ceci peut conduire à la découverte de nouvelles substances naturelles mais aussi permettre de confirmer qu'une souche bactérienne possédant les gènes nécessaires à la biosynthèse d'un produit naturel connu présente bien cette molécule dans ses extraits biologiques.[206]

Le fait que le marquage des composés cibles soit ici réalisé sans conditions anhydres et que la sonde utilisée soit un produit commercial sont les deux grands avantages de cette méthode par rapport à celles décrites dans la partie précédente (voir 1.1.1).

Le DTT est néanmoins peu stable en solution, en particulier à pH basique où il s'oxyde rapidement en présence de l'oxygène de l'air. Ainsi le DTT solubilisé dans le tampon phosphate de potassium (PPB) voit son temps de demi-vie divisé par quatre lorsque le pH augmente de 6.5 à 7.5 (Tableau 21).[207] Etant donné que ce thiol est utilisé en large excès pour l'addition de Michael sur les résidus d'acides aminés déshydratés[205], le problème de stabilité peut cependant être considéré comme négligeable.

[206] Molloy, E. M., Tietz, J. I., Blair, P. M., Mitchell, D. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 6276-6290.

[207] Stevens, R., Stevens, L., Price, N. C. *Biochem. Educ.* **1983**, *11*, 70.

Conditions	Temps de demi-vie (h)
pH = 6.5, 20 °C	40
pH = 7.5, 20 °C	10
pH = 8.5, 20 °C	1.4
pH = 8.5, 0 °C	11

Tableau 21 : Temps de demi-vie d'une solution de DTT dans le tampon phosphate de potassium (0.1 M) en fonction du pH et de la température.

Un autre problème pouvant être mentionné est inhérent au rôle de réducteur du DTT. Ce caractère est très utilisé en biochimie pour rompre les ponts disulfures se formant entre des résidus cystéines, régénérant ainsi les groupements thiols mais aussi pour protéger ces thiols de l'oxydation.[208] Le mécanisme de cette réduction procède en deux étapes réversibles. Tout d'abord, l'addition nucléophile du thiolate issu de **242** sur le pont disulfure **243** génère le composé intermédiaire **244** et le thiol **245a**, puis le thiolate de cet intermédiaire **244** s'additionne de manière intramoléculaire sur le disulfure, conduisant ainsi au deuxième thiol **245b** et au DTT oxydé **242'**. L'équilibre est déplacé vers la formation des deux thiols **245a** et **245b** de par la formation du disulfure cyclique **242'** (Figure 218).

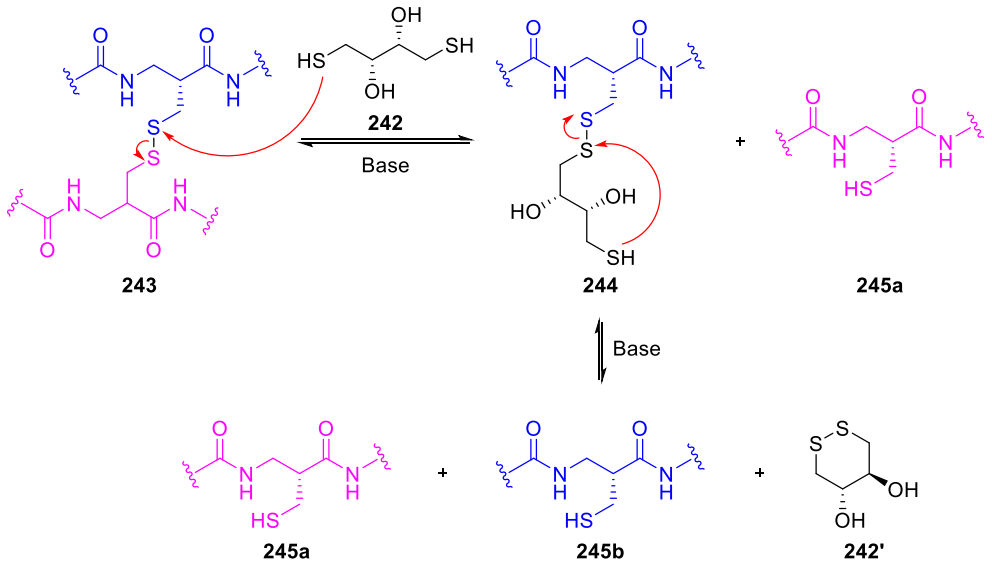


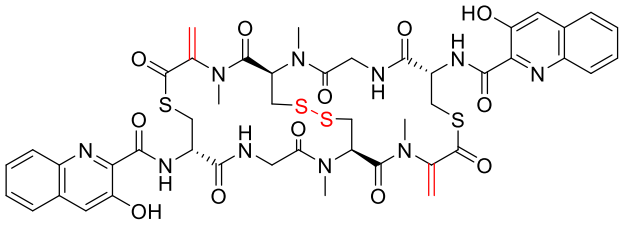
Figure 218 : Mécanisme de réduction d'un pont disulfure par le DTT.

Ainsi le DTT **242** est donc susceptible de réduire les disulfures présents sur les produits naturels portant des acides aminés déshydratés, comme c'est le cas par exemple pour le peptide macrocyclique BE-22179 **246** qui possède ces deux types de motifs (Figure 219).[209]

Dans l'hypothèse d'un extrait naturel contenant ce produit, l'ajout de DTT **242** pourrait donc conduire à la réduction du pont disulfure en plus de réaliser une addition de Michael sur les résidus acides aminés déshydratés, le signal en spectrométrie de masse du composé **246** ne serait donc pas augmentée exactement d'un multiple de 154 Da, caractéristique des adduits dus au DTT, complexifiant donc la déréplication de ce produit naturel connu.

[208] Cleland, W. W. *Biochemistry* **1964**, *3*, 480-482.

[209] Boger, D. L., Ichikawa, S., Tse, W. C., Hedrick, M. P., Jin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 561-568.



BE-22179 **246**

Figure 219 : Structure du peptide macrocyclique BE-22179 **246**. Les fonctions potentiellement réactives vis-vis du DTT sont mises en évidence en rouge.

Finalement, un composé naturel possédant la fonction chimique cible mais présent en très faible quantité sera occulté sur le spectre de masse par d'autres produits naturels marqués plus abondants. La probabilité qu'un produit naturel soit déjà découvert croît avec son abondance au sein de l'extrait, par conséquent des méthodes sont nécessaires pour accroître de manière significative l'intensité de la réponse d'un produit naturel marqué vis-à-vis du bruit de fond dû à la complexité du milieu étudié.

1.2.2.2 Utilisation de molécules organiques nucléophiles possédant un marqueur de masse

Comme présenté précédemment, un des principaux obstacles à la découverte de nouveaux produits naturels est la quantité de composé présent au sein de l'extrait biologique. L'approche basée sur la réactivité suppose que les processus de marquage puissent être visualisés facilement en spectrométrie de masse et sans ambiguïté. Une possibilité pour répondre à cette problématique est la présence d'atomes présentant une signature isotopique unique tels que le brome (ratio isotopique $^{79}Br/^{81}Br$: 50.69%/49.31%) et le chlore (ratio isotopique $^{35}Cl/^{37}Cl$: 75.76%/24.24%) sur la sonde utilisée. Cette stratégie, déjà utilisée en protéomique, permet d'utiliser des outils informatiques pouvant rechercher sur un spectre de masse les signatures isotopiques propres aux atomes de brome et de chlore.

Le groupe du Prof. Bertozzi a ainsi utilisé cette approche pour le marquage des groupements thiols de protéines grâce à l'iodoacétamide du dérivé de tyrosine **247**. Les protéines sont ensuite digérées par la trypsine et les fragments peptidiques marqués peuvent facilement être identifiés en spectrométrie de masse (Figure 220).[210]

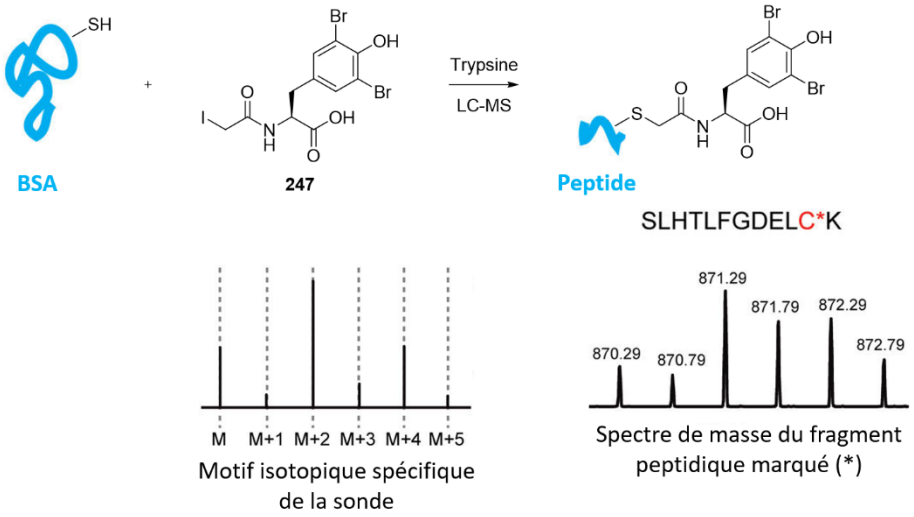


Figure 220 : Principe du marquage isotopique de protéines. L'astérisque montre le résidu cystéine (en rouge) sur lequel le marquage a eu lieu.

[210] Palaniappan, K. K., Pitcher, A. A., Smart, B. P., Spiciarich, D. R., Iavarone, A. T., Bertozzi, C. R. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 829-836.

Le groupe du Prof. Mitchell a envisagé en 2016 ce type de stratégie à la découverte de produits naturels dans le cadre de l'approche basée sur la réactivité développée précédemment. Le principe développé repose sur l'utilisation d'une sonde possédant une fonction hydroxylamine susceptible de réagir avec les groupements carbonyles des produits naturels pour former l'oxime correspondante. Le choix de la formation d'une fonction oxime est particulièrement intéressant de par la bonne stabilité de cette fonction à l'hydrolyse[211] mais également parce que la vitesse de formation de l'oxime est très sensible à la nature des groupement carbonyle et hydroxylamine mis en jeu.[212] Ce dernier point, loin d'être un défaut, permet en effet la visualisation sur le même spectre de masse le composé naturel natif et le composé correspondant marqué, ce qui facilite l'identification des produits naturels ayant réagi avec la sonde.[213]

Le marqueur hydroxylamine **248**, possédant deux atomes de brome, ainsi synthétisé a d'abord été testé sur un échantillon pur de l'antibiotique naturel streptomycine **249**, qui possède une fonction aldéhyde et ensuite sur un extrait de *Streptomyces griseus*, connu pour produire ce composé. Le marquage est observé dans les deux cas et le motif isotopique dû à l'adduit formé entre la sonde **248** et le produit naturel **249** peut être reconnu sans ambiguïté (Figure 221).

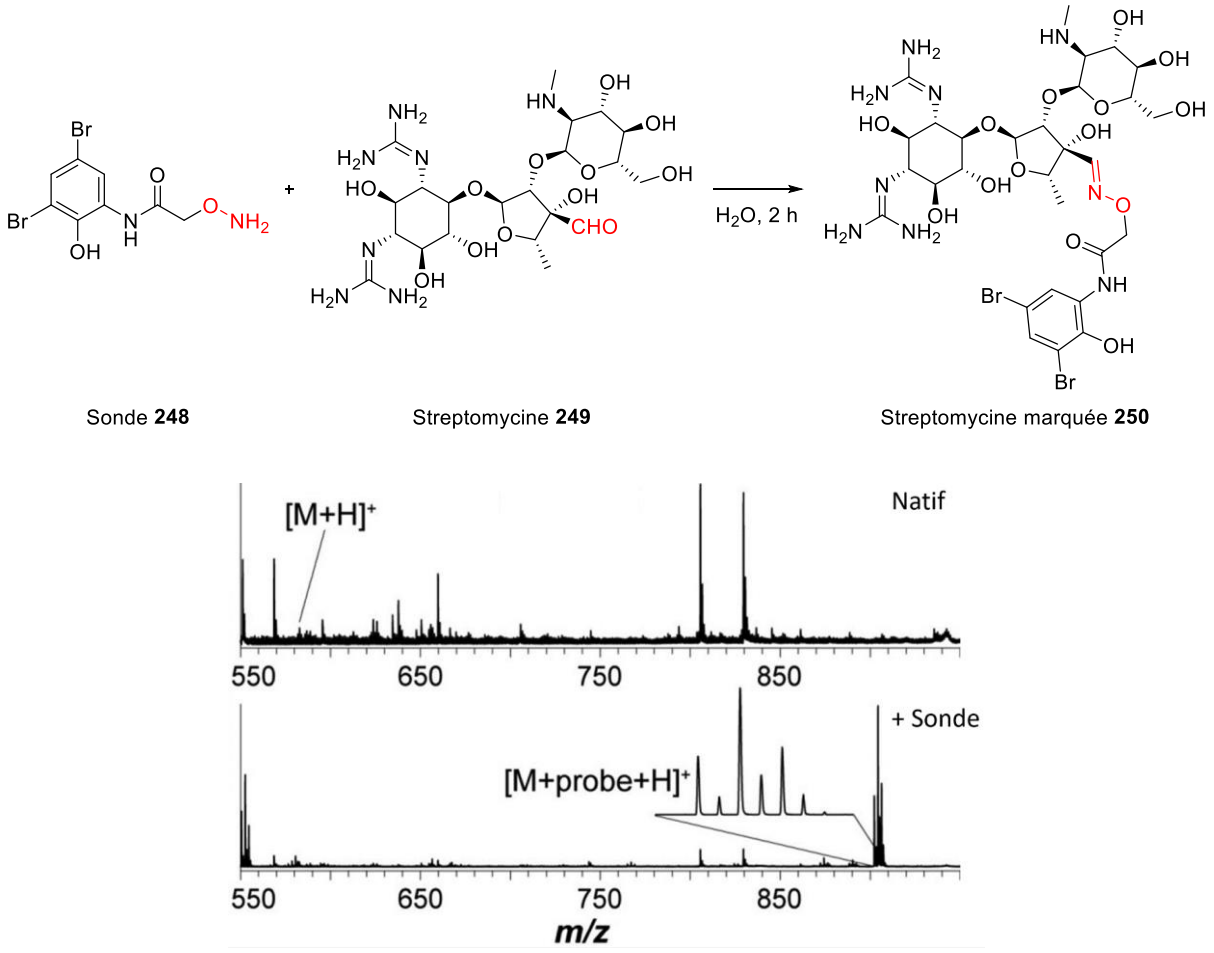


Figure 221 : Marquage de la streptomycine **249** par la sonde hydroxylamine **248** dans un extrait de *S. griseus*. La zone du spectre de masse contenant l'adduit **250** a été agrandie pour montrer la présence du motif isotopique dû aux deux atomes de brome.

La spécificité de la sonde **248** vis-à-vis des fonctions carbonyles a également été vérifiée. En effet des fonctions époxyde et halogénoalkyle sont susceptibles de subir l'addition nucléophile de

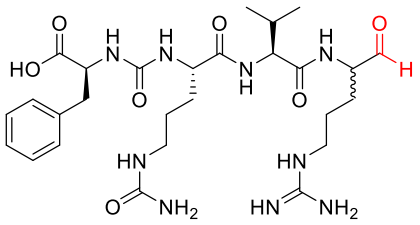
[211] Kalia, J., Raines, R. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.

[212] Kool, E. T., Crisalli, P., Chan, K. M. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1454-1457.

[213] Maxson, T., Tietz, J. I., Hudson, G. A., Guo, X. R., Tai, H.-C., Mitchell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15157-15166.

l'hydroxylamine et par conséquent de donner de faux positifs en spectrométrie de masse. Dans les conditions expérimentales utilisée, aucun marquage n'a été observé sur des produits naturels possédant ce type de fonction et par conséquent la sonde **248** peut être utilisée en large excès. [213]

Finalement cette méthodologie a pu être exploitée pour l'identification de nouveaux produits naturels. Le traitement d'un extrait de *Streptomyces albulus* par la sonde **248** a permis d'identifier un nouveau composé, baptisé déimino-antipain **251** (Figure 222). Ce résultat met de plus en avant l'avantage de la sonde **248** qui peut être utilisé en temps que chromophore UV, facilitant ainsi la purification par HPLC des produits naturels marqués. La possible réversibilité du marquage sur le composé naturel **251** a pu être établie, le composé natif a pu être récupéré après marquage et purification *via* un traitement acide en présence d'acétone pour piéger la sonde **248** ainsi régénérée.



Déimino-antipain **251**

Figure 222 : Structure du déimino-antipain **251**. La stéréochimie du résidu arginine n'est pas déterminée du fait de sa racémisation lors de la purification.

Cette méthode de marquage *via* la formation d'une oxime se révèle donc spécifique des produits naturels possédant des groupements carbonyles. Les composés marqués sont de plus facilement identifiables par spectrométrie de masse mais aussi par détection UV du fait du groupement aromatique dibromé de la sonde **248**. Cette méthode peut également être élargie aux produits naturels possédant des fonctions cétones moins réactives grâce à l'utilisation de conditions réactionnelles développées pour le marquage de protéines utilisant des catalyseurs[214a), 214b)] ou l'effet des basses températures[214c)].

Dans le même temps, le groupe du Prof. Hughes a développé une stratégie similaire en s'inspirant des travaux du Prof. Mitchell[205, 213] et du mécanisme d'action des produit naturels électrophiles vis-à-vis de leurs cibles biologiques[192]. En effet les résidus cystéines de protéines sont souvent impliqués dans l'interaction covalente entre le produit naturel et sa cible, la conception de sondes nucléophiles dont la fonction réactive est un groupement thiol est donc judicieuse. Deux sondes à produits naturels **252** et **253** possédant la fonction nucléophile thiol ainsi qu'un atome de brome ou de chlore servant à la détection en spectrométrie de masse ont ainsi été sélectionnée. La sonde **252** cible plus particulièrement les fonctions carbonyles contraintes comme les β-lactones ou β-lactames ainsi que les accepteurs de Michael mais se montre peu réactive vis-à-vis des époxydes, au contraire de la molécule **253** réagissant plus particulièrement avec ceux-ci (Figure 223).[215]

[214] a) Rashidian, M., Mahmoodi, M. M., Shah, R., Dozier, J. K., Wagner, C. R., Distefano, M. D. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 333-342. b) Larsen, D., Pittelkow, M., Karmakar, S., Kool, E. T. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 274-277. c) Agten, S. M., Suylen, D. P. L., Hackeng, T. M. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 42-46.

[215] Castro-Falcón, G., Hahn, D., Reimer, D., Hughes, C. C. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2328-2336.

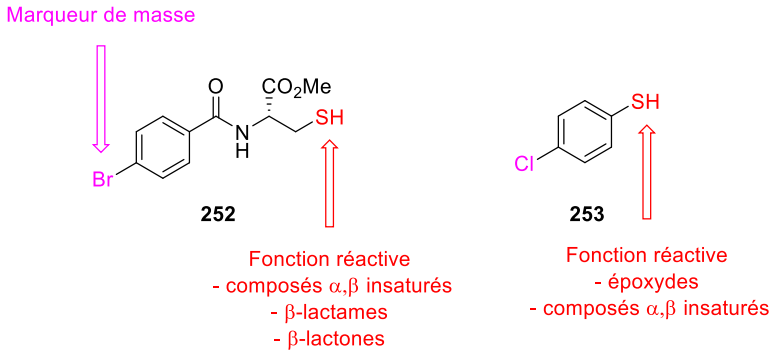
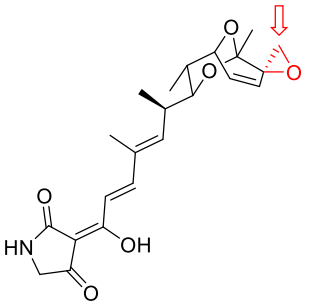


Figure 223 : Structures des sondes à produits naturels **252** et **253**.

Le traitement d'un échantillon d'extrait naturel provenant de *Salinispora pacifica* par les sondes **252** et **253** en présence de triéthylamine dans le DMF a permis l'identification d'un unique adduit entre le composé **253** et un produit naturel en spectrométrie de masse. Cette observation a permis de guider l'isolement de la molécule naturelle native correspondante par HPLC couplée à la spectrométrie de masse, identifiée comme l'antibiotique tirandalydigin[216] **254** possédant une fonction époxyde (Figure 224).



Tirandalydigin **254**

Figure 224 : Structure du tirandalygin **254**. Le motif réactif et la position d'addition de la sonde **253** sont mis en évidence (rouge).

Lors de l'isolement de molécules naturelles, en particulier pour les composés électrophiles, des artéfacts, c'est-à-dire des molécules qui sont détectées lors des analyses mais qui ne sont pas des métabolites de l'organisme étudié, peuvent être observés. L'apparition de molécules artéfacts peut être due à l'addition des solvants employés pour l'extraction sur le produit naturel[217], l'oxydation d'une fonction chimique[218] ou à des réactions dues aux composés présents dans le milieu de culture.[219]

De la même manière, la sonde **252** a permis à l'équipe du Prof. Hughes d'étudier la famille des ammosamides. Ces produits naturels possèdent un motif commun pyrrolo[4,3,2-*de*]quinoline et sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*. En particulier, l'ammosamide C **257** possède un caractère électrophile de par la présence d'un motif pyrroloquinolinium (Figure 225).[220]

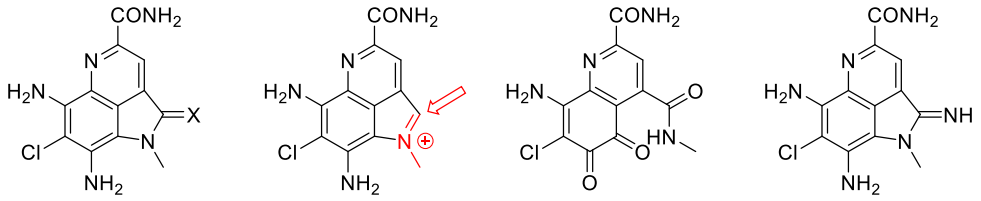
[216] Karwowski, J. P., Jackson, M., Theriault, R. J., Barlow, G. J., Coen, L., Hensey, D. M., Humphrey, P. E. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1125-1132.

[217] a) Pina, I. C., Sanders, M. L., Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 2-6. b) Marek, R., Seckarova, P., Hulova, D., Marek, J., Dostal, J., Sklenar, V. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 481-486.

[218] Fort, D. M., Litvak, J., Chen, J. L., Lu, Q., Phuan, P.-W., Cooper, R., Bierer, D. E. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1528-1530.

[219] Fu, P., Legako, A., La, S., MacMillan, J. B. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3491-3495.

[220] Reimer, D., Hughes, C. C. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 126-133.



255 : X = S, ammosamide A
256 : X = O, ammosamide B

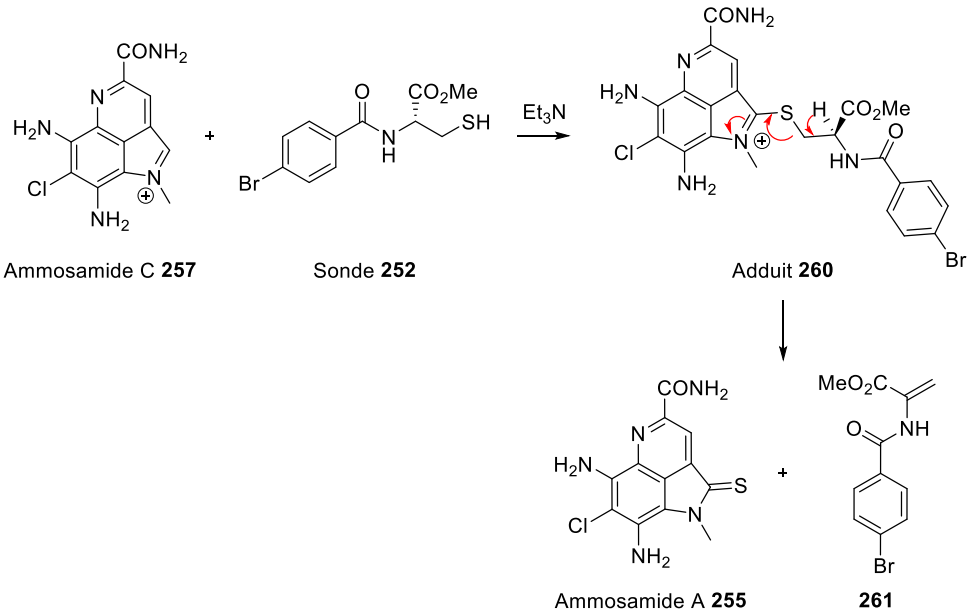
257 : ammosamide C

258 : ammosamide D

259 : ammosamide E

Figure 225 : Structures des ammosamides étudiés par l'équipe du Prof. Hughes. La fonction électrophile de l'ammosamide C **257** est mise en évidence (rouge).

Le traitement d'un extrait naturel issu d'une lignée *Streptomyces* CNR-698 par la sonde **252** montre la formation d'un unique adduit correspondant à l'addition du marqueur sur l'ammosamide C **257**. Ce produit d'addition **260** se décompose spontanément sous forme d'ammosamide A **255** suggérant que des processus non biologiques pourraient être à l'origine de la formation de certains ammosamides lors des procédés de purification (Figure 226).



Ammosamide C **257** | Sonde **252** | Adduit **260** | Ammosamide A **255** | **261**

Figure 226 : Formation artificielle de l'ammosamide A **255** à partir de l'adduit **261** formé entre l'ammosamide C **257** et la sonde à produits naturels **252**.

En traitant un échantillon pur d'ammosamide C **257** par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium, l'ammosamide B **256** peut être observé. De même, lorsque le composé naturel **257** est mis en présence de cystéine à pH = 10, les ammosamides B **256**, E **259** et A **255** sont identifiés. Enfin, l'exposition prolongée d'un échantillon d'ammosamide B **256** dans un solvant protique à la lumière solaire conduit à la formation de l'ammosamide D **258**. Ces observations tendent donc à prouver le caractère artificiel de ces ammosamides, même si étant donné les propriétés électrophiles du composé **38**, des processus enzymatiques pourraient également être impliqués.[220]

Les sondes **252** et **253** sont donc des objets chimiques très intéressants dans le cadre de la déréplication de produits naturels. De par leur structure elle permette de faciliter l'identification de produits naturels électrophiles en spectrométrie de masse grâce au motif isotopique unique apporté par l'atome de brome ou de chlore, mais également en absorption UV-visible grâce à la présence du noyau aromatique pouvant faciliter la détection d'adduits. Cependant, la sensibilité de ces sondes à l'oxydation, spécialement en milieu basique, contraint à l'utilisation d'une atmosphère inerte lors des réactions d'addition sur les extraits.

1.3 Conclusion sur les méthodes de découverte de produits naturels

Deux grandes approches sont utilisées actuellement pour découvrir de nouveaux produits naturels découlant des stratégies appliquées en protéomique. La richesse des micro-organismes dont les extraits sont utilisés en tant que source de produits naturels laisse supposer de nombreuses possibilités de découverte. Cependant la complexité de ces extraits rend inévitable l'isolement de nombreux produits naturels déjà connus, ces approches sont donc développées afin de rendre ce processus d'isolement plus efficace.

La connaissance des cibles biologiques permet une approche orientée vers la chimie médicinale, qui garantit l'obtention de composés actifs et potentiellement le développement de nouveaux médicaments. Cette approche basée sur l'activité biologique doit son essor aux progrès de la génétique (séquençage, manipulation de l'ADN, …). L'utilisation des propriétés chimiques spécifique des produits naturels s'est rapidement révélée comme nécessaire pour améliorer les rendements d'extraction et faciliter l'isolement de composés purs. Cette méthode basée sur la réactivité trouve en partie son origine dans l'observation des mécanismes d'action de ces molécules naturelles électrophiles sur leur cible biologique. Le marquage spécifique de certaines fonctions chimiques offre donc la possibilité d'augmenter la réponse des produits naturels correspondants de manière à vérifier, sans purification complexe, si l'échantillon comporte des molécules naturelles nouvelles.

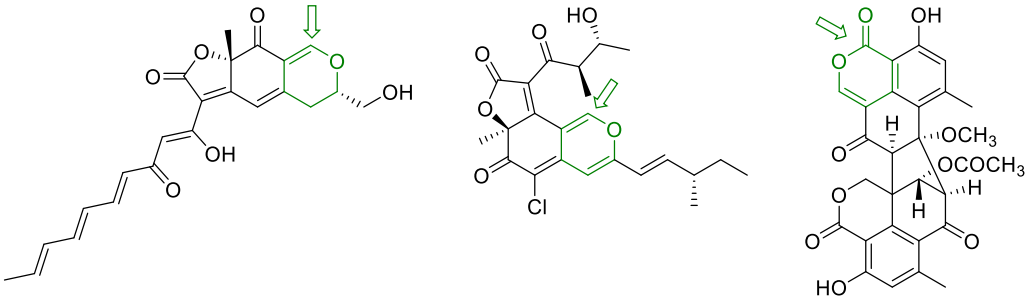
Cependant les méthodes développées jusqu'à présent nécessitent l'emploi d'additifs pour provoquer le marquage, même sur des composés *a priori* électrophiles (ajout d'une base faible par exemple) ce qui peut entraîner la formation de molécules artéfacts, c'est-à-dire ne résultant pas d'un processus biologique mais d'une transformation chimique liée au processus de purification. Ces contraintes, ajoutées à la modification covalente irréversible du produit naturel ciblé, maintiennent pour l'instant les sondes développées à l'échelle du test de détection sur un échantillon d'extrait naturel. Autrement dit, ces molécules sont utilisées sur une petite partie d'extrait afin de détecter des éventuelles molécules nouvelles, puis celles-ci sont isolées à partir de l'extrait natif pour détermination structurale complète.

Dans le cadre de du projet développé ci-après, il a été envisagé d'étudier plus en détails les composés azaphiles, dont la chimie est bien connue au sein du laboratoire, en utilisant une approche basée sur la réactivité.

2 Présentation du projet

L'objectif du projet est d'utiliser les concepts de l'approche basée sur la réactivité pour concevoir une sonde capable de cibler les molécules naturelles azaphiles dans des extraits biologiques, en utilisant particulièrement des extraits connus pour être riches en azaphilones, dont la synthèse est une des spécialités du laboratoire. Le but initial est d'identifier de nouvelles azaphilones naturelles, potentiellement fluorescentes, dont la synthèse pourrait par la suite être entreprise au sein du laboratoire. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Prof. Soizic Prado du Muséum National d'Histoire Naturelle (UMR 7205) qui s'est notamment spécialisée dans l'isolement de nouveaux produits naturels[221] et possède une grande variété d'extraits naturels de *fungi* connus pour produire des composés azaphiles tels que les azaphilones ou les dérivés de la duclauxine (Figure 227).

[221] a) Roullier, C., Guitton, Y., Valery, M., Amand, S., Prado, S., Robiou du Pont, T., Grovel, O., Pouchus, Y. F. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 9143-9150. b) Zang, Y., Genta-Jouve, G., Retailleau, P., Escargueil, A., Mann, S., Nay, B., Prado, S. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2691-2697.



Epicocconone **56** Chaetoviridine A **57** Duclauxine **262**

Figure 227 : Exemples de molécules naturelles azaphiles. Les fonctions potentiellement réactives sont mises en évidence en vert.

La sélection des molécules azaphiles dans un extrait biologique peut se faire grâce à une sonde, dite préparative, comportant une partie réactive amine primaire reliée à un motif biotine permettant l'enrichissement en molécules naturelles marquées grâce à l'interaction forte biotine-streptavidine. Le lien entre la partie réactive et la partie biotine a été envisagé ici par un lien clivable, permettant de faciliter l'identification des composés naturels marqués. Cette stratégie cherche à utiliser les avantages d'une résine d'affinité pouvant enrichir l'extrait naturel en molécules cible grâce à la biotine, tout en conservant les propriétés d'une molécule organique de petite taille pour faciliter les analyses post-marquage.

La sonde réagirait ainsi préférentiellement avec les molécules azaphiles de l'extrait, puis le mélange serait ensuite enrichi en composés marqués par chromatographie sur colonne de streptavidine. La partie biotine peut par la suite être éliminée par clivage du lien biotine-amine primaire, permettant de diminuer la masse de l'adduit et de faciliter la purification et la détermination structurale des composés marqués. La figure ci-après récapitule ce principe sur l'exemple des azaphilones (Figure 228).

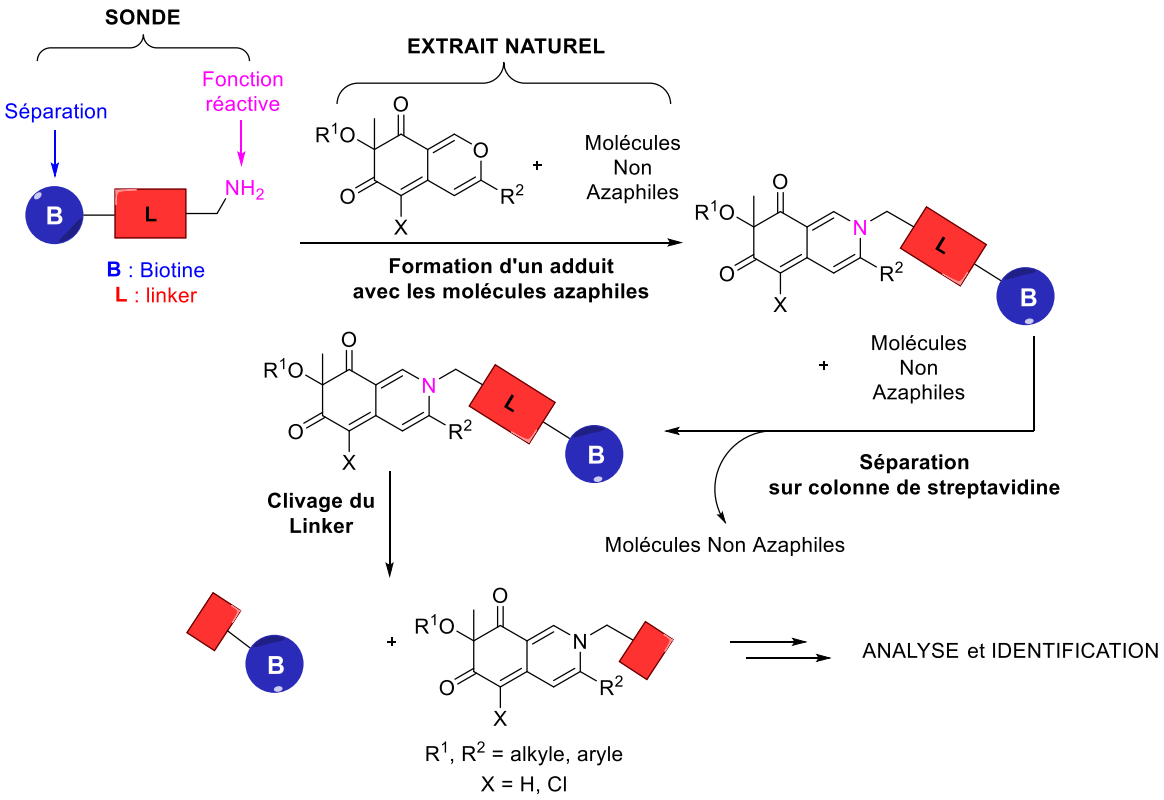


Figure 228 : Principe de marquage des azaphilones naturelles présentes dans un extrait par une sonde biotine-amine possédant un lien clivable.

L'approche envisagée ici, à la différence de la plupart des exemples développés précédemment repose sur la formation spontanée d'adduits entre les produits naturels azaphiles et la sonde. De ce fait, les produits naturels ciblés principalement sont les molécules de la famille des azaphilones, connus pour réagir de cette manière et d'autres composés naturels possédant le même type de réactivité.

Les conditions imposées sur la structure de la sonde sont les suivantes :

- La sonde doit être relativement soluble dans les solvants organiques usuellement utilisés pour l'extraction des produits naturels. Etant donnée l'utilisation d'un motif biotine relativement polaire, la solubilité dans les solvants d'extraction polaires usuels (acétonitrile, méthanol, éthanol, dichlorométhane, acétate d'éthyle, …) sera le minimum exigible.
- Le poids moléculaire du fragment faisant le lien entre la partie réactive amine primaire et le lien clivable doit être le plus faible possible. De cette manière, un marquage n'entraînera qu'une faible augmentation du poids moléculaire de l'adduit sonde clivée-produit naturel observé en spectrométrie de masse.
- Les conditions dans lesquelles sera réalisé le clivage de la partie biotine doivent être suffisamment douces pour ne pas dégrader les produits naturels marqués.

Le choix du lien clivable est le point primordial autour duquel la synthèse de la sonde doit s'articuler. La bibliographie développée en introduction montre que trois stratégies ont déjà été étudiées dans l'approche basée sur la réactivité : le clivage d'une liaison peptidique en conditions enzymatiques,[198] le clivage en présence de fluorures d'un groupement silylé[200,201,202] et le clivage en milieu acide à chaud d'une oxime.[213]

Dans le cas présent, l'utilisation d'un groupe siloxane pouvant être clivé en milieu acide a été envisagée. Ce type de motif a déjà été utilisé par le groupe du Prof. Tirrell pour la conception d'une sonde biotine-azoture **263** capable de réagir par CuAAC sur des protéines modifiées possédant une fonction alcyne terminal. Cette sonde peut être rapidement clivée (30 min) par des solutions aqueuses d'acide formique (5 à 10% soit pH ≈ 2) à température ambiante,[222] ce qui rend ce type de groupement silylé compatible avec un marquage transitoire de produits naturels.

La molécule **263** se compose de trois parties ayant chacune un rôle bien spécifique à jouer. Une fonction réactive azoture est utilisée pour la formation du lien covalent entre les protéines cibles et la sonde. Une fois ce lien formé, la présence d'un motif biotine autorise un enrichissement du milieu biologique étudié en protéines marquées par l'utilisation d'une chromatographie sur colonne de streptavidine. Finalement, le clivage en milieu acide du motif siloxane permet de faciliter l'isolement et l'identification des protéines marquées (Figure 229).

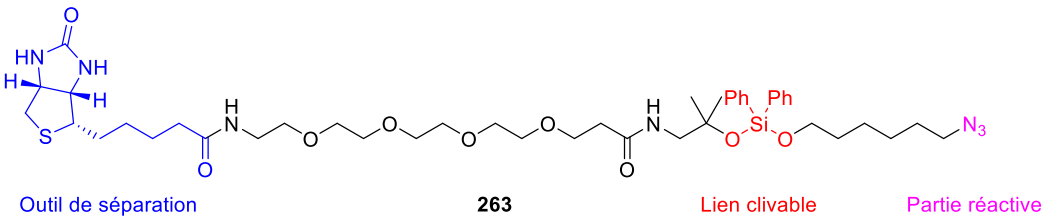


Figure 229 : Structure de la sonde acido-clivable développée par le groupe du Prof. Tirrell.

Une architecture comparable pour la sonde visant les composés naturels azaphiles a donc été retenue pour la suite du projet.

Dans le même temps, la conception d'une sonde analytique permettant une détection facile des composés naturels azaphiles en spectrométrie de masse a été envisagée. Cette molécule viendrait en complément de la sonde préparative pour permettre la déréplication des produits naturels dans les extraits étudiés, avant isolement des composés nouveaux pour identification grâce à la deuxième sonde.

[222] Szychowski, J., Mahdavi, A., Hodas, J. J. L., Bagert, J. D., Ngo, J. T., Landgraf, P., Dieterich, D. C., Schuman, E. M., Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351-18360.

3 Marquage d'un extrait naturel par une sonde analytique

Afin de vérifier la faisabilité du marquage d'azaphilones par une fonction réactive amine primaire, une sonde modèle ne possédant pas de motif biotine ou de lien clivable a été conçue. Cette molécule devant néanmoins être utilisée pour des tests de marquage dans un extrait naturel, elle est donc soumise aux contraintes liées à la quantité de produits naturels azaphiles présente dans l'extrait. Afin de permettre une déréplication rapide des produits naturels, il a été envisagé l'utilisation d'un composé **264** qui porte un motif triphénylphosphonium possédant une charge fixe permettant une amplification du signal observé par spectrométrie de masse.[223] Un des trois groupements phényles étant de plus porteur d'un atome de brome, les composés marqués par une telle sonde sont donc caractérisés par une signature unique et facilement détectable en spectrométrie de masse (Figure 230).

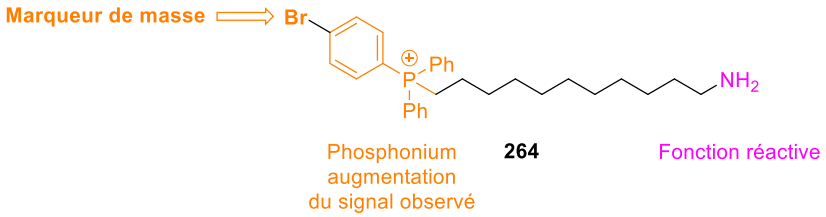


Figure 230 : Structure de la sonde modèle **264**.

3.1 Synthèse de la sonde 264

La synthèse de la sonde **264** se déroule en cinq étapes. L'échange brome-lithium sur le dibromobenzène **265** génère l'anion lithié correspondant, dont l'addition nucléophile sur la diphénylchlorophosphine conduit à la phosphine **266** avec 48% de rendement. La chaîne carbonée portant l'amine primaire est préparée à partir du 1,10-dibromodécane **267** dont l'un des bromes est substitué par le sel de phtalimide **268**, ce qui permet d'obtenir le dérivé phtalimide **269** avec un rendement de 90%. L'addition nucléophile de la phosphine **266** sur le bromure d'alkyle **269** permet de former le sel de phosphonium **270** avec un rendement de 98%. Finalement après la déprotection du groupement phtalimide par l'hydrazine, la sonde **264** est obtenue avec 66% de rendement (Figure 231).

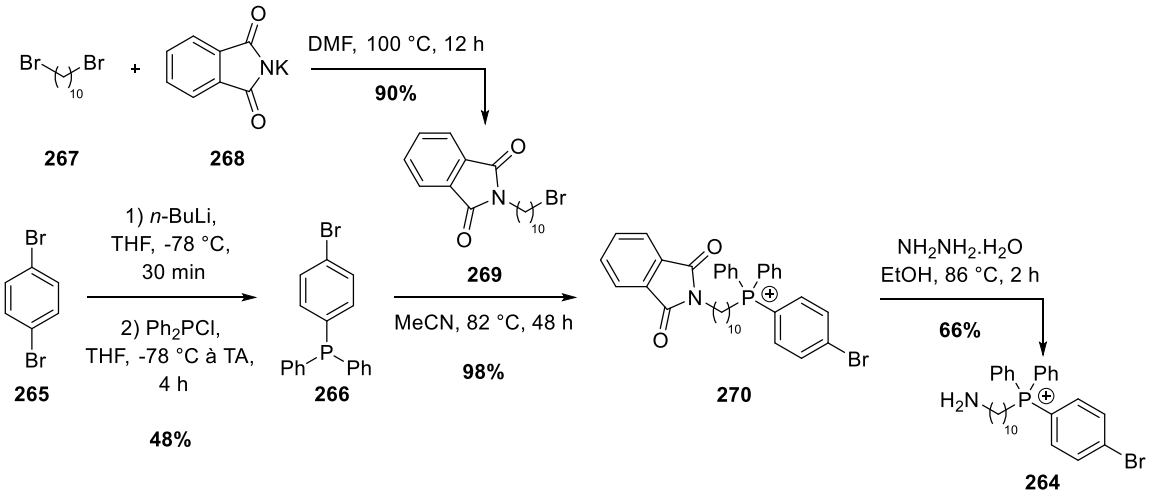


Figure 231 : Voie de synthèse de la sonde **264**.

[223] Lizzul-Jurse, A., Bailly, L., Hubert-Roux, M., Afonso, C., Renard, P.-Y., Sabot, C. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 7777-7791.

Il est à noter ici que la chaîne carbonée liant le groupement phosphonium à l'amine primaire est relativement longue (10 atomes de carbones). Cette longueur importante sert à contrebalancer le caractère hydrophile des fonctions phosphonium et amine afin de conserver une solubilité acceptable dans des solvants organiques usuels (acétate d'éthyle, dichlorométhane, acétonitrile).

Une fois la sonde **264** en main, la réaction d'addition de cette molécule sur des composés azaphiles a pu être étudiée. Ces essais ont été d'abord envisagée sur un composé modèle : l'analogue naphtyle de l'epicocconone **60**.

3.2 Addition de la sonde 264 sur une molécule azaphile modèle

Dans un premier temps la sonde **264** a été testée sur une molécule connue pour être azaphile et disponible en quantité suffisante au laboratoire : l'analogue napthyle **60**. L'avantage d'utiliser un dérivé de l'epicocconone en tant que molécule modèle est la formation spontanée d'un adduit fluorescent facilement observable à l'œil nu. Des quantités équimolaires de sonde **264** et d'analogue natif **60 N** ont donc été mélangées dans le chloroforme deutéré et en moins de quinze minutes la couleur caractéristique de la formation de l'énaminone correspondante **60 E^{264}** (Figure 232). Cette notation caractérise que l'adduit énaminone (**E**) est ici formé entre l'analogue **60** natif (**N**) et la sonde **264**, et sera réutilisée dans la suite de cette partie.

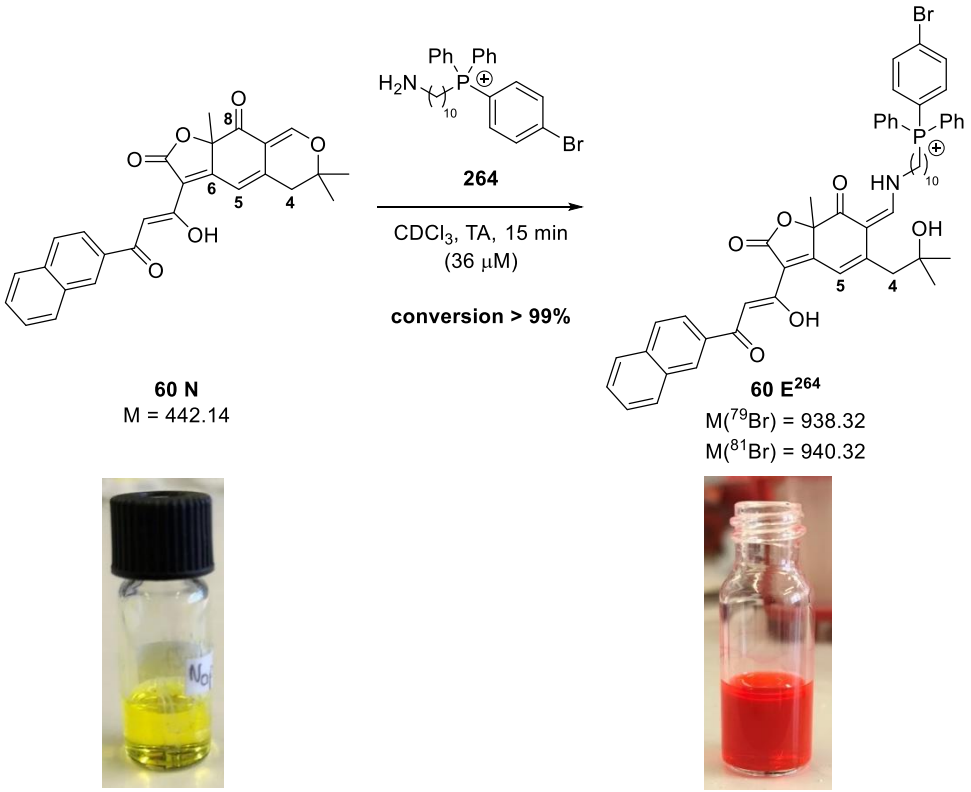


Figure 232 : Réaction d'addition de la sonde **264** sur l'analogue naphtyle **60** (M : masse exacte calculée). Les photos montrent le changement de couleur observé entre l'analogue **60** seul (photo de gauche, forme native **60 N**) et l'analogue **60** mis en présence de la sonde **264** (photo de droite, forme énaminone **60 E^{45}**).

La formation de l'adduit **60 E^{264}** a pu être confirmée par RMN ^{1}H. En particulier, les protons portés par les carbones en position 4 et 5 de l'analogue ont des aspects très différents suivant la forme (**60 N** ou **60 E^{264}**) considérée (Figure 233) et permettent de déterminer rapidement la conversion de la réaction présentée ci-dessus (Figure 232).

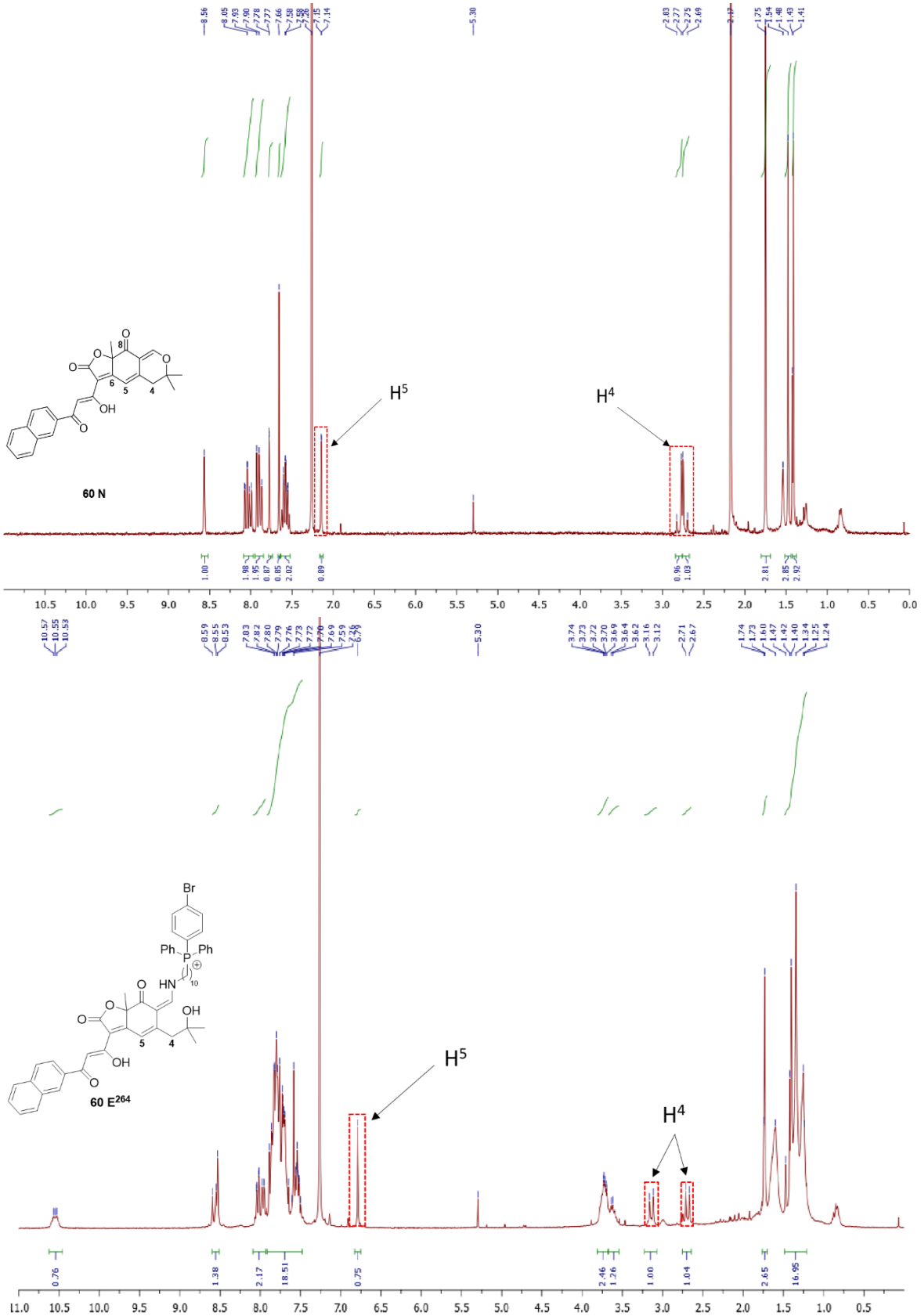


Figure 233 : Spectres RMN ^{1}H de l'analogue **60** sous forme native (**60 N**) et sous forme énaminone (**60 E^{264}**) formée en présence de la sonde **264**.

Le brut réactionnel a également été analysé en spectrométrie de masse afin de vérifier la présence d'un signal caractéristique dû au motif triphénylphosphonium bromé de la sonde **264**. Ceci est confirmé

par la présence des pics correspondants à l'adduit **60 E** d'une masse de 938 et 940 Da. Un pic minoritaire à 860 Da correspondant à la perte de l'atome de brome est également observé (Figure 234).

Il est à noter cependant que la réaction de formation de l'adduit **60 E** est beaucoup plus lente lorsque celle-ci est réalisée dans l'acétate d'éthyle pur puisque la sonde **264** y est peu soluble. L'ajout de dichlorométhane (jusqu'à 40%), dans lequel le composé **264** est beaucoup plus soluble, permet à la réaction d'atteindre 70% de conversion (mesurée en RMN ^{1}H). Le fait que la réaction ne soit pas complète n'est ici pas un inconvénient puisqu'il est possible de repérer sur le même spectre le produit naturel natif et l'adduit sonde-produit naturel, ce qui facilite l'interprétation des données.[213]

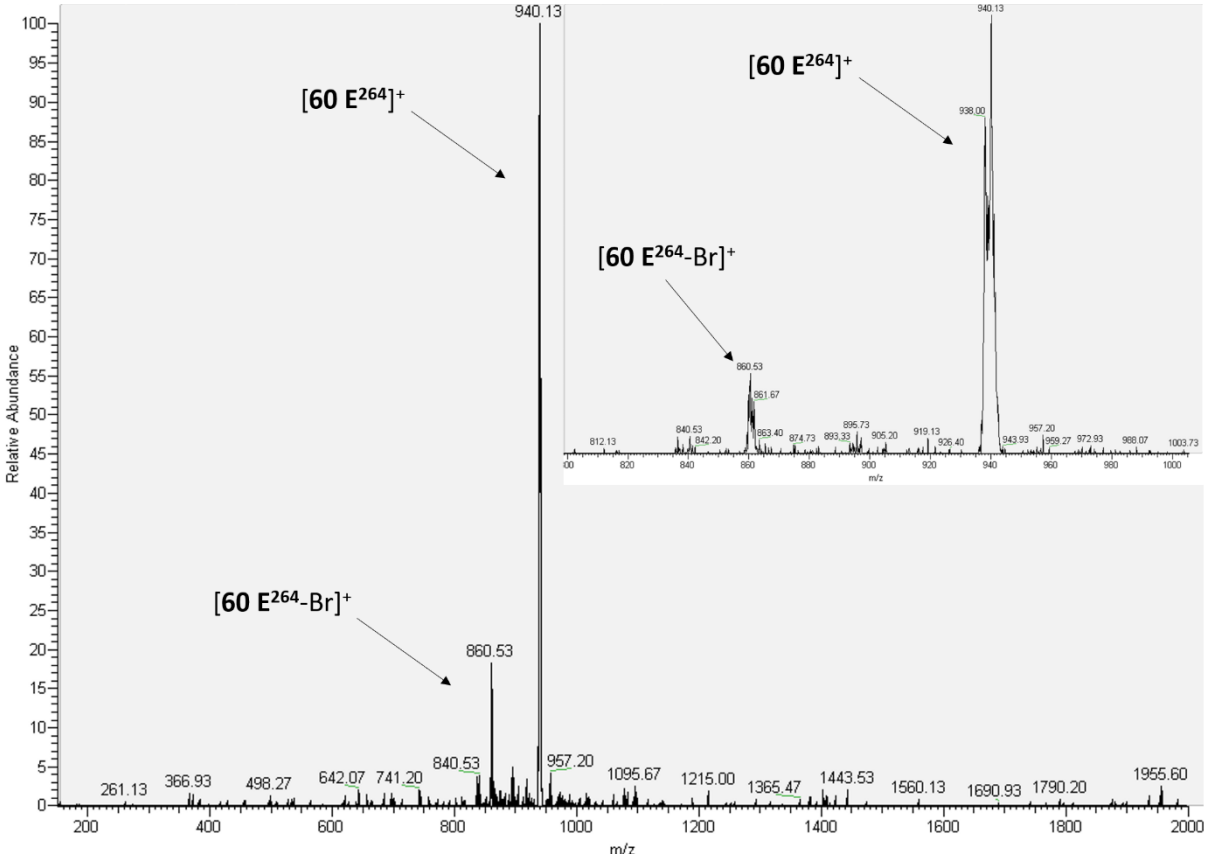
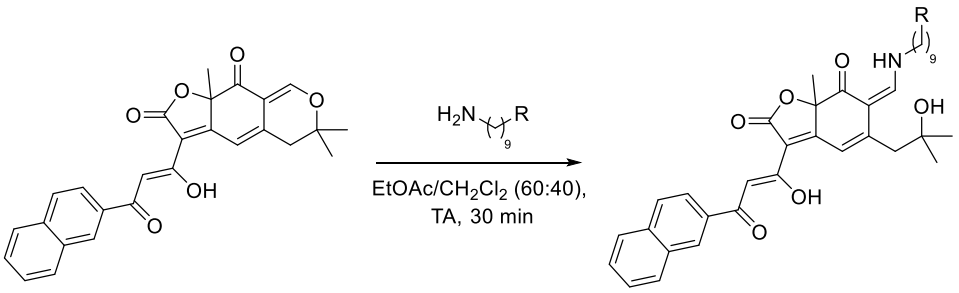


Figure 234 : Spectre de masse (ESI^{+}) de l'adduit **60 E^{264}** formé entre la sonde **264** et l'analogue naphtyle **60** réalisée dans le chloroforme deutéré. L'encart sur le spectre est un zoom afin de visualiser les pics relatifs aux deux isotopes du brome présent sur la sonde **264**.

L'amplification du signal observé en spectrométrie de masse due à la présence de la charge permanente apportée par le groupement phosphonium a également été estimée. Pour cela, l'adduit **60 E^{264}** a été comparé à l'adduit **60 E^{271}** obtenu par réaction entre l'analogue **60** et la décylamine **271**. Les réactions de formation des énaminones ont été réalisées dans le mélange acétate d'éthyle/dichlorométhane (Figure 235) et des quantités identiques de ces deux adduits ont été prélevées, rassemblées dans un même échantillon puis le mélange obtenu a été analysé par spectrométrie de masse révélant que le signal est multiplié par un facteur 20 en présence du groupement phosphonium de la sonde **264** (Figure 236).



60 N
M = 442.14

60 E^{264} : R = $Ph_3P^+CH_2$,
M(^{79}Br) = 938.32
M(^{81}Br) = 940.32
60 E^{271} : R = CH_3, M = 599.32

Figure 235 : Réaction de formation des énaminones **60 E^{264}** et **60 E^{271}** en présence respectivement de la sonde **264** et de décylamine **271**. Les valeurs des masses exactes M des différents composés sont indiquées.

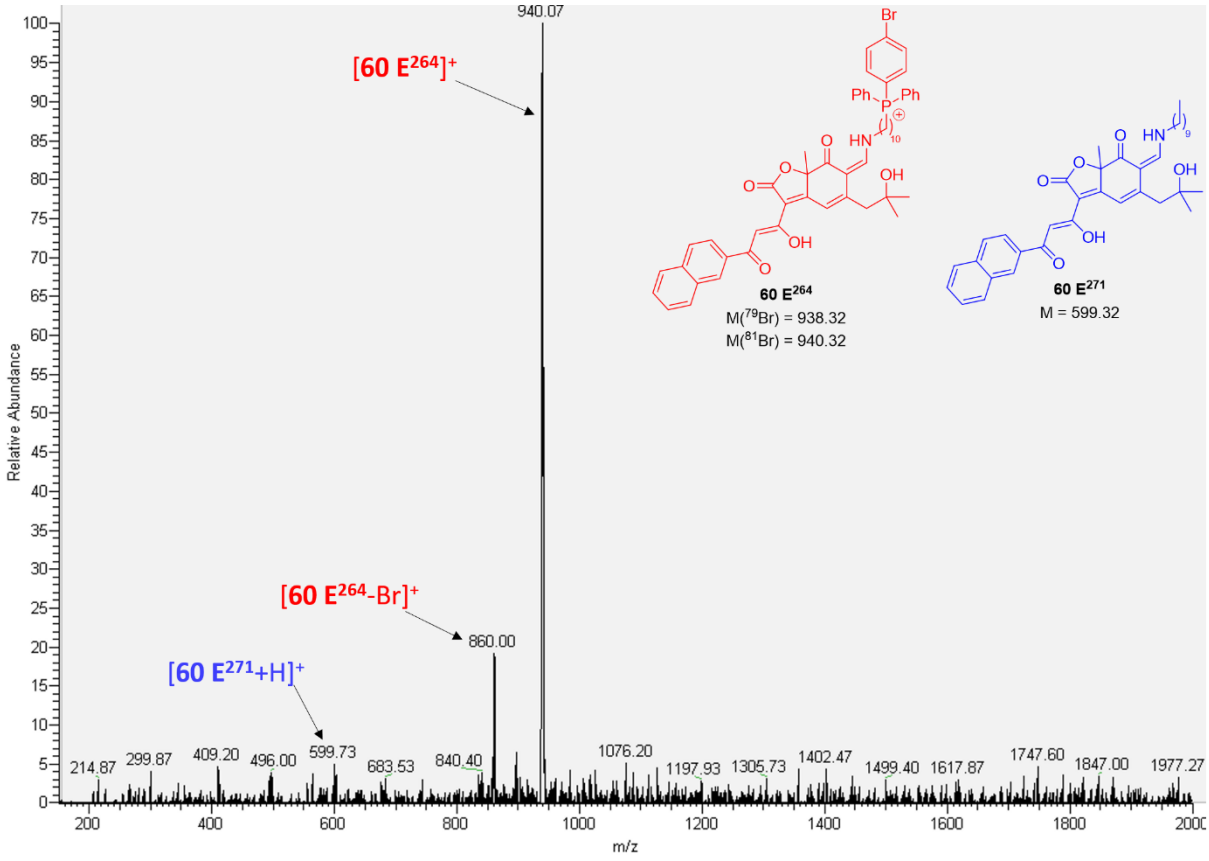


Figure 236 : Spectre de masse (ESI$^+$) du mélange équimolaire des deux énaminones **60 E^{264}** et **60 E^{271}**.

Ces résultats montrent que la sonde **264** est capable de marquer efficacement l'analogue **60** et que l'adduit **60 E^{264}** peut être détecté sans ambiguïté par spectrométrie de masse. L'étape suivante consiste donc à tester la capacité de la sonde **264** à marquer des molécules azaphiles dans le mélange complexe d'un extrait naturel.

3.3 Utilisation de la sonde 264 pour le marquage d'un extrait naturel

Afin de tester la sonde **264** sur un extrait naturel, l'équipe du Prof. Soizic Prado a réalisé la culture d'une souche de *Talaromyces convolutus*, un champignon connu pour produire des azaphilones de la famille de la mitorubrine (Figure 237).[224]

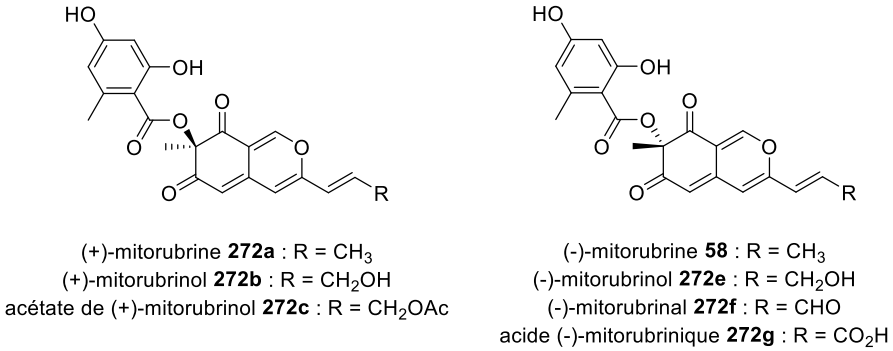


Figure 237 : Structures des azaphilones de la famille de la mitorubrine identifiées chez *T. convolotus*.

L'analyse de l'extrait méthanolique de *T. convolutus* par spectrométrie de masse a permis d'identifier la présence de trois azaphilones au sein de cet extrait : la (+) ou (-)-mitorubrine **272a** ou **58**, le (+) ou (-) mitorubrinol **272b** ou **272e** et l'acide (-)-mitorubrinique **272g** (Figure 238).

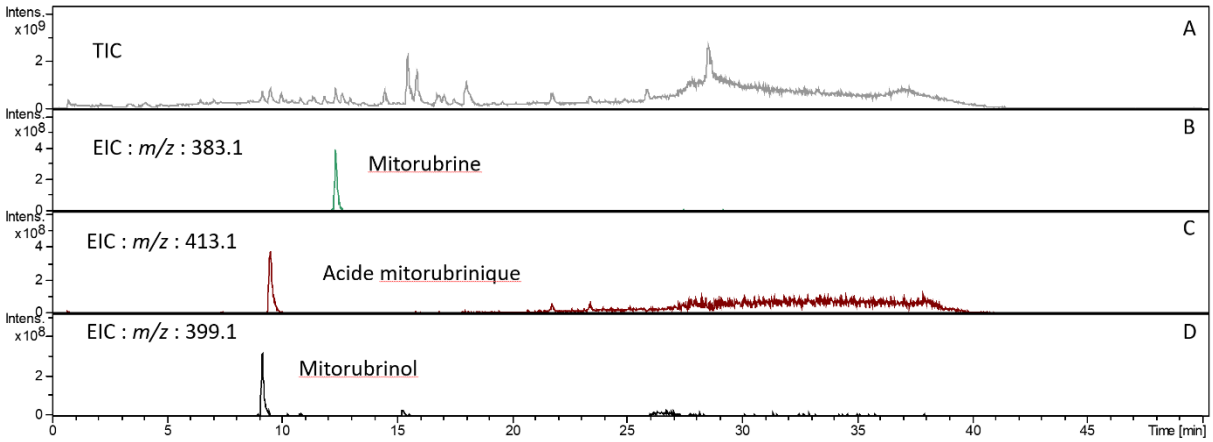
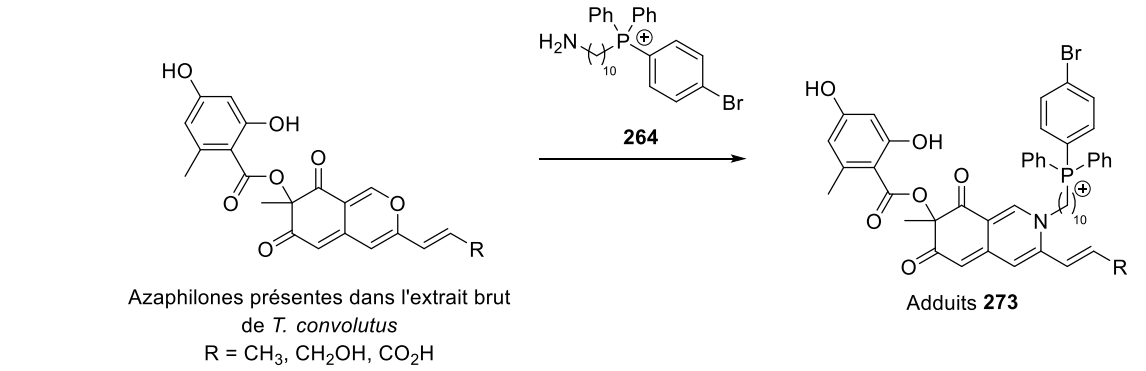


Figure 238 : Chromatogramme TIC de l'extrait brut de *T. convolutus* avant ajout de la sonde **264** (A). Les chromatogrammes EIC correspondants aux trois azaphilones identifiées sont également donnés (B, C et D).

Un échantillon de cet extrait a ensuite été traité par un excès de la sonde **264** (solubilisée dans le dichlorométhane à une concentration de 2 mg/mL) puis de nouveau analysé en masse, révélant la formation des pyridoquinones correspondantes à ces trois azaphilones (Figure 239).

[224] Suzuki, S., Hosoe, T., Nozawa, K., Yaguchi, T., Udagawa, S.-i., Kawai, K.-i. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1328-1329.



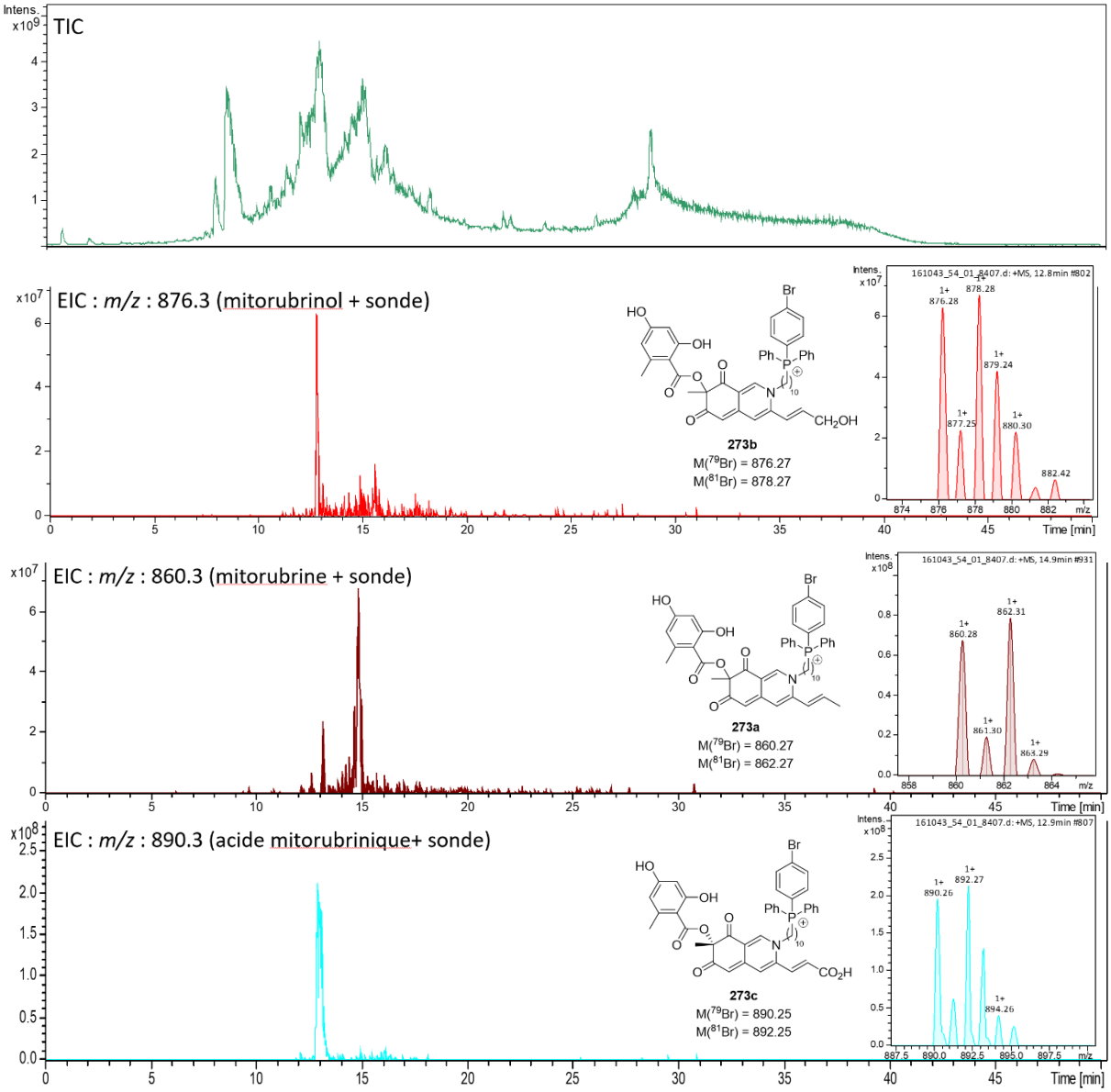


Figure 239 : Marquage de la mitorubrine, du mitorubrinol et de l'acide mitorubrinique, présents dans l'extrait méthanolique brut de *T. convolutus*, par la sonde **264** (M : valeurs des masses exactes calculées). Le chromatogramme TIC ainsi que les chromatogrammes EIC des trois azaphilones sont également donnés.

L'analyse HRMS des extraits traités par la sonde **264** montre qu'il est possible de marquer des azaphilones naturelles et de détecter les adduits correspondants. Ces résultats positifs permettent donc de confirmer que la sonde **264** est capable de réagir avec des composés azaphiles au sein d'un mélange complexe comme un extrait naturel.

La molécule **264** présente tous les prérequis pour être utilisée en tant que sonde anamytique à produits naturels azaphiles dans le cadre de l'approche basée sur la réactivité. Elle pourrait de plus permettre d'identifier de nouveaux composés naturels azaphiles présents en quantité inférieures à la limite de détection des appareils d'analyse grâce à l'amplification de la réponse en spectrométrie de masse des composés marqués. Malgré la présence de groupements hydrophiles (amine primaire et triphénylphosphonium), cette molécule est soluble dans les solvants organiques polaires (dichlorométhane, chloroforme, méthanol, …) ce qui laisse supposer la possibilité de concevoir des sondes à produits naturels azaphiles portant un motif biotine, lui aussi polaire.

4 Synthèses de sondes préparatives comportant un groupement biotine clivable

La voie de synthèse proposée pour la préparation d'une sonde à produits naturels azaphile portant un motif biotine clivable s'inspire des travaux du Prof. Tirrell présentés en introduction (voir Figure 229).[222] La sonde **263**, outre le motif biotine et la fonction réactive azoture, comporte également une chaîne polyéthylène glycol apportant une solubilité en milieu aqueux nécessaire pour le marquage de protéine mais néfaste pour l'étude des extraits naturels envisagé ici. De ce fait, la préparation sonde **274** possédant un groupement clivable siloxane a été envisagée (Figure 240).

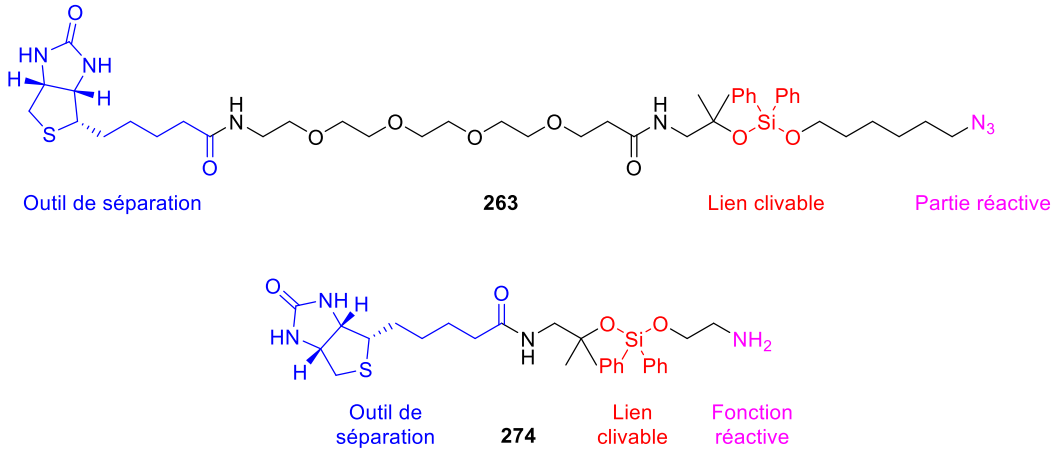


Figure 240 : Structure de la sonde **263** synthétisée par l'équipe du Prof. Tirell et de la molécule **274** envisagée.

4.1 Utilisation d'un motif siloxane en tant que lien clivable – sondes de première génération

La synthèse de la sonde **274** débute par l'activation de l'acide carboxylique de la biotine sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide (NHS) **276** en présence de DCC avec un rendement de 90%. Le couplage de l'amine **277** avec l'ester activé **276** permet d'obtenir l'amide **278** avec 79% de rendement. Finalement, l'amide **278** est traité par un excès de dichlorodiphényle silane pour former le chlorosilane intermédiaire **279** qui est à son tour piégé par l'éthanolamine en présence de triéthylamine pour former le composé **274** avec un rendement de 48% sur deux étapes (Figure 241).

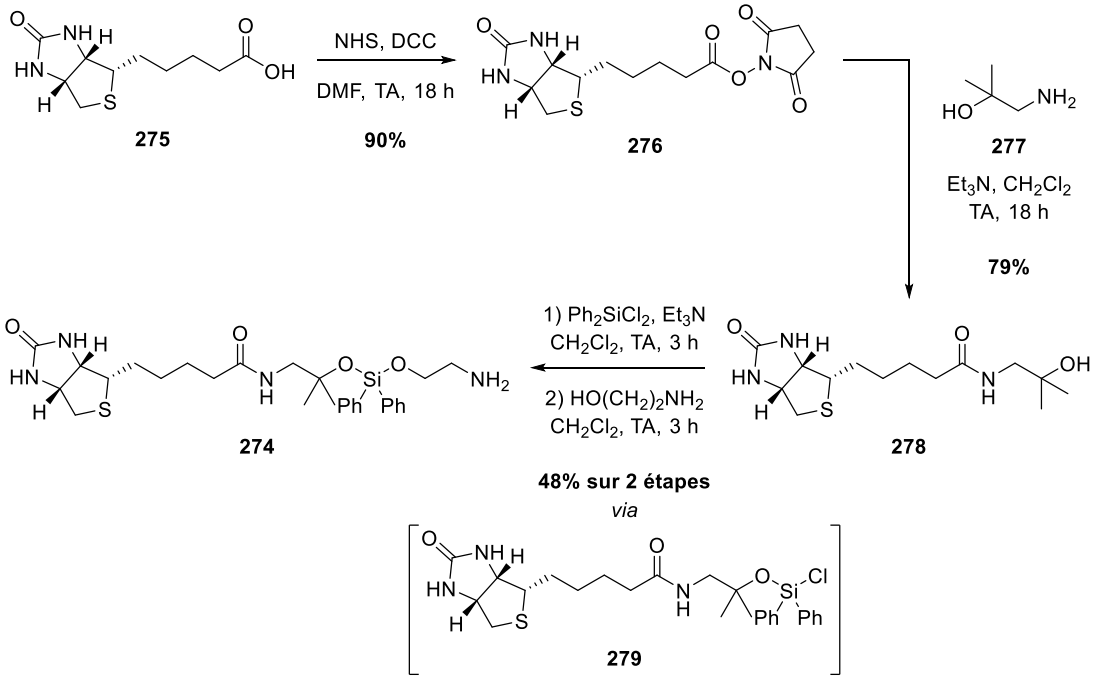


Figure 241 : Voie de synthèse de la sonde **274**.

Malheureusement, la molécule **274** se dégrade spontanément et très rapidement après isolement en un produit, d'une masse de 496 Da, supposé être le silanol correspondant **280** ou le siloxane **280'** et résultant de la perte du fragment éthanolamine (Figure 243 et Figure 243).

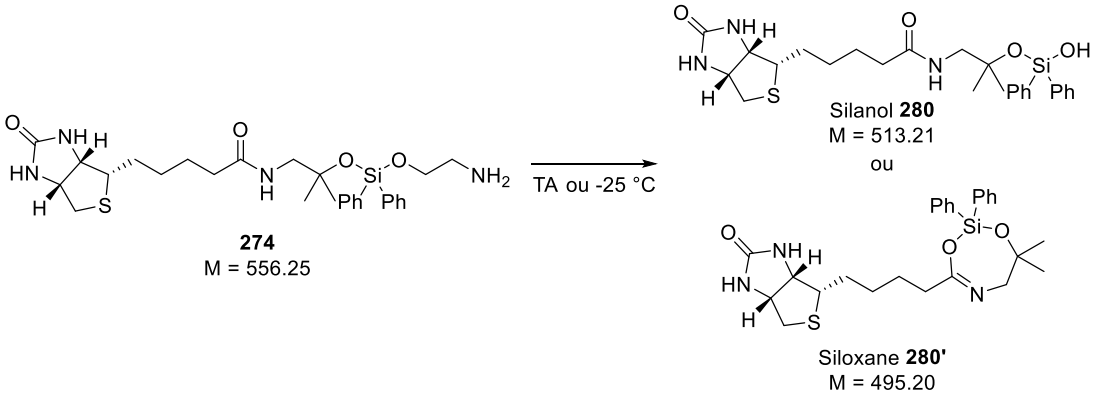


Figure 242 : Produits probables de dégradation de la sonde **274**.

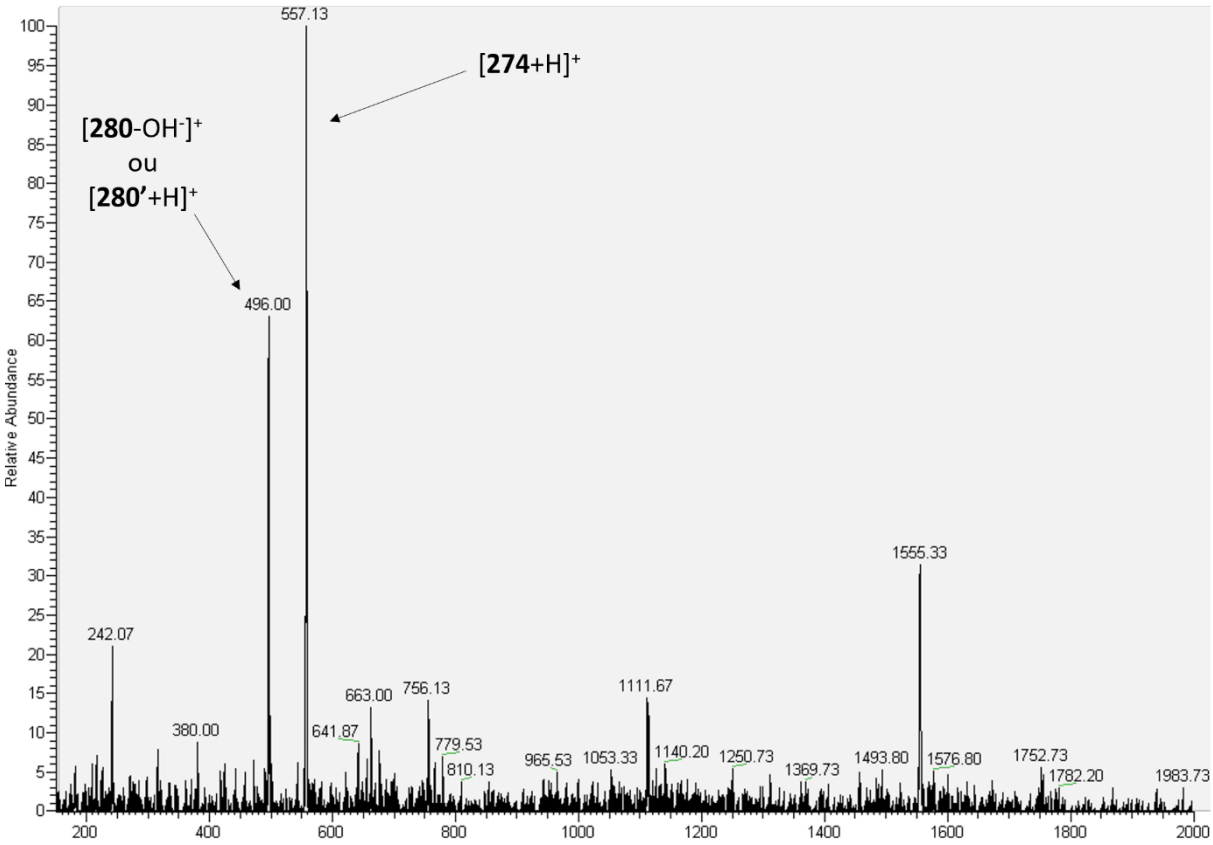


Figure 243 : Spectre de masse (ESI$^+$) d'un échantillon de sonde **274** ayant vieilli pendant 24 h.

Un échantillon de sonde **274** fraîchement isolé a néanmoins pu être mis en réaction avec l'analogue naphtyle **60** afin de vérifier si la formation de l'énaminone **60 E^{274}** correspondante avait lieu (Figure 244). Un signal compatible avec l'adduit **60 E^{274}** est identifié en spectrométrie de masse malgré l'instabilité de la sonde **274** (Figure 245).

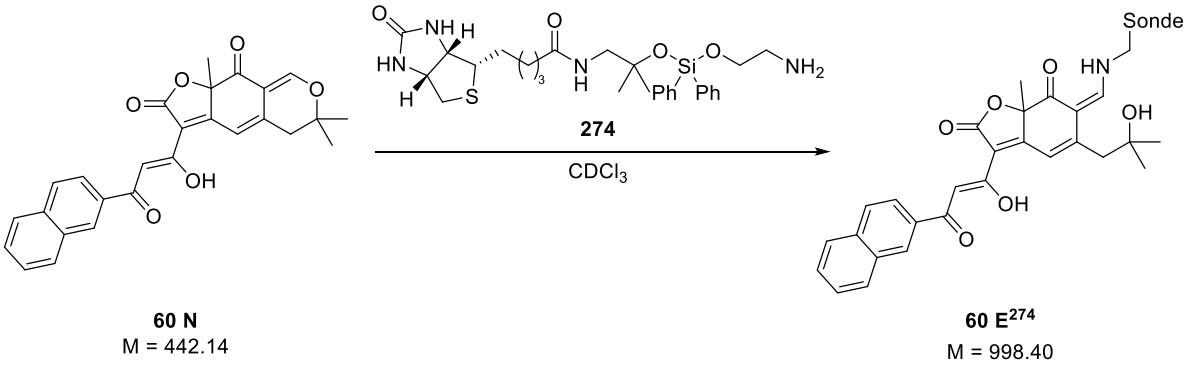


Figure 244 : Réaction d'addition entre la sonde **274** et l'analogue naphtyle **60**.

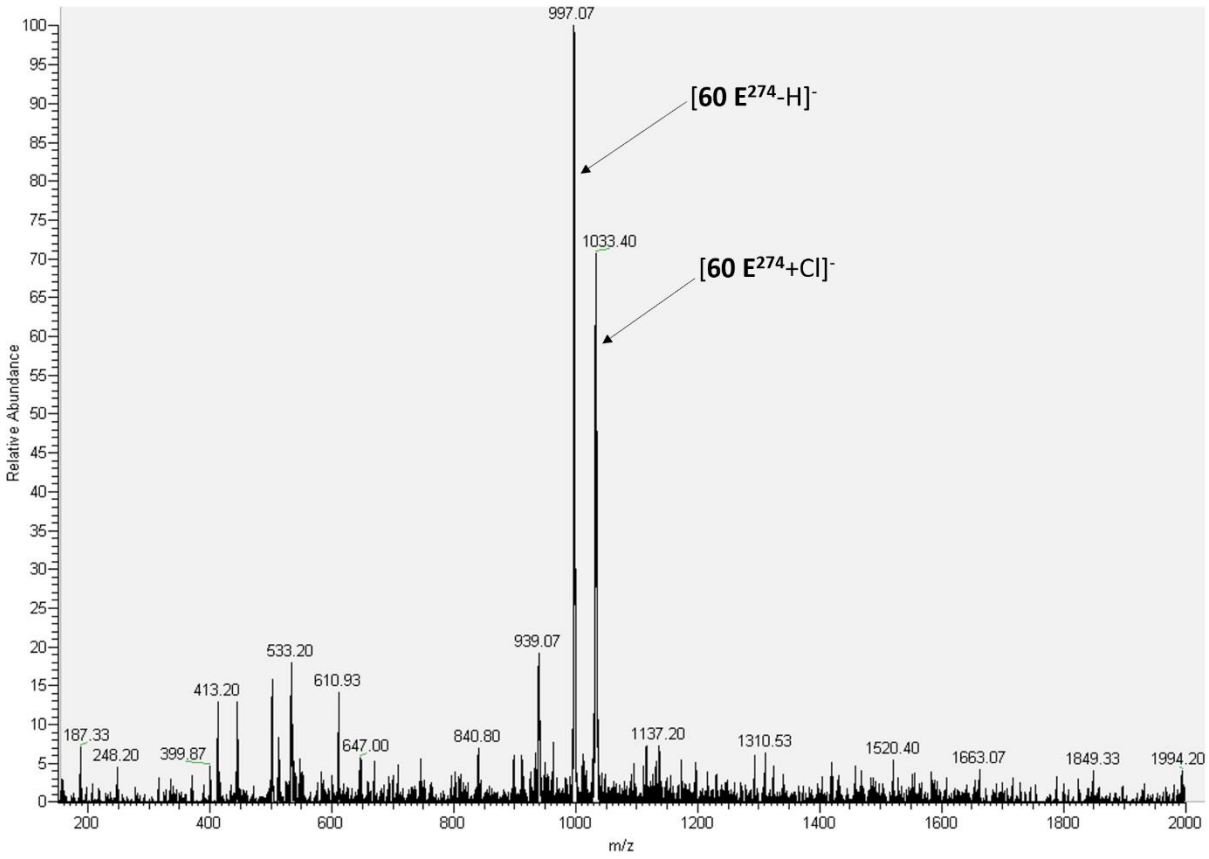


Figure 245 : Spectre de masse (ESI-) du brut réactionnel de la formation du composé **60 E^{274}**.

Les principales différences entre la sonde **274** et son modèle qui est le composé **263** sont la longueur de la chaîne séparant la fonction réactive du lien clivable (6 carbones pour la molécule **263** contre 2 pour la molécule **274**), la nature de cette fonction réactive (une fonction azoture pour le composé **263** et une amine primaire pour le composé **274**) et la présence de la chaîne PEG (PolyEthylène Glycol) sur la sonde **263** (Figure 246).

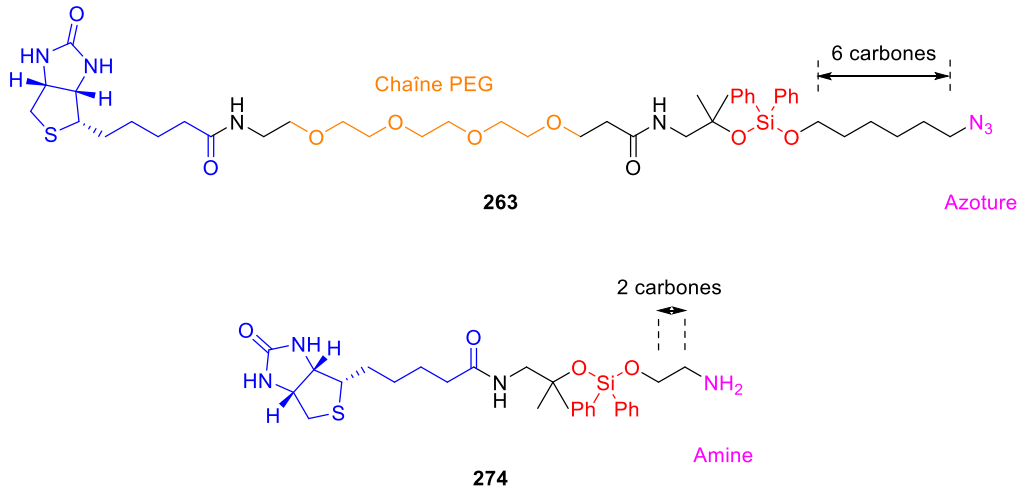


Figure 246 : Principales différences structurales entre les sondes **263** et **274**.

Afin de comprendre si ces différences structurales sont à l'origine des problèmes de stabilité observés, l'utilisation d'un amino-alcool possédant une chaîne carbonée plus longue a été envisagée. Pour cela, le 4-aminobutan-1-ol a été utilisé à la place de l'éthanolamine pour le piégeage du

chlorosilane **279**. Cependant, après une réaction beaucoup plus complexe qu'avec l'éthanolamine, le produit désiré **281** n'est pas détecté et le produit majoritairement isolé est le silanol **280** (Figure 247).

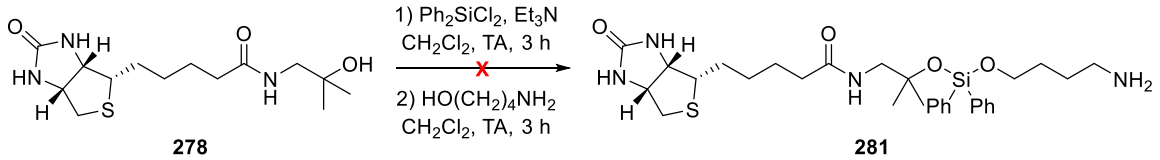


Figure 247 : Essai de formation de la sonde **281**.

L'utilisation de l'amine **277** dans la synthèse des sondes **263** et **274** est justifié par la stabilité à l'hydrolyse acide qu'apporte la substitution du carbone en α du siloxane.[225] Afin d'empêcher un clivage prématuré du lien, notamment sur la partie comportant la fonction amine, l'amine **277** a été utilisée pour tenter de piéger le chlorosilane **279** et permettre la formation d'une sonde **282** plus résistante au clivage. Aucune formation du produit désiré **282** n'est observé dans ce cas non plus (Figure 248).

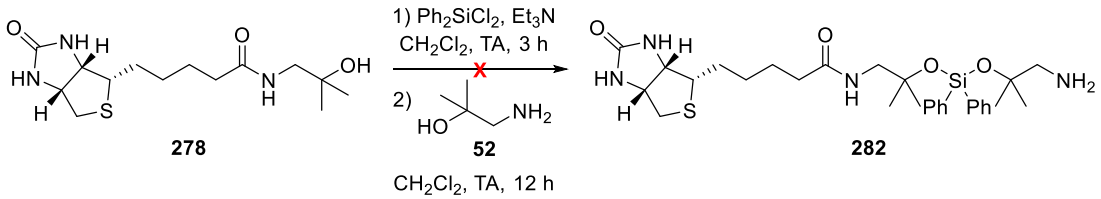


Figure 248 : Essai de formation de la sonde **282**.

Ces échecs associés au manque de stabilité de la sonde **274** ont conduit à l'abandon de la stratégie initiale utilisant le siloxane en tant que lien clivable. L'utilisation d'un groupement, *a priori* plus robuste comportant un éther silylé a alors été envisagée, de manière à conserver des conditions de clivages acides proches de celles décrites pour les siloxanes (5 à 10% d'acide formique aqueux).

4.2 Utilisation d'un éther silylé en tant que lien clivable – sondes de deuxième génération

La formation du lien clivable éther silylé sur la chaîne latérale de la biotine utilisée s'inspire de la synthèse de la sonde **274** dans la mesure où un chlorosilane intermédiaire **279** est toujours piégé par un aminoalcool comme l'éthanolamine. Ce chlorosilane peut être préparé par une réaction d'hydrosilylation de l'alcène terminal **285**, aboutissant à la rétrosynthèse de la sonde **283** présentée ci-dessous (Figure 249).

[225] Gillard, J. W., Fortin, R., Morton, H. E., Yoakim, C., Quesnelle, C. A., Daignault, S., Guindon, Y. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2602-2608.

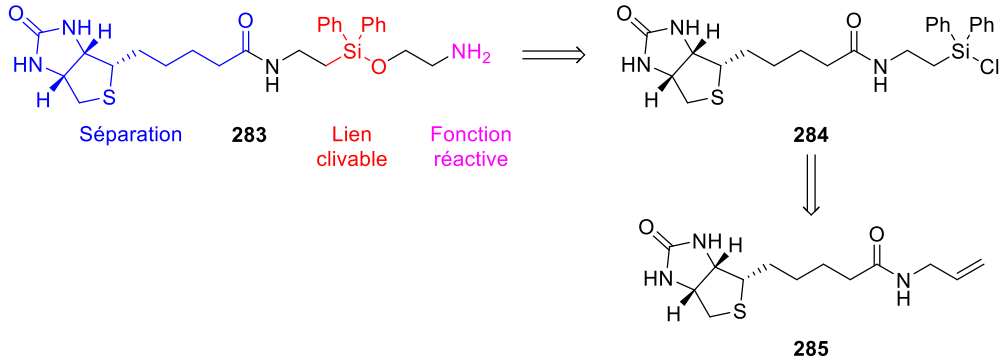


Figure 249 : Rétrosynthèse utilisant une étape clé d'hydrosilylation envisagée pour la préparation d'une sonde **283** de deuxième génération.

Cette stratégie est encouragée par l'existence d'une référence bibliographique où le triméthoxysilane **287** est introduit sur l'alcène terminal d'un dérivé de biotine **286** par une réaction d'hydrosilylation dans le toluène en présence d'acide hexachloroplatinique $H_2PtCl_6.xH_2O$ permettant d'obtenir la molécule silylée **288** avec un rendement de 67% (Figure 250).[226]

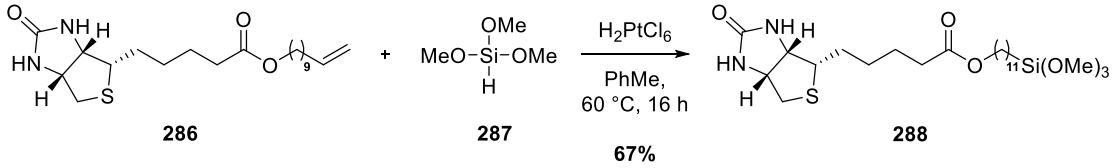


Figure 250 : Réaction d'hydrosilylation sur le dérivé de biotine **288**.

Deux catalyseurs au platine sont très communs pour les réactions d'hydrosilylation : l'acide hexachloroplatinique **289** (aussi appelé catalyseur de Speier) et le catalyseur de Karstedt **290**. L'acide hexachloroplatinique est un complexe inorganique de platine (IV) dont la formule brute est souvent abrégée en $H_2PtCl_6.xH_2O$.[227] Le catalyseur de Karstetdt est un complexe organique de platine (0) stabilisé par des ligands divinyltétraméthyldisiloxanes (Figure 251).

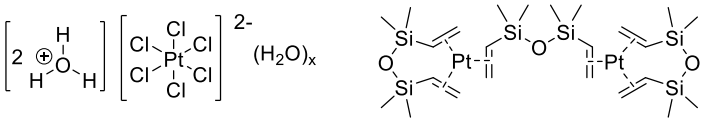


Figure 251 : Structures des catalyseurs de Speier **289** et de Karstedt **290**.

Le mécanisme admis comme représentatif de la réaction d'hydrosilylation catalysée au platine a été proposé par Chalk et Harrod en 1964.[228] Dans ce mécanisme, l'addition oxydante du Pt(0) dans la liaison Si-H conduit à l'intermédiaire **I**, suivie par la complexation de l'alcène sur le Pt(II) pour donner le complexe **II**. Cette étape peut être suivie dans le cas classique par l'insertion de l'alcène dans la liaison Pt-H pour former le complexe **III** (mécanisme de Chalk-Harrod classique) ou bien par l'insertion de cet alcène dans la liaison Pt-SiR_3 pour conduire au complexe **IV** (mécanisme de Chalk-Harrod modifié). Une élimination réductrice achève le cycle catalytique par la régénération du Pt(0) (Figure 252).[229]

[226] Um, S. H., Lee, G. S., Lee, Y.-J., Koo, K.-K., Lee, C., Yoon, K. B. *Langmuir* **2002**, *18*, 4455-4459.

[227] Schweizer, A. E., Kerr, G. T. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2326-2327.

[228] Chalk, A. J., Harrod, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 16-21.

[229] Sakaki, S., Mizoe, N., Sugimoto, M., Musashi, Y. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190-192*, 933-960.

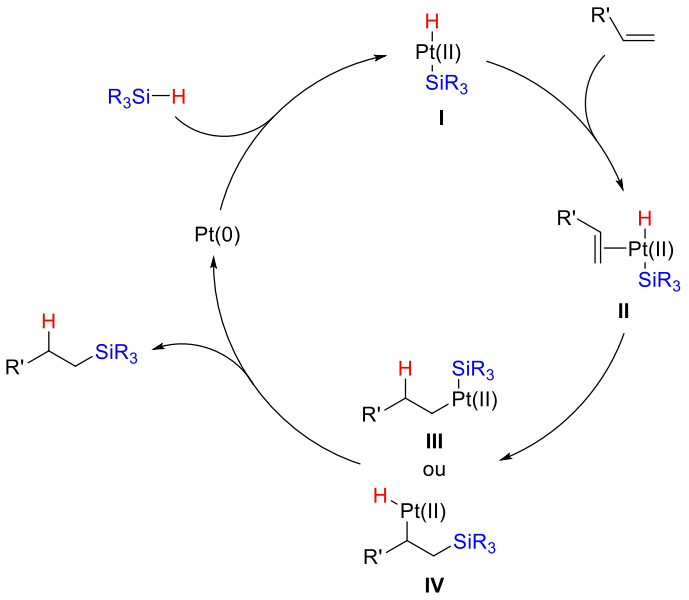


Figure 252 : Cycle catalytique de Chalk-Harrod pour la réaction d'hydrosilylation.

La synthèse de la sonde **283** débute donc par l'addition nucléophile de l'allylamine sur l'ester de NHS **276** conduisant à l'amide **291** avec un rendement de 90%. Ce dérivé amide est ensuite mis en réaction d'hydrosilylation avec le diphénylchlorosilane dans le toluène en présence du catalyseur de Karstedt.[230] Cependant, l'insolubilité du composé **291** dans le toluène empêche la formation du produit désiré **284** et le réactif **291** et récupéré intact (Figure 253).

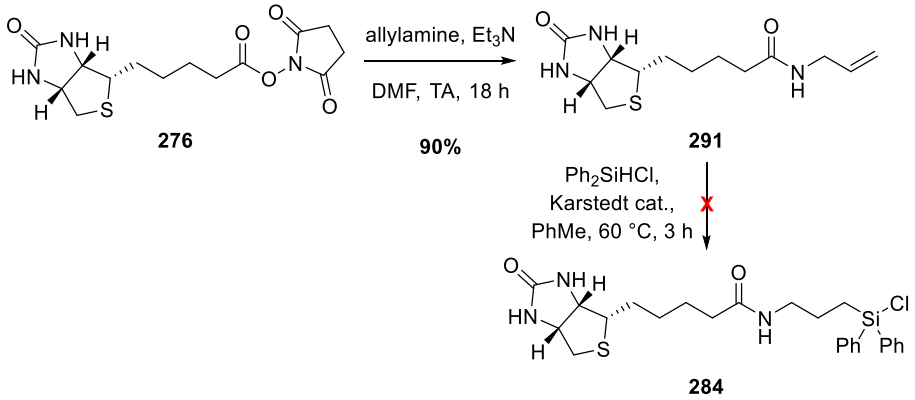


Figure 253 : Essai d'hydrosilylation de l'amide **291** en présence du catalyseur de Karstedt.

Afin d'augmenter la solubilité et de se rapprocher de la structure du dérivé biotine utilisé en hydrosilylation, l'utilisation du 1-amino-10-undécène **293** a été considérée. Ce dernier peut être obtenu en une seule étape par amination réductrice du 10-undécénal **292** (Figure 254).[231] Cependant cette réaction se révèle peu reproductible, empêchant la poursuite de la synthèse vers le dérivé de biotine correspondant **294**.

[230] Organ, M. G., Buon, C., Decicco, C. P., Combs, A. P. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2683-2685.

[231] Dangerfield, E. M., Plunkett, C. H., Win-Mason, A. L., Stocker, B. L., Timmer, M. S. M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5470-5477.

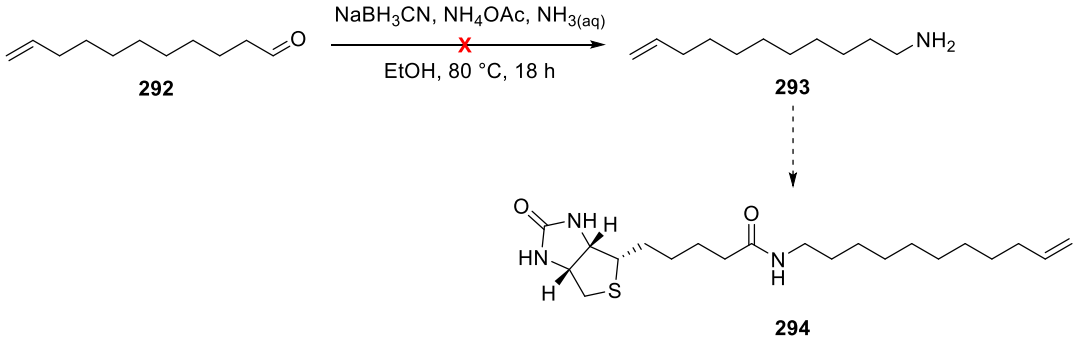


Figure 254 : Tentative de synthèse du dérivé de biotine **294**.

Devant ces échecs, la préparation de l'ester de biotine **286**, dont la solubilité dans le toluène est suffisante pour permettre la réaction d'hydrosilylation, a été préférée pour la suite de la synthèse. Cet ester est obtenu par addition nucléophile du 10-undécénol sur l'ester de NHS **276** avec un rendement de 75%. La réaction d'hydrosilylation du composé **286** dans les conditions décrites précédemment permet de détecter la formation du chlorosilane intermédiaire **295** par RMN ^{1}H en vérifiant la disparition des protons de l'alcène de l'ester **286** (Figure 255 et Figure 256). Ce chlorosilane **295** est piégé par l'ajout d'éthanolamine ou d'éthanol pour conduire aux composés **297** et **298** avec des rendements respectifs de 20% et 80%.

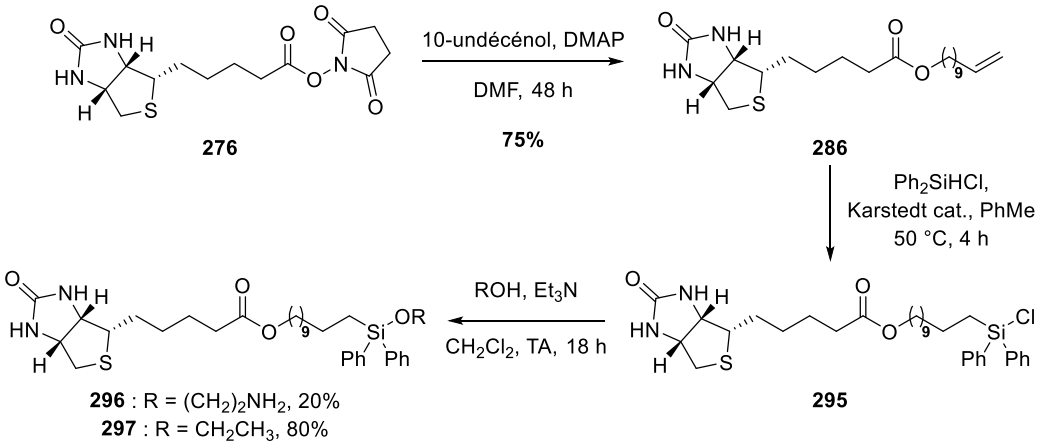


Figure 255 : Synthèse de la sonde **296**.

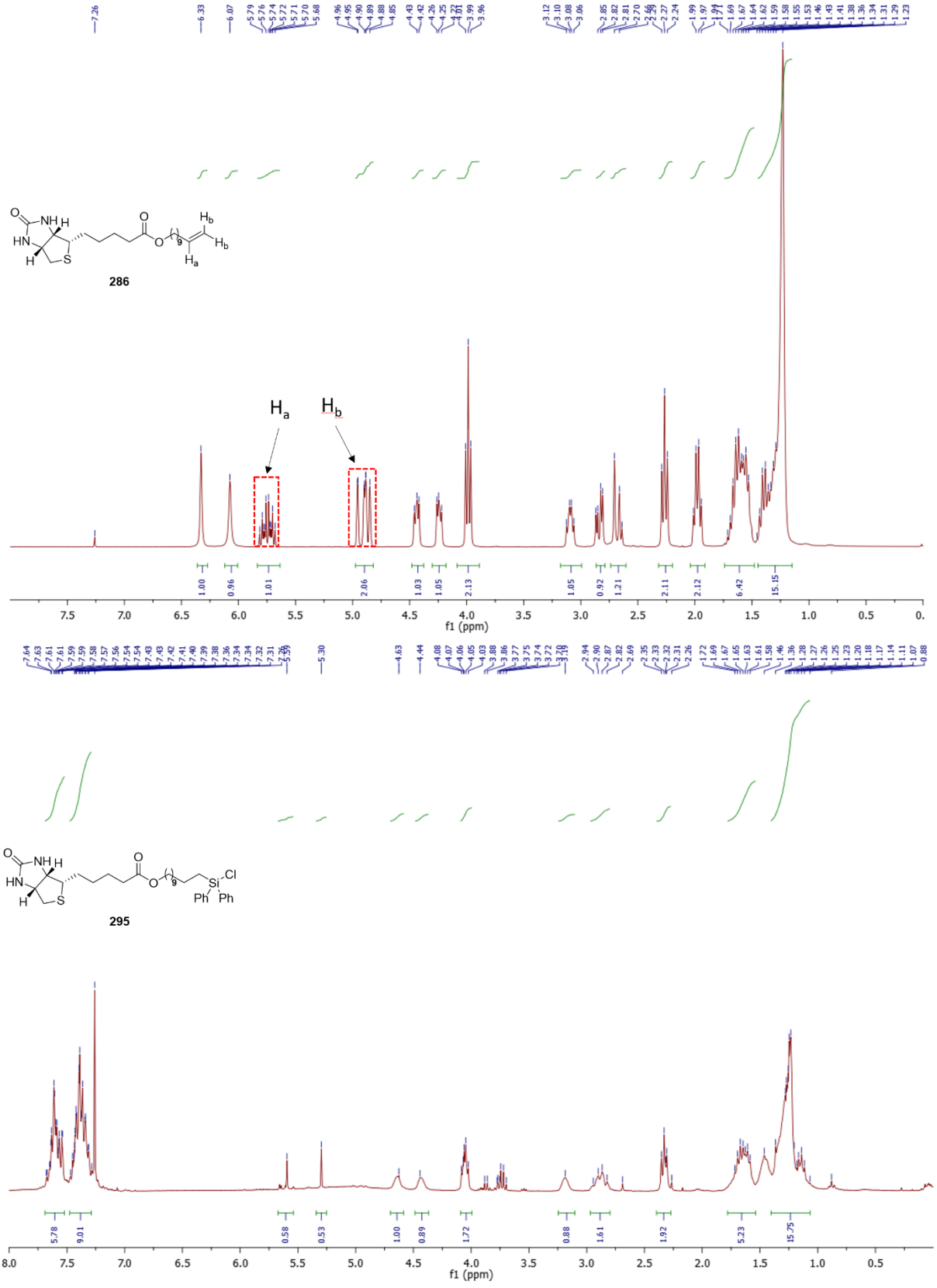
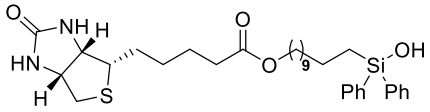


Figure 256 : Spectres RMN ^{1}H du composé **286** (haut) et d'un prélèvement du milieu réactionnel de la réaction de formation du chlorosilane intermédiaire **295** (bas). La disparition des protons de l'alcène H_a et H_b permet de vérifier que la réaction a bien eu lieu.

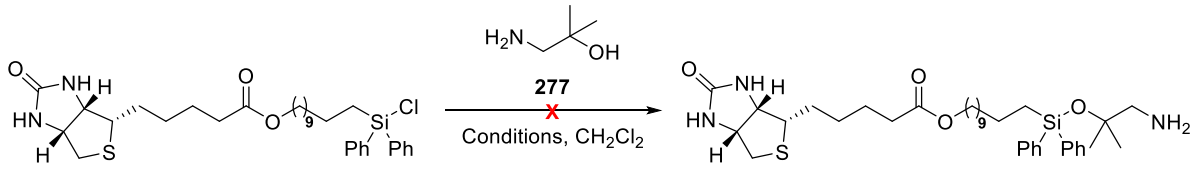
Cependant, la molécules **296** ainsi obtenues présente les mêmes soucis de stabilité et se dégrade rapidement. Le remplacement de l'éthanolamine par l'amine **277**, pouvant apporter plus de résistance à

l'hydrolyse, ne permet pas de former le produit correspondant **298**. Dans toutes les conditions testées, le silanol **299** résultant de l'hydrolyse du chlorosilane **295** est obtenu à l'issue du traitement de la réaction (Figure 257 et Tableau 22).



299

Figure 257 : Structure du silanol **299** résultant de l'hydrolyse du chlorosilane **295**.



295 **298**

Entrée	Base	Additif	Temps	Résultat
1	Et_3N	/	18 h	Aucune réaction
2	Et_3N	DMAP cat.	18 h	Aucune réaction
3	Excès de **277**	DMAP cat.	16 h	Aucune réaction
4	Excès de **277**	DMAP (2 éq.)	16 h	Aucune réaction
5	Imidazole	/	18 h	Aucune réaction

Tableau 22 : Tentatives de formation de la molécule **298**.

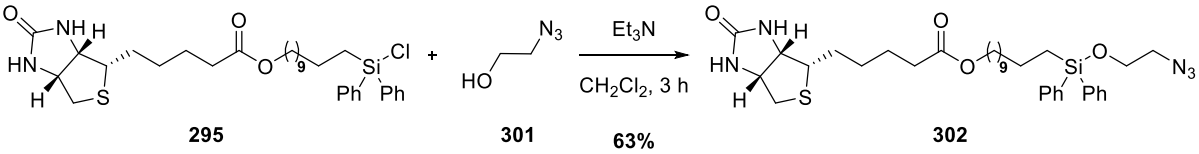
Des problèmes de stabilité ainsi que de réactivité sont donc également rencontrés sur cette deuxième génération de sonde. Afin de comprendre l'origine de ces problèmes, une étude de stabilité a été menée sur des composés modèles possédant le même type de groupement clivable que les sondes développées ci-desssus, à savoir un groupement éther silylé.

4.3 Utilisation du groupement azoture comme précurseur de la fonction amine primaire

L'observation à l'origine de la volonté de mener cette étude sur la stabilité du lien éther silylé présent sur les sondes de deuxième génération est lié au fait que l'équipe du Prof. Tirrell ne fait aucune mention de problèmes d'hydrolyse prématurée de la sonde **263**. La synthèse de molécules possédant non plus une fonction amine libre mais une fonction azoture, comme la sonde **263**, a donc été entreprise pour confirmer si les échecs observés sont dus à une instabilité de la fonction clivable en présence de la fonction amine primaire. Une fois un dérivé de biotine suffisamment stable synthétisé, une réduction de la fonction azoture en amine permettrait d'achever la synthèse de la sonde à produit naturel azaphile.

Une première modification par rapport à la synthèse initiale est d'effectuer d'abord l'addition nucléophile de la chaine azido-alcool sur le chlorosilane puis la réaction d'hydrosilylation sur l'alcène de la biotine **286**. Pour cela, l'azidoéthanol **301** a été préparé à partir du bromoéthanol **300**,[232] puis mis en réaction avec le chlorosilane **295**, généré par la réaction d'hydrosilylation, conduisant au produit désiré **302** avec un rendement de 63% (Figure 258).

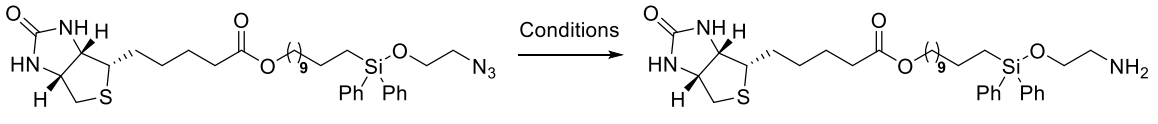
[232] Hounsou, C., Margathe, J.-F., Oueslati, N., Belhocine, A., Dupuis, E., Thomas, C., Mann, A., Ilien, B., Rognan, D., Trinquet, E., Hibert, M., Pin, J.-P., Bonnet, D., Durroux, T. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 466-474.



295 301 302

Figure 258 : Formation du composé biotinylé **302** portant la fonction azoture.

La molécule **302** ainsi formée présente une stabilité à l'hydrolyse plus importante que les dérivés de biotine synthétisés précédemment. Des réactions de réduction de la fonction azoture du composé **302** ont alors été entreprises. L'hydrogénation catalysée au palladium sur charbon[233] et la réduction de Staudinger en présence d'une phosphine et d'eau ont été testée sur la molécule **302** (Tableau 23).



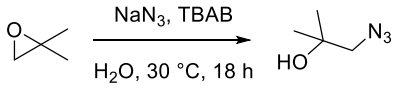
302 296

Entrée	Conditions	Temps	Résultat
1	PPh_3, THF/H_2O (10:1)	20 h	Mélange 1:1 entre **296** et **299**
2	PMe_3, THF/H_2O (10:1)	2 h	Dégradation
3	H_2, Pd/C, EtOAc	6 h	Produit **296** majoritaire

Tableau 23 : Réactions de réduction de la fonction azoture du composé

La présence d'eau dans la réduction de Staudinger ainsi que la nécessité d'une purification pour éliminer l'oxyde de triphénylphosphine généré n'ont pas permis d'isoler le produit de réduction **296**, du fait de sa relative instabilité (entrée 1). L'utilisation de la triméthylphosphine, dont l'oxyde est volatil, dégrade totalement le composé **302** (entrée 2). Finalement, l'utilisation du palladium sur charbon dans l'acétate d'éthyle permet d'effectuer la réduction chimiosélective de la fonction azoture par rapport à l'éther silylé de la molécule **302** et de détecter le produit désiré **296**. Malheureusement celui-ci s'hydrolyse très rapidement en silanol **299**, confirmant ainsi que l'instabilité de la sonde **296** est due à la présence de la fonction amine (entrée 3).

Afin de combattre ce problème de stabilité, la synthèse du dérivé biotine **298** a été reprise en utilisant cette stratégie qui consiste à réduire la fonction azoture après formation de l'éther silylé. L'équivalent azoture **304** de l'amine **277** est obtenu par ouverture de l'oxyde d'isobutylène **303** par l'azoture de sodium catalysée par le bromure de tétrabutylammonium[234] avec 44% de rendement (Figure 259).



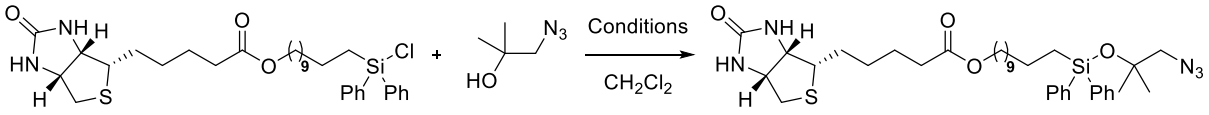
303 304

Figure 259 : Formation de l'azidoalcool **304**.

Cet azidoalcool **304** a ensuite été utilisé pour piéger le chlorosilane **295** généré par l'hydrosilylation de l'ester **286**. Aucunes des conditions testées n'a permis de former le composé désiré **305** (Tableau 24).

[233] Sajiki, H., Ikawa, T., Hattori, K., Hirota, K. *Chem. Comm.* **2003**, 654-655.

[234] Fringuelli, F., Piermatti, O., Pizzo, F., Vaccaro, L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6094-6096.

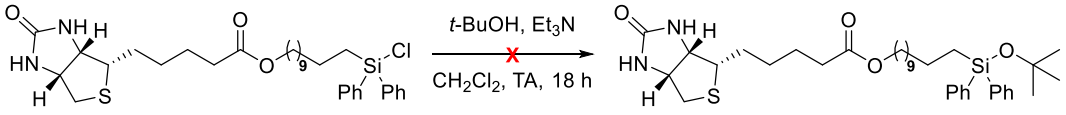


295 **304** **305**

Entrée	Base	Additif	Temps	Résultat
1	Et_3N	/	18 h	Silanol **299** + alcool **304** récupérés
2	Et_3N	DMAP cat.	18 h	Silanol **299** + alcool **304** récupérés
3	DMAP	/	18 h	Silanol **299** + alcool **304** récupérés
4[235]	Et_3N	$AgNO_3$	18 h	Silanol **299** + alcool **304** récupérés
5	2,6 lutidine	/	18 h	Dégradation complète
6[235]	DABCO	$AgNO_3$	3 h	Silanol **299** + alcool **304** récupérés

Tableau 24 : Essais de formation du composé **305**.

L'impossibilité de former le lien éther silylé à partir du chlorosilane **295** et de l'alcool **304** est sans doute due à l'encombrement des groupements phényles portés par le silicium du composé **295** auquel il faut ajouter la classe tertiaire de l'alcool de la molécule **304**. Cette hypothèse semble confirmer par la mise en réaction le composé **295** avec du *tert*-butanol dans les conditions de l'entrée 1 du Tableau 24. En effet, aucune réaction n'est observée dans ce cas (Figure 260), alors que le produit désiré avait été obtenu en utilisant l'éthanol dans ces mêmes conditions (Figure 255).



295 **306**

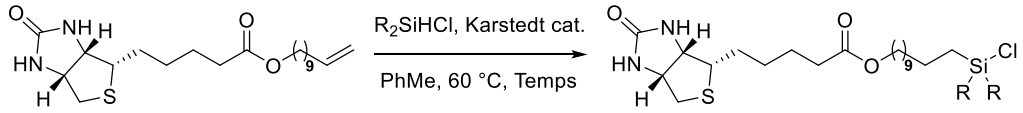
Figure 260 : Test de réaction entre le chlorosilane **51** et le *tert*-butanol.

Cette potentielle gêne stérique pourrait être diminuée en changeant la nature des groupements portés par le silicium, au prix d'une stabilité sans doute moindre du lien éther silylé.

4.4 Etude de la nature des groupements portés par le silicium

L'influence de la substitution du silicium par des groupements isopropyle et *tert*-butyle sur la réaction d'hydrosilylation de l'alcène du composé **286** a été étudiée. Aucune formation des chlorosilanes correspondants **307a** et **307b** n'est cependant observée. En effet, l'ester **286** se dégrade en présence du diisopropyle chlorosilane (Tableau 25, entrée 1) alors qu'aucune réaction n'est observée dans le deuxième cas, probablement du fait de l'encombrement du di*tert*-butyle chlorosilane (Tableau 25, entrée 2).

[235] Hakimelahi, G. H., Proba, Z. A., Ogilvie, K. K. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 5243-5246.



286 **307a** : R = iPr
307b : R = *t*Bu

Entrée	Silane	Temps	Résultat
1	iPr_2SiHCl	4 h	Dégradation
2	tBu_2SiHCl	18 h	Pas de réaction

Tableau 25 : Essais de formation des chlorosilanes intermédiaires **307a** et **307b**.

Ces derniers résultats négatifs mettent pour le moment dans l'impasse l'utilisation de la fonction éther silylé en tant que lien clivable envisagé entre la biotine et l'amine primaire de la sonde à produits naturels azaphiles.

5 Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre, le concept d'approche basée sur la réactivité a été appliquée à la conception de sondes servant à piéger des produits naturels azaphiles. La synthèse d'un composé modèle **45** a été réalisée en trois étapes avec un rendement global de 31%. Cette première sonde, dite analytique, présente un groupement phosphonium associée à un marqueur de masse (atome de brome) garantissant l'obtention d'un signal intense et caractéristique en spectrométrie de masse (Figure 261).

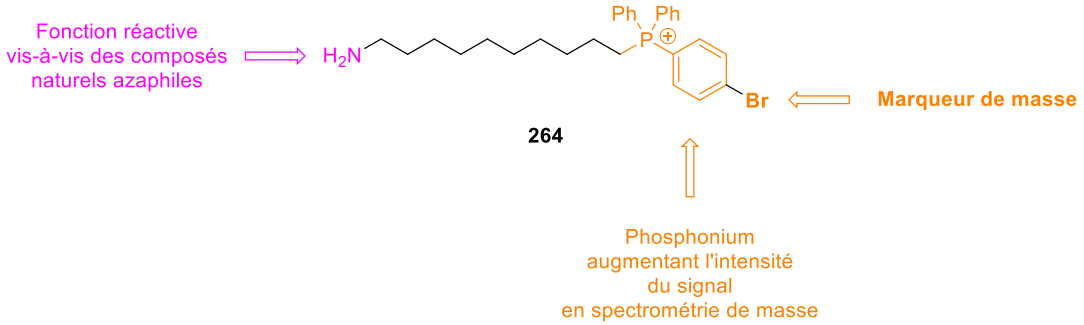
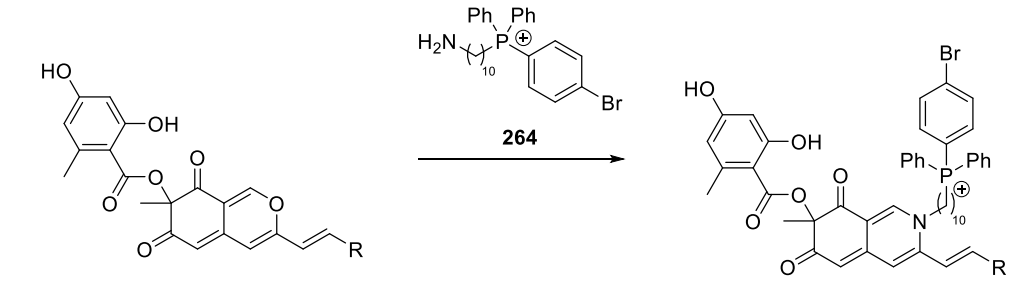


Figure 261 : Structure de la sonde analytique **264** possédant un marqueur de masse.

Le traitement d'un extrait naturel brut de *T. convolutus* contenant trois azaphilones par la sonde **264** a permis de former spontanément puis de détecter les adduits pyridoquinones correspondants directement par spectrométrie de masse (Figure 262).



Azaphilones présentes dans l'extrait brut
de *T. convolutus*
R = CH_3, CH_2OH, CO_2H

Adduit pyridoquinone
formé avec la sonde **264**

Figure 262 : Formation des adduits entre les azaphilones produites par *T. convolutus* et la sonde **264**.

Cette première sonde peut donc être utilisée pour détecter des produits naturels de la famille des azaphilones de manière analytique, permettant d'envisager la découverte de nouvelles molécules naturelles. Une application très intéressante sur ce projet pourrait être l'utilisation de la dualité marquage de masse/fluorescence pour rechercher de nouvelles azaphilones profluorescentes semblables à l'epicocconone **56**.

Dans un deuxième temps, une nouvelle approche cherchant à utiliser les propriétés séparatives de la biotine grâce à l'interaction forte biotine-streptavidine, bien connues en protéomique, a été envisagée. La présence du motif biotine relativement polaire ne serait que transitoire grâce à l'utilisation d'un lien clivable en milieu acide. Ainsi, une fois l'enrichissement en composés naturels marqués effectué, ceux-ci pourraient être séparés et analysés plus facilement sans la présence du groupement biotine. La stratégie initiale s'est inspirée des travaux de l'équipe du Prof. Tirrell[222] et la formation d'un motif siloxane. La sonde **263** est ainsi obtenue avec 34% de rendement sur 4 étapes (Figure 263).

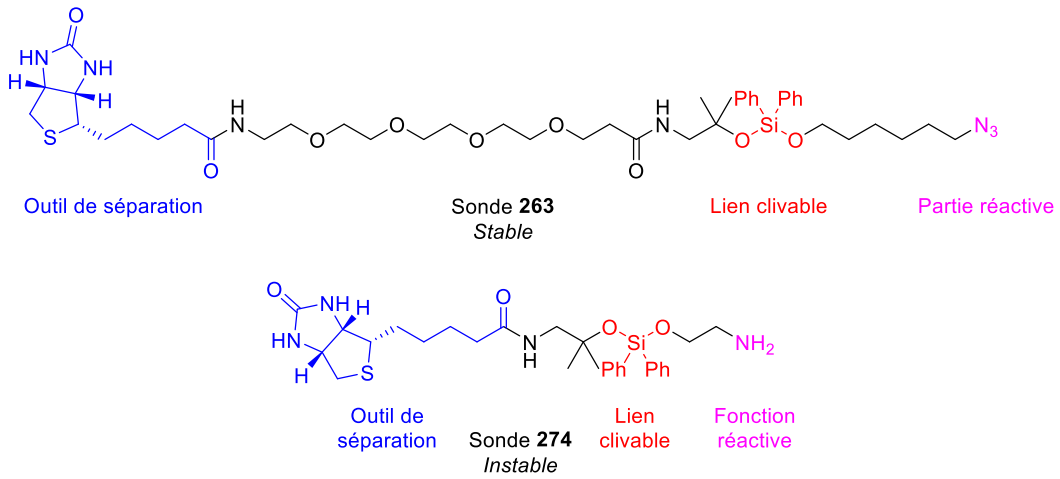


Figure 263 : Structure de la sonde **263**, décrite par le groupe du Prof. Tirrell et de la sonde **274** synthétisée lors de ce projet.

Malgré son hydrolyse spontanée, il a été possible de vérifier que cette sonde **274** était capable de marquer l'analogue naphtyle **60**. Des modifications synthétiques, notamment sur la chaîne aminoalcool, n'ont pas permis d'obtenir de sondes plus stables. Ces échecs semblent dus à la présence de la fonction amine, beaucoup plus réactive que la fonction azoture présente sur la sonde décrite par le groupe du Prof. Tirrell, qui pourrait être à l'origine de la faible stabilité du motif siloxane sur la molécule **274**.

Dans le but d'augmenter la stabilité du lien reliant la partie biotine de la sonde à la partie réactive portant l'amine libre, une méthodologie utilisant l'hydrosilylation d'un alcène a été développée. Moyennant une distance suffisante entre le résidu biotine et l'alcène terminal, l'introduction d'un groupement chlorosilane est réalisée avec une conversion quantitative en RMN ^{1}H. L'espèce ainsi générée peut ensuite être piégée par un alcool primaire et a permis l'obtention des composés **296**, **297** et **302** (Figure 264).

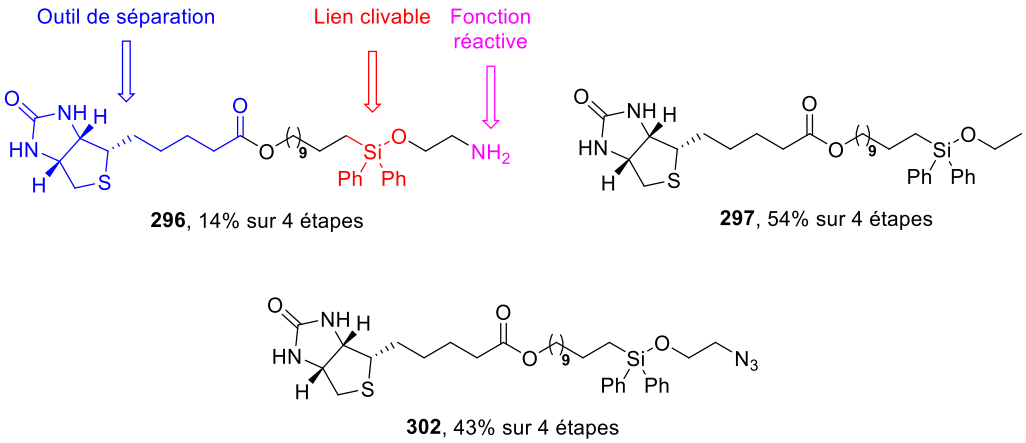


Figure 264 : Composés obtenus par la méthodologie utilisant la réaction d'hydrosilylation.

Cependant des problèmes de stabilité sont également observés lorsque la fonction réactive amine primaire est présente comme sur la structure **296**. Les composés **297** et **302** présentent, eux, moins de problèmes de stabilité. Les tentatives de réduction de la fonction azoture du composé **302** ont permis de confirmer les problèmes de stabilité induits par la présence d'une fonction amine.

Il pourrait être intéressant d'étudier si la présence d'une contrainte stérique, imposée par exemple par un groupement aromatique, permet d'augmenter la stabilité du produit formé en éloignant l'amine primaire du groupement silylé. Il pourrait donc être vérifié si c'est l'interaction intramoléculaire (si les groupements phényles présents sur l'atome de silicium suffisent à empêcher une interaction intermoléculaire) entre ces deux groupements qui peut expliquer des différences de stabilité observées entre les molécules **296** et **302**.

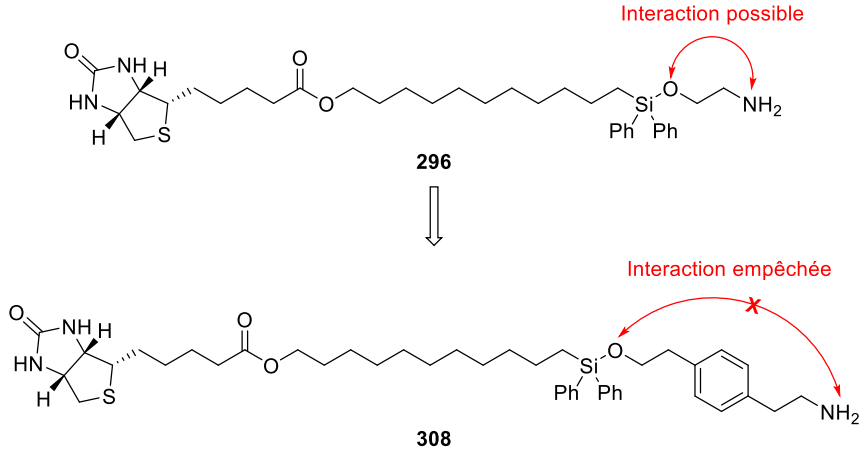
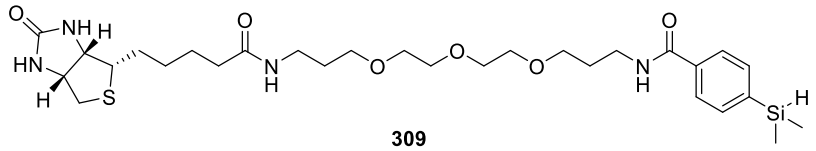


Figure 265 : Modification structurale possible de la sonde **296** pour étudier l'interaction intramoléculaire entre le lien clivable et l'amine primaire.

Une autre possibilité serait d'effectuer la réaction d'hydrosilylation sur un alcyne terminal, comme l'a reporté récemment l'équipe du Prof. Spring[236] sur un silane **309** portant un groupement biotine (Figure 266).

[236] Kwan, T. T. L., Boutureira, O., Frye, E. C., Walsh, S. J., Gupta, M. K., Wallace, S., Wu, Y., Zhang, F., Sore, H. F., Galloway, W. R. J. D., Chin, J. W., Welch, M., Bernardes, G. J. L., Spring, D. R. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3871-3878.



309

Figure 266 : Structure du silane **309** utilisé par l'équipe du Prof. Spring pour le marquage de protéines modifiées.

Ce composé a été utilisé pour marquer des protéines modifiées portant une fonction alcyne terminal accessible comme le lysozyme présenté ci-dessous (Figure 267). Cette réaction a lieu à température ambiante, en présence d'un catalyseur à base de ruthénium **310**.

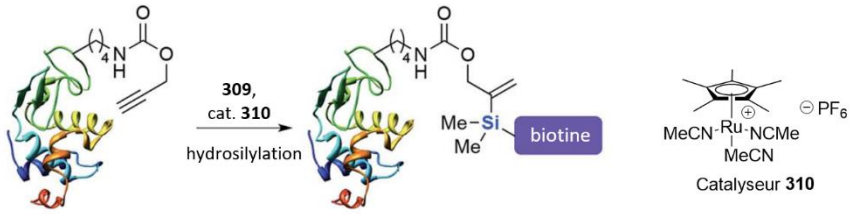


Figure 267 : Représentation schématique d'un lysozyme modifié par une fonction alcyne terminal accessible pouvant donc réagir sur le silane **309** par hydrosilylation.

Ces conditions utilisant un alcyne terminal pourraient être appliquées au projet présenté dans ce chapitre, moyennant l'utilisation du dérivé de biotine **313** déjà synthétisé au laboratoire à partir du 7-octyn-1-ol **312**, lui-même obtenu à partir du 2-octyn-1-ol **311**[237] avec un rendement sur deux étapes de 34% (Figure 268).

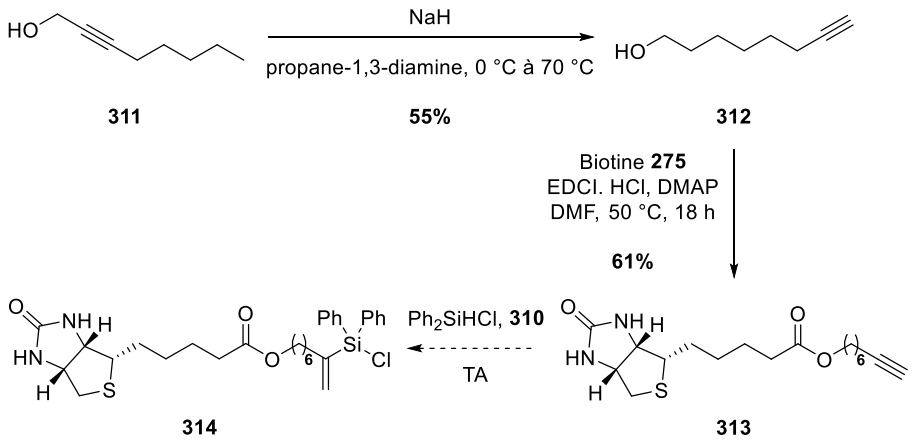


Figure 268 : Préparation de l'ester de biotine **313** comportant une fonction alcyne terminal.

Il restera cependant à définir si cette stratégie permet de former plus efficacement un éther silylé suffisamment stable pour être utilisé dans la continuité du projet développé précédemment. En effet, le lien clivable utilisé par l'équipe du Prof. Spring est un carbamate et non pas le motif silylé directement formé par la réaction d'hydrosilylation (Figure 267) contrairement à ce qui a été développé précédemment sur les composés **296**, **297** et **302** (Figure 264). Il peut être espéré que le déroulement de la réaction ci-dessus (Figure 268) à température ambiante autorisera l'emploi de nouvelles stratégies.

Une autre application directement inspirée de cette approche serait le développement d'une sonde analytique **315** semblable à la molécule **264** mais possédant une fonction réactive silane de type R_2SiH (R = alkyle, aryle) capable de réagir avec les produits naturels possédant une fonctions alcyne terminal.

[237] Kojima, N., Suga, Y., Matsumoto, T., Tanaka, T., Akatsuka, A., Yamori, T., Dan, S., Iwasaki, H., Yamashita, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1276-1283.

L'utilisation d'une très faible quantité de catalyseur nécessaire à ce type de réaction reste compatible avec l'approche basée sur la réactivité (Figure 269).

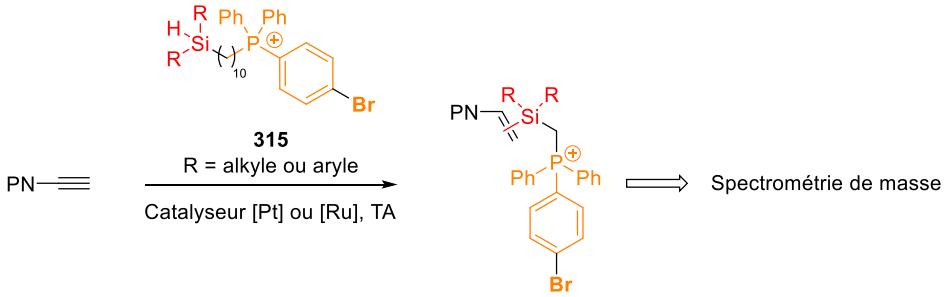


Figure 269 : Stratégie d'identification de produits naturels (PN) possédant une fonction alcyne terminal par une sonde analytique **315**.

Conclusion générale et perspectives

1 Conclusion

1.1 Synthèse de nouveaux analogues de l'epicocconone

Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'un des premiers objectifs a été de développer de nouvelles sondes polyfonctionnelles basées sur le squelette de l'epicocconone **56**. Ce fluorophore appartenant à la famille des azaphilones présente en effet la particularité de produire des adduits fluorescents de type énaminone **56 E** en présence d'amines primaires grâce à la formation d'une liaison covalente mais réversible en fonction du pH (Figure 270).

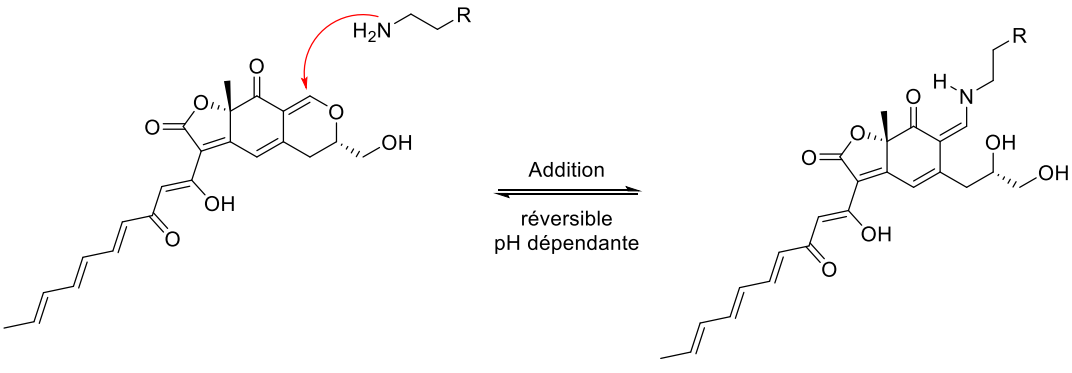


Figure 270 : Réaction réversible entre l'epicocconone **56** et les amines primaires.

Cette réactivité particulière de l'epicocconone a été exploitée en protéomique où le composé **56** est utilisé en tant que marqueur fluorescent pour la détection de protéines sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). L'epicocconone est en effet capable de réagir avec les résidus lysine présents sur les protéines permettant une très grande sensibilité de détection jusqu'à des quantités de l'ordre du nanogramme de protéine par bande. Cependant la forme énaminone **56 E** subit un photoblanchiment rapide (temps de demi-vie de l'ordre de 12 minutes) entraînant une perte rapide de fluorescence sous irradiation UV continue. Cette observation a amené à développer des synthèses d'analogues de l'epicocconone au sein de l'équipe du Dr. Xavier Franck aboutissant à un nouveau produit de référence, plus résistant au photoblanchiment, pour le marquage de protéines : l'analogue naphtyle **60**. Cette stratégie de synthèse repose sur la préparation de deux intermédiaires clés que sont l'alcool désaromatisé **61** et la β-céto dioxinone **82** (Figure 271).

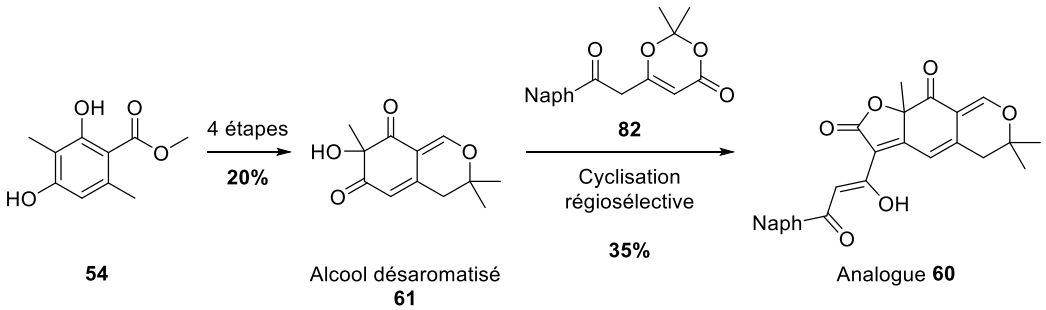


Figure 271 : Intermédiaires clés de la voie de synthèse de l'analogue naphtyle **60**.

L'application de cette stratégie à la synthèse d'un analogue **83** portant une fonction alcyne terminal a permis l'obtention de sondes polyfonctionnelles pour l'imagerie par microscopie de fluorescence grâce à la cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC) permettant de coupler un agent de reconnaissance ou un groupement de séparation (biotine) à un stade avancé de la synthèse (Figure 272).

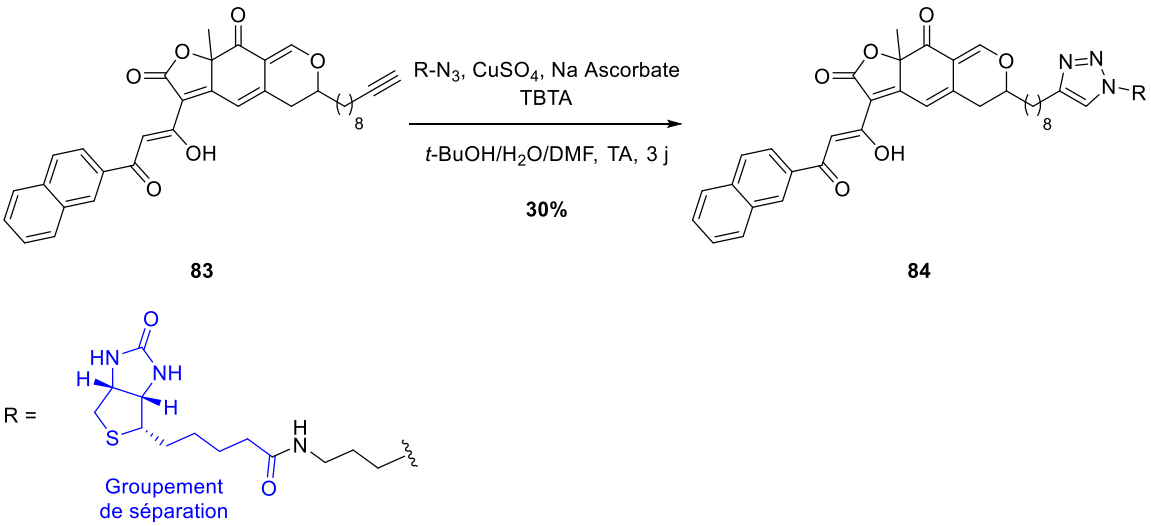


Figure 272 : Structures de l'analogue **83** et réaction de CuAAC entre ce composé et un dérivé azoture portant un groupement de séparation (biotine, bleu).

Les sondes ainsi synthétisées sont cependant obtenues avec de faibles rendements et souffrent des mêmes défauts que l'epicocconone naturelle **56** comme un photoblanchiment rapide et une faible fluorescence.

Dans le cadre de ce projet, la combinaison de ces deux méthodologies a été appliquée à l'obtention de nouvelles sondes polyfonctionnelles. L'introduction des groupements réactifs pour la CuAAC peut être envisagé sur le partenaire alcool désaromatisé ou sur le partenaire dioxinone. La première stratégie n'a pas permis d'introduire les groupes réactifs en CuAAC sur l'alcool désaomatisé malgré de nombreuses tentatives (Figure 273, chemin rouge). En revanche, l'utilisation d'un motif fluorène a permis d'obtenir un analogue fluorène **115** portant un fonction azoture avec 2% de rendement sur 8 étapes et d'entamer la synthèse d'un analogue **116** portant une fonction azoture et une fonction alcyne (Figure 273, chemin A).

Le partenaire alcyne choisi pour effectuer la réaction de CuAAC est le dérivé de la camptothécine SN 38 **143**, connu pour ses activités biologiques. Cependant aucune des conditions testées n'a permis de former le triazole correspondant. Ces échecs semblent dus à une interaction entre l'analogue **115** et les sels de cuivre (I) utilisés, empêchant toute réaction malgré un excès de catalyseur. La formation du triazole résultant de la réaction de cycloaddition spontanée (SPAAC) entre l'analogue **115** et l'alcyne contraint **145**, confirmée en HPLC et spectrométrie de masse, tend à confirmer l'effet néfaste du cuivre sur le bon déroulement de la réaction (Figure 273, partie supérieure).

La méthodologie développée pour la synthèse des analogues **115** et **116** a ensuite été appliquée à la préparation d'analogues optimisés pour l'absorption à deux photons, dans le but d'obtenir des molécules utilisables en imagerie par microscopie de fluorescence à excitation biphotonique (Figure 273, partie basse). La stratégie envisagée consiste à introduire des groupements donneurs d'électrons sur le noyau fluorène, connu pour ses propriétés d'absorption à deux photons, afin d'obtenir des fluorophores de type D-π-A (Donneur-π-Accepteur).

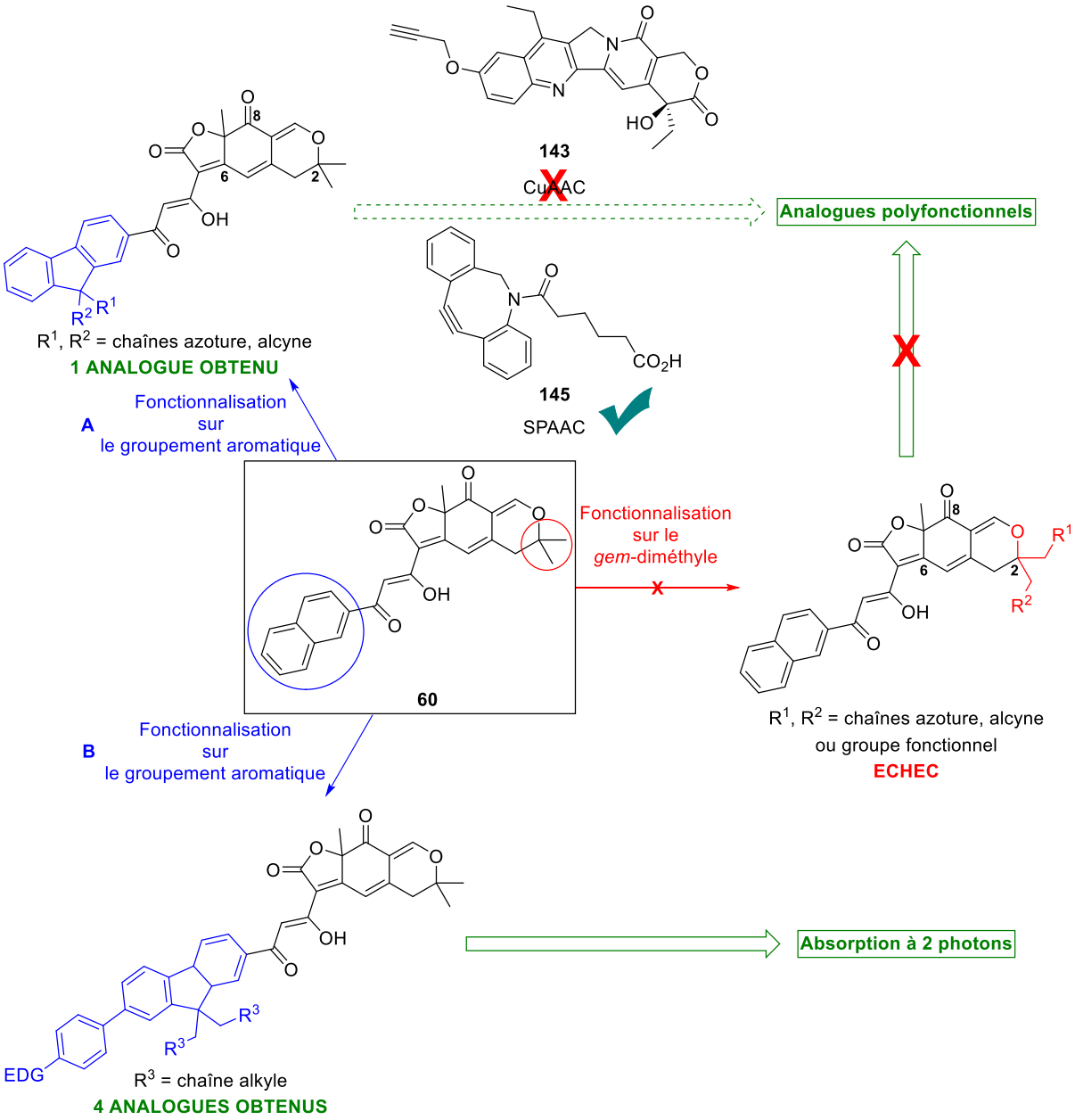


Figure 273 : Différentes stratégies envisagées durant la synthèse des analogues de l'epicocconone.

La préparation des partenaires dioxinone pour la réaction d'acylfuranonisation a nécessité le développement d'une nouvelle voie de synthèse dont les étapes clés sont un couplage carbonylant pallado-catalysé permettant de former des dioxinones fluorène bromées. Un couplage de Suzuki-Miyaura permet d'introduire par la suite les groupements donneurs d'électrons, de manière à conserver un intermédiaire dioxinone bromée **62** commun (Figure 274).

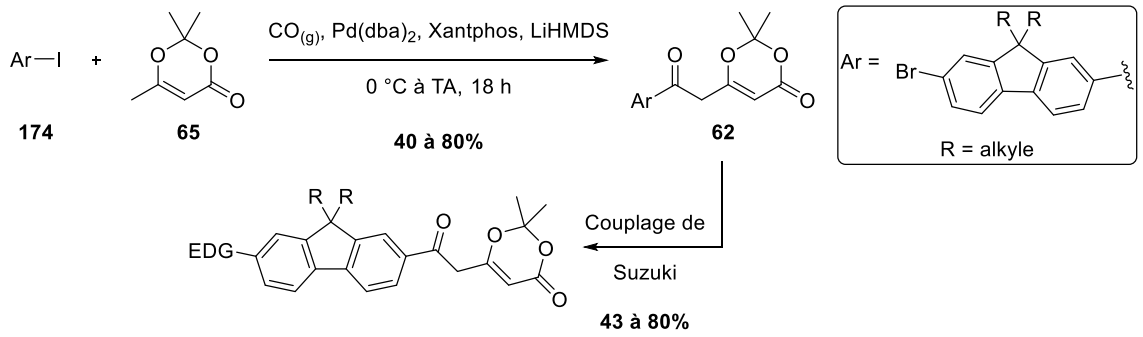
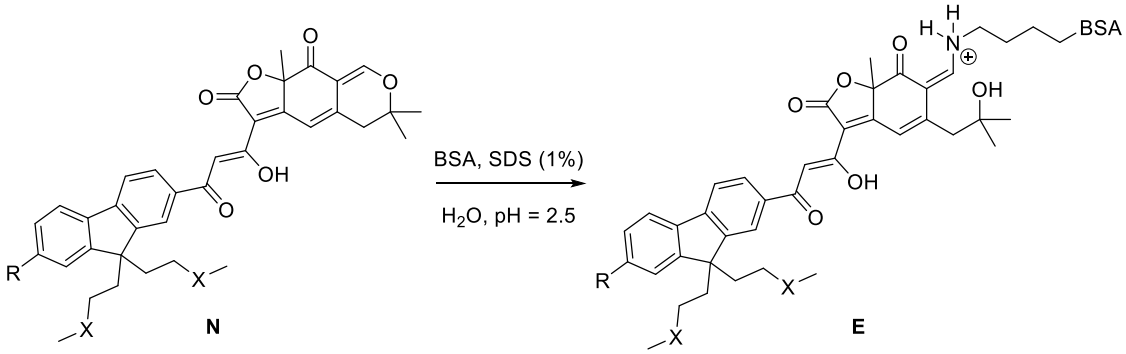


Figure 274 : Voie de synthèse des dioxinones portant des groupes donneurs d'électrons.

Ces dioxinones ont ensuite été mise en réaction d'acylfuranonisation en présence de l'alcool désaromatisé **61**. Cinq nouveaux analogues de l'epicocconone ont pu être obtenus, dont quatre présentent une structure optimisée pour l'absorption à deux photons. Les propriétés spectrales de ces analogues fluorène ont été étudiées, mettant en évidence un effet « off-on », lié à la présence ou non d'une amine primaire dans le milieu, sur les analogues **206** (dans le dichlorométhane) et **212** portant le groupement 4-méthoxyphényle. Ces études ont également montré la très faible fluorescence des analogues **208** et **213** fontionnalisés par un groupement triphénylamine (Tableau 26).



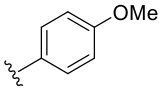
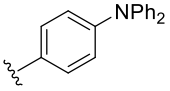
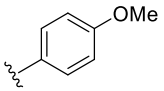
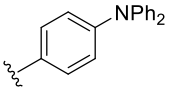
Composé	R	X	λ_{em}max	Φ_F
163a[a] N	H	CH_2	539	0.11
163a[a] E			597	0.22
206 N		CH_2	537	0.1
206 E			600	0.21
208 N		CH_2	575	0.02
208 E			597	0.10
211 N	H	O	524	0.83
211 E	H	O	600	0.34
212 N		**O**	**540**	**0.02**
212 E			**600**	**0.33**
213 N		O	520	0.02
213 E			602	0.09

Tableau 26 : Résumé des propriétés de fluorescence dans l'eau/SDS, sous forme native (**N**) et énaminone (**E**) formée en présence de BSA, des analogues fluorène synthétisés. ([a] analogue obtenu par la voie de synthèse classique).

Du fait de l'augmentation importante du rendement quantique de fluorescence de l'analogue **208** dans le toluène et d'analyses électrochimiques sur ce composé, l'hypothèse d'une inhibition de fluorescence par transfert d'électron photo-induit (PeT) réducteur a été proposée. Ce phénomène serait possible grâce au caractère donneur d'électron, donc réducteur, des groupements 4-méthoxyphényle et triphénylamine introduits sur le motif fluorène et le caractère accepteur d'électron de la partie epicocconone. Dans cette hypothèse, la profluorescence des analogues **206** (dans le dichlorométhane) et **212** pourrait également être expliquée par le caractère plus oxydable du motif dihydropyranoquinone présent sur les molécules natives **206 N** et **212 N** par rapport aux énaminones correspondantes **206 E** et **212 E** (Figure 275).

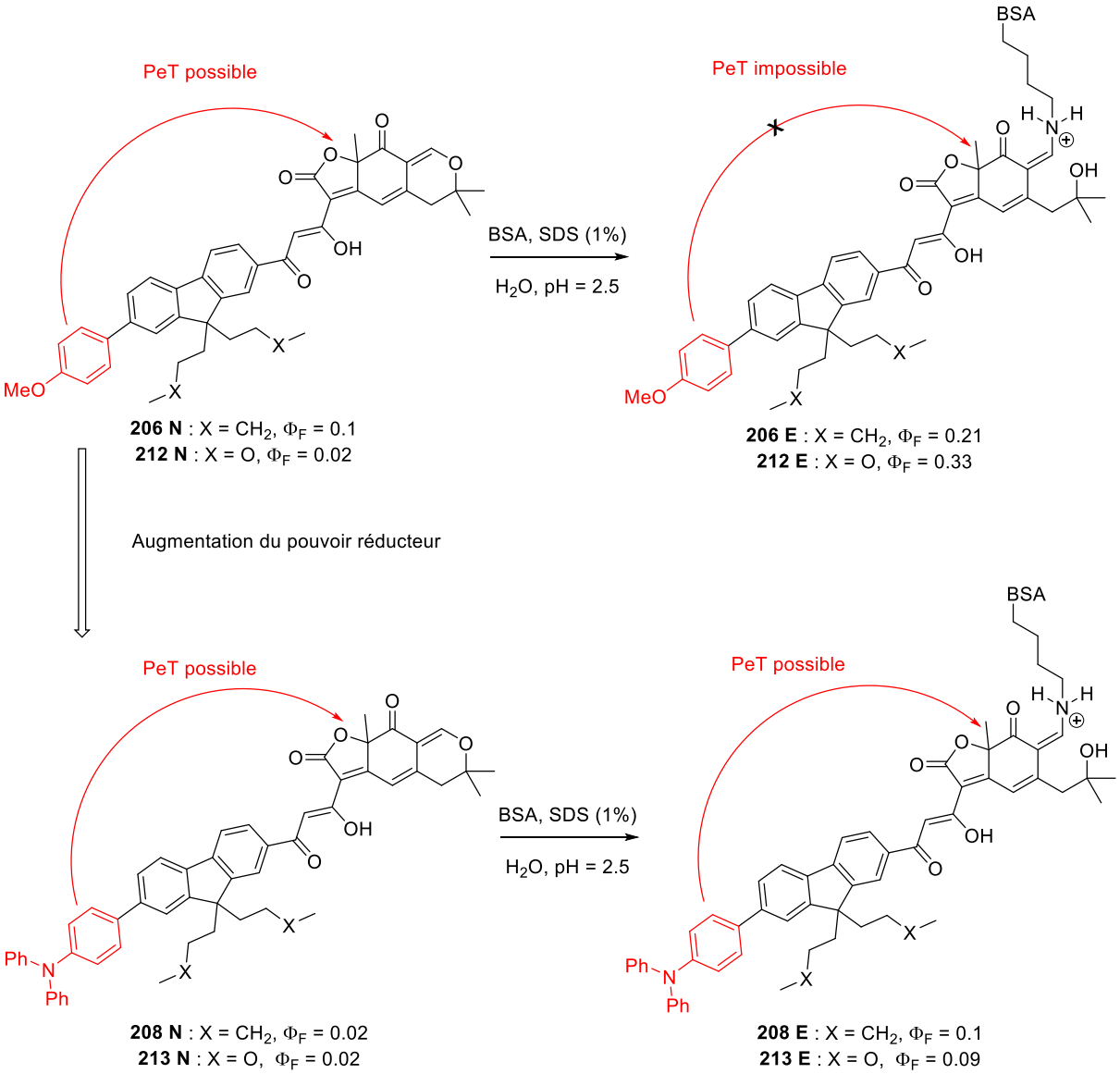
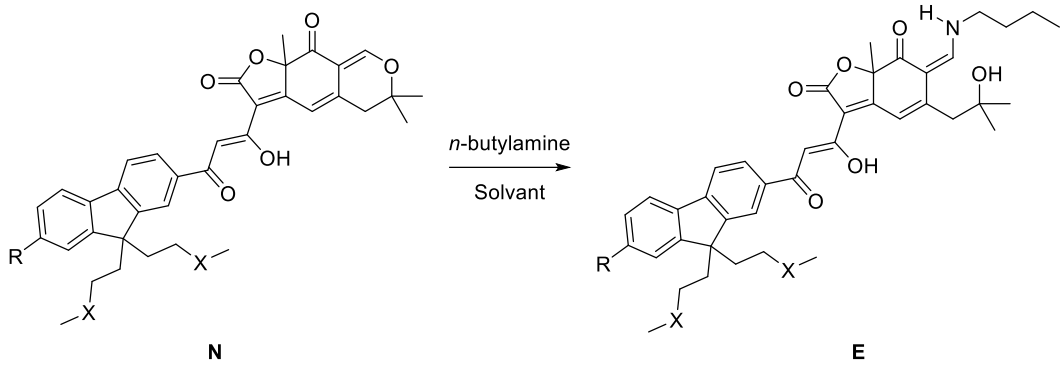


Figure 275 : Mécanisme possible de PeT réducteur expliquant les chutes de rendement quantiques de fluorescence observées sur les analogues **208** et **213** et la profluorescence des analogues **206** et **212**.

Les propriétés d'absorption biphotonique ont ensuite été étudiées sur les cinq analogues fluorène obtenus, dans le but de déterminer leur section efficace d'absorption à deux photons en vue d'une application en imagerie par microscopie de fluorescence à excitation biphotonique. La détermination des valeurs de section efficace est toujours en cours et seuls les spectres bruts d'absorption biphotonique ont pu être exploités pour le moment. Ces premiers résultats mettent en avant l'analogue **212** qui, du fait de ses propriétés de profluorescence déjà observées et d'une longueur d'onde maximale d'absorption à

deux photons de l'ordre de 810 nm dans le dichlorométhane, présente tous les atouts nécessaires pour des études en imagerie (Tableau 27).



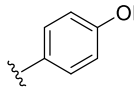
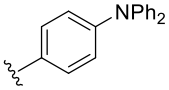
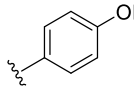
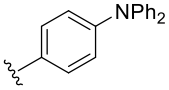
Composé (solvant)	**R**	**X**	**λ_{abs} max 1 photon (nm)**	**λ_{abs} max 2 photons (nm)**	**Φ_F**
163a N (Toluène)	H	CH_2	314, 427	742	0.99
163a E (Toluène)			374, 490	781, 963	0.48
206 N (Toluène)		CH_2	326, 437	766, 922	1
206 E (Toluène)			389, 490	820, 967	0.61
208 N (Toluène)		CH_2	356, 439	786, 934	0.61
208 E (Toluène)			362, 491	838	0.78
211 N (Dichlorométhane)	H	O	314, 426	733	0.27
211 E (Dichlorométhane)			373, 505	781, 973	0.5
212 N (Dichlorométhane)		O	322, 413	**747**	**0.02**
212 E (Dichlorométhane)			369, 505	**809, 969**	**0.49**
213 N (Dichlorométhane)		O	362, 436	779	0.03
213 E (Dichlorométhane)			367, 503	814, 910	0.02

Tableau 27 : Longueurs d'ondes maximales d'absorption à un photon et à deux photons des analogues synthétisés. Les valeurs des rendements quantiques de fluorescence sont également rappelées.

1.2 Synthèse de sondes pour l'analyse et l'isolement de produits naturels azaphiles

Le deuxième aspect de ce travail de thèse se consacre à la détection et l'isolement de nouveaux produits naturels azaphiles présents au sein d'extraits naturels. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Prof. Soizic Prado du Muséum National d'Histoire Naturelle dont l'équipe est spécialisée dans l'isolement de produits naturels et possède une grande collection d'extraits biologiques. La stratégie envisagée se divise en deux parties : l'une orientée sur l'analyse des extraits naturels de manière à identifier rapidement par spectrométrie de masse la présence de nouveaux produits naturels, l'autre se concentre sur l'amélioration de l'isolement des nouvelles molécules naturelles azaphiles ainsi détectées. L'étude préliminaire présentée dans ce manuscrit s'est focalisée sur la famille des azaphilones, dont les propriétés physico-chimiques sont bien connues au sein du laboratoire. Deux types de sondes ont donc été envisagés : la préparation d'une sonde, dite analytique, facilitant la détection des composés marqués en spectrométrie de masse et d'une sonde, dite préparative, possédant un groupement biotine qui permet une séparation des molécules naturelles marquées grâce à l'utilisation de l'interaction forte biotine-streptavidine.

La synthèse de la sonde analytique **264** possédant trois parties différentes a été réalisée avec un rendement de 31% sur trois étapes. Cette sonde se compose d'une partie réactive amine primaire, d'une

partie marqueur de masse par la présence d'un atome de brome possédant un motif isotopique caractéristique en spectrométrie de masse et d'un groupement phosphonium, porteur d'une charge fixe, permettant de faciliter la détection de la molécule et des adduits en spectrométrie de masse (Figure 276).

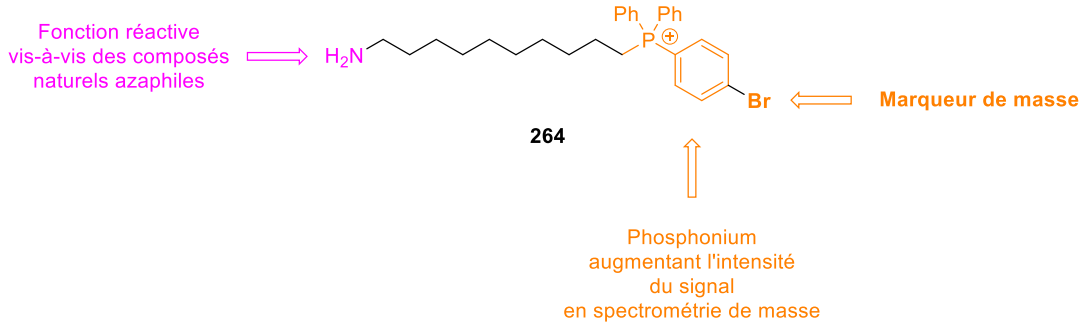


Figure 276 : Structure de la sonde analytique **264** synthétisée.

La sonde **264** ainsi préparée a pu être utilisée pour détecter des azaphilones dans un extrait naturel de *Talaromyces convolutus*. La comparaison entre les spectres de masse d'un échantillon d'extrait brut obtenus avant et après ajout de la sonde montre que toutes les azaphilones connues présentes dans l'extrait ont été marquées spécifiquement (Figure 277).

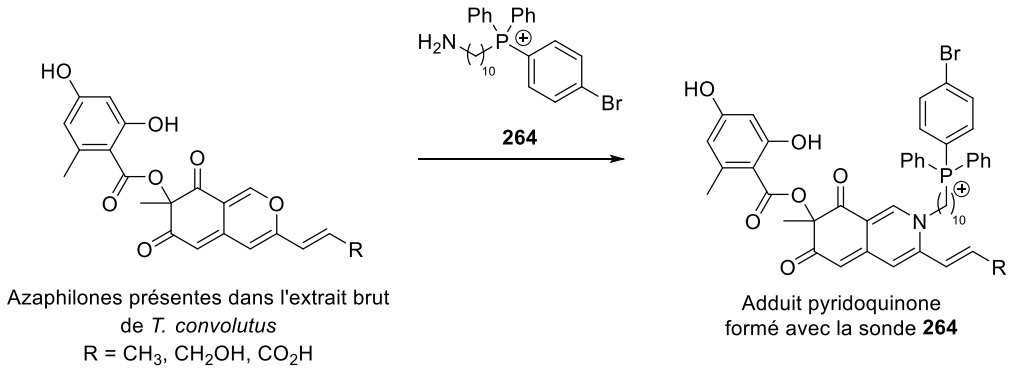


Figure 277 : Marquage par la sonde analytique des azaphilones de *T. convolutus*.

La structure de la sonde pour l'isolement (ou sonde préparative) nécessite la présence d'un groupement de séparation, ici la biotine. Celle-ci est liée de manière temporaire à la fonction réactive amine primaire grâce à l'utilisation d'un lien silylé facilement clivable en milieu acide. Malgré l'utilisation d'un lien clivable siloxane, connu et utilisé en protéomique, les sondes synthétisées *via* cette stratégie se sont révélées trop instables pour être utilisables (Figure 278).

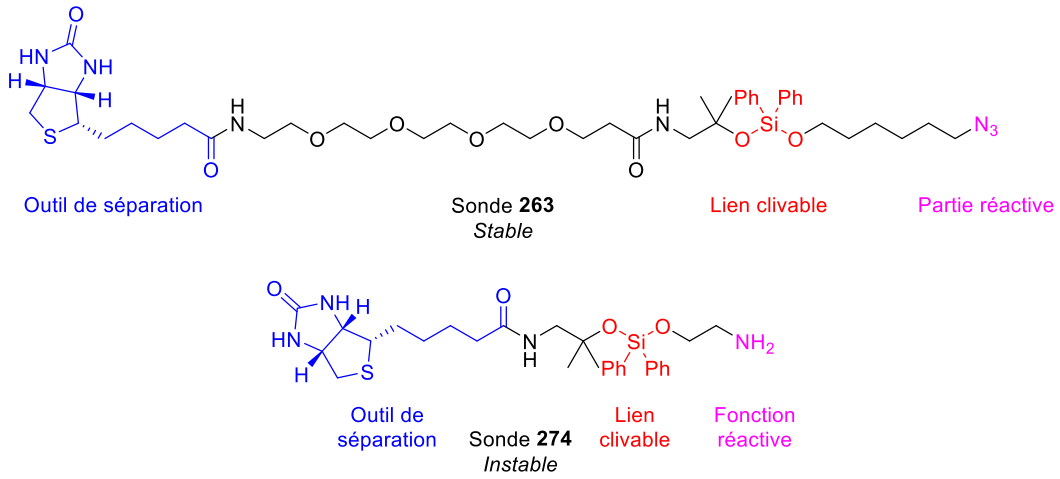


Figure 278 : Structure de la sonde siloxane **263** utilisée en protéomique et de la sonde **274** dont la synthèse a été réalisée au laboratoire.

Une deuxième stratégie utilisant un lien clivable éther silylé a été ensuite envisagée grâce au développement d'une méthodologie basée sur la réaction d'hydrosilylation. Dans ce cas, il a pu être mis en évidence que la fonction amine primaire était en grande partie responsable de l'instabilité des sondes synthétisées et n'a pas permis d'avancer plus loin sur cette partie du projet (Figure 279).

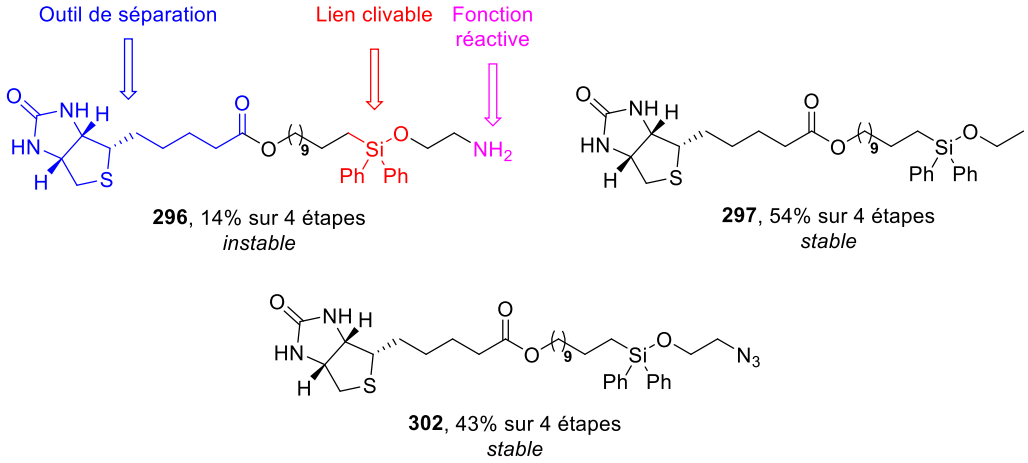


Figure 279 : Structures des dérivés de biotine possédant un lien clivable éther silylé synthétisés.

2 Perspectives

2.1 Synthèse de nouveaux analogues de l'epicocconone

En ce qui concerne la synthèse de sondes polyfonctionnelles basées sur le squelette des analogues de l'epicocconone, une des perspectives immédiatement envisageables est le développement d'une synthèse efficace de cyclooctyne permettant l'utilisation de la SPAAC en tant qu'étape clé pour introduire les groupements d'intérêt sur la partie fluorophore epicocconone (Figure 280).

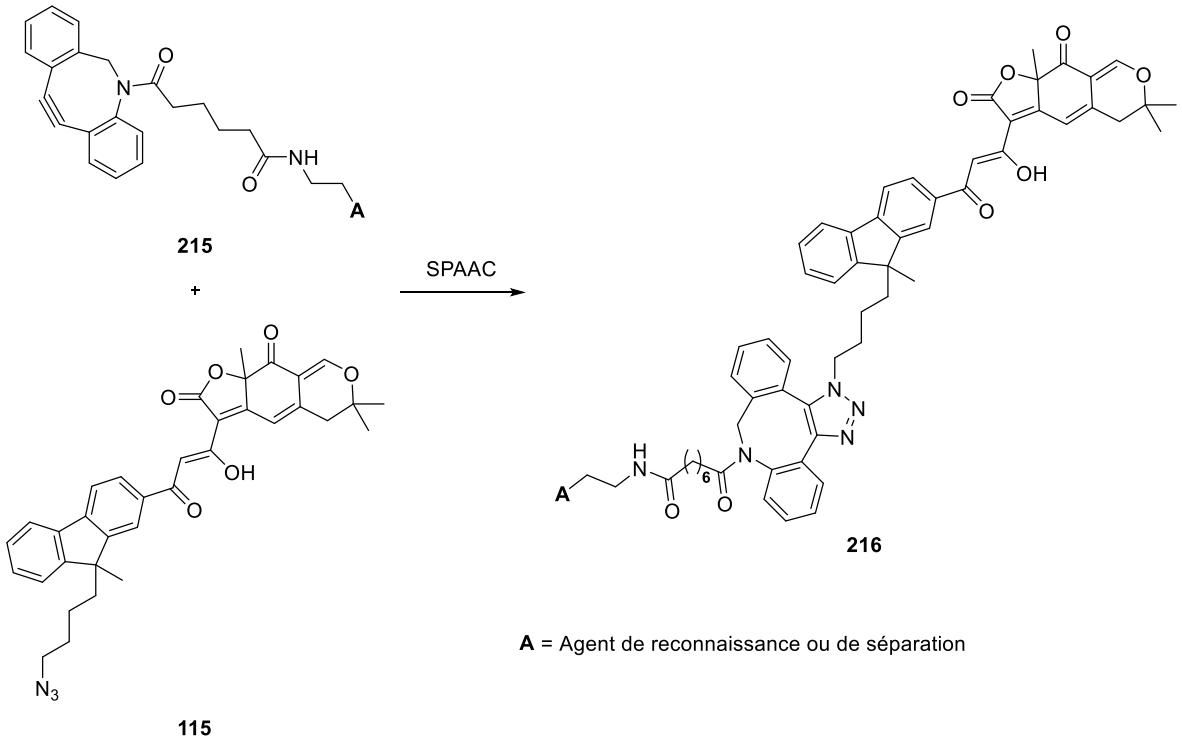


Figure 280 : Utilisation de la SPAAC pour l'obtention de sondes polyfonctionnelles. A désigne ici l'agent de séparation ou de reconnaissance.

Une autre possibilité pourrait être d'utiliser la réaction d'hydrosilylation pour coupler l'analogue de l'epicocconone et l'agent de reconnaissance ou de séparation, cette réaction commençant à être développée pour des applications en protéomique (Figure 281).

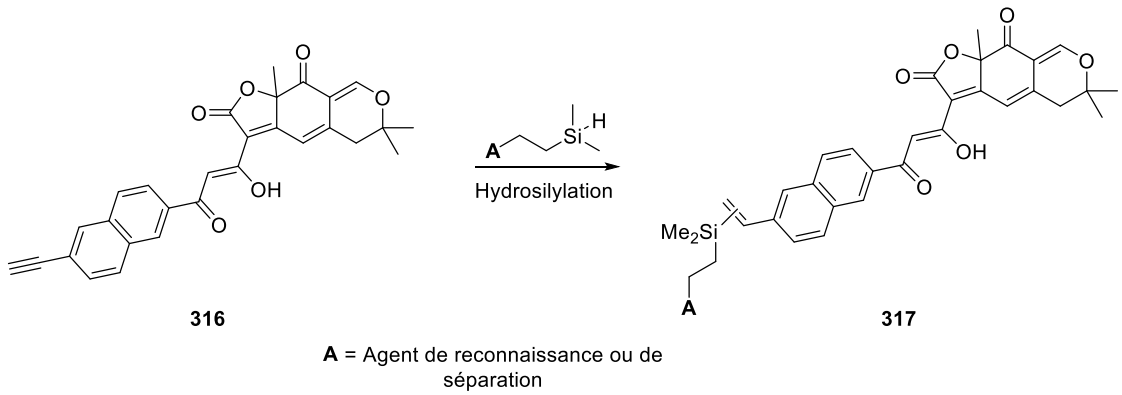
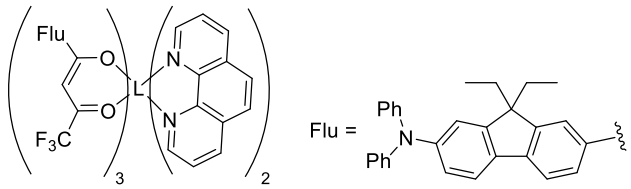


Figure 281 : Utilisation de l'hydrosilylation pour l'obtention de sondes polyfonctionnelles. A désigne ici l'agent de séparation ou de reconnaissance.

Enfin, il pourrait être très intéressant d'envisager la complexation de lanthanides sur les analogues de l'epicocconone optimisés pour l'absorption à deux photons. Récemment, l'équipe du Dr. Belfield a en effet reporté la synthèse de complexes de lanthanides émettant dans le proche infrarouge et dans l'infrarouge, dont l'un des ligands bidentate est un fluorène trifluoroacétylacétonate sensible à l'absorption à deux photons (Figure 282).[238]

[238] Woodward, A. W., Frazer, A., Morales, A. R., Yu, J., Moore, A. F., Campiglia, A. D., Jucov, E. V., V. Timofeeva, T., Belfield, K. D. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 16626-16639.



Complexe de lanthanide **318**
L = Yb, Nd, Eu

Figure 282 : Structure des complexes de lanthanides synthétisés par l'équipe du Dr. Belfield.

La sensibilité de ces complexes à l'absorption à deux photons et la large gamme d'émission du proche infrarouge à l'infrarouge lointain qui est liée aux transitions électroniques propres aux ions lanthanides, sensibilisés par la présence des chromophores fluorènes, permettrait d'obtenir des analogues très intéressant pour l'imagerie par microscopie de fluorescence.

2.2 Synthèse de sondes pour l'identification et l'isolement de produits naturels azaphiles

Bien que des résultats intéressants ait été obtenus sur la sonde analytique **274** développée lors de ce projet, la synthèse d'une sonde préparative portant un motif biotine reste un défi synthétique. L'introduction d'une contrainte stérique pouvant limiter l'interaction intramoléculaire entre le lien clivable et l'amine primaire pourrait initier des pistes de résolution des problèmes d'instabilités rencontrés durant cette partie du projet (Figure 283).

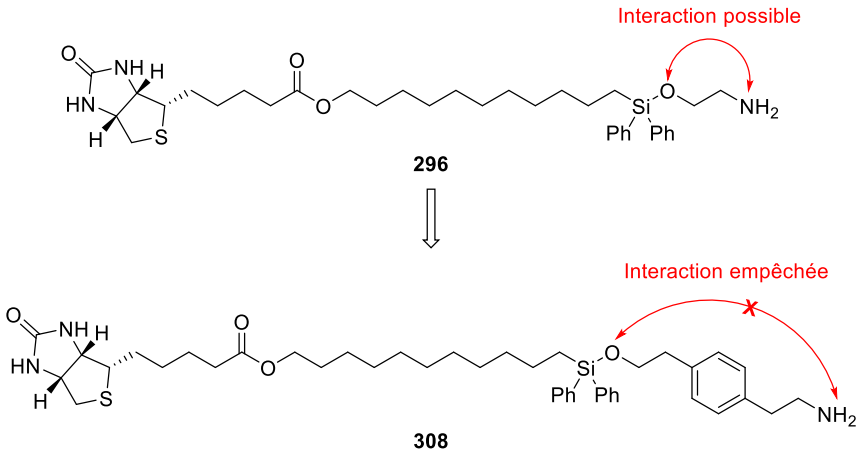


Figure 283 : Modification structurale possible de la sonde **296** pour étudier l'interaction intramoléculaire entre le lien clivable et l'amine primaire.

L'utilisation en protéomique de la réaction d'hydrosilylation par le groupe du Prof. Spring (voir chapitre 2) pour lier un silane portant le groupement biotine à des protéines portant un alcyne clivable laisse toutefois d'autres pistes intéressantes pour obtenir une sonde préparative (Figure 284).

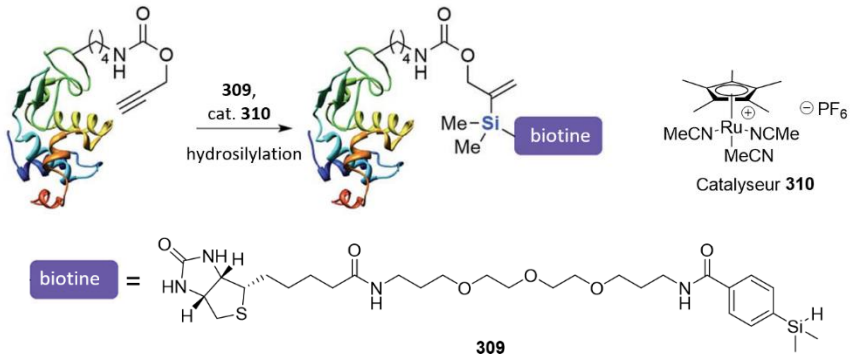


Figure 284 : Exemple d'utilisation de l'hydrosilylation en protéomique en présence d'un catalyseur à base de ruthénium.

L'utilisation de conditions similaires permettrait d'effectuer la réaction d'hydrosilylation à température ambiante sur des groupements silylés moins encombrés et donc autoriser l'emploi d'alcools pour le piégeage du chlorosilane généré dans la stratégie développée au laboratoire durant ce projet (Figure 284).

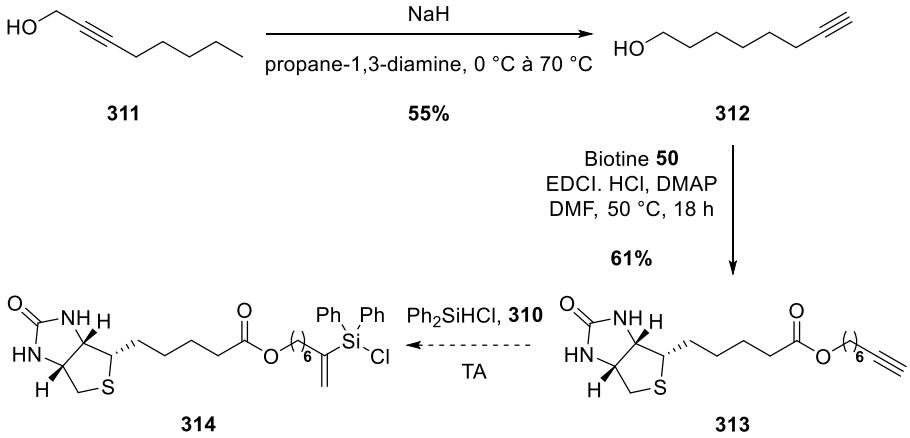


Figure 285 : Utilisation de l'hydrosilylation à température ambiante pour former un chlorosilane sur un dérivé de biotine portant une fonction alcyne terminal.

Dans le cas où cette stratégie ne permettrait pas d'accéder à une structure stable, un changement de lien clivable sera à envisager. Il pourrait être possible d'utiliser le lien, clivable en présence de fluorures (TBAF) développé par l'équipe du Prof. Kim (voir chapitre 2) sur les résines d'affinité (Figure 286).

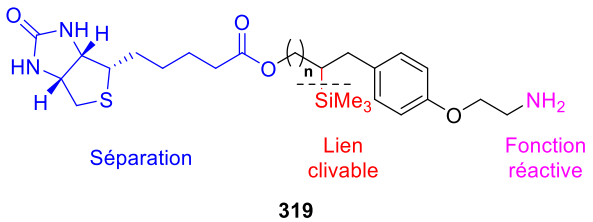


Figure 286 : Structure de la sonde **319** basée sur un lien clivable utilisé par l'équipe du Prof. Kim.

Finalement les conditions d'hydrosilylation à température ambiante décrite par l'équipe du Prof. Spring pourraient être appliquées à la synthèse de nouvelles sondes ciblant les produits naturels portant une fonction alcyne (Figure 287).

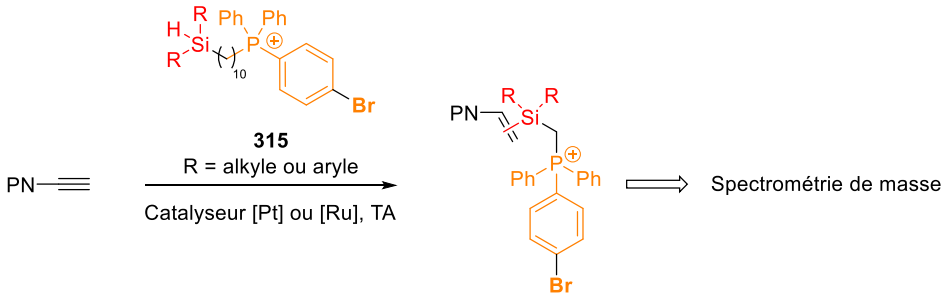


Figure 287 : Exemple de sonde analytique ciblant les produits naturels porteurs d'une fonction alcyne.

Partie expérimentale

1 General information

Unless otherwise noted, ^{1}H NMR spectra were recorded at 300 MHz, ^{13}C NMR spectra at 76 MHz. Residual solvent peaks were used as reference. Data for ^{1}H are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, sex = sextet, sept = septet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration and attribution.

Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer. The bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimeters (cm^{-1}). Absorption are described as s (strong), m (medium), w (weak), and br (broad).

Melting points were measured on a microscopic apparatus and are uncorrected.

Analytical RP-HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. Semi-preparative HPLC was performed on a Thermo Scientific SPECTRA SYSTEM liquid chromatography system (P4000) equipped with a UV-Vis 2000 detector.

LC-MS was performed on a Bruker HCT Ultra ETD II using LC Agilent 1200 series equipped with an electrospray ionization (ESI) source detector.

Low-resolution mass spectra (LRMS) were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray ionization (ESI) source. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded either on a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an ESI source or on a LCT Premier XE bench top orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an ESI source.

UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, light path 10 × 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 × 4 mm, chamber volume: 1400 µL, excitation filter: auto and emission filter: open, excitation and emission slit: 5 nm).

All commercially compounds were used as received, unless otherwise stated. All solvents were distilled prior to use. THF was distilled from sodium benzophenone ketyl under argon. DCM was distilled from phosphorus pentoxide under argon and EtOH from $Mg(OEt)_2$ under argon. All air and water sensitive reactions were carried out under argon atmosphere. All the reactions were monitored by TLC on precoated plates (Merck silica gel 60 F 254) and the products were visualized with 254/365 nm UV followed by ethanolic PMA or $KMnO_4$. Purification of products was accomplished using flash chromatography (Sigma Aldrich 60, 40-63 µm).

2 Methods

2.1 HPLC system

RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 µm, 2.1 × 100 mm) with CH_3CN and 0.1% trifluoroacetic acid (aq. TFA 0.1%, pH 2.0) as eluents [100% TFA (5 min) then linear gradient from 0% to 100% (45 min) of CH_3CN] at a flow rate of 0.25 mL/min was used. UV-vis detection was achieved with the Max Plot (*i.e.* chromatogram at absorbance maximum for each compound, mode: 220-650 nm).

2.2 Photophysical properties

2.2.1 1 photon absorption and emission spectra in water (pH = 2.5) with SDS (0.1% w/v)

Stock solutions : Epicocconone analogues were dissolved in DMSO (Sigma Aldrich, Bio Ultra for molecular analysis) or MeCN (VWR, HPLC grade, 99.7+% min.) at 1 mg/mL.

Mother buffer : Citric acid (10.505 g), sodium tetraborate (9.535 g), tris(hydroxymethyl)aminomethane (6.055 g), sodium dihydrogenphosphate (6.000 g) and lithium chloride (2.100 g) were dissolved in water (500 mL).

Buffer *a* : pH = 2.5, prepared from mother buffer and adjusted to pH = 2.5 with a solution of 2 M hydrochloric acid, containing SDS (0.1% w/v).

Buffer *b* : pH = 10.5, prepared from mother buffer and adjusted to pH = 10.5 with a solution of 2 M sodium hydroxyde, containing BSA (1 mg/mL).

Analogues 92, 114, 163a, 163b, 206, 208, 211, 212 and 213 :

Without BSA : To the 3.5 mL rectangular quartz cell, 40 µL of stock dye solution and 2960 µL of buffer *a* were sequentially added. The resulting mixture was homogenised by inversion for 30 s at 25 °C and the absorption spectra recorded from 250 to 800 nm. Emission spectra were recorded under the same conditions on the sample after excitation at 420 nm.

With BSA : To the 3.5 mL rectangular quartz cell, 160 µL of dye stock solution and 120 µL of buffer *b* were added. The resulting reaction mixture was homogenised by inversion. After 15 min, 2720 µL of buffer *a* was added. The resulting reaction mixture was homogenized by inversion for 30 s, at 25 °C, the absorption spectra were recorded from 250 to 800 nm. Emission spectra were recorded under the same conditions on the same sample after excitation at 488 nm.

2.2.2 1 photon absorption and emission spectra in CH_2Cl_2 or Toluene

Stock solutions :

- Epicocconone analogues were dissolved in CH_2Cl_2 (VWR, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, stabilized) or Toluene (Sigma Aldrich, ACS spectrophotometric grade, >99.5%) at 1 mg/mL.
- *n*- butylamine (Sigma Aldrich, 99.5%) was dissolved in CH_2Cl_2 or Toluene at 0.1 M.

Analogues 163a, 206, 208, 211, 212 and 213 :

Without *n*-butylamine : To the 3.5 mL rectangular quartz cell, 40 µL of stock dye solution and 2960 µL of the corresponding organic solvent were sequentially added. The resulting mixture was

homogenised by inversion for 30 s at 25 °C and the absorption spectra recorded from 250 to 800 nm. Emission spectra were recorded under the same conditions on the sample after excitation at 420 nm.

With *n*-butylamine : To the 3.5 mL rectangular quartz cell, 100 µL of dye stock solution and 30 eq. of *n*-butylamine in the corresponding stock solvent was added. The resulting reaction mixture was homogenised by inversion. After 15 min, the cell was filled up to 3 mL with the corresponding organic solvent. The resulting reaction mixture was homogenized by inversion for 30 s, at 25 °C, the absorption spectra were recorded from 250 to 800 nm. Emission spectra were recorded under the same conditions on the same sample after excitation at 488 nm.

2.2.3 Quantum yields determination

Relative quantum yields were measured on the above solutions at 25 °C using rhodamine 6G (Φ_F = 0.95 in ethanol at 488 nm) as a standard for the BSA or *n*-butylamine-reacted dyes and Lucifer Yellow CH (Φ_F = 0.21 in water at 420 nm) for the native dyes.

The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yields :

$$\Phi_F(x) = \frac{f_s}{f_x}\frac{F_x}{F_s}\frac{{n_x}^2}{{n_s}^2}\Phi_F(s)$$

Where *f* is the absorption factor (*f* = 1 – 10–A, where A = Absorbance at the excitation wavelength), *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.

2.2.4 2 photons absorption spectra and cross-section determination in CH_2Cl_2 or Toluene

Measurements were recorded using a confocal spectral microscope Zeiss LSM 710 equipped with a femtoseconde laser source (accordable Titane : Sapphire, 40 mW).

Analogues 163a, 206, 208, 211, 212 and 213 :

Stock solutions :

- Epicocconone analogues were dissolved in CH_2Cl_2 (VWR, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, stabilized) or Toluene (Sigma Aldrich, ACS spectrophotometric grade, >99.5%) at 1 mg/mL.
- *n*- butylamine (Sigma Aldrich, 99.5%) was dissolved in CH_2Cl_2 or Toluene at 0.1 M.

Without *n*-butylamine : To the 3.5 mL rectangular quartz cell, 40 µL of stock dye solution and 2960 µL of the corresponding organic solvent were sequentially added. The resulting mixture was homogenised by inversion for 30 s at 25 °C and the absorption spectra recorded by scanning the sample ranging from 720 to 1050 nm with successive (10 nm step) wavelength.

With *n*-butylamine : To the 3.5 mL rectangular quartz cell, 100 µL of dye stock solution and 30 eq. of *n*-butylamine in the corresponding stock solvent was added. The resulting reaction mixture was homogenised by inversion. After 15 min, the cell was filled up to 3 mL with the corresponding organic solvent. The resulting reaction mixture was homogenized by inversion for 30 s, at 25 °C, the absorption spectra were recorded by scanning the sample ranging from 720 to 1050 nm with successive (10 nm step) wavelength.

Cross-section values were mesured on the above solutions at 25 °C using Fluorescein (Φ_F = 0.95 in NaOH 2M at 496 nm, δ = 11.3 at 926 nm[239]), Courmarine 510 (Φ_F = 0.85 in EtOH at 496 nm[240]), Coumarine 540 (Φ_F = 1 in MeOH at 480 nm[241], 40 GM at 800 nm) and Styryl 9M[242] (Φ_F = 0.54 in DMSO at 700 nm, δ = 8.4 GM in $CHCl_3$ at 1552 nm) as standards.

The following equation was used to determine the relative cross-section values :

$$\delta(\lambda) = \frac{I_x}{I_s}\frac{{n_x}^2 \Phi_{Fx} c_s}{{n_s}^2 \Phi_{Fs} c_x}\delta_R(\lambda)$$

Where *I* is the area under the absorption curve, *n* is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, Φ_F is the quantum yield, *c* is the concentration and the subscripts *s* and *x* represent standard and unknown, respectively.

2.3 LC-MS method

RP-LC (kinetex C_{18} column, 2.6 µm, 2.1 × 100 mm) with CH_3CN and 0.1% formic acid (aq. FA 0.1%, pH 4.1) as eluents [linear gradient from 10% to 90% (30 min) of CH_3CN then 90% CH_3CN (5 min)] at a flow rate of 0.4 mL/min was used. MS detection was achieved using ESI positive mode scanning from 200 to 1500.

Stock solutions :

- crude extract of *Talaromyces convolutus* was solubilized in CH_2Cl_2 (VWR, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, stabilized) at 10 mg/mL.
- Probe was solubilized in CH_2Cl_2 (VWR, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, stabilized) at 2 mg/mL.

Without probe : Mass spectra were recorded by injecting 2 µL of the crude extract stock solution.

With probe : To 20 µL of the crude extract solution was added 500 µL of the probe stock solution. The resulting mixture was homogenized by inversion for 30 s. Mass spectra were recorded by injecting 2 µL of the above mixture.

2.4 Cyclic voltametry

Voltametric experiments were carried out in a three-electrode configuration cell under argon in MeCN solutions containing 0.1 mol/L Bu_4NBF_4. The working microelectrode was a gold disk electrode (∅ = 0.25 mm) and a platinum counter electrode was used. In all cases the potentials were referenced to a saturated calomel electrode. All the experiments were performed with a computer interfaced to a BioLogic® SP-300 model potentiostat.

[239] Chandra Jha, P., Wang, Y., Ågren, H. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 111-116.

[240] Fletcher, A. N., Bliss, D. E., Kauffman, J. M. *Opt. Commun.* **1983**, *47*, 57-61.

[241] Roubinet, B. *Développement de nouveaux outils chimiques pour la conception d'un système de détection fluorogénique des réactions catalysées par les polymérases*, Université de Rouen, Thèse de doctorat soutenue en 2015, p 232.

[242] Berezin, M. Y., Zhan, C., Lee, H., Joo, C., Akers, W. J., Yazdanfar, S., Achilefu, S. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 11530-11535.

Analogues 60, 208 and triphenylamine 214 :

Stock solutions :

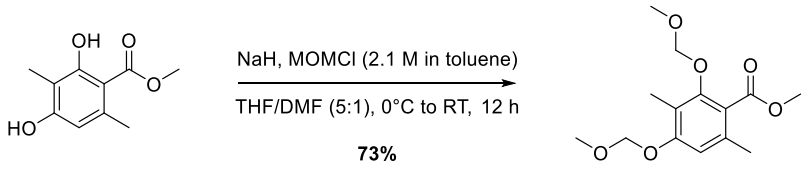
- Epicocconone analogues were dissolved in MeCN at 1 mg/mL.
- Triphenylamine **214** was dissolved in MeCN at 100 mg/mL.

Without *n*-butylamine : To the 5 mL cell was dissolved Bu_4NBF_4 in 4 mL of MeCN at 0.1 mol/L. To the above mixture was added 1 mL of the stock solution. The resulting mixture was stirred at 25 °C for 15 min and cyclic voltametry curves were recorded.

With *n*-butylamine : To the 5 mL cell was dissolved Bu_4NBF_4 in 4 mL of MeCN at 0.1 mol/L. To the above mixture was added 1 mL of the dye stock solution and 30 eq. of *n*-butylamine. The resulting mixture was stirred at 25 °C for 15 min and cyclic voltametry curves were recorded.

3 Experimental data

Methyl 2,4-bis(methoxymethoxy)-3,6-dimethylbenzoate 66



64
$C_{10}H_{12}O_4$
196.20

66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

To a solution of methyl atratate **64** (20.0 g, 102 mmol) in THF/DMF (150 mL/30 mL) was added portionwise at 0 °C NaH (12.2 g, 306 mmol). After 15 min at 0 °C a 2.1 M solution of MOMCl in toluene (146 mL, 306 mmol) was added at 0 °C. After 12 h at RT a saturated solution of NH_4Cl (150 mL) was added slowly at 0 °C. The reaction mixture was extracted with EtOAc (3x300 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (20.3 g, 71.3 mmol, 73%) as a colourless oil.

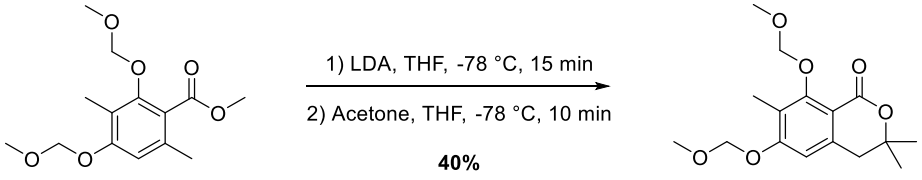
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.72 (s, 1H, Ar**H**), 5.19 (s, 2H, OC**H$_2$**), 4.96 (s, 2H, OC**H$_2$**), 3.89 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.54 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.28 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.15 (s, 3H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 168.8 (**C**), 157,1 (**C**), 154.2 (**C**), 134.9 (**C**), 122.4 (**C**), 118.6 (**C**), 111.8 (**C**H), 100.4 (**C**H_2), 94.5 (**C**H_2), 57.6 (**C**H_3), 56.2 (**C**H_3), 52.1 (**C**H_3), 20.1 (**C**H_3), 9.6 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2952 (br), 2838 (w), 1724 (s), 1606 (m), 1436 (w), 1389 (w), 1315 (w), 1274 (s), 1209 (w), 1191 (w), 1144 (s), 1114 (s), 1087 (m), 1054 (s), 1041 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 263 (10%) $[M\text{-}MOM+Na]^+$.

6,8-bis(methoxymethoxy)-3,3,7-trimethylisochroman-1-one 63



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

63
$C_{16}H_{22}O_6$
310.35

To a solution of DIPA (9.0 mL, 63.3 mmol) in THF (130 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (25.5 mL, 63.3 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of the atratate **66** (12.0 g, 42.2 mmol) in THF (20 mL) was added at -78 °C. After 15 min at -78 °C, freshly distilled acetone (3.1 mL, 42.2 mmol) was added at -78 °C. After 10 min at -78 °C a saturated solution of NH_4Cl (100 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (5.2 g, 16.8 mmol, 40%) as a yellow oil.

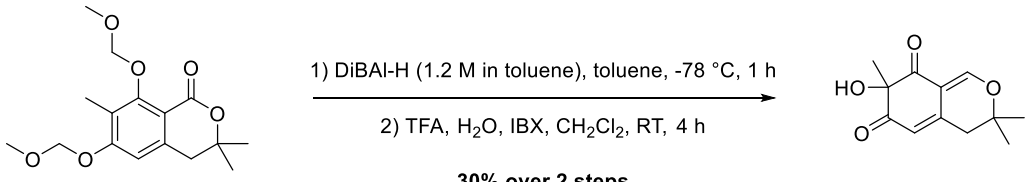
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.69 (s, 1H, Ar**H**), 5.25 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.10 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.61 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.49 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.92 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.22 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 162.6 (**C**), 160.0 (**C**), 159.3 (**C**), 138.9 (**C**), 121.4 (**C**), 111.2 (**C**), 108.7 (**C**H), 101.6 (**C**H_2), 94.3 (**C**H_2), 79.4 (**C**), 57.7 (**C**H_3), 56.5 (**C**H_3), 40.7 (**C**H_2), 27.3 (2x**C**H_3), 9.6 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2928 (br), 2110 (w), 1700 (s), 1596 (s), 1474 (w), 1291 (s), 1149 (s), 1108 (s), 1047 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 311 $[M+H]^+$ (100%).

7-hydroxy-3,3,7-trimethyl-3,4-dihydro-6H-isochromene-6,8(7H)-dione 61



63
$C_{16}H_{22}O_6$
310.35

61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

To a solution of the lactone **63** (3.5 g, 11.3 mmol) in toluene (100 mL) was added dropwise at -78 °C a 1.2 M solution of DiBAl-H in toluene (9.4 mL, 11.3 mmol). After 30 min at -78 °C a 1.2 M solution of DiBAl-H (4.9 mL, 5.7 mmol) was added. After 30 min at -78 °C a 1M solution of HCl (100 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x100 mL). The organic phases were combined, washed with a 1 M solution of HCl (2x100 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording quantitatively the corresponding lactol which was used without any further purification.

To a solution of the crude lactol (3.51 g, 11.3 mmol) in CH_2Cl_2 (100 mL) were added TFA (6.1 mL, 79.1 mmol), H_2O (4.1 mL, 226 mmol) and IBX (6.33 g, 22.6 mmol) and the mixture was vigorously stirred. After 4 h at RT the reaction mixture was filtered on a short pad of silica with CH_2Cl_2 (2x100 mL) and the filtrate was concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40%-50%-60% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.75 g, 3.39 mmol, 30%) as an orange solid.

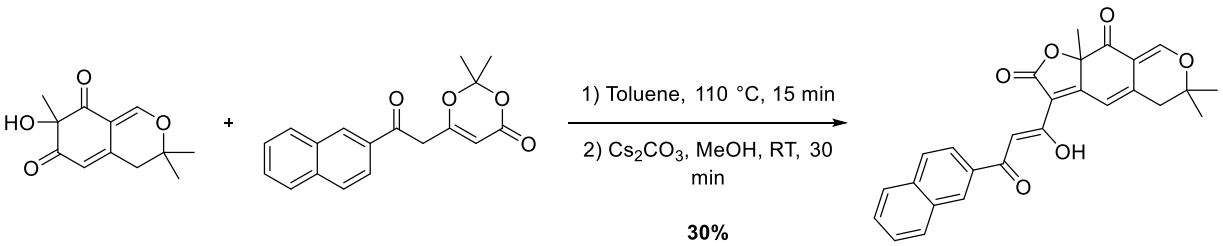
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.79 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, C**H**), 5.81 (dd, *J* = 2.6, 1.3 Hz, 1H, C**H**), 3.78 (br. s, 1H, O**H**), 2.68 (s, 2H, C**H$_2$**), 1.53 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.42 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 197.6 (**C**), 195.0 (**C**), 158.9 (**C**H), 146.9 (**C**), 116.6 (**C**H), 109.6 (**C**), 83.1 (**C**), 81.1 (**C**), 39.7 (**C**H_2), 28.8 (**C**H_3), 26.5 (**C**H_3), 26.0 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3430 (br), 2979 (w), 1706 (s), 1661 (s), 1568 (m), 1275 (m), 1179 (m), 1088 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 223 $[M+H]^+$ (100%).

(Z)-3-(1-hydroxy-3-(naphthalen-2-yl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 60



61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

82
$C_{18}H_{16}O_4$
296.32

60
$C_{27}H_{22}O_6$
442.47

To a solution of the dioxinone **82** (0.16 g, 0.54 mmol) and alcohol **61** (0.1 g, 0.45 mmol) in toluene (5 mL) was added 4 Å M.S. (0.1 g). After 15 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT, filtered and concentrated *in vacuo*. The resulting oil was dissolved in MeOH (5 mL) and Cs_2CO_3 (0.3 g, 0.9 mmol) was added. After 30 min at RT a 1 M solution of HCl (20 mL) was added and the mixture was vigorously stirred. After 15 min at RT the mixture was extracted with EtOAc (3x10 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (60 mg, 0.14 mmol, 30 %) as an orange solid.

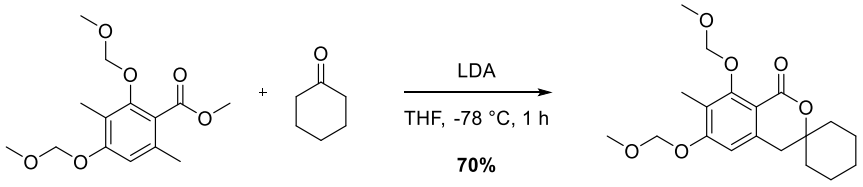
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.57 (s, 1H, C**H**), 8.06 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H, Ar**H**), 8.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.94-7.86 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.78 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.66 (s, 1H, C**H**), 7.63-7.52 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.14 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, C**H**), 2.80 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, C**H**H), 2.73 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, CH**H**), 1.75 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.48 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 3H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.4 (**C**), 189.9 (**C**), 172.6 (**C**), 168.5 (**C**), 167.3 (**C**), 159.4 (**C**H), 141.9 (**C**), 136.1 (**C**), 133.7 (**C**), 133.3 (**C**), 130.2 (**C**H), 129.9 (**C**H), 129.1 (**C**H), 129.0 (**C**H), 128.3 (**C**H), 127.4 (**C**H), 124.1 (**C**H), 115.2 (**C**), 114.0 (**C**H), 110.7 (**C**), 98.0 (**C**H), 81.7 (**C**), 40.3 (**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 27.0 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2981 (w), 1755 (s), 1709 (m), 1584 (s), 1374 (w), 1266 (s), 1177 (m), 1092 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 443 $[M+H]^+$ (100%).

6',8'-bis(methoxymethoxy)-7'-methylspiro[cyclohexane-1,3'-isochroman]-1'-one 91'



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

89i
$C_6H_{10}O$
98.14

91'
$C_{19}H_{26}O_6$
350.41

To a solution of DIPA (0.37 mL, 2.63 mmol) in THF (20 mL) at -78 °C was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (1.1 mL, 2.63 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (0.50 g, 1.75 mmol) in THF (5 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of cyclohexanone **89i** (0.15 mL, 1.4 mmol) in THF (5 mL) was added. After 1 h at -78 °C a saturated solution of NH_4Cl (10 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.34 g, 0.94 mmol, 70%) as a yellow oil.

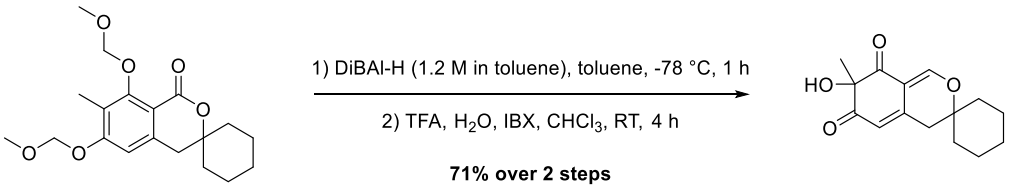
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.69 (s, 1H, Ar**H**), 5.25 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.10 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.62 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.5 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.92 (s, C**H$_2$**), 2.22(s, 3H, C**H$_2$**), 1.91-1.84 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.79-1.69 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.56-1.46 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 162.4 (**C**), 156.9 (**C**), 159.0 (**C**), 138.4 (**C**), 121.1(**C**), 111.6 (**C**), 108.7 (**C**H), 101.5 (**C**H_2), 94.2 (**C**H_2), 80.5 (**C**), 57.6 (**C**H_3), 56.4 (**C**H_3), 35.8 (2x**C**H_2), 25.4 (**C**H_2), 21.7 (2x**C**H_2), 9.48 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2925 (br), 2858 (w), 1705 (s), 1597 (s), 1451 (w), 1424 (w), 1320 (w), 1245 (s), 1157 (s), 1114 (s), 1088 (m), 1057 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 352 $[M+H]^+$ (100%).

7'-hydroxy-7'-methylspiro[cyclohexane-1,3'-isochromene]-6',8'(4'H,7'H)-dione 91



91'
$C_{19}H_{26}O_6$
350.41

91
$C_{15}H_{18}O_4$
262.31

To a solution of the lactone **91'** (0.30 g, 0.84 mmol) in toluene (15 mL) was added dropwise at -78 °C a 1.2 M solution of DiBAl-H in toluene (0.7 mL, 1.27 mmol). After 30 min at -78 °C a 1.2 M solution of DiBAl-H in toluene (0.35 mL, 0.64 mmol) was added. After 30 min at -78 °C a saturated solution of Rochelle salts (20 mL) was added and the mixture was stirred at RT for 1 h. The reaction mixture was extracted with EtOAC (3x30 mL). The organic phases were combined, washed with a 0.5 M solution of HCl (30 mL) and brine (30 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo* affording quantitatively the corresponding crude lactol as a colourless oil, which was used without any further purification.

To a solution of the crude lactol (0.3 g, 0.84 mmol) in $CHCl_3$ (15 mL) was added TFA (0.45 mL, 5.88 mmol). After 30 min at RT H_2O (0.15 mL, 16.8 mmol) and IBX (0.47 g, 1.68 mmol). After 3.5 h the reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (10%-30% EtOAc/cyclohexane then 100% EtOAc) affording the product (0.16 g, 0.59 mmol, 71% over 2 steps) as an orange oil.

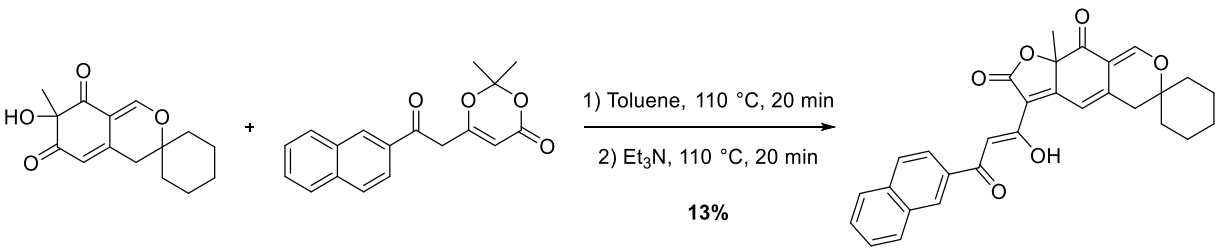
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.79 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, C**H**=C), 5.77 (q, *J* = 1.4 Hz, 1H, C**H**=C), 3.98-3.54 (br. s, 1H, O**H**), 2.64 (dd, *J* = 4.2, 1.2 Hz, C**H$_2$**), 1.86-1.79 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.65-1.51 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.49 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.44-1.39 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 197.5 (**C**), 195.1 (**C**), 158.9 (**C**H), 146.8 (**C**), 116.5 (**C**H), 109.8 (**C**), 83.0 (**C**), 82.0 (**C**), 38.7 (**C**H_2), 34.7 (**C**H_2), 34.2 (**C**H_2), 28.8 (**C**H_3), 24.9 (**C**H_2), 21.3 (**C**H_2), 21.2 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3422 (br), 2925 (m), 2858 (w), 1704 (m), 1645 (m), 1606 (s), 1564 (s), 1441 (m), 1414 (m), 1281 (m), 1251 (m), 1230 (s), 1178 (s), 1120 (m), 1083 (s), 1015 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^-$) 261 $[M-H]^-$ (55%).

(Z)-3'-(1-hydroxy-3-(naphthalen-2-yl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)-9a'-methylspiro[cyclohexane-1,6'-furo[3,2-g]isochromene]-2',9'(5'H,9a'H)-dione 92



91
$C_{15}H_{18}O_4$
262.31

82
$C_{18}H_{16}O_4$
296.32

92
$C_{30}H_{26}O_6$
482.53

To a solution of alcohol **61** (85 mg, 0.32 mmol) in toluene (3 mL) were added dioxinone **82** (144 mg, 0.49 mmol) and 4 Å molecular sieves (64 mg). After 20 min at 110 °C Et_3N (89 µL, 0.64 mmol) was added. After 20 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT, quenched with 1 M HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3x10 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrate *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (20 mg, 0.042 mmol, 16%) as an orange oil.

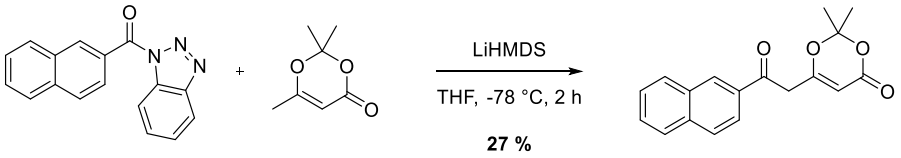
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.57 (s, 1H, C**H**), 8.07 (dd, *J* = 8.6, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 8.01 (br. d, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar**H**), 7.94-7.87 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.82 (s, 1H, C**H**), 7.66 (s, 1H, Ar**H**), 7.59 (dp, *J* = 7.0, 1.6 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.14 (br. d, *J* = 0.9 Hz, 1H, C**H**), 2.76 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, C**H**H), 2.74 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, CH**H**), 1.93-1.83 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.74 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.69-1.47 (m, 8H, 4xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.1 (**C**), 189.8 (**C**), 174.4 (**C**), 168.3 (**C**), 168.1 (**C**), 158.7 (**C**H), 141.3 (**C**), 135.6 (**C**), 133.1 (**C**), 132.7 (**C**), 129.7 (**C**H), 129.3 (**C**H), 128.5 (**C**H), 128.4 (**C**H), 127.8 (**C**H), 126.8 (**C**H), 123.5 (**C**H), 114.4 (**C**), 113.4 (**C**H), 110.9 (**C**), 97.4 (**C**H), 86.4 (**C**), 82.4 (**C**), 39.1 (**C**H_2), 34.8 (**C**H_2), 34.5 (**C**H_2), 28.0 (**C**H_3), 25.0 (**C**H_2), 21.4 (**C**H_2), 21.3 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1727 (s), 1677 (s), 1642 (m), 1373 (s), 1317 (m), 1272 (s), 1200 (s), 1180 (s), 1124 (m), 1016 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 483 $[M+H]^+$ (25%).

2,2-dimethyl-6-(2-(naphthalen-2-yl)-2-oxoethyl)-4H-1,3-dioxin-4-one 82



71
$C_{17}H_{11}N_3O$
273.30

66
$C_7H_{10}O_3$
142.15

82
$C_{18}H_{16}O_4$
296.32

To a solution of HMDS in THF (40 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (8.1 mL, 20.0 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and dioxinone **66** (2.63 mL, 20.0 mmol) was added. After 2 h at -78 °C a solution of benzotriazol ester **71**in THF (10 mL) was added. After 2 h at -78 °C a solution of 1 M HCl (20 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x200 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-30% EtOAc/cyclohexane) affording the product as a white solid. Recrystallization from Et_2O afforded the pure product (0.78 g, 2.63 mmol, 27%) as a white solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 (s, 1H, Ar**H**), 7.98-7.94 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.91-7.86 (m, 2H, Ar**H**), 7.65-7.54 (m, 2H, 2xAr**H**), 5.48 (s, 1H, C=C**H**), 4.01 (s, 2H, C**H$_2$**), 1.70 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

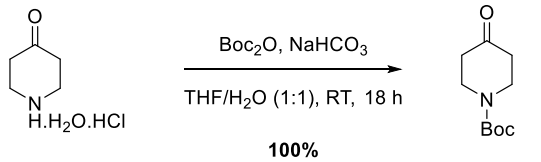
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 193.3 (**C**), 165.7 (**C**), 161.1 (**C**), 136.1 (**C**), 133.4 (**C**), 132.6 (**C**), 130.7 (**C**H), 129.9 (**C**H), 129.4 (**C**H), 129.1 (**C**H), 128.1 (**C**H), 127.4 (**C**H), 123.8 (**C**H), 107.6 (**C**), 97.3 (**C**H), 43.6 (**C**H_2), 25.3 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3002 (br), 1723 (s), 1676 (s), 1641 (s), 1600 (m), 1465 (w), 1389 (s), 1373 (s), 1352 (s), 1272 (s), 1249 (s), 1200 (s), 1181 (s), 1121 (m), 1015 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 296 $[M+H+MeCN]^+$ (100%).

Partie expérimentale

Tert-butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate 88a



88'
$C_5H_{12}ClNO_2$
153.61

88a
$C_{10}H_{17}NO_3$
199.25

To a solution of $NaHCO_3$ (13.1 g, 156.0 mmol) and 4-piperidone **88'** (8.0 g, 52.0 mmol) in H_2O (90 mL) was added at 0 °C a solution of Boc_2O (13.1 mL, 57.2 mmol) in THF (90 mL). After 18 h at RT the reaction mixture was concentrated *in vacuo* to approximately half of its volume. The residue was partitioned between Et_2O (200 mL) and H_2O (100 mL). The organic phase was separated, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (50% Et_2O/cyclohexane) afforded the product (10.4 g, 52.0 mmol, 100%) as a white solid.

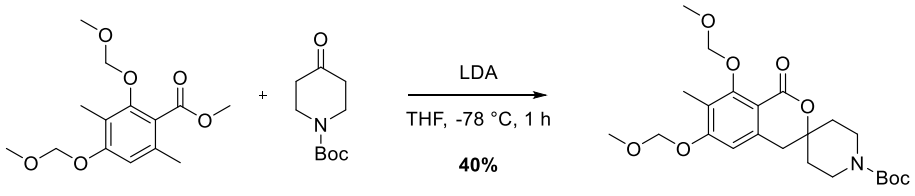
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.71 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, 2xCH_2), 2.43 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, 2xCH_2), 1.49 (s, 9H, $(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 207.9 (**C**), 154.4 (**C**), 80.4 (**C**), 41.1 (4x**C**H_2), 28.3 ((**C**H_3)$_3$)

IR (neat, cm^{-1}) 2979 (br), 1808 (w), 1755 (m), 1689 (m), 1475 (w), 1398 (w), 1372 (m), 1311 (w), 1235 (w), 1212 (m), 1163 (m), 1114 (s), 1062 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 236 $[M\text{-}Boc+TFA+Na]^+$ (10%).

Tert-butyl 6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methyl-1-oxospiro[isochromane-3,4'-piperidine]-1'-carboxylate 89a



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

88a
$C_{10}H_{17}NO_3$
199.25

89a
$C_{23}H_{33}NO_8$
451.52

To a solution of DIPA (0.37 mL, 2.63 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (1.1 mL, 2.63 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (0.50 g, 1.76 mmol) in THF (5 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of 4-piperidone **88a** (0.35 g, 1.76 mmol) in THF (5 mL) was added. After 1 h at -78 °C a saturated solution of NH_4Cl (20 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x60 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.32 g, 0.71 mmol, 40%).

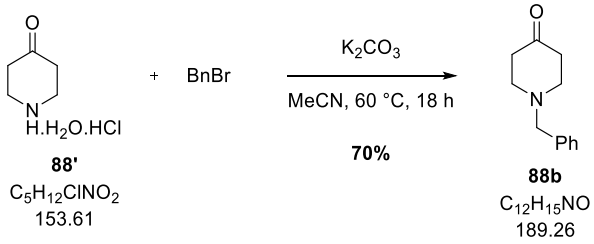
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.71 (s, 1H, Ar**H**), 5.25 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.10 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.91-3.75 (m, 2H, C**H$_2$**), 3.62 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.5 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.31 (t, *J* = 12.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.93 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.22 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.88 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.64-1.54 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.46 (s, 9H, (C**H$_3$**)$_3$).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 161.5 (**C**), 159.9 (**C**), 158.9 (**C**), 154.4 (**C**), 137.3 (**C**), 121.2 (**C**), 111.1 (**C**), 108.6 (**C**H), 101.1 (**C**H_2), 93.9 (**C**H_2), 79.4 (**C**), 77.8 (**C**), 57.5 (**C**H_3), 56.1 (**C**H_3), 39.3 (4x**C**H_2), 35.1 (**C**H_2), 28.1 ((**C**H_3)$_3$), 9.3 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2925 (br), 1688 (s), 1598 (s), 1425 (s), 1393 (m), 1366 (m), 1279 (m), 1237 (s), 1152 (s), 1113 (s), 1054 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 352 $[M\text{-Boc}+H]^+$ (100%).

1-benzylpiperidin-4-one 88b



To a solution of 4-piperidone **88'** (8.0 g, 52.0 mmol) in MeCN (200 mL) were added at 0 °C K_2CO_3 (18.0 g, 130 mmol) and BnBr (7.4 mL, 62.4 mmol). After 18 h at 60 °C the reaction mixture was filtered and the filter cake was rinsed with MeCN (150 mL). The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL) and a saturated solution Of $NaHCO_3$ (50 mL) was added. The aqueous phase was separated and extracted with CH_2Cl_2 (2x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (40% EtOAc/cyclohexane then 100% EtOAc) afforded the product (6.79 g, 36.4 mmol, 70%) as a yellow oil.

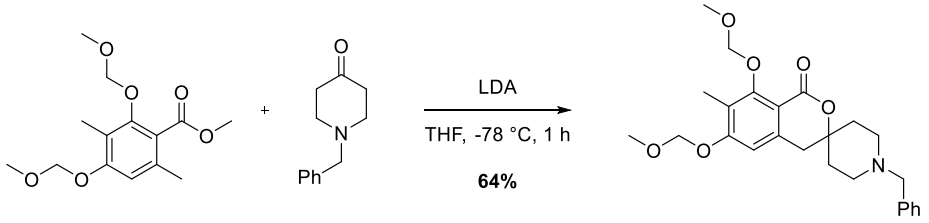
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39-7.29 (m, 5H, 5xAr**H**), 3.64 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.76 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.47 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 208.9 (**C**), 137.8 (**C**), 128.6 (2x**C**H), 128.1 (2x**C**H), 127.0 (**C**H), 61.6 (**C**H_2), 52.6 (2x**C**H_2), 41.0 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2966 (br), 2899 (br), 2798 (m), 2758 (m), 1714 (s), 1495 (w), 1448 (m), 1349 (s), 1319 (m), 1196 (s), 1125 (m), 1071 (m), 1011 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 399 $[M+TFA+H_2O+Br]^-$ (35%).

1'-benzyl-6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylspiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89b



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

88b
$C_{12}H_{15}NO$
189.26

89b
$C_{25}H_{31}NO_6$
441.52

To a solution of DIPA (1.48 mL, 10.6 mmol) in THF (90 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (4.2 mL, 10.6 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (2.0 g, 7.03 mmol) in THF (10 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of 4-piperidone **88b** (1.33 g, 7.03 mmol) in THF (10 mL) was added. After 1 h at -78 °C a saturated solution of NH_4Cl (30 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x60 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-50% acetone/CH_2Cl_2) afforded the product (3.0 g, 6.79 mmol, 64%) as a yellow oil.

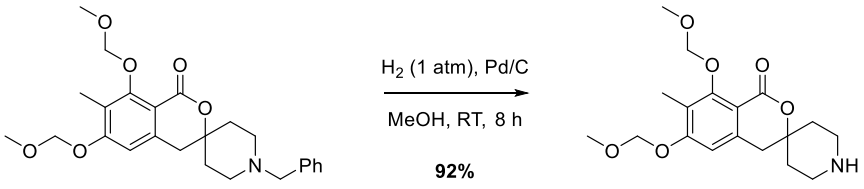
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.29 (m, 5H, 5xAr**H**), 6.70 (s, 1H, Ar**H**), 5.25 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.09 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.61 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.54 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.51 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.92 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.64-2.48 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.22 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.96-1.92 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.77-1.67 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 161.9 (**C**), 159.9 (**C**), 158.8 (**C**), 138.2 (**C**), 137.8 (**C**), 129.0 (2x**C**H), 128.1 (2x**C**H), 127.0 (**C**H), 121.2 (**C**), 111.4 (**C**), 108.6 (**C**H), 101.3 (**C**H_2), 94.1 (**C**H_2), 78.0 (**C**), 62.8 (**C**H_2), 57.6 (**C**H_3), 56.3 (**C**H_3), 48.6 (2x**C**H_2), 39.4 (**C**H_2), 35.3 (2x**C**H_2), 9.4 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2919 (br), 1709 (s), 1598 (s),1448 (w), 1300 (m), 1243 (s), 1154 (m), 1136 (m), 1053 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 384 $[M\text{-MOM-Bn+MeCN+Cl}]^-$ (15%).

6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylspiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89b'



89b
$C_{25}H_{31}NO_6$
441.52

89b'
$C_{18}H_{25}NO_6$
351.40

To a solution of benzylamine **89b** (0.92 g, 2.10 mmol) in degased MeOH (60 mL) was added Pd/C (0.28 g, 0.21 mmol). After 8 h at RT under H_2 (1 atm) the reaction mixture was filtered through a pad of Celite® with CH_2Cl_2 (50 mL) and MeOH (50 mL) and concentrated *in vacuo* affording the product (0.67 g, 1.92 mmol, 92%) as a yellow oil.

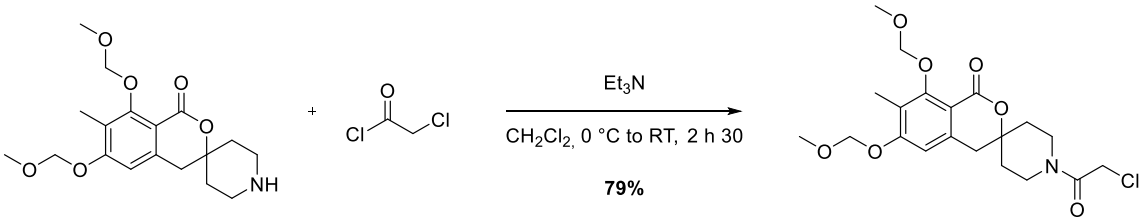
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.71 (s, 1H, Ar**H**), 5.26 (s, 2H, C**H₂**), 5.10 (s, 2H, C**H₂**), 3.62 (s, 3H, C**H₃**), 3.51 (s, 3H, C**H₃**), 3.15-3.07 (m, 2H, C**H₂**), 2.94-2.86 (m, 4H, 2xC**H₂**), 2.53 (br. s, 1H, N**H**), 2.22 (s, 3H, C**H₃**), 1.95-1.90 (s, 2H, C**H₂**), 1.73-1.63 (m, 2H, C**H₂**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 161.6 (**C**), 159.6 (**C**), 158.5 (**C**), 137.5 (**C**), 120.9 (**C**), 111.1 (**C**), 108.3 (**C**H), 101.0 (**C**H_2), 93.8 (**C**H_2), 78.2 (**C**), 57.2 (**C**H_3), 55.9 (**C**H_3), 46.7 (**C**H_2), 41.4 (**C**H_2), 39.3 (**C**H_2), 35.9 (**C**H_2), 34.9 (**C**H_2), 9.0 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2947 (br), 2827 (w), 1708 (s),1598 (s), 1430 (w), 1392 (w), 1294 (w), 1245 (s), 1142 (s), 1115 (s), 1055 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 352 [M+H] (100%).

1'-(2-chloroacetyl)-6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylspiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89e



89b'
$C_{18}H_{25}NO_6$
351.40

89e
$C_{20}H_{26}ClNO_7$
427.88

To a solution of the amine **89b'** (0.27 g, 0.78 mmol) and Et_3N (0.33 mL, 2.34 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added at 0 °C chloroacetyl chloride (68 µL, 0.86 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was warmed up to RT. After 2 h at RT a saturated solution of $NaHCO_3$ (25 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5% MeOH/CH_2Cl_2) afforded the product (0.26 g, 0.61 mmol, 79%) as a yellow oil.

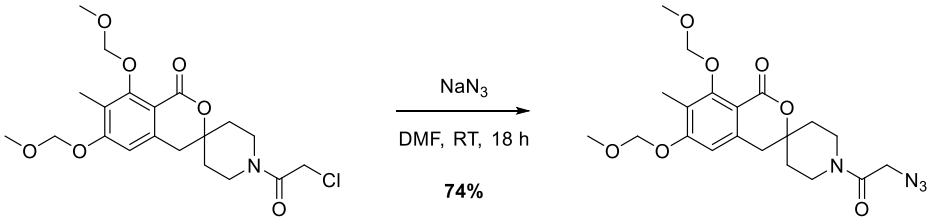
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.68 (s, 1H, Ar**H**), 5.21 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.04 (s, 2H, C**H$_2$**), 4.32-4.28 (m, 1H, C**H**H), 4.09 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, C**H**H), 3.99 (d, *J* =12.1 Hz, 1H, CH**H**), 3.69-3.60 (m,2H, C**H$_2$**), 3.57 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.45 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.19-3.09 (m, 1H, C**H**H), 2.90 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.17 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.01-1.92 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.74-1.64 (m, 1H, C**H**H), 1.62-1.51 (m, 1H, CH**H**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 164.8 (**C**), 161.2 (**C**), 160.2 (**C**), 158.9 (**C**), 137.1 (**C**), 121.6 (**C**), 111.0 (**C**), 108.7 (**C**H), 101.2 (**C**H_2), 94.1 (**C**H_2), 57.6 (**C**H_3), 56.3 (**C**H_3), 41.8 (**C**H_2), 40.9 (**C**H_2), 39.5 (**C**H_2), 37.6 (**C**H_2), 35.6 (**C**H_2), 34.6 (**C**H_2), 9.4 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2923 (br), 1648 (s), 1622 (s), 1586 (w), 1510 (w), 1428 (m), 1374 (w), 1307 (m), 1266 (m), 1245 (m), 1149 (s), 1116 (s), 1072 (s), 1052 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 338 [M(^{35}Cl)-MOM-MOM-H]$^-$ (100%), 340 [M(^{37}Cl)-MOM-MOM-H]$^-$ (40%).

1'-(2-azidoacetyl)-6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylspiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89f



89e
$C_{20}H_{26}ClNO_7$
427.88

89f
$C_{20}H_{26}N_4O_7$
434.45

To a solution of the chloroacetamide **89e** (84.7 mg, 0.20 mmol) in DMF (5 mL) was added NaN_3 (38.6 mg, 0.60 mmol). After 18 h at RT a saturated solution Of $NaHCO_3$ (100 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x40 mL). The organic phases were combined, washed with saturated brine (3x50 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5% MeOH/CH_2Cl_2) afforded the product (64.0 mg, 0.15 mmol, 74%) as a yellow oil.

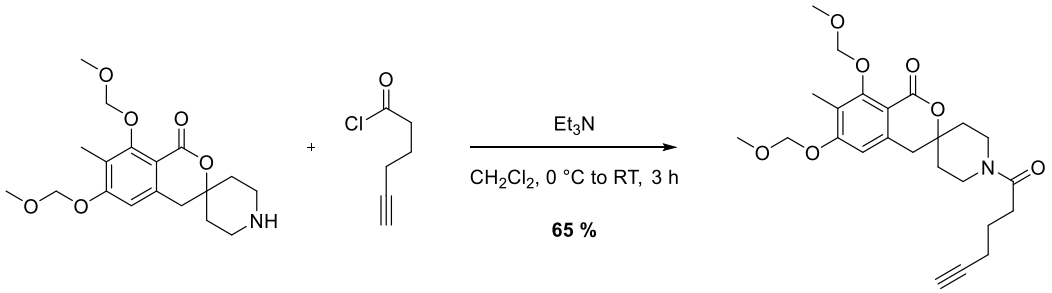
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.69 (s, 1H, Ar**H**), 5.23 (s, 2H, C**H₂**), 5.06 (s, 2H, C**H₂**), 4.35 (br. d, *J* = 13.2 Hz, 1H, C**H**H), 3.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, C**H₂**), 3.59 (s, 3H, C**H₃**), 3.58-3.50 (m, 2H, C**H₂**), 3.47 (s, 3H, C**H₃**), 3.19-3.11 (m, 1H, CH**H**), 2.91 (s, C**H₂**), 2.19 (s, 3H, C**H₃**), 1.99-1.95 (s, 2H, C**H₂**), 1.66-1.52 (s, 2H, C**H₂**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 165.4 (**C**), 161.2 (**C**), 160.3 (**C**), 159.0 (**C**), 137.0 (**C**), 121.7(**C**), 111.0 (**C**), 108.8 (**C**H), 101.3 (**C**H_2), 94.1 (**C**H_2), 57.6 (**C**H_3), 56.3 (**C**H_3), 50.6 (**C**H_2), 40.6 (**C**H_2), 39.5 (**C**H_2), 37.5 (**C**H_2), 35.7 (**C**H_2), 34.7 (**C**H_2), 9.4 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2923 (br), 2103 (s), 1710 (s), 1653 (s), 1597 (s), 1448 (m), 1429 (m), 1373 (w), 1288 (w), 1267 (w), 1231 (s), 1153 (s), 1113 (s), 1082 (m), 1054 (s), 1001 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 391 $[M\text{-}MOM+H]^+$ (50%).

1'-(hex-5-ynoyl)-6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylspiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89h'



89b'
$C_{18}H_{25}NO_6$
351.40

89h'
$C_{24}H_{31}NO_7$
445.51

To a solution of the amine **89b'** (0.76 g, 2.15 mmol) and Et_3N (1.2 mL, 8.6 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) was added at 0 °C a solution of the freshly prepared acyl chloride (0.52 g, 4.0 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL). After 1 h at 0 °C the reaction mixture was warmed up to RT. After 2 h at RT a saturated solution of $NaHCO_3$ (50 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x60 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (60-70% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.61 g, 1.37 mmol, 65%) as a yellow oil.

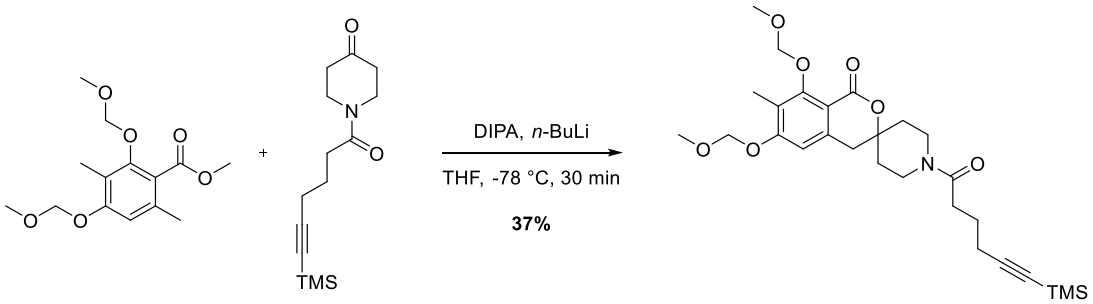
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.70 (s, 1H, Ar**H**), 5.24 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.08 (s, 2H, C**H$_2$**), 4.35 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, C**H**H), 3.69 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, CH**H**), 3.60 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.58-3.54 (m, 1H, CH**H**), 3.48 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.18-3.09 (m, 1H, C**H**H), 2.92 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H,C**H$_2$**), 2.27 (dd, *J* = 2.6, 6.9 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.20 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.02-1.98 (m, 1H, C**H**H), 1.95 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, C**H**), 1.89-1.85 (m, 1H, CH**H**), 1.84 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.61 (dq, *J* = 4.6, 12.6 Hz, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 170.5 (**C**), 161.5 (**C**), 160.3 (**C**), 159.0 (**C**), 137.2 (**C**), 121.7 (**C**), 111.2 (**C**), 108.8 (**C**H), 101.4 (**C**H_2), 94.2 (**C**H_2), 83.7 (**C**), 77.8 (**C**), 69.0 (**C**H), 57.7 (**C**H_3), 56.4 (**C**H_3), 40.9 (**C**H_2), 39.6 (**C**H_2), 37.1 (**C**H_2), 35.9 (**C**H_2), 34.9 (**C**H_2), 31.4 (**C**H_2), 23.8 (**C**H_2), 17.9 (**C**H_2), 9.5 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2962 (br), 2181 (br), 1754 (s), 1690 (s), 1603(s), 1562 (s), 1160 (s), 1120 (s), 1059 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 446 $[M+H]^+$ (100%).

6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methyl-1'-(6-(trimethylsilyl)hex-5-ynoyl)spiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89h



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

88h
$C_{14}H_{23}NO_2Si$
265.43

89h
$C_{27}H_{39}NO_7Si$
517.69

To a solution of DIPA (0.19 mL, 1.32 mmol) in dry THF (15 mL) was added dropwise at -78 °C *n*- BuLi (0.53 mL, 1.32 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (0.25 g, 0.88 mmol) in THF (5 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of piperidone **88h** (0.23 g, 0.88 mmol) in THF. After 10 min at -78 °C a saturated solution of NH_4Cl (10 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (40%-60% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.17 g, 0.33 mmol, 37%) as a yellow oil.

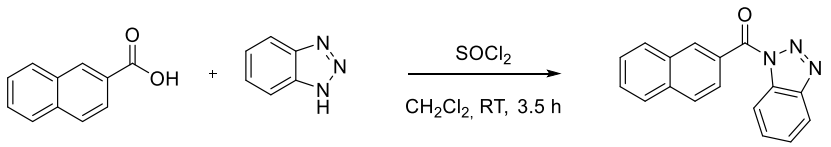
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.64 (s, 1H, Ar**H**), 5.18 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.01 (s, 2H, C**H$_2$**), 4.28 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, CH**H**), 3.85-3.58 (m, 1H, C**H**H), 3.53 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.50-3.33 (m, 4H, CH**H** + C**H$_3$**), 3.17-2.99 (m, 1H, C**H**H), 2.86 (s,2H, C**H$_2$**), 2.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.22 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.14 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.96-1.83 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.82-1.71 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.61-1.42 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.06 (s, 9H, 3xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 170.7 (**C**), 161.5 (**C**), 160.3 (**C**), 159.0 (**C**), 137.3 (**C**), 121.6 (**C**), 111.2 (**C**), 108.8 (**C**H), 106.5 (**C**), 101.3 (**C**H_2), 94.2 (**C**H_2), 85.3 (**C**), 77.8 (**C**), 57.7 (**C**H_3), 56.3 (**C**H_3), 41.0 (**C**H_2), 39.6 (**C**H_2), 37.1 (**C**H_2), 36.0 (**C**H_2), 34.9 (**C**H_2), 31.5 (**C**H_2), 24.0 (**C**H_2), 19.3 (**C**H_2), 9.5 (**C**H_3), 0.1 (3x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2953 (br), 2175 (w), 1714 (s), 1640 (s), 1597 (s), 1429 (m), 1235 (s), 1151 (s), 1114 (s), 1055 (s), 1000 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 518 $[M+H]^+$ (100%).

(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)(naphthalen-2-yl)methanone 71



72
$C_{11}H_8O_2$
172.18

73
$C_6H_5N_3$
119.13

71
$C_{17}H_{11}N_3O$
273.30

To a solution of benzotriazol **73** (17.4 g, 146 mmol) in CH_2Cl_2 (150 mL) was added $SOCl_2$ (2.7 mL, 36.6 mmol). After 30 min at RT 2-naphtoic acid **72** (6.3 g, 36.6 mmol) was added. After 3 h at RT the reaction mixture was filtered and the filter cake was washed with a 2 M solution of NaOH (100 mL). The filtrate was extracted with CH_2Cl_2 (3x100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording the product (10 g, 36.6 mmol, 100%) as a white solid.

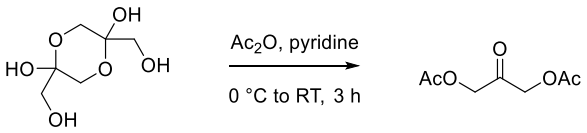
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.87 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, Ar**H**), 8.45 (dt, *J* = 0.9, 8.3 Hz, 1H, Ar**H**), 8.23 (dd, *J* = 1.8, 6.0 Hz, 1H, Ar**H**), 8.21 (dt, *J* = 0.9, 6.0 Hz, 1H, Ar**H**), 8.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.74 (ddd, *J* = 1.1, 7.1, 8.3 Hz, 1H, Ar**H**), 7.68 (ddd, *J* = 1.5, 6.9, 8.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.64-7.54 (m, 2H, 2xAr**H**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 166.7 (**C**), 145.8 (**C**), 135.7 (**C**), 134.3 (**C**H), 132.5 (**C**), 132.2 (**C**), 130.4 (**C**H), 129.9 (**C**H), 129.1 (**C**H), 128.5 (**C**), 128.3 (**C**H), 127.8 (**C**H), 127.1 (**C**H), 126.6 (**C**H), 126.4 (**C**H), 120.2 (**C**H), 114.9 (**C**H).

IR (neat, cm^{-1}) 1702 (s), 1593 (w), 1485 (m), 1445 (m), 1371 (s), 1283 (m), 1190 (s), 1038 (s), 1007 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 273 $[M+H]^+$ (40%)

2-oxopropane-1,3-diyl diacetate 95a



98
$C_6H_{12}O_6$
180.16

37%

95a
$C_7H_{10}O_5$
174.15

To a solution of dihydroxyacetone dimer **98** (2.0 g, 11.1 mmol) in pyridine (10 mL) was added dropwise at 0 °C Ac_2O (3.2 mL, 33.3 mmol). After 3 h at RT the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and washed with CH_2Cl_2 (10 mL) and a saturated solution of $CuSO_4$ (3x50 mL). The organic phases were combined, washed with 1 M HCl (50 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was dissolved in toluene (10 mL) and heptane (15 mL) was added. After 1 h at 0 °C the reaction mixture was filtered and the precipitate was washed with heptane affording the product (0.70 g, 4.02 mmol, 37%) as a white solid.

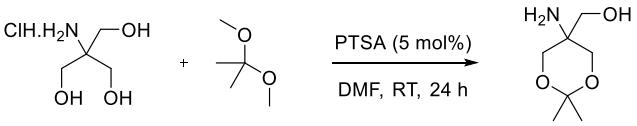
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.75 (s, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.17 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 198.0 (2x**C**), 170.2 (**C**), 66.4 (2x**C**H_2), 20.4 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2927 (w), 1738 (s), 1409 (m), 1373 (m), 1216 (s), 1093 (w), 1024 (s).

LRMS ($^m/_z$, EI) 57 [M-2OAc] (100%).

(5-amino-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-yl)methanol 97



96
$C_4H_{11}NO_3$
121.14

97
$C_7H_{15}NO_3$
161.20

To a solution of the amine **96** (5.0 g, 29.1 mmol) in DMF (40 mL) were added 2,2 dimethoxypropane (3.94 mL, 32.0 mmol) and PTSA (0.28 g, 1.46 mmol). After 24 h at RT EtOAc (60 mL) and Et_3N (30 mL) were added. The reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo* affording the product (4.69 g, 26.8 mmol, 94%) as a white solid.

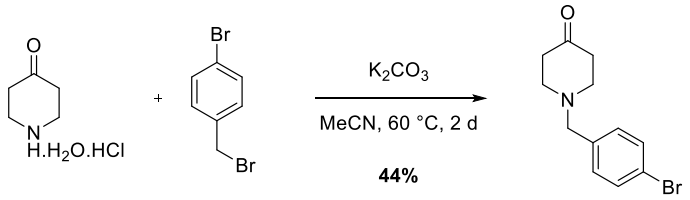
^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ 4.13 (d, *J* = 13.2 Hz, C**H₂**), 3.85 (d, *J* = 13.2 Hz, C**H₂**), 3.66 (s, 2H, C**H₂**), 1.51 (s, 3H, C**H₃**), 1.46 (s, 3H, C**H₃**).

^{13}C NMR (76 MHz, D_2O) δ 98.4 (**C**), 67.2 (2x**C**H_2), 65.0 (**C**H_2), 50.2 (**C**), 24.9 (**C**H_3), 22.5 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3177 (br), 2773 (br), 1647 (w), 1584 (m), 1513 (m), 1379 (m), 1324 (w), 1254 (m), 1202 (m), 1154 (m), 1087 (s), 1051 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 162 $[M+H]^+$ (100%).

1-(4-bromobenzyl)piperidin-4-one 89b



88'
$C_5H_{12}ClNO_2$
153.61

89g
$C_{12}H_{14}BrNO$
268.15

To a solution of 4-piperidone **88'** (2.0 g, 13.0 mmol) in MeCN (100 mL) were added at 0 °C K_2CO_3 (4.5 g, 32.5 mmol) and bromobenzyl bromide (3.9 g, 15.6 mmol). After 48 h at 60 °C the reaction mixture was cooled down to RT, filtered and the filter cake was rinsed with MeCN (20 mL). The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL), washed with a saturated solution Of $NaHCO_3$ (100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (50%-70% Et_2O/cyclohexane) afforded the product (1.54 g, 5.7 mmol, 44%) as a yellow oil.

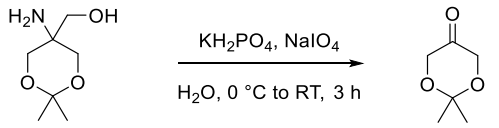
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48-7.45 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.26-7.23 (m, 2H, 2xAr**H**), 3.57 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.73 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.45 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 208.6 (**C**), 137.0 (**C**), 131.2 (**C**H), 130.2 (**C**H), 120.8 (**C**), 60.9 (**C**H_2), 52.6 (2x**C**H_2), 40.9 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2955 (br), 2914 (br), 2800 (br), 1714 (s), 1600 (w), 1486 (m),1346 (m), 1326 (w), 1195 (m), 1127 (m), 1084 (s), 1069 (s),1011 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 299 [M(^{79}Br)+H+MeOH]$^+$ (100%), 301 [M(^{81}Br)+H+MeOH]$^+$ (100%).

2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-one 95b



97
$C_7H_{15}NO_3$
161.20

95b
$C_6H_{10}O_3$
130.14

To a solution of the amine **97** (4.0 g, 24.8 mmol) and KH_2PO_4 (3.38 g, 24.8 mmol) in H_2O (25 mL) was added dropwise at 0 °C a 0.5 M solution of $NaIO_4$ (5.3 g, 24.8 mmol) in H_2O (50 mL) over 1 h. After 1 h at RT the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3x150 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording the product (1.12 g, 8.6 mmol, 35%) as a yellow oil.

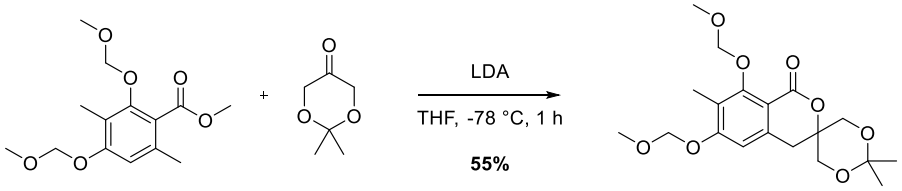
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.15 (s, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.45 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 208.1 (**C**), 100.1 (**C**), 66.8 (2x**C**H_2), 23.5 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3406 (br), 2939 (w), 1724 (s), 1658 (w), 1423 (w), 1374 (m), 1168 (m), 1056 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 131 $[M+H]^+$ (10%).

6,8-bis(methoxymethoxy)-2',2',7-trimethylspiro[isochromane-3,5'-[1,3]dioxan]-1-one 94b



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

95b
$C_6H_{10}O_3$
130.14

94b
$C_{19}H_{26}O_8$
382.41

To a solution of DIPA (0.74 mL, 5.28 mmol) in dry THF (50 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (2.45 mL, 5.28 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (1.0 g, 3.52 mmol) in THF (10 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of protected dihydroxyacetone **95b** (1.12 g, 3.52 mmol) in THF (10 mL) was added. After 1 h at -78 °C the reaction mixture was warmed up at 0 °C. After 30 min at 0 °C a saturated solution of NH_4Cl (20 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.74 g, 1.93 mmol, 55%) as a yellow oil.

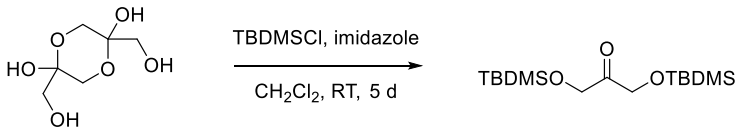
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.77 (s, 1H, Ar**H**), 5.27 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.08 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.93 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.71 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.61 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.51 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.21 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.42 (C**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 161.1 (**C**), 160.5 (**C**), 159.3 (**C**), 137.4 (**C**), 121.9 (**C**), 111.0 (**C**), 109.3 (**C**H), 101.5 (**C**H_2), 99.3 (**C**), 94.3 (**C**H_2), 74.4 (**C**), 65.7 (2x**C**H_2), 55.8 (**C**H_3), 56.5 (**C**H_3), 33.9 (**C**H_2), 26.7 (**C**H_3), 20.2 (**C**H_3), 9.6 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2993 (br), 2953 (w), 1697 (s), 1599 (s), 1370 (m), 1255 (s), 1146 (s), 1118 (s), 1088 (s), 1069 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 383 $[M+H]^+$ (100%).

2,2,3,3,9,9,10,10-octamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundecan-6-one 95c



98
$C_6H_{12}O_6$
180.16

95c
$C_{15}H_{34}O_3Si_2$
318.60

To a suspension of dihydroxyacetone dimer **98** (0.9 g, 5.0 mmol) and TBDMSCl (3.0 g, 20.0 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) was added imidazole (1.36 g, 20.0 mmol). After 5 d at RT H_2O (50 mL) was added and the reaction mixture was extracted with cyclohexane (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.60 g, 5.0 mmol, 100%) as a colourless oil.

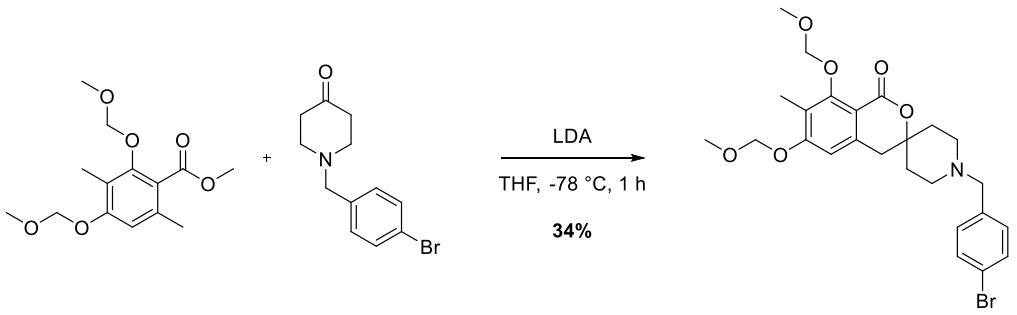
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.41 (s, 4H, 2xCH_2), 0.90 (s, 18H, 2x(CH_3)$_3$), 0.09 (s, 12H, 4xCH_3).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 209.0 (**C**), 68.0 (2xCH_2), 25.9 (8xCH_3), 18.5 (2x**C**), -5.4 (2xCH_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2955 (w), 2930 (w), 2858 (w), 1739 (m), 1464 (w), 1253 (s), 1101 (br), 1006 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 319 $[M+H]^+$ (50%), 336 $[M+H_2O+H]^+$ (100%), 383 $[M+Na+MeCN]^+$ (80%), 392 $[M+K+MeOH]^+$ (60%).

1'-(4-bromobenzyl)-6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylspiro[isochromane-3,4'-piperidin]-1-one 89g



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

88g
$C_{12}H_{14}BrNO$
268.15

89g
$C_{25}H_{30}BrNO_6$
520.42

To a solution of DIPA (0.37 mL, 1.76 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (1.23 mL, 2.64 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (0.5 g, 1.76 mmol) in THF (10 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of 4-piperidone **89g** (0.47 g, 1.76 mmol) in THF (10 mL) was added. After 1 h at -78 °C a saturated solution of NH_4Cl (20 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% acetone/CH_2Cl_2) afforded the product (0.31 g, 0.60 mmol, 34%) as a yellow oil.

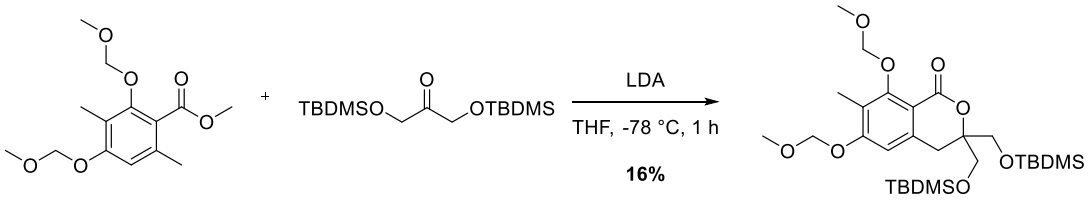
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2xAr**H**), 6.69 (s, 1H, Ar**H**), 5.24 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.60 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.50 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.47 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.91 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.55-2.52 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.21 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.92 (br. d, *J* = 12.7 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.74-1.54 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 162.1 (**C**), 160.2 (**C**), 159.0 (**C**), 137.9 (**C**), 137.4 (**C**), 131.4 (2x**C**H), 130.8 (2x**C**H), 129.1 (**C**), 121.0 (**C**), 111.5 (**C**), 108.8 (**C**H), 101.5 (**C**H_2), 94.3 (**C**H_2), 78.0 (**C**), 62.2 (**C**H_2), 57.8 (**C**H_3), 56.5 (**C**H_3), 48.7 (2x**C**H_2), 39.6 (**C**), 35.4 (2x**C**H_2), 9.57 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2934 (br), 2829 (w), 1709 (s), 1597 (s), 1383 (w), 1243 (s), 1154 (s), 1114 (s), 1054 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 521 $[M(^{79}Br)+H]^+$ (100%), 523 $[M(^{81}Br)+H]^+$ (100%).

3,3-bis(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-6,8-bis(methoxymethoxy)-7-methylisochroman-1-one 94c



66
$C_{14}H_{20}O_6$
284.31

95c
$C_{15}H_{34}O_3Si_2$
318.60

94c
$C_{28}H_{50}O_8Si_2$
570.87

To a solution of DIPA (0.74 mL, 5.28 mmol) in dry THF (80 mL) was added dropwise at -78 °C a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (2.45 mL, 5.28 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of methyl atratate **66** (1.0 g, 3.52 mmol) in THF (10 mL) was added. After 15 min at -78 °C a solution of protected dihydroxyacetone **95c** (1.12 g, 3.52 mmol) in THF (10 mL) was added. After 1 h at -78 °C the reaction mixture was warmed up at 0 °C. After 30 min at 0 °C a saturated solution of NH_4Cl (20 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.33 g, 0.58 mmol, 16%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.71 (s, 1H, Ar**H**), 5.24 (s, 2H, C**H$_2$**), 5.10 (s, 1H, C**H$_2$**), 3.69 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.62-3.59 (m, 4H, C**H$_2$** + C**H$_3$**), 3.48 (C**H$_3$**), 3.03 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.22 (s, 3H, C**H$_3$**), 0.86 (s, 18H, 2x(C**H$_3$**)$_3$), 0.01 (s, 3H, C**H$_3$**), -0.02 (s, 3H, C**H$_3$**).

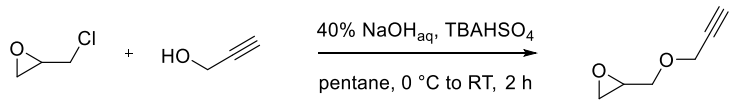
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 161.8 (**C**), 160.1 (**C**), 159.2 (**C**), 138.6 (**C**), 121.3 (**C**), 111.4 (**C**), 109.1 (**C**H), 101.7 (**C**H$_2$), 94.3 (**C**H$_2$), 83.3 (**C**), 64.1 (2x**C**H$_2$), 57.7 (**C**H$_3$), 56.4 (**C**H$_3$), 30.5 (**C**H$_2$), 25.9 (8x**C**H$_3$), 18.4 (2x**C**), 9.7 (**C**H$_3$), -5.4 (2x**C**H$_3$).

IR (neat, cm^{-1}) 1721 (s), 1625 (s), 1599 (s), 1471 (m), 1390 (w), 1361 (w), 1249 (s), 1155 (s), 1058 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 572 [M+H]$^+$ (100%).

Partie expérimentale

2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)oxirane 104a



103	**102a**		**104a**
C_3H_5ClO	C_3H_4O	**24%**	$C_6H_8O_2$
92.52	56.06		112.13

To an aqueous solution of 40% NaOH (21 mL) was added at 0 °C propargyl alcohol **102a** (2.3 mL, 40.0 mmol). After 30 min at 0 °C a solution of $TBAHSO_4$ (0.68 g, 2.0 mmol) and epichlorohydrin **103** (6.3 mL, 80.0 mmol) in pentane/H_2O (23 mL) was added at 0 °C. After 2 h at RT a saturated solution of brine (40 mL) was added and the mixture was extracted with Et_2O (3x100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated i*n vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.08 g, 9.63 mmol, 24%) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.22 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.83 (dd, *J* = 11.3, 3.0 Hz, 1H, C**H**H), 3.49 (dd, *J* = 11.3, 5.8 Hz, CH**H**), 3.22-3.14 (m, 1H, C**H**), 2.81 (dd, *J* = 4.9, 4.2 Hz, 1H, C**H**H), 2.64 (dd, *J* = 5.0, 2.7 Hz, 1H, CH**H**), 2.45 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, C**H**).

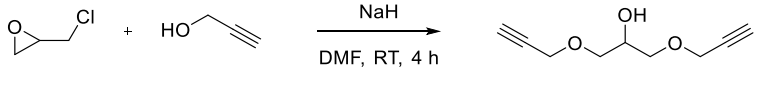
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 79.4 (**C**), 75.0 (**C**H), 70.5 (**C**H$_2$), 58.6 (**C**H$_2$), 50.6 (**C**H), 44.4 (**C**H$_2$).

IR (neat, cm^{-1}) 3275 (br), 2894 (br), 2116 (w), 1717 (m), 1444 (w),1232 (m), 1092 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 113 $[M+H]^+$

Partie expérimentale

1,3-bis(prop-2-yn-1-yloxy)propan-2-ol 105a



103	**102a**	**22%**	**105a**
C_3H_5ClO	C_3H_4O		$C_9H_{12}O_3$
92.52	56.06		168.19

To a solution of propargyl alcohol **102a** (1.4 mL, 24.0 mmol) in DMF (20 mL) was added portionwise at 0 °C NaH (1.0 g, 24.0 mmol). After 30 min at 0 °C epichlorohydrin **103** (0.63 mL, 8.0 mmol) was added dropwise. After 4 h at RT the reaction mixture was cooled to 0 °C and a saturated sol of NH_4Cl (20 mL) was added. The reaction mixture was extracted with Et_2O (3x80 mL). The organic phases were combined, washed with saturated brine (3x100 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography afforded the product as a colourless oil.

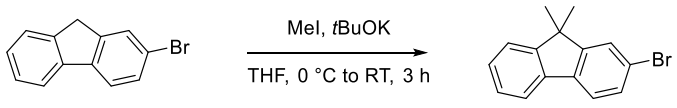
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H, 2xC**H**$_2$), 4.05-3.97 (m, 1H, C**H**), 3.67-3.53 (m, 4H, 2xC**H**$_2$), 2.45 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, 2xC**H**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 79.5 (**C**H), 75.0 (2x**C**), 71.1 (2x**C**H_2), 69.5 (2x**C**H), 58.8 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3288 (br), 2868 (br), 2116 (w), 1718 (w), 1661 (s), 1388 (m), 1360 (w), 1256 (m), 1089 (s), 1017 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 169 $[M+H]^+$ (40%).

2-bromo-9,9-dimethyl-9H-fluorene 110



109
$C_{13}H_9Br$
245.12

91%

110
$C_{15}H_{13}Br$
273.17

To a solution of 2-bromofluorene **109** (3.0 g, 12.2 mmol) in THF (80 mL) was added at 0 °C *t*-BuOK (4.2 g, 36.6 mmol). After 30 min at 0 °C MeI (2.3 mL, 36.6 mmol) was added at 0 °C. After 3 h at RT H_2O (100 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% cyclohexane then 10% CH_2Cl_2/cyclohexane) afforded the product (3.0 g, 11.1 mmol, 91%) as a yellow oil.

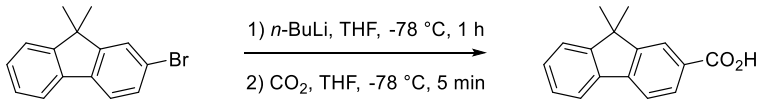
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72-7.65 (m, 1H, Ar**H**), 7.60-7.55 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.47-7.41 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.37-7.32 (m, 2H, Ar**H**), 1.48 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 155.8 (**C**), 153.4 (**C**), 138.4 (**C**), 138.3 (**C**), 130.2 (**C**H), 127.8 (**C**H), 127.3 (**C**H), 126.3 (**C**H), 122.8 (**C**H), 121.5 (**C**H), 121.2 (**C**), 120.2 (**C**H), 47.3 (**C**), 27.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2959 (m), 2855 (w), 1566 (w), 1470 (w), 1456 (w), 1441 (s), 1403 (m), 1246 (m), 1083 (m), 1060 (m), 1008 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 274 $[M(^{79}Br)+H)]^+$ (100%), 276 $[M(^{81}Br)+H]^+$ (100%).

9,9-dimethyl-9H-fluorene-2-carboxylic acid 111



110
$C_{15}H_{13}Br$
273,17

75 %

111
$C_{16}H_{14}O_2$
238.29

To a solution of the fluorene **110** (1.0 g, 3.66 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (2.2 mL, 5.49 mmol). After 1 h at -78 °C CO_2 was bubbled through the mixture. After 5 min at -78 °C a solution of 1 M HCl (30 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-40% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.65 g, 2.72 mmol, 75%) as a yellow solid.

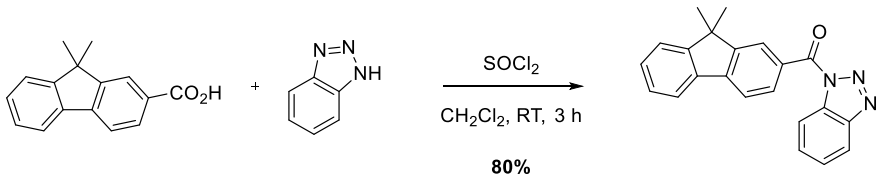
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 8.13 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.49 (m, 1H, Ar**H**), 7.39 (m, 2H, 2xAr**H**), 1.54 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 172.0 (**C**), 155.0 (**C**), 153.9 (**C**), 145.0 (**C**), 138.0 (**C**), 129.9 (**C**H), 128.9 (**C**H), 127.9 (**C**), 127.4 (**C**H), 124.7 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.2 (**C**H), 120.0 (**C**H), 47.2 (**C**), 27.1 (2x**C**H$_3$).

IR (neat, cm^{-1}) 2960 (w), 2521 (br), 1678 (s), 1613 (m), 1429 (m), 1296 (s), 1276 (s), 1244 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 237 $[M-H]^-$ (100%).

(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)(9,9-dimethyl-9H-fluoren-2-yl)methanone 112



111 $C_{16}H_{14}O_2$ 238.29 | **73** $C_6H_5N_3$ 119.13 | **112** $C_{22}H_{17}N_3O$ 339,40

To a solution of benzotriazol **73** (2.0 g, 16.8 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) was added $SOCl_2$ (0.3 mL, 4.2 mmol). After 30 min at RT the acid **111** (1.0 g, 4.2 mmol) was added at RT. After 3 h at RT the reaction mixture was filtered and the filter cake was washed with a 2M solution of NaOH (80 mL). The filtrate was extracted with CH_2Cl_2 (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording the product (1.14 g, 3.36 mmol, 80%) as a yellow oil which was used for the next step without any further purification.

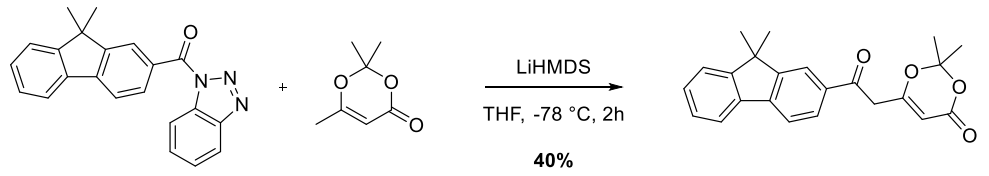
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar**H**), 8.31 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 8.28 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 8.19 (dd, *J* = 8.3, 0.8 Hz, 1H, Ar**H**), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.86-7.81 (m, 1H, Ar**H**), 7.73 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.60-7.54 (m, 1H, Ar**H**), 7.53-7.48 (m, 1H, Ar**H**), 7.41 (dt, *J* = 9.8, 3.3 Hz, 2H, 2xAr**H**), 1.58 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 167.0 (**C**), 155.1 (**C**), 153.7 (**C**), 145.9 (**C**), 145.2 (**C**), 137.8 (**C**), 132.7 (**C**), 131.9 (**C**H), 130.4 (**C**H), 129.9 (**C**), 129.1 (**C**H), 127.5 (**C**H), 126.5 (**C**H), 126.4 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.4 (**C**H), 120.3 (**C**H), 119.9 (**C**H), 115.0 (**C**H), 47.4 (**C**), 27.1 (2x**C**H$_3$).

IR (neat, cm^{-1}) 2960 (w), 1692 (s), 1606 (m),1442 (m), 1356 (s), 1290 (m), 1215 (m), 1045 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 340 $[M+H]^+$ (100%).

6-(2-(9,9-dimethyl-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-one 113



112
$C_{22}H_{17}N_3O$
339.40

66
$C_7H_{10}O_3$
142.15

113
$C_{23}H_{22}O_4$
362.42

To a solution of HMDS (0.64 mL, 3.0 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (1.2 mL, 3.0 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and methyl dioxinone **66** (0.4 mL, 3.0 mmol) was added at -78 °C. After 20 min at -78 °C a solution of the benzotriazol **112** (0.5 g, 1.5 mmol) in THF (10 mL) was added at -78 °C. After 2 h at -78 °C a solution of 1 M HCl (20 mL) was added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.22 g, 0.62 mmol, 40%) as a yellow oil.

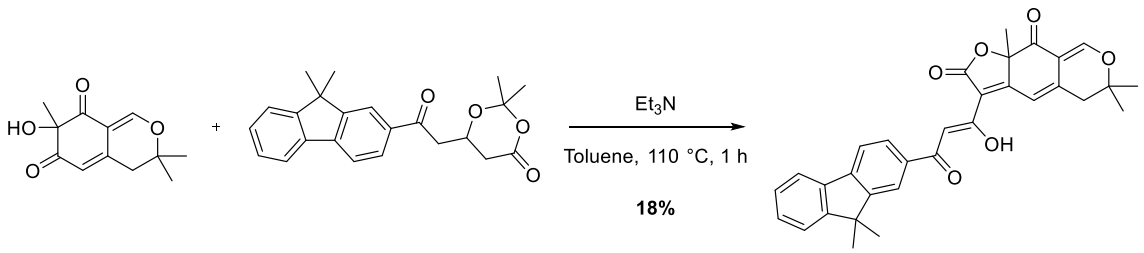
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.03 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.93 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.83-7.76 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.48 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.43-7.37 (m, 2H, 2xAr**H**), 5.45 (s, 1H, C**H**), 3.96 (s, 2H, C**H$_2$**), 1.72 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.55 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) 192.9 (**C**), 165.6 (**C**), 160.9 (**C**), 154.9 (**C**), 154.1 (**C**), 145.1 (**C**), 137.5 (**C**), 134.7 (**C**), 129.0 (**C**H), 128.2 (**C**H), 127.4 (**C**H), 122.9 (**C**H), 122.6 (**C**H), 121.2 (**C**H), 120.1 (**C**H), 107.3 (**C**), 96.9 (**C**H), 47.1 (**C**), 43.5 (**C**H_2), 26.9 (2x**C**H_3), 25.0 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2961 (w), 2924 (w), 2864 (w), 1714 (s), 1634 (s), 1604 (s), 1445 (w), 1422 (s), 1377 (s), 1272 (m), 1201 (w), 1157 (s), 1089 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 361 $[M-H]^-$ (100%).

(Z)-3-(3-(9,9-dimethyl-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 114



61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

113
$C_{23}H_{24}O_4$
364.44

114
$C_{32}H_{28}O_6$
508.57

To a solution of the alcohol **61** (58.2 mg, 0.26 mmol) and dioxinone **113** (113.9 mg, 0.31 mmol) in toluene (5 mL) was added 4 Å molecular sieves (52 mg). After 30 min at 110 °C Et_3N (72.5 µL, 0.52 mmol). After 20 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a 1 M solution of HCl (5 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x30 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10%-15%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (23.7 mg, 46.4 µmol, 18%) as an orange solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.08 (s, 1H, C**H**), 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.80 (s, 1H, Ar**H**), 7.77 (s, 2H, 2xAr**H**), 7.56 (s, 1H, Ar**H**), 7.50-7.44 (m, 1H, Ar**H**), 7.41-7.34 (m1 1H, Ar**H**), 7.13 (s, 1H, C**H**), 2.79 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, C**H**H), 2.72 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, CH**H**), 1.74 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.53 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.40 (s, 3H, C**H$_3$**).

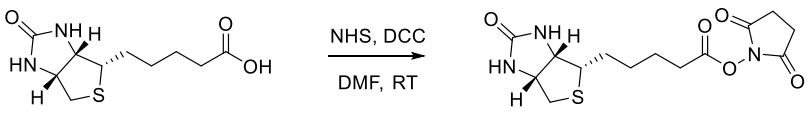
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.6 (**C**), 189.9 (**C**), 173.9 (**C**), 168.5 (**C**), 167.8 (**C**), 158.9 (**C**H), 155.0 (**C**), 154.1 (**C**), 144.5 (**C**), 141.2 (**C**), 138.1 (**C**), 134.8 (**C**), 128.8 (**C**H), 127.8 (**C**H), 127.4 (**C**H), 123.0 (**C**H), 122.0 (**C**H), 121.2 (**C**H), 120.2 (**C**H), 114.8 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 97.5 (**C**H), 47.2 (**C**), 40.1 (**C**H$_2$), 28.1 (**C**H$_3$), 27.1 (2x**C**H$_3$), 26.6 (**C**H$_3$), 26.3 (**C**H$_3$).

IR (neat, cm^{-1}) 2959 (w), 2922 (s), 2853 (m), 1769(m), 1716 (s), 1591 (s), 1457(w), 1445 (w), 1260 (s), 1179 (w), 1093 (s), 1018 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 508 $[M+H]^+$ (100%).

Partie expérimentale

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate 276



275
$C_{10}H_{16}N_2O_3S$
244.31

91%

276
$C_{14}H_{19}N_3O_5S$
341.38

To a solution of biotin **275** (0.5 g, 2.05 mmol) in DMF (15 mL) were added NHS (0.24 g, 2.05 mmol) and DCC (0.55 g, 2.66 mmol). After 24 h at RT the reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The resulting white solid was washed with $CHCl_3$ (2x10 mL) and iPrOH (2x10 mL) affording the product (0.64 g, 1.87 mmol, 91%) as a white solid.

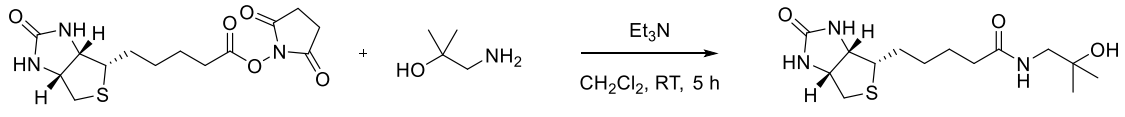
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 6.42 (s, 1H, N**H**), 6.36 (s, 1H, N**H**), 4.35-4.27 (m, 1H, C**H**), 4.16-4.13 (m, 1H, C**H**), 3.18-3.14 (m, 1H, C**H**), 2.89-2.85 (m, 1H, C**H**H), 2.81 (s, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.62-2.54 (m, 1H, CH**H**), 1.72-1.35 (m, 6H, 3xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, DMSO-d_6) δ 170.3 (2x**C**), 168.9 (**C**), 162.7 (**C**), 61.0 (**C**H), 59.2 (**C**H), 55.2 (**C**H), 39.9 (**C**H$_2$), 30.0 (**C**H$_2$), 27.8 (**C**H$_2$), 27.6 (**C**H$_2$), 25.4 (2x**C**H$_2$), 24.3 (**C**H$_2$).

IR (neat, cm^{-1}) 3235 (br), 1818 (w), 1699 (s), 1462 (w), 1364 (m),1214 (s), 1071 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 342 $[M+H]^+$ (100%).

N-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamide 278



276
$C_{14}H_{19}N_3O_5S$
341.38

277
$C_4H_{11}NO$
89.14

278
$C_{14}H_{25}N_3O_3S$
315.43

To a solution of biotin-NHS **276** (0.6 g, 1.75 mmol) and aminoalcohol **277** (0.19 g, 2.11 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added Et_3N (0.29 mL, 2.11 mmol). After 5 h at RT the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (10%-15% MeOH/CH_2Cl_2) affording the product (0.44 g, 1.40 mmol, 79%) as a white solid.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7.63 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, O**H**), 6.41 (s, 1H, N**H**), 6.34 (s, 1H, N**H**), 4.42 (s, 1 H, N**H**), 4.33-4.22 (m, 1H, C**H**), 4.17-4.06 (m, 1H, C**H**), 3.13-3.05 (m, 1H, C**H**), 3.00 (d, *J* = 6.0 Hz, C**H$_2$**), 2.82 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H, C**H**H), 2.59 (s, 1H, CH**H**), 2.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.69-1.13 (m, 6H, 3xC**H$_2$**), 1.03 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

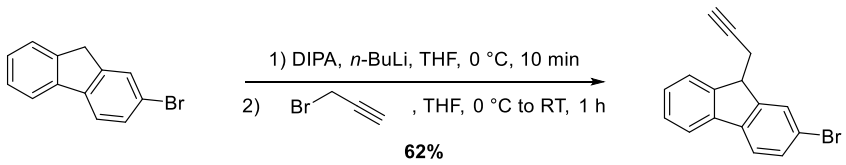
^{13}C NMR (76 MHz, DMSO-d_6) δ 172.4 (**C**), 162.7 (**C**), 69.4 (**C**), 61.1 (**C**H), 59.2 (**C**H), 55.4 (**C**H), 49.6 (**C**H$_2$), 35.2 (**C**H$_2$), 28.3 (**C**H$_2$), 28.1 (**C**H$_2$), 27.3 (2x**C**H$_3$), 25.4 (**C**H$_2$), 25.2 (**C**H$_2$).

IR (neat, cm^{-1}) 3398 (m), 3261 (br), 2914 (br), 1688 (s), 1646 (s), 1521 (m), 1465 (m), 1398 (m), 1261 (m), 1213 (m), 1184 (m), 1161 (m), 1071 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 316 $[M+H]^+$ (100%)

Partie expérimentale

2-bromo-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-fluorene 128



109
$C_{13}H_9Br$
245.12

128
$C_{16}H_{11}Br$
283.17

To a solution of DIPA (1.1 mL, 8.16 mmol) in THF (60 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (3.3 mL, 8.16 mmol). After 30 min at 0 °C a solution of 2-bromofluorene **109** in THF (20 mL) was added at 0 °C. After 10 min at 0 °C propargyl bromide **127** (0.92 mL, 8.16 mmol) was added. After 1 h at RT a solution of 1 M HCl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% PE) afforded the product (1.42 g, 5.01 mmol, 62%) as a yellow solid.

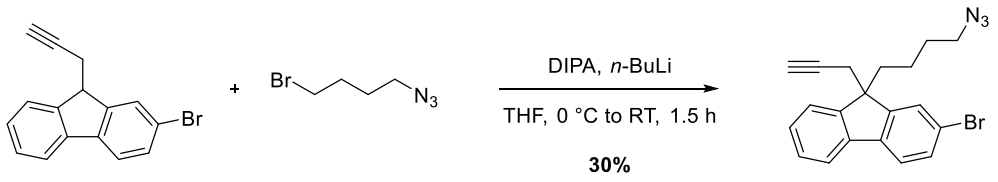
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88-7.85 (m, 1H, Ar**H**), 7.75-7.66 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.61 (d, *j* = 8.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.52 (ddd, *J* = 8.1, 1.8, 0.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.43-7.31 (m, 2H, 2xAr**H**), 4.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, C**H**), 2.87-2.48 (m, 2H, C**H$_2$**), 2.08 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, C**H**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) 148.2 (**C**), 145.8 (**C**), 140 (2x**C**), 130.9 (**C**H), 128.2 (**C**H), 127.9 (**C**H),127.6 (**C**H), 124.7 (**C**H), 121.3 (**C**H), 121.0 (**C**), 120.1 (**C**H), 82.2 (**C**), 45.8 (**C**H), 23.3 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3274 (s), 1448 (m), 1431 (m), 1408 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 284 $[M(^{79}Br)+H]^+$ (100%), 286 $[M(^{81}Br)+H]^+$ (100%).

9-(4-azidobutyl)-2-bromo-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-fluorene 122



128
$C_{16}H_{11}Br$
283.17

129
$C_4H_8ClN_3$
133.58

122
$C_{20}H_{18}BrN_3$
380,29

To a solution of DIPA (0.5 mL, 3.53 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (1.8 mL, 3.53 mmol). After 30 min at 0 °C a solution of the bromofluorene **128** (0.5 g, 1.77 mmol) in THF (5 mL) was added at 0 °C. After 10 min at 0 °C a solution of the bromoazide **129** (0.26 g, 1.94 mmol) in THF (5 mL) was added at 0 °C. After 1.5 h at RT a solution of 1 M HCl (20 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% cyclohexane then 10%-20% CH_2Cl_2/cyclohexane) afforded the product (0.2 g, 0.53 mmol, 30%) as a yellow oil.

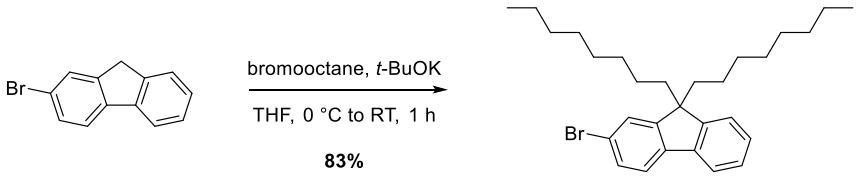
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71-7.67 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.54-7.47 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.36 (ddd, *J* = 12.4, 7.4, 1.6 Hz, 2H, 2xAr**H**), 3.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.61 (dd, *J* = 16.9, 2.6 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.20-2.16 (m, 2H, C**H$_2$**), 2.04 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, C**H**), 1.49-1.32 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.78-0.62 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.2 (**C**), 148.8 (**C**), 139.7 (**C**), 139.6 (**C**), 131.0 (**C**H), 128.0 (**C**H), 127.9 (**C**H), 126.8 (**C**H), 123.4 (**C**H), 121.4 (**C**H), 120.2 (**C**H), 81.0 (**C**), 71.1 (**C**), 52.7 (**C**), 51.1 (**C**H_2), 36.8 (**C**H_2), 30.3 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 21.3 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3294 (br), 2924 (br), 2855 (w), 2092 (s), 1566 (w), 1466 (m), 1443 (s), 1405 (m), 1250 (br), 1063 (m), 1005 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 781 [2M(^{79}Br)+Na]$^+$ (100%), 783 [2M(^{81}Br)+Na]$^+$ (100%).

2-bromo-9,9-dioctyl-9H-fluorene 159b



109
$C_{13}H_9Br$
245.12

159b
$C_{29}H_{41}Br$
469.55

To a solution of bromofluorene **109** (1.0 g, 4.08 mmol) and bromooctane (1.4 mL, 8.16 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise at 0 °C a solution of *t*-BuOK (1.4 g, 12.2 mmol) in THF (15 mL). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was warmed up to RT. After 30 min at RT a 1 M solution of HCl (40 mL) was added and the mixture was extacted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% PE) afforded the product (1.58 g, 3.39 mmol, 83%) as a colourless oil.

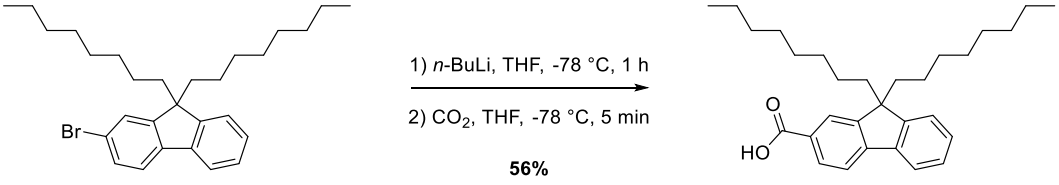
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69-7.63 (m, 1H, Ar**H**), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar**H**), 7.47-7.41 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.35-7.29 (m, 3H, 3xAr**H**), 1.93 (ddd, *J* = 8.8, 5.1, 3.1 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.25-0.98 (m, 20H, 10xC**H$_2$**), 0.82 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.65-0.53 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 153.1 (**C**), 150.5 (**C**), 140.3 (**C**), 140.2 (**C**), 130.0 (**C**H), 127.6 (**C**H), 127.1 (**C**H), 126.3 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.1 (**C**H+**C**), 119.9 (**C**H), 55.5 (**C**), 40.4 (2x**C**H_2), 31.9 (2x**C**H_2), 30.1 (2x**C**H_2), 29.3 (4x**C**H_2), 23.8 (2x**C**H_2), 22.7 (2x**C**H_2), 14.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1465 (s), 1441 (s), 1376 (m), 1261 (w), 1217 (w), 1132 (w), 1062 (m), 1004 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 470 $[M(^{79}Br)+H]^+$ (50%), 472 $[M(^{81}Br)+H]^+$ (50%).

9,9-dioctyl-9H-fluorene-2-carboxylic acid 160b



159b
$C_{29}H_{41}Br$
469.55

160b
$C_{30}H_{42}O_2$
434.66

To a solution of *n*-BuLi (2.6 mL, 6.40 mmol) in THF (25 mL) was added dropwise at -78 °C a solution of the fluorene **159b** (2.0 g, 4.3 mmol) in THF (25 mL). After 1 h at -78 °C CO_2 was bubbled through the mixture at -78 °C for 5 min then a solution of 1 M HCl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.04 g, 2.40 mmol, 56%) as a colourless oil.

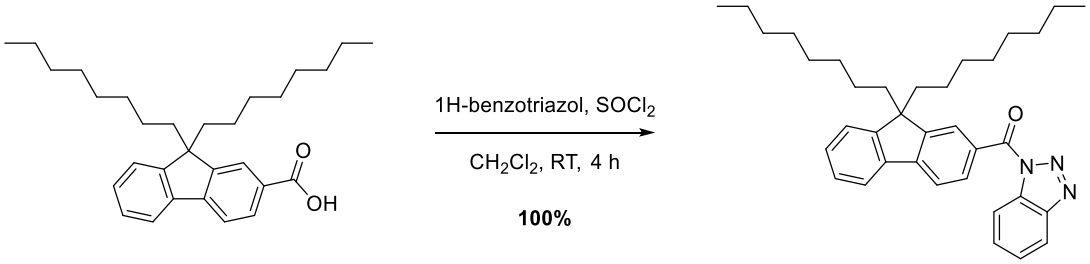
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21-8.01 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.86-7.71 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.42-7.31 (m, 3H, 3xAr**H**), 2.08-1.93 (m, 4H, 2x$C\mathbf{H_2}$), 1.25-0.98 (m, 20H, 5x$C\mathbf{H_2}$), 0.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2x$C\mathbf{H_3}$), 0.65-0.53 (m, 4H, 2x$C\mathbf{H_2}$).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 172.9 (**C**), 152.1 (**C**), 151.0 (**C**), 147.0 (**C**), 139.9 (**C**), 129.7 (**C**H), 128.7 (**C**H), 127.8 (**C**), 127.2 (**C**H), 124.8 (**C**H), 123.2 (**C**H), 120.9 (**C**H), 119.7 (**C**H), 55.4 (**C**), 40.3 (2x$\mathbf{C}CH_2$), 31.9 (2x$\mathbf{C}CH_2$), 30.1 (2x$\mathbf{C}CH_2$), 29.3 (4x$\mathbf{C}CH_2$), 23.8 (2x$\mathbf{C}CH_2$), 22.7 (2x$\mathbf{C}CH_2$), 14.2 (2x$\mathbf{C}CH_3$).

IR (neat, cm^{-1}) 2916 (br), 1680 (s), 1615 (w), 1428 (m), 1298 (s), 1260 (s), 1154 (w), 1043 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 433 $[M-H]^-$ (100%).

(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)(9,9-dioctyl-9H-fluoren-2-yl)methanone 161b



160b
$C_{30}H_{42}O_2$
434.66

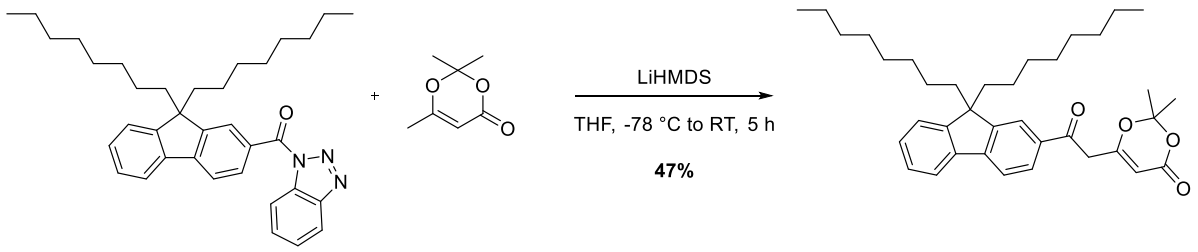
161b
$C_{36}H_{45}N_3O$
535.78

To a solution of benzotriazol (1.1 g, 9.21 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) was added $SOCl_2$ (0.17 mL, 2.31 mmol). After 30 min a solution of the acid **160b** (1.0 g, 2.31 mmol) was added. After 4 h at RT the reaction mixture was filtered and the filter cake was rinced with a 2 M solution of NaOH (20 mL). The filtrate was extracted with CH_2Cl_2 (3x50 mL) and concentrated *in vacuo* affording the product (1.17 g, 2.31 mmol, 100%) as a yellow oil which was used for the next step without any further purification.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 (dt, *J* = 9.3,0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 8.30 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 8.23 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar**H**), 8.19 (dt, *J* = 8.2-0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.85-7.79 (m, 1H, Ar**H**), 7.72 (ddd, *J* = 8.2,7.1,1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.56 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.42-7.39 (m, 3H, 3xAr**H**), 2.07-2.00 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.29-0.99 (m, 20H, 5xC**H$_2$**), 0.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.68 (br. s, 4H, 2xC**H$_2$**).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 558 $[M+Na]^+$ (100%).

6-(2-(9,9-dioctyl-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 162b



161b
$C_{36}H_{45}N_3O$
535.78

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

162b
$C_{37}H_{50}O_4$
558.80

To a solution of HMDS (1.0 mL, 2.62 mL) in THF (50 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (1.85 mL, 4.62 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and methyldioxinone **65** (0.57 mL, 4.62 mmol) was added at -78 °C. After 20 min at -78 °C a solution of the benzotriazol **161b** (1.17 g, 2.31 mmol) in THF (30 mL) was added at -78 °C. After 4 h at -78 °C the reaction mixture was warmed up at RT. After 30 min at RT a solution of 1 M HCl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.6 g, 1.10 mmol, 47%) as a yellow oil.

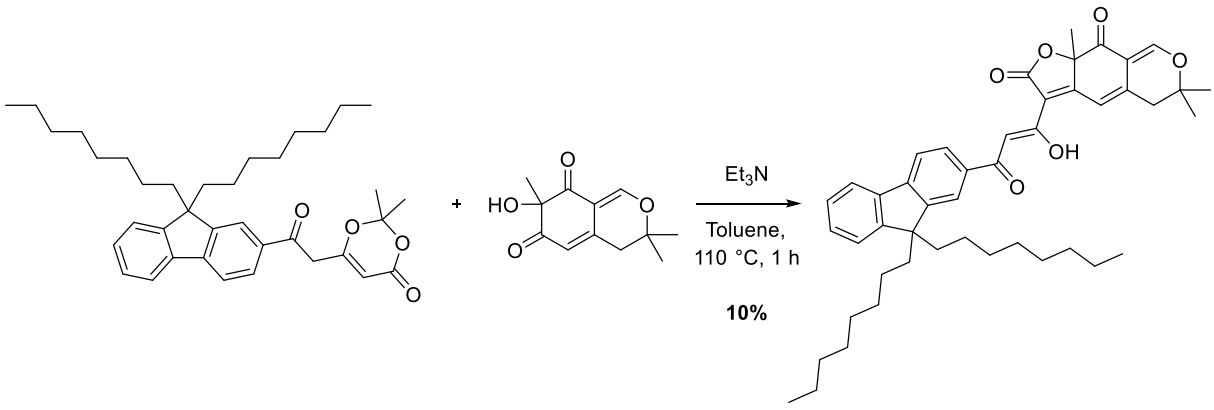
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.95-7.76 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.42-7.36 (m, 3H, 3xAr**H**), 5.46 (s, 1H, C**H**), 3.97 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.05-1.99 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.73 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.25-0.97 (m, 20H, 10xC**H$_2$**), 0.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.56 (br. s, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 207.1 (**C**), 193.1 (**C**), 165.7 (**C**), 161.0 (**C**), 152.0 (2x**C**), 139.5 (**C**), 134.6 (**C**), 129.0 (**C**H), 128.2 (**C**H), 127.3 (**C**H), 123.3 (**C**H), 122.6 (**C**H), 121.1 (**C**H), 119.8 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.2 (**C**H), 55.5 (**C**), 43.7 (**C**H_2), 40.3 (2x**C**H_2), 31.9 (2x**C**H_2), 31.1 (2x**C**H_2), 29.3 (4x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3), 23.9 (2x**C**H_2), 22.7 (2x**C**H_2), 14.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1710 (s), 1686 (s), 1606 (s), 1453 (m), 1376 (m), 1264 (s), 1210 (m), 1087 (m), 1046 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 560 $[M+H]^+$ (40%).

(Z)-3-(3-(9,9-dioctyl-9H-fluoren-2-yl)-3-hydroxyacryloyl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 163b



162b
$C_{37}H_{50}O_4$
558.80

61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

163b
$C_{46}H_{56}O_6$
704.95

To a solution of the dioxinone **162b** (0.6 g, 1.07 mmol) and the dearomatized alcohol **61** (0.2 g, 0.89 mmol) in toluene (10 mL) was added 4Å M.S. (200 mg). After 30 min at 110 °C Et_3N (0.25 mL, 1.78 mmol) was added. After 20 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a 1 M solution of HCl (20 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (62 mg, 0.09 mmol, 10%) as a brown oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.03 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1H, C**H**), 7.99 (s, 1H, Ar**H**), 7.77-7.75 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.57 (s, 1H, C**H**), 7.39-7.36 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.13 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, C**H**), 2.79 (d, *J* = 17.3 Hz, CH**H**), 2.72 (d, *J* = 16.0 Hz, C**H**H), 2.01 (dd, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 2xC**H$_2$**), 1.74 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.23-0.93 (m, 24H, 6xC**H$_2$**), 0.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.57 (br. s, 4H, 2xC**H$_2$**).

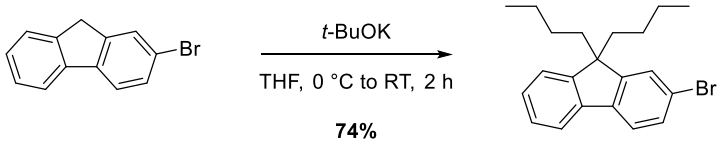
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9 (**C**), 189.9 (**C**), 168.5 (**C**), 167.7 (**C**), 158.9 (**C**H), 152.2 (**C**), 151.4 (**C**), 146.5 (**C**), 141.1 (**C**), 140.0 (**C**), 134.5 (**C**), 128.6 (**C**H), 127.7 (**C**H), 127.2 (**C**H), 123.2 (**C**H), 122.0 (**C**H), 120.9 (**C**H), 119.8 (**C**H), 114.9 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 97.8 (**C**H), 86.6 (**C**), 81.3 (**C**), 55.5 (**C**), 40.3 (**C**H_2), 40.1 (**C**), 31.9 (2x**C**H_2), 29.3 (8x**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 26.6 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3), 23.9 (2x**C**H_2), 22.7 (2x**C**H_2), 14.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2979 (w), 2926 (w), 1755 (s), 1585 (s), 1449 (m), 1373 (w), 1351 (w), 1264 (s), 1177 (m), 1088 (s), 1045 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 727 $[M+Na]^+$ (100%).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{46}H_{57}O_6]^+$ 705.4155, found 705.4170.

2-bromo-9,9-dibutyl-9H-fluorene 159a



109
$C_{13}H_9Br$
245.12

159a
$C_{21}H_{25}Br$
357.33

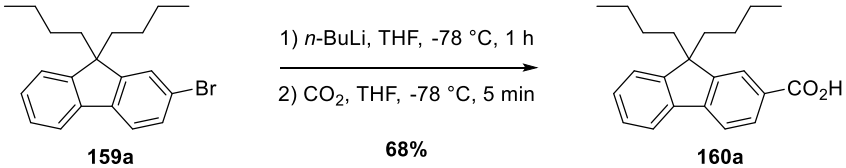
To a solution of bromofluorene **109** (2.0 g, 8.16 mmol) and bromobutane (1.76 mL, 16.3 mmol) in THF (30 mL) was added at 0 °C a solution of *t*-BuOK (2.8 g, 24.4 mmol) in THF (10 mL). After 2 h at RT a 1 M solution of HCl (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5% EtOAc/PE) afforded the product (2.2 g, 6.16 mmol, 74%) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69-7.63 (m, 1H, Ar**H**), 7.58-7.53 (m, 1H, Ar**H**), 7.48-7.42 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.367.30 (m, 3H, 3xAr**H**), 2.02-1.84 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.08 (sex, *J* = 7.3 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.68 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.63-0.52 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 153.1 (**C**), 150.4 (**C**), 140.3 (**C**), 140.2 (**C**), 130.0 (**C**H), 127.6 (**C**H), 127.1 (**C**H), 126.3 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.2 (**C**H), 121.1 (**C**), 119.9 (**C**H), 55.4 (**C**), 40.2 (2x**C**H$_2$), 26.0 (2x**C**H$_2$), 23.1 (2x**C**H$_2$), 13.9 (2x**C**H$_3$).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 357[M(^{79}Br)+H]$^+$ (10%), 359 [M(^{81}Br)+H]$^+$ (10%).

9,9-dibutyl-9H-fluorene-2-carboxylic acid 160a



159a
$C_{21}H_{25}Br$
357.33

160a
$C_{22}H_{26}O_2$
322.45

To a solution of *n*-BuLi (3.3 mL, 8.24 mL) in THF (40 mL) was added dropwise at -78 °C a solution of the fluorene **159a** (1.96 g, 5.49 mmol) in THF (10 mL). After 1 h at -78 °C CO_2 was bubbled through the mixture for 5 min then a 1 M solution of HCl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/PE) afforded the product (1.21 g, 3.73 mmol, 68%) as a yellow oil.

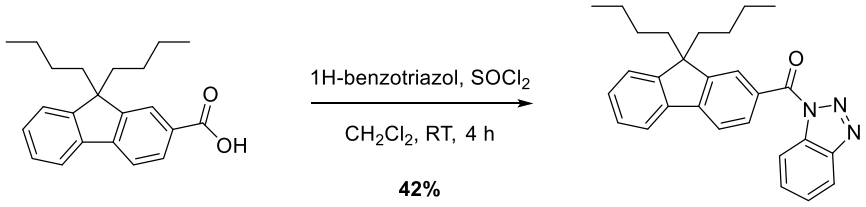
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, Ar**H**), 8.10 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.41-7.36 (m, 3H, 3xAr**H**), 2.06-1.99 (m, 4H, 2xC**H₂**), 1.14-0.99 (m, 4H, 2xC**H₂**), 0.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H₃**), 0.63-0.50 (m, 4H, 2xC**H₂**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 172.0 (**C**), 152.1 (**C**), 151.0 (**C**), 146.9 (**C**), 139.9 (**C**), 129.7 (**C**H), 128.7 (**C**H), 127.2 (**C**H), 127.5 (**C**), 124.7 (**C**H), 123.2 (**C**H), 120.9 (**C**H), 119.7 (**C**H), 55.3 (**C**), 40.1 (2x**C**H_2), 26.1 (2x**C**H_2), 23.1 (2x**C**H_2), 13.9 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1677 (s), 1607 (w), 1584 (w), 1415 (m), 1349 (w), 1291 (m), 1261 (m), 1220 (m), 1123 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 321 $[M-H]^-$ (100%).

(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)(9,9-dibutyl-9H-fluoren-2-yl)methanone 161a



160a
$C_{22}H_{26}O_2$
322.45

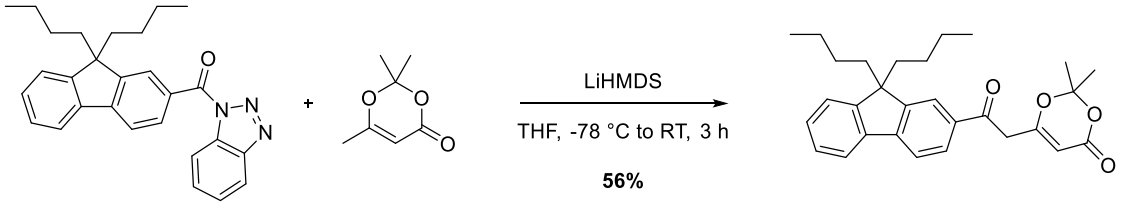
161a
$C_{28}H_{29}N_3O$
423.56

To a solution of 1H-benzotriazol (1.77 g, 14.9 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added $SOCl_2$ (0.27 mL, 3.72 mmol). After 30 min at RT a solution of the fluorene **160a** (1.2 g, 3.72 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added. After 4 h at RT the reaction mixture was filtered and the filter cake was rinced with a 2 M solution of NaOH (50 mL). The filtrate was extracted with CH_2Cl_2 (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was taken up in Et_2O (20 mL) and the filtrate was concentrated *in vacuo* affording the product (0.65 g, 1.53 mmol, 42%) as a white solid which was used for the next step without any further purification.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 8.30 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar**H**), 8.23 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 8.19 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 7.88 (dd, *J* = 8.0, 0.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.85-7.80 (m, 1H, Ar**H**), 7.72 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.57 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.44-7.37 (m, 3H, 3xAr**H**), 2.09-2.01 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.14-1.06 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.65-0.57 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 447 [$M+Na^+$] (15%).

6-(2-(9,9-dibutyl-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 162a



161a
$C_{28}H_{29}N_3O$
423.56

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

162a
$C_{29}H_{34}O_4$
446.59

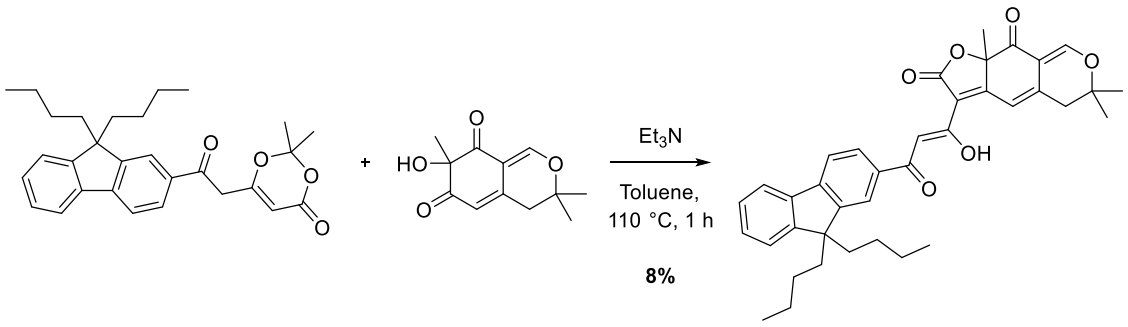
To a solution of HMDS (0.65 mL, 3.08 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (1.23 mL, 3.08 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and methyl dioxinone **65** (0.57 mL, 4.62 mmol) was added. After 20 min at -78 °C a solution of the benzotriazol **161a** (0.65 g, 1.54 mmol) in THF (10 mL) was added at -78 °C. After 2 h at -78 °C the reaction mixture was allowed to warm up at RT. After 30 min at RT a 1 M solution of HCl (30 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.39 g, 0.86 mmol, 56%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.93 (s, 1H, Ar**H**), 7.90 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar**H**), 7.79-7.76 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.42-7.36 (m, 3H, 3xAr**H**), 5.46 (s, 1H, C**H**), 3.98 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.08-1.96 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.73 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.13-0.97 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.59-0.48 (m, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 193.1 (**C**), 165.6 (**C**), 161.0 (**C**), 152.2 (**C**), 151.6 (**C**), 147.3 (**C**), 139.6 (**C**), 134.6 (**C**), 129.0 (**C**H), 128.2 (**C**H), 127.3 (**C**H), 123.3 (**C**H), 122.6 (**C**H), 121.1 (**C**H), 119.9 (**C**H),107.5 (**C**), 97.1 (**C**H), 55.5 (**C**), 43.7 (**C**H_2), 40.1 (2x**C**H_2), 26.1 (2x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3), 23.1 (2x**C**H_2), 13.9 (2x**C**H_3).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 447 $[M+H]^+$ (50%).

(Z)-3-(3-(9,9-dibutyl-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 163a



162a
$C_{29}H_{34}O_4$
446.59

61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

163a
$C_{38}H_{40}O_6$
592.73

To a solution of dioxinone **162a** (0.39 g, 0.87 mmol) and dearomatized alcohol **61** (0.16 g, 0.73 mmol) in toluene (8 mL) was added 4Å M.S. (174 mg). After 30 min at 110 °C Et_3N (0.2 mL, 1.46 mmol). After 30 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a 1M solution of HCl (10 mL) was added. The mixture was vigorously stirred for 15 min at RT and extracted wih EtOAc (3x40 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-15%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (36.2 mg, 0.061 mmol, 8%) as a brown oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.99 (s, 1H, C**H**), 7.77 (dd, *J* = 4.5, 3.3 Hz, 3H, 3xAr**H**), 7.57 (s, 1H, C**H**), 7.39-7.35 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.13 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, C**H**), 2.79 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, C**H**H), 2.72 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, CH**H**), 2.10-1.96 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.74 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.42 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.10-1.03 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.88-0.83 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.67-0.56 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

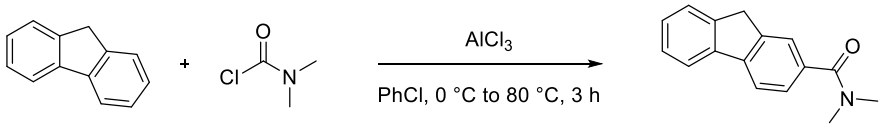
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9 (**C**), 189.9 (**C**), 173.7 (**C**), 168.5 (**C**), 167.7 (**C**), 158.8 (**C**), 152.2 (**C**), 151.4 (**C**), 146.5 (**C**), 141.1 (**C**), 140.0 (**C**), 134.6 (**C**), 128.6 (**C**H), 127.7 (**C**H), 127.2 (**C**H), 123.2 (**C**H), 122.0 (**C**H), 120.9 (**C**H), 119.8 (**C**H), 114.9 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 97.6 (**C**H), 86.6 (**C**), 81.3 (**C**), 55.4 (**C**), 40.1 (2x**C**H$_2$), 28.1 (**C**H$_3$), 26.6 (**C**H$_3$), 26.3 (**C**H$_3$), 26.1 (2x**C**H$_2$), 23.1 (2x**C**H$_2$), 13.9 (2x**C**H$_3$).

IR (neat, cm^{-1}) 2956 (w), 2930 (w), 2859 (w), 1758 (s), 1712 (m), 1587 (s), 1466 (w), 1373 (w), 1353 (w), 1265 (s), 1250 (m), 1178 (m), 1091 (m), 1023 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 615 $[M+Na]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{38}H_{41}O_6]^+$ 593.2903, found 593.2916.

N,N-dimethyl-9H-fluorene-2-carboxamide 133



124	**132**	**90%**	**133**
$C_{13}H_{10}$	C_3H_6ClNO		$C_{16}H_{15}NO$
166.22	107.54		237.30

To a solution of fluorene **124** (5.0 g, 30.1 mmol) and dimethylcarbamyl chloride **132** (8.3mL, 90.3 mmol) in chlorobenzene (25 mL) was added at 0 °C $AlCl_3$ (12.0 g, 90.3 mmol). After 3 h at RT the reaction mixture was cooled down and poured into a 2 M HCl solution (100 mL) at 0 °C. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3x150 mL). The organic phases were combined, washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x100 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (50%-70% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (6.4 g, 27.1 mmol, 90%) as a yellow solid.

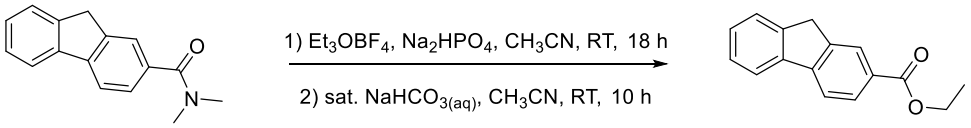
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85-7.75 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.62 (br. s, 1H, Ar**H**), 7.45-7.31 (m, 3H, 3xAr**H**), 3.93 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.13 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.05 (s, 3H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 172.2 (**C**), 143.8 (**C**), 143.4 (**C**), 143.1 (**C**), 141.0 (**C**), 134.7 (**C**), 127.4 (**C**H), 127.0 (**C**H), 126.1 (**C**H), 125.3 (**C**H), 124.2 (**C**H), 120.4 (**C**H), 119.7 (**C**H), 39.9 (**C**H_3), 37.0 (**C**H_2), 35.6 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1622 (s), 1506 (m), 1408 (m), 1391 (s), 1265 (w), 1148 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 236 $[M-H]^-$ (40%), 268 $[M+MeOH-H]^-$ (50%).

Ethyl 9H-fluorene-2-carboxylate 123



133
$C_{16}H_{15}NO$
237.30

87%

123
$C_{16}H_{14}O_2$
238.29

To a solution of the amide **133** (1.5 g, 6.32 mmol) in MeCN (30 mL) was added at RT were added Na_2HPO_4 (1.35 g, 9.48 mmol) and Et_3OBF_4 (3.6 g, 19.0 mmol). After 18 h at RT a saturated solution of $NaHCO_3$ (120 mL) was added at RT the mixture was extracted with EtOAc (3x100 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.3 g, 5.40 mmol, 87%) as a yellow solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, Ar**H**), 8.14-8.05 (m, 1H, Ar**H**), 7.84 (t, *J* = 10.5 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.62-7.56 (m, 1H, Ar**H**), 7.39 (pd, *J* = 10.5, 4.5, 2H, 2xAr**H**), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.96 (s, 2H, C**H$_2$**), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, C**H$_3$**).

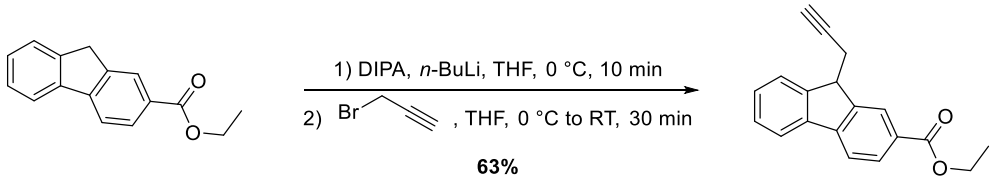
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 167.1 (**C**), 146.3 (**C**), 144.5 (**C**), 143.2 (**C**), 140.8 (**C**), 128.8 (**C** + **C**H), 128.0 (**C**H), 127.2 (**C**H), 126.4 (**C**H), 125.4 (**C**H), 120.9 (**C**H), 119.7 (**C**H), 61.1 (**C**H_2), 37.0 (**C**H_2), 14.6 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2979 (w), 1694 (s), 1617 (w), 1475 (w), 1429 (m), 1401 (m), 1276 (s), 1186 (s), 1168 (m), 1086 (m), 1031 (w), 1004 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 237 $[M-H]^-$ (15%).

Partie expérimentale

Ethyl 9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-fluorene-2-carboxylate 135



123
$C_{16}H_{14}O_2$
238.29

135
$C_{19}H_{16}O_2$
276.33

To a solution of DIPA (0.58 mL, 4.20 mmol) in THF was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (1.68 mL, 4.20 mmol). After 30 min at 0 °C a solution of the fluorene ester **123** (1.0 g, 4.20 mmol) in THF (10 mL) was added at 0 °C. After 10 min at 0 °C propargyl bromide **127** (0.47 mL, 4.20 mmol) was added at 0 °C. After 30 min at 0 °C a 1 M solution of HCl (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.73 g, 2.64 mmol, 63%) as a white solid.

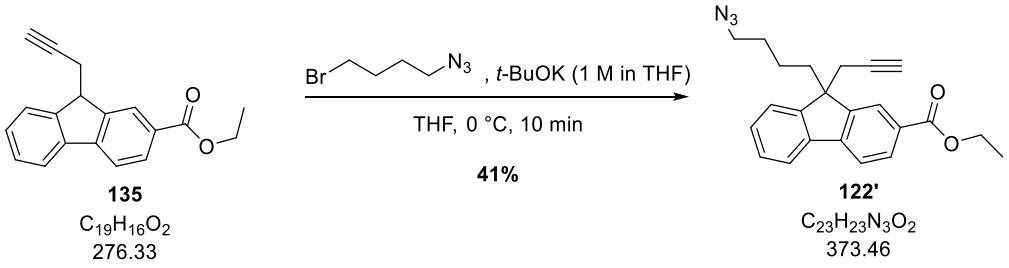
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.39-8.34 (m, 1H, Ar**H**), 8.18-8.07 (m, 1H, Ar**H**), 7.87-7.72 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.41 (pd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 2H, 2xAr**H**), 4.41 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, C**H$_2$**), 4.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, C**H**), 2.85-2.66 (m, 2H, C**H$_2$**), 2.04 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, C**H**), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 167.0 (**C**), 147.3 (**C**), 146.0 (**C**), 145.5 (**C**), 140.0 (**C**), 129.7 (**C**H), 129.2 (**C**), 128.4 (**C**H), 128.0 (**C**H), 125.9 (**C**H), 125.0 (**C**H), 120.9 (**C**H), 119.7 (**C**H), 70.2 (**C**H), 61.1 (**C**H_2), 45.8 (**C**H), 23.2 (**C**H_2), 14.5 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1707 (s), 1606 (m), 1416 (w), 1265 (m), 1031 (br).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 299 $[M+Na]^+$ (20%).

Ethyl 9-(4-azidobutyl)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-fluorene-2-carboxylate 122'



135
$C_{19}H_{16}O_2$
276.33

122'
$C_{23}H_{23}N_3O_2$
373.46

To a solution of the fluorene **135** (0.3 g, 1.08 mmol) and bromobutyl azide **129** (0.57 g, 1.62 mmol) in THF (30 mL) was added at 0 °C a solution of *t*-BuOK (0.14 g, 1.2 mmol) in THF (1 mL). After 10 min at 0 °C a saturated solution of NH_4Cl (20 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-50% CH_2Cl_2/cyclohexane) afforded the product (0.16 g, 0.43 mmol, 41%) as a yellow oil.

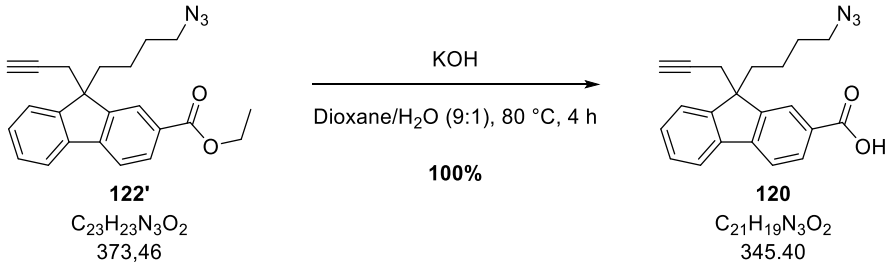
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.20 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 8.10 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.79-7.75 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.59-7.57 (m, 1H, Ar**H**), 7.44-7.37 (m, 2H, Ar**H**), 4.45-4.38 (m, 2H, C**H$_2$**), 3.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.67 (dd, *J* = 5.4, 2.7 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.26-2.23 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.99 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, C**H**), 1.43 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H, C**H$_3$**), 0.88-0.83 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.73-0.63 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 167.0 (**C**), 150.1 (**C**), 149.1 (**C**), 145.3 (**C**), 139.6 (**C**), 129.7 (**C**H), 129.4 (**C**), 128.7 (**C**H), 128.0 (**C**H), 124.5 (**C**H), 123.6 (**C**H), 121.0 (**C**H), 119.8 (**C**H), 81.1 (**C**), 70.9 (**C**H), 61.2 (**C**H_2), 52.7 (**C**), 51.1 (**C**H_2), 36.8 (**C**H_2), 30.3 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 21.4 (**C**H_2), 14.6 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1709 (s), 1612 (m), 1452 (w), 1423 (w), 1366 (m), 1272 (w), 1262 (s), 1217 (m), 1099 (m), 1021 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 396 (50%) $[M+Na]^+$, 769 (80%) $[2M+Na]^+$.

9-(4-azidobutyl)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-fluorene-2-carboxylic acid 120



122'
$C_{23}H_{23}N_3O_2$
373,46

120
$C_{21}H_{19}N_3O_2$
345.40

To a solution of the fluorene **122'** (80 mg, 0.21 mmol) in dioxane/H_2O (9:1) (2 mL) was added KOH (47 mg, 0.84 mmol). After 4 h at 80 °C the reaction mixture was cooled down to RT and concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between a solution of 5 M HCl (5 mL) and EtOAc (5 mL). The organic phase was separated and concentrated *in vacuo* affording the product (72.5 mg, 0.21 mmol, 100%) as a yellow oil.

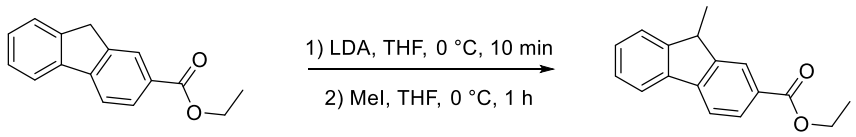
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (s, 1H, Ar**H**), 8.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar**H**), 7.86-7.74 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.60-7.57 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.42 (dd, *J* = 8.4,4.5 Hz, 2H, 2xAr**H**), 3.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.68 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.28 (dd, *J* = 13.6, 7.1 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.03 (s, 1H, C**H**), 1.47-1.26 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.73-0.66 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 172.1 (**C**), 150.3 (**C**), 149.2 (**C**), 146.3 (**C**), 139.4 (**C**), 130.6 (**C**H), 129.0 (**C**H), 128.1 (**C**), 128.0 (**C**H), 125.2 (**C**H), 123.6 (**C**H), 121.2 (**C**H), 120.0 (**C**H), 81.0 (**C**), 71.0 (**C**H), 52.7 (**C**), 51.1 (**C**H_2), 36.8 (**C**H_2), 30.3 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 21.4 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3299 (br), 1687 (s), 1630 (m), 1611 (m), 1467 (w), 1376 (m),1273 (s), 1200 (m), 1124 (w), 1046 (m), 1018 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 344 $[M-H]^-$ (70%).

ethyl 9-methyl-9H-fluorene-2-carboxylate 134



123
$C_{16}H_{14}O_2$
238.29

54%

134
$C_{17}H_{16}O_2$
252.31

To a solution of DIPA (1.2 mL, 8.39 mmol) in THF (50 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (3.4 mL, 8.39 mmol). After 30 min at 0 °C a solution of the fluorene **123** (2.0 g, 8.39 mmol) in THF (10 mL) was added at 0 °C. After 10 min at 0 °C MeI (0.52 mL, 8.39 mmol) was added at 0 °C. After 1 h at 0 °C a saturated solution of NH_4Cl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.14 g, 4.52 mmol, 54%) as a colourless oil.

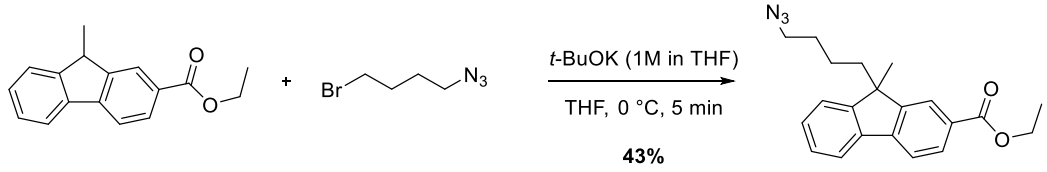
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (s, 1H, Ar**H**), 8.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.87-7.73 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.59-7.49 (m, 1H, Ar**H**), 7.44-7.33 (m, 2H, 2xAr**H**), 4.41 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, C**H$_2$**), 4.02-3.96 (m, 1H, C**H**), 1.55 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 167.0 (**C**), 150.1 (**C**), 148.9 (**C**), 145.1 (**C**), 139.5 (**C**), 128.9 (**C**H), 128.1 (**C**H), 127.2 (**C**H), 125.3 (**C**H), 124.3 (**C**H), 121.0 (**C**H), 119.5 (**C**H), 61.0 (**C**H_2), 42.5 (**C**H), 18.0 (**C**H_3), 14.5 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1709 (s), 1614 (m), 1454 (w), 1390 (w), 1367 (m), 1297 (s), 1273 (s), 1230 (s), 1115 (w), 1097 (s), 1021 (w), 1006 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 286 $[M\text{-}Cl]^-$ (20%).

ethyl 9-(4-azidobutyl)-9-methyl-9H-fluorene-2-carboxylate 121'



134
$C_{17}H_{16}O_2$
252.31

129
$C_4H_8BrN_3$
178.03

121'
$C_{21}H_{23}N_3O_2$
349.43

To a solution of the fluorene ester **134** (1.0 g, 3.96 mmol) and bromobutyl azide **129** (1.0 g, 5.94 mmol) in THF (54 mL) was added dropwise at 0 °C a 1 M solution of *t*-BuOK (0.5 g, 4.36 mmol) in THF (5 mL). After 5 min at 0 °C a saturated solution of NH_4Cl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.6 g, 1.52 mmol, 43%) as a slightly yellow oil.

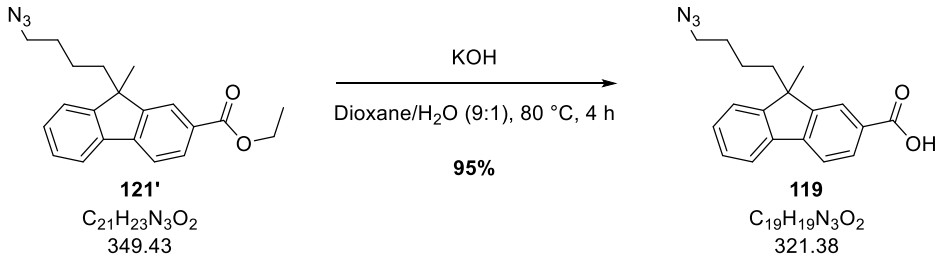
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.12-8.02 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.84-7.68 (m, 1H, Ar**H**), 7.41-7.36 (m, 3H, 3xAr**H**), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.09-2.02 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.51 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.44 (t, *J* = 7.1 Hz, C**H$_3$**), 1.35 (dd, *J* = 14.9-7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 0.70-0.65 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 167.1 (**C**), 152.8 (**C**), 151.8 (**C**), 144.9 (**C**), 139.2 (**C**), 129.3 (**C**), 129.2 (**C**H), 128.6 (**C**H), 127.5 (**C**H), 124.0 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.0 (**C**H), 119.8 (**C**H), 61.1 (**C**H_2), 51.2 (**C**H_2), 50.9 (**C**), 40.1 (**C**H_2), 29.2 (**C**H_2), 26.6 (**C**H_3), 21.6 (**C**H_2), 14.5 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1620 (s), 1601 (w), 1503 (w), 1497 (m), 1360 (m), 1120 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 350 $[M+H]^+$ (100%).

9-(4-azidobutyl)-9-methyl-9H-fluorene-2-carboxylic acid 119



121'
$C_{21}H_{23}N_3O_2$
349.43

119
$C_{19}H_{19}N_3O_2$
321.38

To a solution of fluorene ester **121'** (0.6 g, 1.71 mmol) in dioxane/H_2O (9:1) (11 mL) was added KOH (0.4 g, 6.87 mmol). After 4 h at 80 °C the reaction mixture was cooled down to RT and concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between EtOAc (20 mL) and a solution of 5 M HCl (20 mL). The organic phase was separated, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.52 g, 1.62 mmol, 95%) as a white solid.

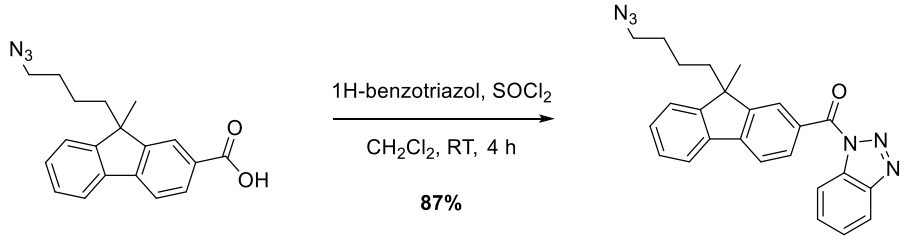
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17-8.10 (m, 1H, Ar**H**), 7.81-7.78 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.44-7.38 (m, 3H, 3xAr**H**), 3.02 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, C**H**), 2.11-2.03 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.53 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41-1.33 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.75-0.64 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 172.0 (**C**), 152.9 (**C**), 121.9 (**C**), 145.9 (**C**), 139.0 (**C**), 130.0 (**C**H), 128.9 (**C**H), 127.9 (**C**), 127.5 (**C**H), 124.6 (**C**H), 123.1 (**C**H), 121.2 (**C**H), 120.0 (**C**H), 51.1 (**C**H_2), 50.9 (**C**), 40.1 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 26.7 (**C**H_3), 21.7 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2941 (br), 2093 (m), 1680 (s), 1615 (m), 1438 (w), 1297 (s), 1097 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 320$[M-H]^-$ (60%).

(9-(4-azidobutyl)-9-methyl-9H-fluoren-2-yl)(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)methanone 135



119
$C_{19}H_{19}N_3O_2$
321.38

135
$C_{25}H_{22}N_6O$
422.49

To a solution of 1H-benzotriazol (1.0 g, 8.52 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added at RT $SOCl_2$ (0.15 mL, 2.13 mmol). After 30 min at RT a solution of the acid **119** (0.69 g, 2.13 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added at RT. After 4 h at RT the reaction mixture was filtered and the filter cake was rinced with a 2M solution of NaOH (40 mL). The organic phase was separated, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording the product (0.78 g, 1.85 mmol, 87%) as a colourless oil.

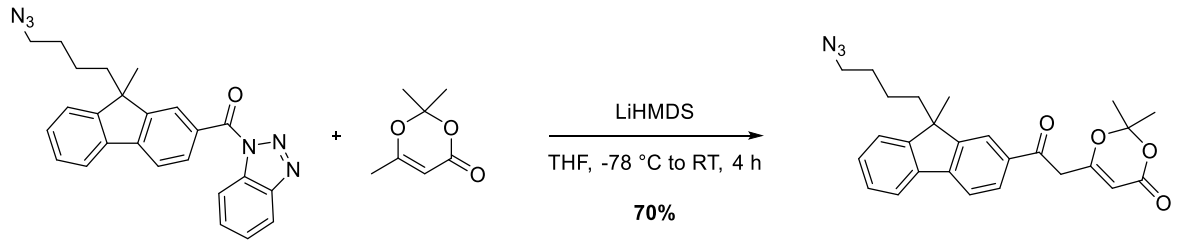
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 8.30 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 8.27-8.25 (m, 1H, Ar**H**), 8.20 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 7.90 (dd, *J* = 8.0, 0.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.86-7.82 (m, 1H, Ar**H**), 7.73 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.57 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.47-7.39 (m, 3H, 3xAr**H**), 3.05 (td, *J* = 7.1, 1.7 Hz, C**H$_2$**), 2.29-1.90 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.56 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.44-1.35 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.91-0.63 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 166.9 (**C**), 153.2 (**C**), 151.8 (**C**), 146.1 (**C**), 145.9 (**C**), 138.7 (**C**), 132.7 (**C**), 132.0 (**C**H), 130.5 (**C**H), 129.9 (**C**), 129.2 (**C**H), 127.7 (**C**H), 126.5 (**C**H), 126.4 (**C**H), 123.1 (**C**H), 121.4 (**C**H), 120.3 (**C**H), 119.9 (**C**H), 115.0 (**C**H), 51.2 (**C** + **C**H_2), 40.1 (**C**H_2), 29.2 (**C**H_2), 26.6 (**C**H_3), 21.8 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2925 (br), 2090 (m), 1695 (s), 1607 (s), 1484 (w), 1467 (m), 1420 (w), 1357 (s), 1321 (w), 1286 (m), 1212 (m), 1147 (w), 1105 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 423 $[M+H]^+$ (20%).

6-(2-(9-(3-azidopropyl)-9-methyl-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 117



135
$C_{25}H_{22}N_6O$
422.49

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

117
$C_{26}H_{27}N_3O_4$
445.52

To a solution of HMDS (0.83 mL, 3.92 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi (1.57 mL, 3.92 mmol). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was cooled down to -78 °C and methyl dioxinone **65** (0.52 ml, 3.92 mmol) was added. After 30 min at -78 °C a solution of the benzotriazole **135** (0.83 g, 1.96 mmol) in THF (10 ml) was added at -78 °C. After 3 h at -78 °C the reaction mixture was allowed to warm up to RT. After 1 h at RT a solution of 1 M HCl (20 mL) and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10%-15% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.6 g, 1.37 mmol, 70%) as a yellow oil.

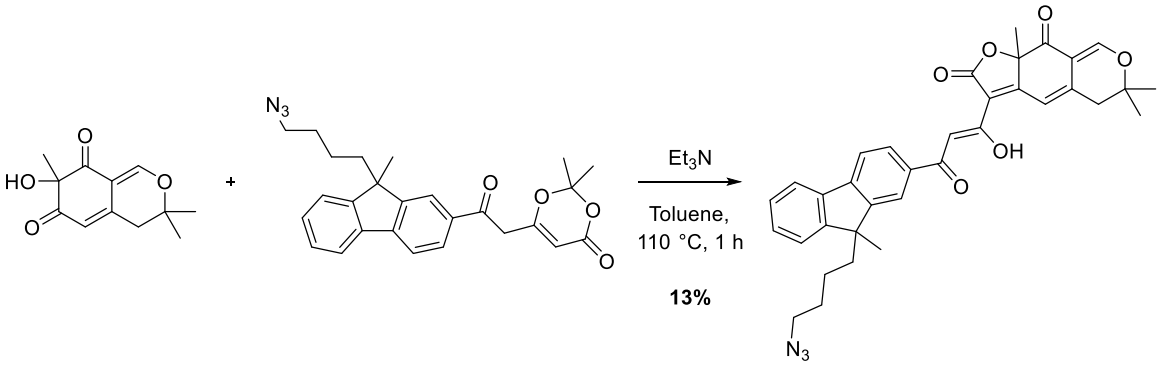
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.93 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.82-7.77 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.44-7.38 (m, 3H, 3xAr**H**), 5.45 (s, 1H, C**H**), 3.96 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.02 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.11-2.01 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.73 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.55 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.41-1.25 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.73-0.58 (m, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 193.0 (**C**), 165.6 (**C**), 153.0 (**C**), 152.4 (**C**), 146.2 (**C**), 138.6 (**C**), 134.8 (**C**), 129.3 (**C**H), 128.5 (**C**H), 127.7 (**C**H), 123.1 (**C**H), 12206 (**C**H), 121.4 (**C**H), 120.2 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.1 (**C**H), 51.1 (**C**H_2), 51.0 (**C**), 43.6 (**C**H_2), 40.1 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 26.7 (**C**H_3), 25.2 (2x**C**H_3), 21.7 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1705 (s), 1610 (m), 1508 (w), 1449 (w), 1315 (m), 1357 (s), 1249 (m), 1217 (w), 1117 (w), 1042 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 446 $[M+H]^+$ (100%).

(Z)-3-(3-(9-(4-azidobutyl)-9-methyl-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 115



61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

117
$C_{26}H_{27}N_3O_4$
445.52

115
$C_{35}H_{33}N_3O_6$
591.66

To a solution of dioxinone **117** (0.45 g, 1.0 mmol) and alcohol **61** (0.19 g, 0.83 mmol) in toluene (10 mL) was added 4Å M.S. (100 mg). After 40 min at 110 °C Et_3N (0.23 mL, 1.66 mmol) was added. After 20 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a solution of 1 M HCl (20 mL). After being vigorously stirred at RT for 15 min the reaction mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (62 mg, 0.1 mmol, 13%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, C**H** + Ar**H**), 7.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, 3xAr**H**), 7.56 (s, 1H, C**H**), 7.44-7.34 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.13 (s, 1H, C**H**), 3.01 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.79 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, C**H**H), 2.72 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, CH**H**), 2.16-1.97 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.74 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.52 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.35-1.28 (m, 2H, C**H$_2$**), 0.76-0.60 (m, 2H, C**H$_2$**).

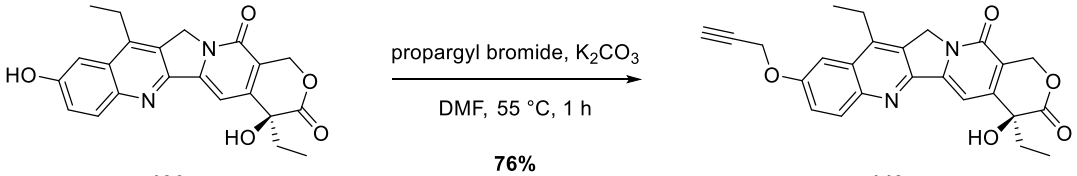
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.6 (**C**), 189.9 (**C**), 173.9 (**C**), 168.5 (**C**), 167.9 (**C**), 158.9 (**C**), 153.0 (**C**), 152.2 (**C**), 145.4 (**C**), 141.2 (**C**), 139.0 (**C**), 134.8 (**C**), 128.8 (**C**H), 127.9 (**C**H), 127.5 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.9 (**C**H), 121.2 (**C**H), 120.1 (**C**H), 114.8 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.7 (**C**), 97.5 (**C**H), 86.7 (**C**), 81.4 (**C**), 51.1 (**C**H_2), 51.0 (**C**), 40.1 (2x**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 26.7 (**C**H_3), 26.5 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3), 21.7 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2095 (m), 1756 (s), 1721 (m), 1588 (s), 1578 (w), 1453 (w), 1372 (w), 1265 (m), 1250 (w), 1179 (w), 1093 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 592 $[M+H]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{35}H_{34}N_3O_6]^+$ 592.2448, found 592.2444.

(S)-4,11-diethyl-4-hydroxy-9-(prop-2-yn-1-yloxy)-1,12-dihydro-14H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H)-dione 143



136
$C_{22}H_{20}N_2O_5$
392.41

143
$C_{25}H_{22}N_2O_5$
430.46

To a solution of SN-38 **136** (30 mg, 0.08 mmol) and propargyl bormide **127** (45µL, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) was added K_2CO_3 (55 mg, 0.40 mmol). After 1 h at 55 °C the reaction mixture was cooled down to RT and the mixture was filtered on a short pad of Celite®. The filtrate was concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (40%-50%-60% EtOAc/cyclohexane) affording the product (26 mg, 0.06 mmol, 76%) as a yellow solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.61 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.54-7.48 (m, 1H, Ar**H**), 5.76 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, C**H**H), 5.31 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, CH**H**), 5.25 (s, 2H, C**H$_2$**), 4.89 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.15 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.60 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, C**H**), 1.93-1.70 (m, 2H, C**H$_2$**), 1.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, C**H$_3$**), 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, C**H$_3$**).

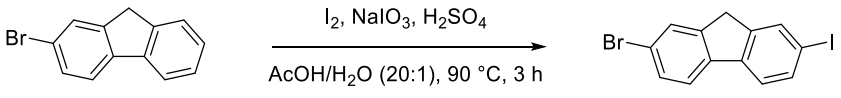
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 174.2 (**C**), 157.9 (**C**), 156.8 (**C**), 150.4 (**C**), 150.3 (**C**), 1475 (**C**), 145.9 (**C**), 144.1 (**C**), 132.5 (**C**H), 128.1 (**C**), 127.5 (**C**), 122.7 (**C**H), 118.1 (**C**), 103.8 (**C**H), 97.6 (**C**H), 78.0 (**C**H), 73.0 (**C**), 66.5 (**C**H_2), 56.3 (**C**H_2), 49.6 (**C**H_2), 31.8 (**C**H_2), 23.4 (**C**H_2), 13.8 (**C**H_3), 8.0 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3300 (br), 2924 (w), 1746 (m), 1657 (s), 1631 (m), 1521 (w), 1443 (m), 1379 (s), 1281 (w), 1169 (m), 1086 (s), 1044 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 431 $[M+H]^+$ (100%).

Partie expérimentale

2-bromo-7-iodo-9H-fluorene 179



109
$C_{13}H_9Br$
245.12

70%

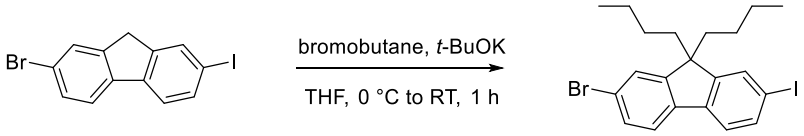
179
$C_{13}H_8BrI$
371.02

To a solution of 2-bromofluorene **109** (4.0 g, 16.3 mmol) and I_2 (2.0 g, 8.1 mmol) in H_2O (3 mL) were added at RT glacial AcOH (65 mL) and H_2SO_4 (1.5 mL). After 3 h at 90 °C the reaction mixture was cooled down to RT and filtered. The filter cake was rinced with glacial AcOH (30 mL), a 10% Na_2SO_3 solution (50 mL), H_2O (100 mL) and MeCN (20 mL) affording the product (4.2 g, 11.4 mmol, 70%) as a white solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, Ar**H**), 7.73-7.68 (m, 1H, Ar**H**), 7.67 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.52-7.49 (m, 2H, 2xAr**H**), 3.86 (s, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 145.2 (**C**), 144.8 (**C**), 140.5 (**C**), 139.9 (**C**), 136.1 (**C**H), 134.4 (**C**H), 130.3 (**C**H), 128.4 (**C**H), 121.7 (**C**H), 121.4 (**C**H), 121.2 (**C**), 92.4 (**C**), 36.6 (**C**H_2).

2-bromo-9,9-dibutyl-7-iodo-9H-fluorene 180



179
$C_{13}H_8BrI$
371.02

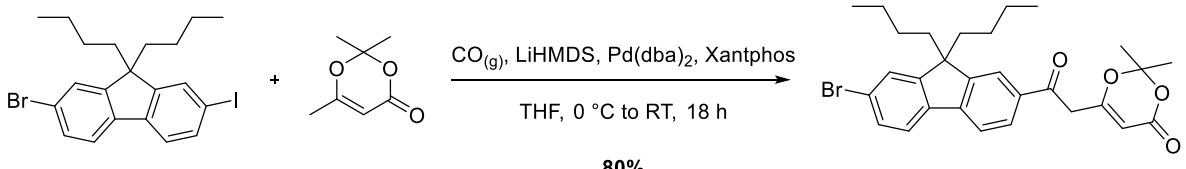
180
$C_{21}H_{24}BrI$
483,23

To a solution of fluorene **179** (2.0 g, 5.3 mmol) and bromobutane (1.2 mL, 10.8 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise at 0 °C a solution of *t*-BuOK (1.8 g, 16.0 mmol) in THF (18 mL). After 30 min at 0 °C the reaction mixture was allowed to warm up at RT. After 30 min at RT a 1M solution of HCl (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5% EtOAc/cyclohexane) afforeded the product (1.9 g, 3.9 mmol, 74%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69-7.61 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.45-7.42 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar**H**), 1.97-1.87 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.09 (sex, *J* = 7.2 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.63-0.50 (m, 4H, 2x**C**H$_2$).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 152.8 (**C**), 152.4 (**C**), 139.8 (**C**), 139.2 (**C**), 136.2 (**C**H), 132.2 (**C**H), 130.3 (**C**H), 126.2 (**C**H), 121.8 (**C**), 121.6 (**C**H), 121.3 (**C**H), 93.2 (**C**), 55.6 (**C**), 40.1 (2x**C**H$_2$), 25.9 (2x**C**H$_2$), 23.1 (2x**C**H$_2$), 13.9 (2x**C**H$_3$).

6-(2-(7-bromo-9,9-dibutyl-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 154



180
$C_{21}H_{24}BrI$
483.23

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

154
$C_{29}H_{33}BrO_4$
525.48

Note: This reaction was carried on into a double-chamber reactor designed by Skrydstrup et al.

Chamber A: To a solution of methyldioxinone **65** (0.28 mL, 2.2 mmol) and fluorene **180** (1.0 g, 2.0 mmol) in degassed THF (15 mL) were added in this order at 0 °C $Pd(dba)_2$ (0.12 g, 0.2 mmol), Xantphos (0.12 g, 0.2 mmol) and a solution of freshly prepared LiHMDS (HMDS : 1.2 mL, 6.0 mmol; *n*-BuLi : 2.5 M in hexane, 2.4 mL, 6.0 mmol) in degassed THF (5 mL). The chamber was then sealed.

Chamber B: When the chamber A was sealed, THF (20 mL) was added to a solid mixture of CO-gen. (0.64 g, 2.6 mmol) and CsF (40 mg, 0.2 mmol) and the chamber was sealed.

After 18 h at RT a solution of 1 M HCl (20 mL) was added in chamber A and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.82 g, 1.6 mmol, 80%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91-7.89 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar**H**), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar**H**), 7.50-7.42 (m, 2H, 2xAr**H**), 5.44 (s, 1H, C**H**), 3.95 (s, 2H, C**H$_2$**), 1.99-1.90 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.69 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.10-0.92 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.56-0.39 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

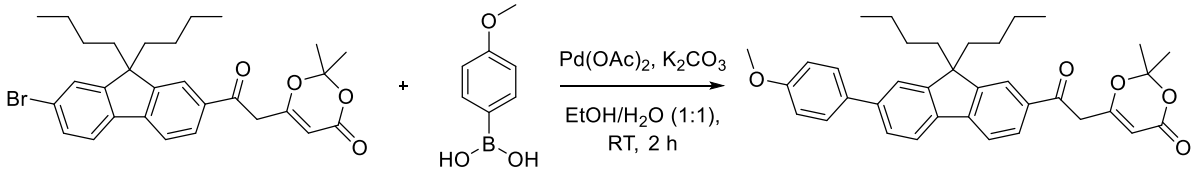
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.9 (**C**), 165.5 (**C**), 160.8 (**C**), 154.1 (**C**), 151.0 (**C**), 145.8 (**C**), 138.4 (**C**), 134.8 (**C**), 130.5 (**C**H), 128.3 (**C**H), 126.4 (**C**H), 123.1 (**C**), 122.5 (**C**H), 122.3 (**C**H), 119.9 (**C**H), 107.3 (**C**), 97.0 (**C**H), 55.6 (**C**), 43.5 (**C**H_2), 39.9 (2x**C**H_2), 25.9 (2x**C**H_2), 25.0 (2x**C**H_3), 22.9 (2x**C**H_2), 13.8 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1728 (s), 1681 (m), 1607 (s), 1463 (s), 1375 (s), 1367 (m), 1273 (m), 1220 (m), 1053 (w), 1022 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 547 $[M(^{79}Br)+Na]^+$ (30%), 549 $[M(^{81}Br)+Na]^+$ (30%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{29}H_{34}O_4(^{79}Br)]^+$ 525.1640, found 525.1646.
calculated for $[C_{29}H_{34}O_4(^{81}Br)]^+$ 527.1620, found 527.1632.

6-(2-(9,9-dibutyl-7-(4-methoxyphenyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 196



154
$C_{29}H_{33}BrO_4$
525.48

165
$C_7H_9BO_3$
151.96

80%

196
$C_{36}H_{40}O_5$
552.71

To a solution of dioxinone **154** (0.2 g, 0.38 mmol) and boronic acid **165** (0.12 g, 0.76 mmol) in EtOH/H_2O (2 mL/2 mL) were added K_2CO_3 (0.17 g, 1.14 mmol) and $Pd(OAc)_2$ (14 mg, 0.038 mmol). After 2 h at RT a 1 M solution of HCl (10 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x20 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.17 g, 0.3 mmol, 80%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (s, 1H, Ar**H**), 7.91 (d, *J* = 1.6 Hz, Ar**H**), 7.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.64-7.59 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.56 (dd, *J* = 10.1, 1.4 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2xAr**H**), 5.47 (s, 1H, C**H**), 3.98 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.88 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.04 (t, *J* = 8.2 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.74 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.14-1.01 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.61-0.51 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

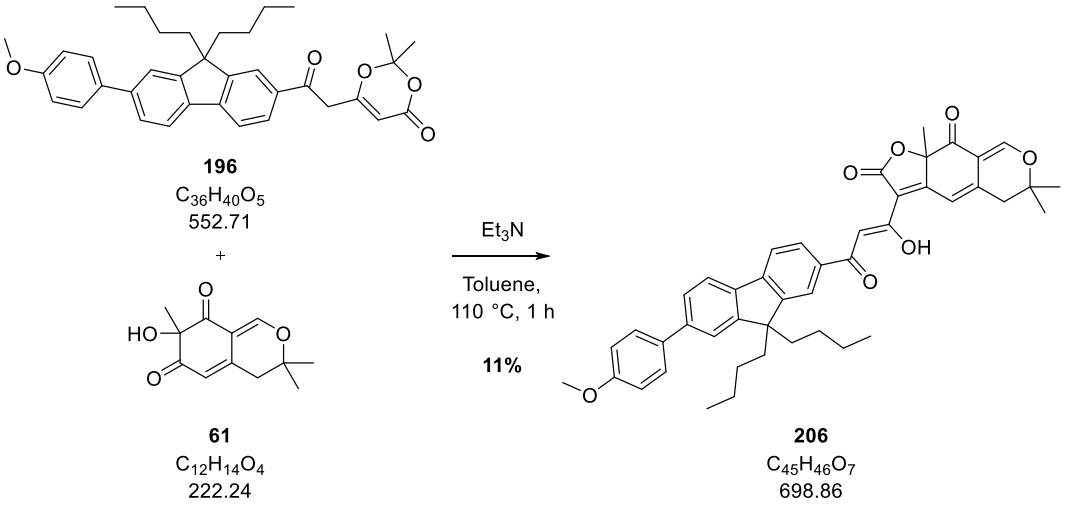
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 193.1 (**C**), 165.8 (**C**), 161.1 (**C**), 159.5 (**C**), 152.7 (**C**), 151.7 (**C**), 147.0 (**C**), 141.8 (**C**), 138.1 (**C**), 134.3 (**C**), 133.7 (**C**), 128.4 (2x**C**H), 128.3 (**C**H), 126.1 (**C**H), 122.5 (**C**H), 121.3 (2x**C**H), 119.7 (**C**H), 114.4 (2x**C**H), 107.4 (**C**), 97.0 (**C**H), 55.5 (**C**H_3), 55.4 (**C**), 43.6 (**C**H_2), 40.2 (2x**C**H_2), 26.1 (2x**C**H_2), 25.1 (2x**C**H_3), 23.1 (2x**C**H_2), 13.9 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1720 (m), 1683 (m), 1603 (s), 1517 (s), 1464 (m), 1376 (s), 1247 (m), 1209 (w), 1178 (s), 1087 (m), 1044 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 575 $[M+Na]^+$(30%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{36}H_{41}O_5]^+$ 553.2954, found 553.2947.

(Z)-3-(3-(9,9-dibutyl-7-methoxy-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 206



To a solution of dioxinone **196** (0.17 g, 0.31 mmol) and alcohol **61** (58 mg, 0.26 mmol) in toluene (5 mL) was added 4Å M.S. (75 mg). After 30 min at 110 °C Et_3N (0.1 mL, 0.62 mmol) was added at 110 °C. After 30 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a 1M solution of HCl (5 mL) and the mixture was vigorously stirred for 15 min. The mixture was extracted with EtOAc (3x20 mL), the organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10%-15% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (17 mg, 0.029 mmol, 11%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, C**H**), 8.00 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.83-7.75 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.64 (m, 6H, 6xAr**H**), 7.14 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar**H**), 7.06-6.99 (m, 2H, Ar**H** + C**H**), 3.88 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.79 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, C**H**H), 2.72 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, CH**H**), 2.11-1.98 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.75 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, C**H$_3$**), 1.08 (dq, *J* = 14.6, 7.2 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.93-0.79 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.62-0.55 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

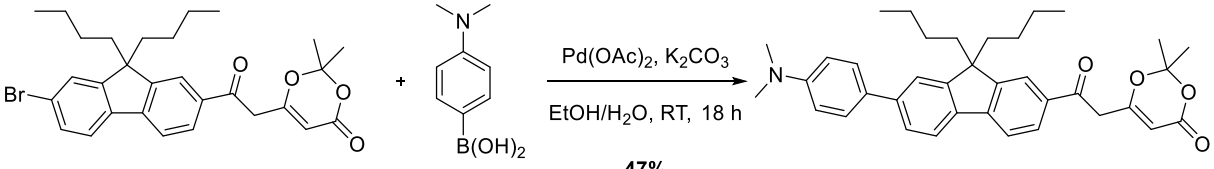
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9 (**C**), 189.9 (**C**), 173.7 (**C**), 168.5 (**C**), 167.7 (**C**), 159.5 (**C**), 158.9 (**C**), 152.9 (**C**), 151.5 (**C**), 146.3 (**C**), 141.3 (**C**), 141.1 (**C**), 138.7 (**C**), 134.4 (**C**), 134.0 (**C**), 128.4 (2x**C**H), 127.8 (**C**H), 126.0 (**C**H), 122.0 (**C**H), 121.3 (**C**H), 121.2 (**C**H), 119.8 (**C**H), 114.9 (**C**), 114.4 (2x**C**H), 113.6 (**C**), 110.8 (**C**), 97.6 (**C**H), 86.6 (**C**), 81.3 (**C**), 55.6 (**C** + **C**H_3), 40.2 (2x**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 27.1 (2x**C**H_2), 26.7 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3), 26.1 (**C**H_2), 23.1 (2x**C**H_2), 13.9 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2930 (w), 1758 (s), 1713 (m), 1589 (s), 1518 (m), 1464 (w), 1355 (w), 1249 (s), 1178 (m), 1091 (w), 1026 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 699 $[M+H]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{45}H_{47}O_7]^+$ 699.3322, found 699.3325.

6-(2-(9,9-dibutyl-7-(4-(dimethylamino)phenyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 197



154
$C_{29}H_{33}BrO_4$
525.48

195
$C_8H_{12}BNO_2$
165.00

197
$C_{37}H_{43}NO_4$
565.75

To a solution of dioxinone **154** (0.2 g, 0.38 mmol) and boronic acid **195** (0.13 g, 0.76 mmol) in EtOH/H_2O (2 mL/2mL) were added $Pd(OAc)_2$ (14 mg, 0.04 mmol) and K_2CO_3 (0.17 g, 1.14 mmol). After 3 h at RT a 1 M solution of HCl (10 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x20 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.1 g, 0.18 mmol, 47%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91 (dd, *J* = 9.6,1.2 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.81-7.70 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.66-7.49 (m, 4H, 4xAr**H**), 6.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2xAr**H**), 5.47 (s, 1H, C**H**), 3.98 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.02 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.08-1.96 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.73 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.15-1.01 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.66 (t, *J* = 15.5 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.62-0.50 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

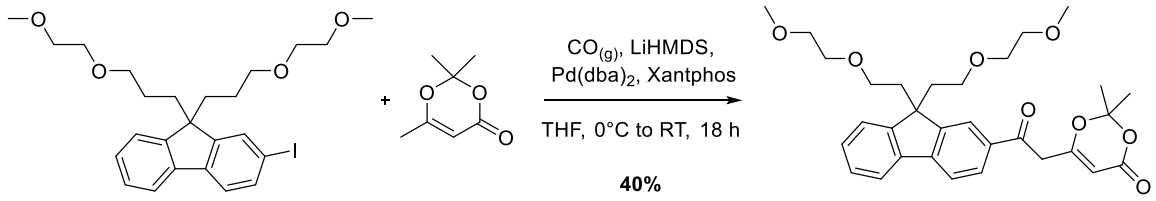
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 193.1 (**C**), 165.8 (**C**), 161.0 (**C**), 152.9 (**C**), 151.7 (**C**), 150.4 (**C**), 147.3 (**C**), 142.2 (**C**), 137.5 (**C**), 134.1 (**C**), 129.1 (**C**), 128.3 (**C**H), 128.0 (2x**C**H), 125.6 (**C**H), 122.5 (**C**H), 121.3 (**C**H), 120.8 (**C**H), 119.6 (**C**H), 112.9 (2x**C**H), 107.5 (**C**), 97.1 (**C**H), 55.5 (**C**), 43.7 (**C**H_2), 40.6 (2x**C**H_3), 40.3 (2x**C**H_2), 26.1 (2x**C**H_2), 25.2 (**C**H_3), 23.1 (2x**C**H_2), 13.9 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2928 (br), 1727 (s), 1686 (s), 1635 (m), 1603 (s), 1529 (m), 1473 (w), 1377 (m), 1286 (m), 1017 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 566 $[M+H]^+$ (50%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{37}H_{44}NO_4]^+$ 566.3270, found 566.3265.

6-(2-(7-bromo-9,9-bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 193



191
$C_{25}H_{33}IO_4$
524.44

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

193
$C_{31}H_{38}O_8$
538.64

Note: This reaction was carried on into a double-chamber reactor designed by Skrydstrup et al.

Chamber A : To a solution of methyldioxinone **65** (87 µL, 0.66 mmol), and fluorene **191** (0.3 g, 0.57 mmol) in degassed THF (15 mL) were added in this order at 0 °C $Pd(dba)_2$ (28 mg, 0.06 mmol), Xantphos (28 mg, 0.06 mmol) and a solution of freshly prepared LiHMDS (HMDS : 0.5 mL, 1.8 mmol; *n*-BuLi : 2.5 M in hexane, 0.72 mL, 1.8 mmol) in degassed THF (5 mL). The chamber was then sealed.

Chamber B : When the chamber A was sealed, THF (20 mL) was added to a solid mixture of CO-gen. (0.19 g, 0.78 mmol) and CsF (9.2 mg, 0.06 mmol) and the chamber was sealed.

After 18 h at RT a 1M solution of HCl (30 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (50%-60%-70% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.13 g, 0.24 mmol, 40%) as a brown oil.

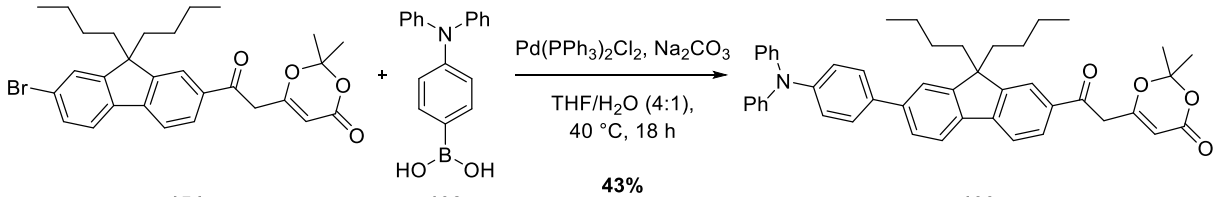
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.00 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.95 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.80-7.74 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.50-7.36 (m, 3H, 3xAr**H**), 5.46 (s, 1H, C**H**), 3.97 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.32-3.22 (m, 10H, 2xC**H$_3$** + 2xC**H$_2$**), 3.19-3.11 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.81-2.63 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.47-2.42 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.75 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.7 (**C**), 165.5 (**C**), 160.9 (**C**), 150.3 (**C**), 149.8 (**C**), 146.3 (**C**), 138.9 (**C**), 134.8 (**C**), 129.2 (**C**H), 128.4 (**C**H), 127.8 (**C**H), 123.6 (**C**H), 123.2 (**C**H), 121.1 (**C**H), 120.0 (**C**H), 107.4 (**C**), 97.1 (**C**H), 71.7 (2x**C**H_2), 70.0 (2x**C**H_2), 59.0 (2x**C**H_3), 53.5 (**C**H_2), 51.6 (**C**), 43.4 (2x**C**H_2), 39.5 (2x**C**H_2), 25.1 (2x**C**H_3).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 561 (60%) $[M+Na]^+$.

HRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) calculated for $[C_{31}H_{42}NO_8]^+$ 556.2910, found 556.2904 ($[M+NH_4]^+$)

6-(2-(9,9-dibutyl-7-(4-(diphenylamino)phenyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 199



154
$C_{29}H_{33}BrO_4$
525.48

198
$C_{18}H_{16}BNO_2$
289.14

199
$C_{47}H_{47}NO_4$
689.90

To a solution of dioxinone **154** (0.36 g, 0.67 mmol) and boronic acid **198** (0.32 g, 1.0 mmol) in degassed THF/H_2O (20 mL) were added $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (64 mg, 0.07 mmol) and Na_2CO_3 (0.12 g, 1.0 mmol). After 18 h at 40 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a 1M solution of HCl (20 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.2 g, 0.29 mmol, 43%) as a yellow oil.

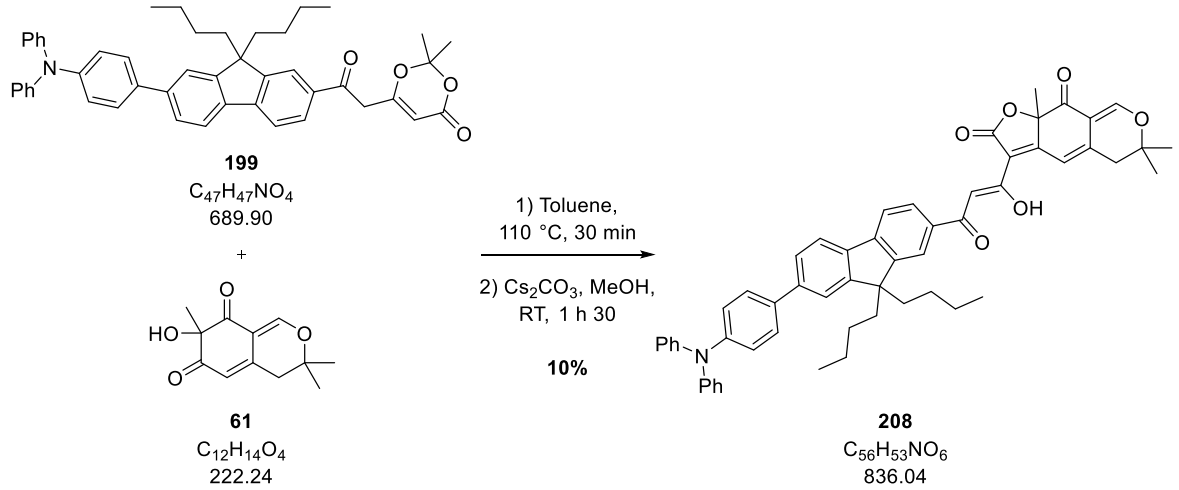
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (s, 1H, Ar**H**), 7.91 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Ar**H**), 7.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.63-7.52 (m, 3H, 4xAr**H**), 7.33-7.28 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.20-7.13 (m, 5H, 5xAr**H**), 7.05 (ddd, *J* = 8.4, 2.3,1.2 Hz, 2H, 2xAr**H**), 5.47 (s, 1H, C**H**), 3.98 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.15-1.93 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.73 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 1.14-1.01 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.61-0.53 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 193.1 (**C**), 165.7 (**C**), 161.0 (**C**), 152.9 (**C**), 151.8 (**C**), 147.7 (3x**C**), 147.0 (**C**), 141.5 (**C**), 138.3 (**C**), 134.9 (**C**), 134.4 (**C**), 129.5 (4x**C**H), 128.3 (**C**H), 128.0 (2x**C**H), 126.0 (**C**H), 124.7 (4x**C**H), 124.9 (2x**C**H), 123.3 (2x**C**H), 122.6 (**C**H), 121.4 (**C**H), 121.2 (**C**H), 119.8 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.1 (**C**H), 55.6 (**C**), 43.7 (**C**H_2), 40.2 (2x**C**H_2), 27.1 (2x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3), 23.0 (2x**C**H_2), 14.0 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2931 (w), 1731 (s), 1676 (s), 1593 (s), 1514 (m), 1492 (s), 1468 (m), 1331 (w), 1280 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 690 $[M+H]^+$ (50%).

(Z)-3-(3-(9,9-dibutyl-7-(4-(diphenylamino)phenyl)-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 208



To a solution of dioxinone **199** (0.4 g, 0.56 mmol) and alcohol **61** (0.11 g, 0.48 mmol) in toluene (10 mL) was added 4Å M.S. (50 mg). After 30 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was suspended in MeOH (10 mL) and Cs_2CO_3 (0.3 g, 0.96 mmol) was added. After 1 h 30 at RT a 1 M solution of HCl (10 mL) was added and the mixture was vigorously stirred for 15 min. The mixture was extracted with EtOAc (3x40 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (40 mg, 0.048 mmol, 10%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.05 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, Ar**H**), 8.01 (s, 1H, C**H**), 7.83-7.74 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.63-7.53 (m, 6H, 6xAr**H**), 7.32-7.26 (m, 5H, 5xAr**H**), 7.20-7.12 (m, 8H, 7xAr**H** + C**H**), 7.04 (dd, *J* = 10.3, 4.2 Hz, 3H, 3xAr**H**), 2.80 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, C**H**H), 2.73 (d, *J* = 17.1 Hz, CH**H**), 2.11-1.99 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.75 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.48 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.10-1.05 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.64-0.55 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

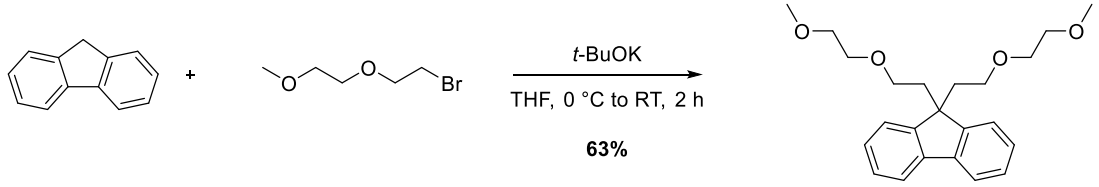
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9 (**C**), 189.9 (**C**), 173.7 (**C**), 168.5 (**C**), 167.7 (**C**), 158.8 (**C**), 152.9 (**C**), 151.6 (**C**), 147.8 (2x**C**), 147.5 (**C**), 141.1 (2x**C**), 138.8 (**C**), 135.2 (**C**), 134.4 (**C**), 129.5 (4x**C**H), 128.0 (2x**C**H), 127.8 (**C**H), 125.9 (**C**H), 124.6 (4x**C**H), 124.0 (2x**C**H), 123.2 (2x**C**H), 122.0 (**C**H), 121.2 (**C**H), 121.1 (**C**H), 119.8 (**C**H), 114.9 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 86.6 (**C**), 81.3 (**C**), 55.5 (**C**), 40.2 (**C**H_2), 40.1 (**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 27.1 (2x**C**H_2), 26.6 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3), 26.1 (**C**H_2), 23.1 (2x**C**H_2), 13.9 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 3035 (w), 2955 (w), 2929 (w), 2859 (w), 1758 (s), 1712 (m), 1587 (s), 1514 (m), 1491 (s), 1463 (m), 1246 (s), 1178 (m), 1091 (w), 1027 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 837 $[M+H]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{56}H_{54}NO_6]^+$ 836.3951, found 836.3970.

9,9-bis(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)-9H-fluorene 183



124
$C_{13}H_{10}$
166.22

181
$C_7H_{15}BrO_3$
227.10

183
$C_{23}H_{30}O_4$
370.49

To a solution of fluorene **124** (0.5 g, 3.0 mmol) in THF (20 mL) was added at 0 °C *t*-BuOK (1.0 g, 9.0 mmol). After 10 min at 0 °C a solution of PEG_2-Br **181** (1.2 g, 6.0 mmol) in THF (10 mL) was added at 0 °C. After 20 min at 0 °C the reaction mixture was allowed to warm up at RT. After 1 h 30 at RT a 1 M solution of HCl (30 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40%-50% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.7 g, 1.89 mmol, 63%) as a yellow oil.

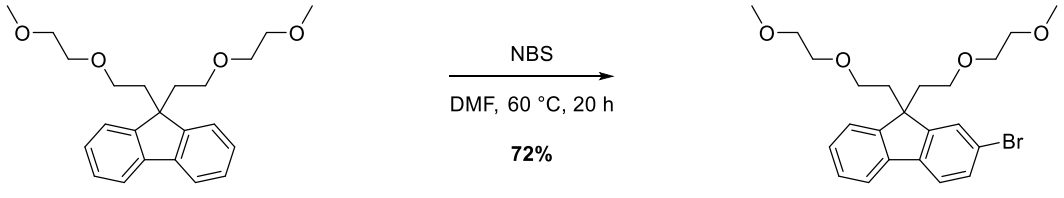
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71-7.65 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.45-7.39 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.37-7.27 (m, 4H, 4xAr**H**), 3.32-3.28 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 3.27 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 3.20-3.16 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.74 (dd, *J* = 9.0, 6.5 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.41 (dd, *J* = 8.8, 6.7 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 148.9 (2x**C**), 140.6 (2x**C**), 127.5 (2x**C**H), 127.4 (2x**C**H), 123.3 (2x**C**H), 119.9 (2x**C**H), 71.9 (2x**C**H_2), 70.0 (2x**C**H_2), 67.2 (2x**C**H_2), 59.1 (2x**C**H_3), 51.2 (**C**), 39.8 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1449 (s), 1359 (w), 1244 (w), 1198 (m), 1099 (s)1051 (w), 1028 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 393 $[M+Na]^+$ (10%).

2-bromo-9,9-bis(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)-9H-fluorene 185



183
$C_{23}H_{30}O_4$
370.49

185
$C_{23}H_{29}BrO_4$
449.38

To a solution of fluorene **183** (1.0 g, 2.5 mmol) in DMF (25 mL) was added NBS (0.5 g, 2.75 mmol). After 18 h at 60 °C NBS (0.25 g, 1.38 mmol) was added. After 2 h at 60 °C the reaction mixture was cooled down to RT and H_2O (50 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.8 g, 1.8 mmol, 72%) as a yellow oil.

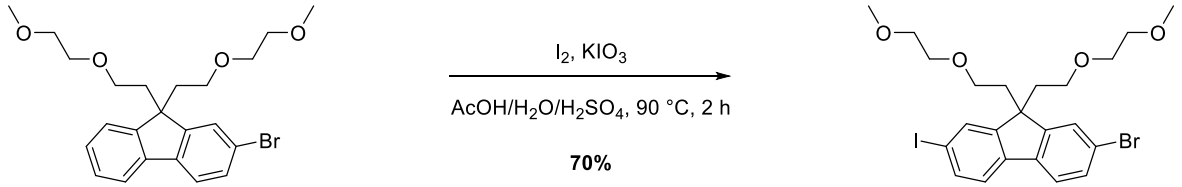
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.65 (ddd, *J* = 4.4, 2.3, 0.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.57-7.55 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.46 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar**H**), 7.42-7.37 (m, 1H, Ar**H**), 7.36-7.31 (m, 2H, Ar**H**), 3.32-3.25 (m, 10H, 2xC**H$_3$** + 2xC**H$_2$**), 3.25-3.11 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.41-2.38 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.1 (**C**), 148.4 (**C**), 139.3 (**C**), 139.2 (**C**), 130.3 (**C**H), 127.7 (**C**H), 127.4 (**C**H), 126.5 (**C**H), 123.1 (**C**H), 121.0 (**C**H + **C**), 119.8 (**C**H), 71.5 (2x**C**H_2), 69.7 (2x**C**H_2), 66.8 (2x**C**H_2), 58.8 (2x**C**H_3), 51.4 (**C**), 39.4 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1443 (m), 1359 (w), 1244 (w), 1197 (w), 1098 (s), 1004 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 449 [M(^{79}Br)+H]$^+$ (5%), 451 [M(^{81}Br)+H]$^+$ (5%).

2-bromo-7-iodo-9,9-bis(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)-9H-fluorene 187



185
$C_{23}H_{29}BrO_4$
449.38

187
$C_{23}H_{28}BrIO_4$
575.28

To a solution of fluorene **185** (0.8 g, 1.78 mmol) in $AcOH/H_2O/H_2SO_4$ (10:5:1, 24.2 mL) were added I_2 (0.23 g, 0.89 mmol) and KIO_3 (96 mg, 0.45 mmol). After 2 h at 90 °C the reaction mixture was cooled down to RT and H_2O (50 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x60 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.82 g, 1.24 mmol, 70%) as a pale-yellow oil.

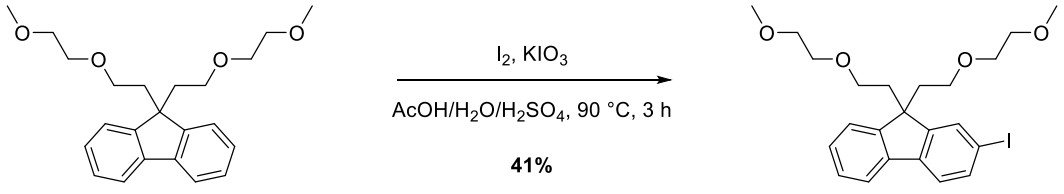
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar**H**), 7.67 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.55-7.44 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 3.32-3.26 (m, 10H, 2xC**H₃** + 2xC**H₂**), 3.21-3.15 (m, 4H, 2xC**H₂**), 2.77 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, 2xC**H₂**), 2.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, 2xC**H₂**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.1 (**C**), 150.8 (**C**), 139.2 (**C**), 138.6 (**C**), 136.7 (**C**H), 132.7 (**C**H), 130.8 (**C**H), 126.8 (**C**H), 122.0 (**C**), 121.6 (**C**H), 121.4 (**C**H), 93.2 (**C**), 71.9 (2x**C**H_2), 70.1 (2x**C**H_2), 66.9 (2x**C**H_2), 59.2 (2x**C**H_3), 51.9 (**C**), 39.6 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1449 (s), 1413 (w), 1359 (w), 1244 (m), 1198 (m), 1103 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 573 [M(^{79}Br)-H]$^-$ (5%), 575 [M(^{81}Br)-H]$^-$ (10%).

2-iodo-9,9-bis(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)-9H-fluorene 191



183
$C_{23}H_{30}O_4$
370.49

191
$C_{23}H_{29}IO_4$
496.39

To a solution of fluorene **183** (0.5 g, 1.35 mmol) in $AcOH/H_2O/H_2SO_4$ (10:5:1, 12.3 mL) were added I_2 (150 mg, 0.68 mmol) and KIO_3 (65 mg, 0.34 mmol). After 3 h at 90 °C the reaction mixture was cooled down to RT and H_2O (20 mL) was added. The reaction mixture was extracted with EtOAc (3x40 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.3 g, 0.55 mmol, 41%) as a yellow oil.

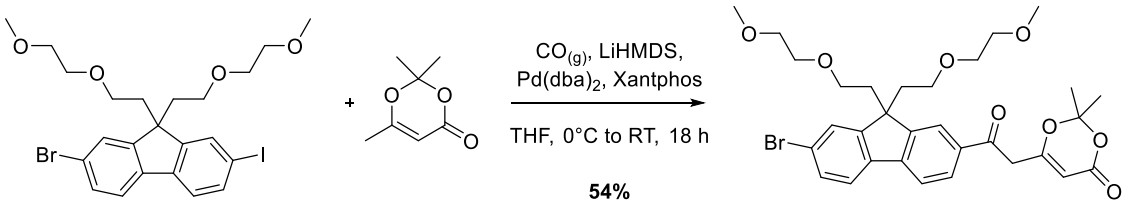
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.67-7.60 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.43-7.36 (m, 2H, 2xAr**H**), 3.33-3.25 (m, 10H, 2xC**H$_3$** + 2xC**H$_2$**), 3.22-3.13 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.74 (dd, *J* = 8.4, 6.9 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.37 (dd, *J* = 8.6, 6.9 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.4 (**C**), 148.4 (**C**), 140.1 (**C**), 139.5 (**C**), 136.4 (**C**H), 132.6 (**C**H), 128.1 (**C**H), 127.5 (**C**H), 123.2 (**C**H), 121.5 (**C**H), 120.0 (**C**H), 92.7 (**C**), 71.6 (2x**C**H_2), 69.7 (2x**C**H_2), 59.1 (2x**C**H_3), 51.5 (**C**), 39.6 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1642 (w), 1149 (s), 1359 (m), 1244 (m), 1198 (m),1095 (s), 1028 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 510 $[M+Na]^+$ (10%).

6-(2-(7-bromo-9,9-bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 189



187
$C_{23}H_{28}BrIO_4$
575.28

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

189
$C_{31}H_{37}BrO_8$
617.53

Note: This reaction was carried on into a double-chamber reactor designed by Skrydstrup et al.

Chamber A : To a solution of methyl dioxinone **65** (75µL, 0.57 mmol) and fluorene **187** (0.3 g, 0.52 mmol) in degassed THF (15 mL) were added $Pd(dba)_2$ (28 mg, 0.05 mmol) and Xantphos (28 mg, 0.05 mmol) and at 0 °C a solution of freshly prepaired LiHMDS (HMDS : 0.33 mL, 1.56 mmol; *n*-BuLi : 2.5 M in hexane, 0.6 mL, 1.56 mmol) in degassed THF (5 mL) then the chamber was sealed.

Chamber B : When chamber A was sealed THF (20 mL) was added to a solid mixture of CO-gen (0.16 g, 0.68 mmol) and CsF (0.05 mmol, 9 mg) and the chamber was sealed.

After 18 h at RT a 1 M solution of HCl (20 mL) was added in chamber A and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40%-50% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.17 g, 0.28 mmol, 54%) as a brown oil.

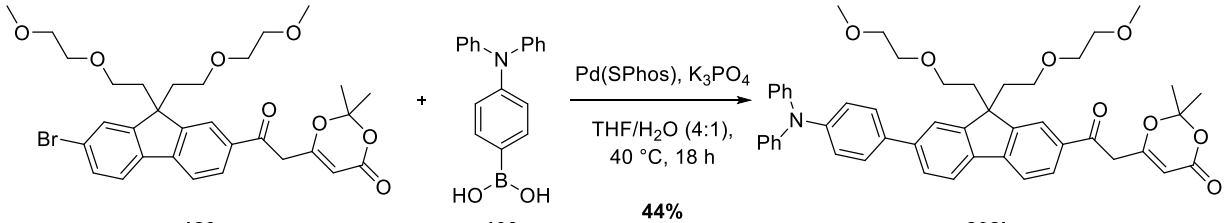
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.95 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.62 (dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.53 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 5.45 (s, 1H, C**H**), 3.96 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.29-3.24 (m, 10H, 2xC**H$_3$** + 2xC**H$_3$**), 3.20-3.13 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.81-2.70 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.45-2.38 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.75 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.7 (**C**), 165.4 (**C**), 160.8 (**C**), 152.3 (**C**), 149.6 (**C**), 145.2 (**C**), 137.9 (**C**), 135.1 (**C**), 131.0 (**C**H), 128.5 (**C**H), 127.2 (**C**H), 123.3 (**C** + **C**H), 122.4 (**C**H), 120.1 (**C**H), 107.4 (**C**), 97.2 (**C**H), 71.8 (2x**C**H_2), 70.0 (2x**C**H_2), 66.9 (**C**H_2), 59.1 (2x**C**H_3), 52.0 (**C**), 43.5 (2x**C**H_2), 39.4 (2x**C**H_2), 25.1 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2872 (w), 1721 (s), 1685 (w), 1454 (s), 1403 (s), 1390 (w), 1199 (m), 1165 (s), 1096 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 617 $[M(^{79}Br)+H]^+$ (20%), 619 $[M(^{81}Br)+H]^+$ (20%).

6-(2-(7-(4-(diphenylamino)phenyl)-9,9-bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 202b



189
$C_{31}H_{37}BrO_8$
617.53

199
$C_{18}H_{16}BNO_2$
289.14

202b
$C_{49}H_{51}NO_8$
781.95

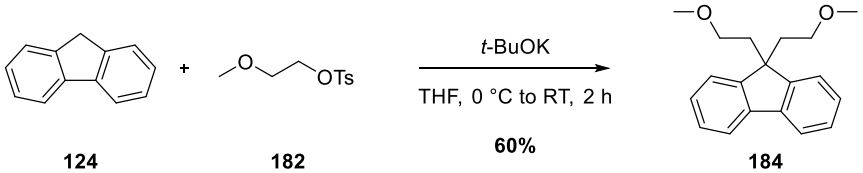
To a solution of dioxinone **189** (0.33 g, 0.5 mmol) and boronic acid **199** (0.29 g, 1.0 mmol) in degassed THF/H_2O (5 mL) were added Pd(SPhos) (18 mg, 0.025 mmol) and K_3PO_4 (0.21 g, 1.0 mmol). After 18 h at 40 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a 1 M solution of HCl (20 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (50%-60%-70% EtOAc/PE) afforded the product (0.17 g, 0.22 mmol, 44%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.02-7.93 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.78 (dd, *J* = 7.9, 5.0 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.66 -7.60 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.57-7.52 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.30 (dd, *J* = 6.8, 1.5 Hz, 3H, 3xAr**H**), 7.20-7.13 (m, 6H, 6xAr**H**), 7.06 (ddd, *J* = 7.3, 4.0, 1.2 Hz, 3H, 3xAr**H**), 5.47 (s, 1H, C**H**), 3.98 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.30-3.23 (m, 10H, 2xC**H$_3$** + 2xC**H$_2$**), 3.18-3.16 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.87-2.71 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.76 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.8 (**C**), 165.6 (**C**), 161.0 (**C**), 151.2 (**C**), 150.1 (**C**), 147.8 (**C**), 147.7 (2x**C**), 146.2 (**C**), 141.8 (**C**), 137.6 (**C**), 134.7 (**C**), 134.6 (**C**), 129.5 (4x**C**H), 128.6 (**C**H), 128.0 (2x**C**H), 126.4 (**C**H), 124.7 (4x**C**H), 124.6 (2x**C**H), 123.3 (2x**C**H), 123.2 (**C**H), 121.6 (**C**H), 121.5 (**C**H), 120.0 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.2 (**C**H), 71.9 (2x**C**H_2), 70.1 (2x**C**H_2), 67.1 (**C**H_2), 59.1 (2x**C**H_3), 51.8 (**C**), 43.5 (2x**C**H_2), 39.7 (2x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 805 $[M+Na]^+$ (50%).

9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluorene 184



124
$C_{13}H_{10}$
166.22

182
$C_{10}H_{14}O_4S$
230.28

184
$C_{19}H_{22}O_2$
282.38

To a solution of fluorene **124** (2.0 g, 12.0 mmol) in THF (30 mL) was added at 0 °C *t*-BuOK (4.0 g, 36.0 mmol). After 10 min at 0 °C a solution of PEG_1-OTs **182** (5.5 g, 24.0 mmol) in THF (10 mL) was added at 0 °C. After 1 h at 0 °C the reaction mixture was warmed up to RT. After 1 h at RT a 1 M solution of HCl (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 60 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (2.0 g, 7.1 mmol, 60%) as a yellow oil.

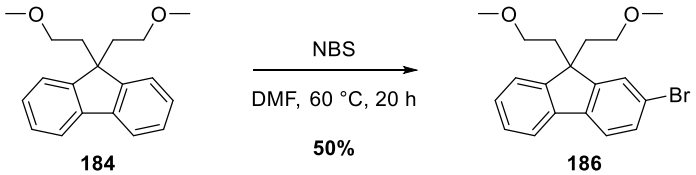
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.70 (dd, *J* = 5.9, 1.8 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.43 (dd, *J* = 6.0, 2.1 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.39-7.29 (m, 4H, 4xAr**H**), 3.01 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.78-2.59 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.48-2.20 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 149.0 (2x**C**), 140.6 (2x**C**), 127.6 (2x**C**H), 127.5 (2x**C**H), 123.1 (2x**C**H), 120.0 (2x**C**H), 68.6 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_2), 51.2 (**C**), 39.8 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1680 (w), 1628 (w), 1515 (m), 1467 (m), 1361 (m), 1284 (s), 1192 (s), 1128 (w), 1069 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^-) 281 $[M-H]^-$ (10%).

2-bromo-9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluorene 186



184
$C_{19}H_{22}O_2$
282.38

186
$C_{19}H_{21}BrO_2$
361.28

To a solution of fluorene **184** (1.5 g, 5.3 mmol) in DMF (50 mL) was added NBS (1.0 g, 5.8 mmol). After 18 h at 60 °C NBS (0.5 g, 2.7 mmol) was added at 60 °C. After 2 h at 60°C the reaction mixture was cooled down to RT and H_2O (50 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, washed with a 10% solution of Na_2SO_3 (2x30 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclochexane) afforded the product (0.97 g, 2.7 mmol, 50%) as a pale-yellow oil.

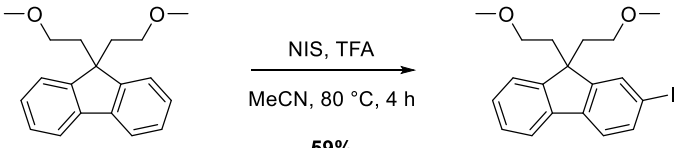
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.70 -7.65 (m, 1H, Ar**H**), 7.56 (dd, *J* = 4.9, 2.8 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.48 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar**H**), 7.44-7.39 (m, 1H, Ar**H**), 7.39-7.31 (m, 2H, 2xAr**H**), 3.02 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.71-2.62 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 239-2.26 (m, 4H, 2xC**H$_2$**)

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.3 (**C**), 148.7 (**C**), 139.6 (**C**), 139.5 (**C**), 130.7 (**C**H), 128.0 (**C**H), 127.7 (**C**H), 126.6 (**C**H), 123.2 (**C**H), 121.4 (**C**), 121.3 (**C**H), 120.1 (**C**H), 68.4 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_2), 51.5 (**C**), 39.7 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1727 (m), 1607 (w), 1645 (w), 1375 (m), 1276 (s), 1202 (s), 1113 (s), 1017 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 383 $[M+Na]^+$ (20%).

2-iodo-9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluorene 192



184
$C_{19}H_{22}O_2$
282.38

192
$C_{19}H_{21}IO_2$
408.28

To a solution of fluorene **184** (0.2 g, 0.71 mmol) and NIS (0.18 g, 0.78 mmol) in MeCN (10 mL) was added TFA (16 µL, 0.21 mmol). After 4 h at 80 °C the reaction mixture was cooled down to RT and H_2O (20 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, washed with a 10% solution of Na_2SO_3, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.17 g, 0.42 mmol, 59%) as a colourless oil.

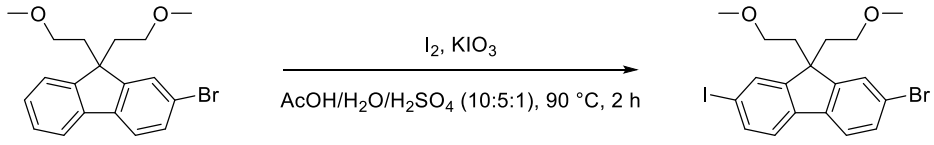
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar**H**), 7.71-7.64 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.46-7.40 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.35 (dd, *J* = 5.5, 3.4 Hz, 2H, 2xAr**H**), 3.01 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.71-2.63 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.33 (ddd, *J* = 9.2, 6.3, 2.0 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.4 (**C**), 148.5 (**C**), 140.2 (**C**), 139.5 (**C**), 136.5 (**C**H), 132.4 (**C**H), 128.2 (**C**H), 127.7 (**C**H), 123.1 (**C**H), 121.7 (**C**H), 120.1 (**C**H) 68.4 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_2), 51.4 (**C**), 39.6 (2x**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 1449 (m), 1409 (w), 1393 (m), 1244 (w), 1112 (s), 1002 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 431 $[M+Na]^+$ (10%).

2-bromo-7-iodo-9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluorene 188



186
$C_{19}H_{21}BrO_2$
361.28

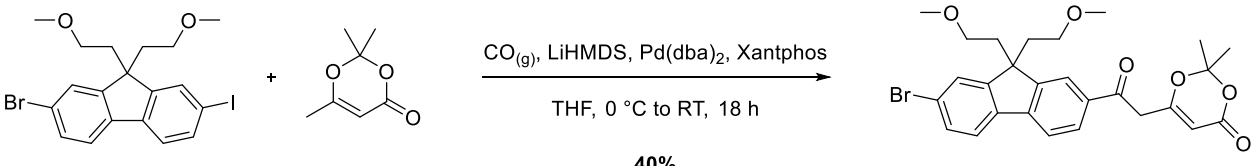
188
$C_{19}H_{20}BrIO_2$
487.18

To a solution of fluorene **186** (1.0 g, 2.77 mmol) in $AcOH/H_2O/H_2SO_4$ (10:5:1, 24.6 mL) were added I_2 (0.34 g, 1.35 mmol) and KIO_3 (144 mg, 0.68 mmol). After 2 h at 90 °C the reaction mixture was cooled down to RT and H_2O (30 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x60 mL). The organic phases were combined, washed with a 10% solution of Na_2SO_3 (2x50 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.0 g, 2.05 mmol, 74%) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.71-7.66 (m, 1H, Ar**H**), 7.57-7.51 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.48 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 3.03 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.82-2.59 (m, 4H, 2x**C**H_2), 2.41-2.22 (m, 4H, 2x**C**H_2).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 151.0 (**C**), 150.7 (**C**), 139.1 (**C**), 138.5 (**C**), 136.7 (**C**H), 132.5 (**C**H), 130.8 (**C**H), 126.5 (**C**H), 122.0 (**C**), 121.7 (**C**H), 121.4 (**C**H), 93.3 (**C**), 68.2 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_2), 51.7 (**C**), 39.4 (2x**C**H_3).

6-(2-(7-bromo-9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 190



188
$C_{19}H_{20}BrIO_2$
487.18

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

194
$C_{27}H_{29}BrO_6$
529.43

Note: This reaction was carried on into a double-chamber reactor designed by Skrydstrup et al.

Chamber A : To a solution of methyl dioxinone **65** (0.28 mL, 2.2 mmol) and fluorene **188** (1.0 g, 2 mmol) in degassed THF (15 mL) were added $Pd(dba)_2$ (120 mg, 0.2 mmol) and Xantphos (120 mg, 0.2 mmol) and at 0 °C a solution of freshly prepaired LiHMDS (HMDS : 1.27 mL, 6.0 mmol; *n*-BuLi : 2.5 M in hexane, 2.4 mL, 6.0 mmol) in degassed THF (5 mL) then the chamber was sealed.

Chamber B : When chamber A was sealed THF (20 mL) was added to a solid mixture of CO-gen (0.64 g, 2.6 mmol) and CsF (0.2 mmol, 40 mg) and the chamber was sealed.

After 18 h at RT a 1 M solution of HCl (20 mL) was added in chamber A and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.43 g, 0.6 mmol, 40%) as a brown oil.

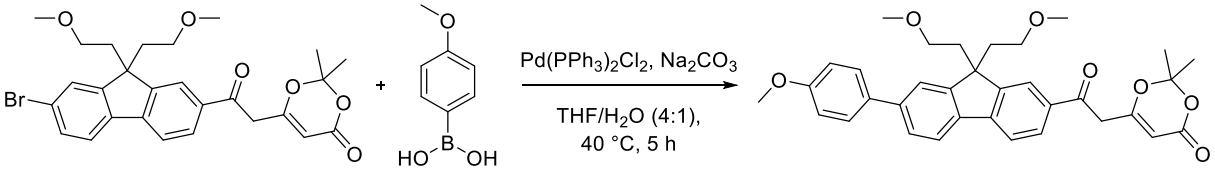
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.01 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.95 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar**H**), 7.63 (dd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.55 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, Ar**H**), 5.45 (s, 1H, C**H**), 3.96 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.99 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.76-2.60 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.40-2.29 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.74 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.7 (**C**), 165.3 (**C**), 160.9 (**C**), 152.6 (**C**), 149.7 (**C**), 145.2 (**C**), 137.9 (**C**), 135.2 (**C**), 131.2 (**C**H), 128.7 (**C**H), 127.0 (**C**H), 123.5 (**C**), 123.1 (**C**H), 122.5 (**C**H), 120.2 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.2 (**C**H), 68.3 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_3), 52.0 (**C**), 43.6 (**C**H_2), 39.4 (2x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1728 (s), 1691 (s), 1610 (w), 1600 (m), 1533 (w), 1458 (m), 1392 (s), 1273 (m), 1205 (s), 1118 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 594 [M(^{79}Br)+MeCN+Na]$^+$ (50%), 596 [M(^{81}Br)+MeCN+Na]$^+$ (50%).

6-(2-(9,9-bis(2-methoxyethyl)-7-(4-methoxyphenyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 201a



190
$C_{27}H_{29}BrO_6$
529.43

165
$C_7H_9BO_3$
151.96

62%

201a
$C_{34}H_{36}O_7$
556.65

To a solution of dioxinone **190** (0.2 g, 0.38 mmol) and boronic acid **165** (86 mg, 0.57 mmol) in degassed THF/H_2O (4:1, 15 mL) were added $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (32 mg, 0.038 mmol) and Na_2CO_3 (60 mg, 0.57 mmol). After 5 h at 40 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a solution of 1 M HCl (20 mL) was added. The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30%-40%-50% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (130 mg, 0.23 mmol, 62%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.03 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.96 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.84-7.77 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.62 (dd, *J* = 8.3,1.6 Hz, 4H, 4xAr**H**), 7.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2xAr**H**), 5.46 (s, 1H, C**H**), 3.97 (s, 2H, C**H$_2$**), 3.88 (s, 3H, C**H$_3$**), 2.99 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.79-2.62 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, 2x**C**H_2), 1.75 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

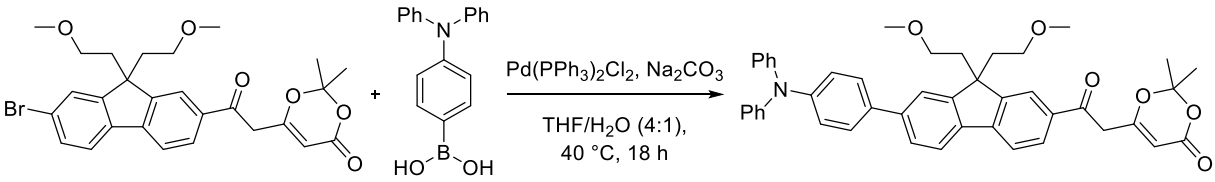
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.8 (**C**), 165.5 (**C**), 159.6 (**C**), 151.4 (**C**), 146.3 (**C**), 142.1 (**C**), 137.5 (**C**), 134.7 (**C**), 133.3 (**C**), 128.7 (**C**H), 128.4 (2x**C**H), 126.6 (**C**H), 122.9 (**C**H), 121.6 (**C**H), 121.5 (**C**H), 120.0 (**C**H), 114.6 (2x**C**H), 107.5 (**C**), 97.2 (**C**H), 68.5 (2x**C**H_2), 58.6 (2x**C**H_3), 55.4 (**C**H_3), 51.7 (**C**), 43.7 (**C**H_2), 39.4 (2x**C**H_2), 25.0 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2930 (w), 1726 (s), 1682 (m), 1636 (w), 1603 (s), 1517 (s), 1464 (m), 1407 (m), 1390 (w), 1247 (s), 1177 (s), 1024 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 557 $[M+H]^+$ (20%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{34}H_{37}O_7]^+$ 557.2539, found 557.2527.

6-(2-(7-(4-(diphenylamino)phenyl)-9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 202a



190
$C_{27}H_{29}BrO_6$
529.43

199
$C_{18}H_{16}BNO_2$
289.14

202a
$C_{45}H_{43}NO_6$
693.84

To a solution of dioxinone **190** (0.25 g, 0.47 mmol) and boronic acid **199** (0.2 g, 0.71 mmol) in degassed THF/H_2O (4:1, 16 mL) were added $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (36 mg, 0.05 mmol) and Na_2CO_3 (76 mg, 0.71 mmol). After 18 h at 40 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a solution of 1M HCl (20 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (150 mg, 0.22 mmol, 41%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.03 (s, 1H, Ar**H**), 7.96 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.80 (dd, *J* = 8.2, 6.0 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.66 (s, 2H, 2xAr**H**), 7.63-7.60 (m, 1H, Ar**H**), 7.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.20-7.12 (m, 6H, 6xAr**H**), 7.09-7.03 (m, 3H, 3xAr**H**), 5.46 (s, 1H, C**H**), 3.97 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.99 (s, 2xC**H$_3$**), 2.81-2.61 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.75 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

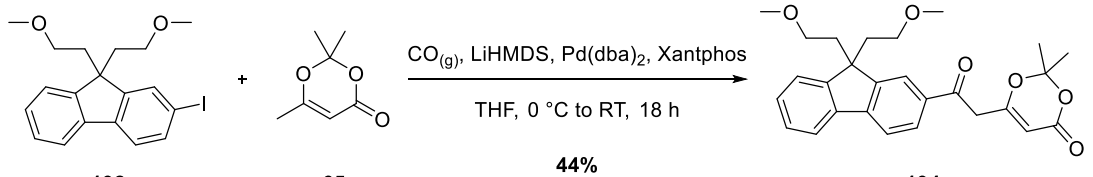
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.8 (**C**), 165.5 (**C**), 160.9 (**C**), 151.2 (**C**), 150.1 (**C**), 147.8 (**C**), 147.6 (2x**C**), 146.2 (**C**), 141.9 (**C**), 137.6 (**C**), 134.6 (**C**), 134.5 (**C**), 129.5 (4x**C**H), 128.7 (**C**H), 128.0 (2x**C**H), 126.5 (**C**H), 124,7 (4x**C**H), 124.1 (2x**C**H), 123.9 (2x**C**H), 122.9 (**C**H), 121.6 (**C**H), 121.4 (**C**H), 120.0 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.2 (**C**H), 68.4 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_3), 51.7 (**C**), 43.6 (**C**H_2), 39.6 (2x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2924 (br), 2246 (w), 1719 (s), 1715 (s), 1514 (m), 1327 (m), 1248 (s), 1198 (m), 1108 (s), 1028 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 694 $[M+H]^+$ (20%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{45}H_{44}NO_6]^+$ 694.3169, found 694.3160.

6-(2-(9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluoren-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one 194



192
$C_{19}H_{21}IO_2$
408.28

65
$C_7H_{10}O_3$
142.15

194
$C_{27}H_{30}O_6$
450.53

Note: This reaction was carried on into a double-chamber reactor designed by Skrydstrup et al.

Chamber A : To a solution of methyl dioxinone **65** (0.25 mL, 1.89 mmol) and fluorene **192** (0.7 g, 1.71 mmol) in degassed THF (15 mL) were added $Pd(dba)_2$ (110 mg, 0.17 mmol), Xantphos (110 mg, 0.17 mmol) and at 0 °C a solution of freshly prepared LiHMDS (HMDS : 1.11 mL, 5.13 mmol ; *n*-BuLi : 2.1 mL, 5.13 mL) in degassed THF (5 mL). The chamber was then sealed.

Chamber B : When chamber A was sealed THF (20 mL) was added to $Ph_2MeSiCO_2H$ (0.54 g, 2.22 mmol) and CsF (30 mg, 0.17 mmol) and the chamber was sealed.

After 18 h at RT a solution of 1 M HCl (20 mL) was added in chamber A and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (230 mg, 0.51 mmol, 44%) as a brown oil.

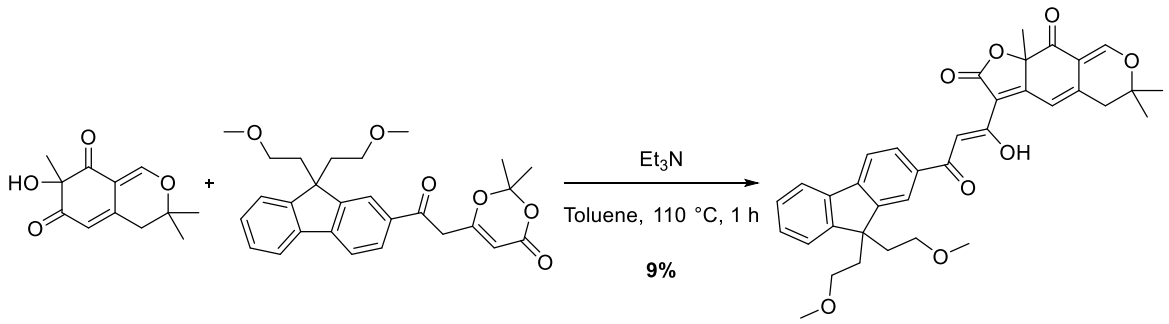
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.02 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 7.96 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.79 (dd, *J* = 8.1, 3.5 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.50-7.45 (m, 1H, Ar**H**), 7.44-7.40 (m, 2H, 2xAr**H**), 5.46 (s, 1H, C**H**), 3.97 (s, 2H, C**H$_2$**), 2.98 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.71-2.59 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 2.42-2.33 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.74 (s, 6H, 2xC**H$_3$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.8 (**C**), 165.4 (**C**), 160.9 (**C**), 150.5 (**C**), 150.0 (**C**), 146.4 (**C**), 138.9 (**C**), 134.9 (**C**), 129.3 (**C**H), 128.6 (**C**H), 127.9 (**C**H), 123.5 (**C**H), 123.0 (**C**H), 121.3 (**C**H), 120.1 (**C**H), 107.5 (**C**), 97.2 (**C**H), 68.4 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_3), 51.6 (**C**), 43.6 (**C**H_2), 39.6 (2x**C**H_2), 25.2 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1724 (s), 1682 (m), 1635 (w), 1605 (s), 1450 (m), 1390 (m), 1374 (m), 1270 (s), 1199 (s), 1109 (s), 1014 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 451 $[M+H]^+$ (40%).

(Z)-3-(3-(9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 211



61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

194
$C_{27}H_{30}O_6$
450.53

211
$C_{36}H_{36}O_8$
596.68

To a solution of dioxinone **194** (0.13 g, 0.29 mmol) and alcohol **61** (64 mg, 0.29 mmol) in toluene (2 mL) was added 4Å M.S. (30 mg). After 30 min at 110 °C Et_3N (83 µL, 0.58 mmol) was added. After 30 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a solution of 1 M HCl (5 mL) was added. The mixture was vigorously stirred for 15 min at RT and extracted with EtOAc (3x20 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (16 mg, 0.027 mmol, 9%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 8.04 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, C**H**), 7.81-7.75 (m, 3H, 3xAr**H**), 7.56 (s, 1H, C**H**), 7.51-7.36 (m, 4H, 4xAr**H**), 7.14 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, C**H**), 2.99 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.80 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, C**H**H), 2.76-2.62 (m, 6H, CH**H** + 2xC**H$_2$**), 2.51-2.30 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.74 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.47 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.42 (s, 3H, C**H$_3$**).

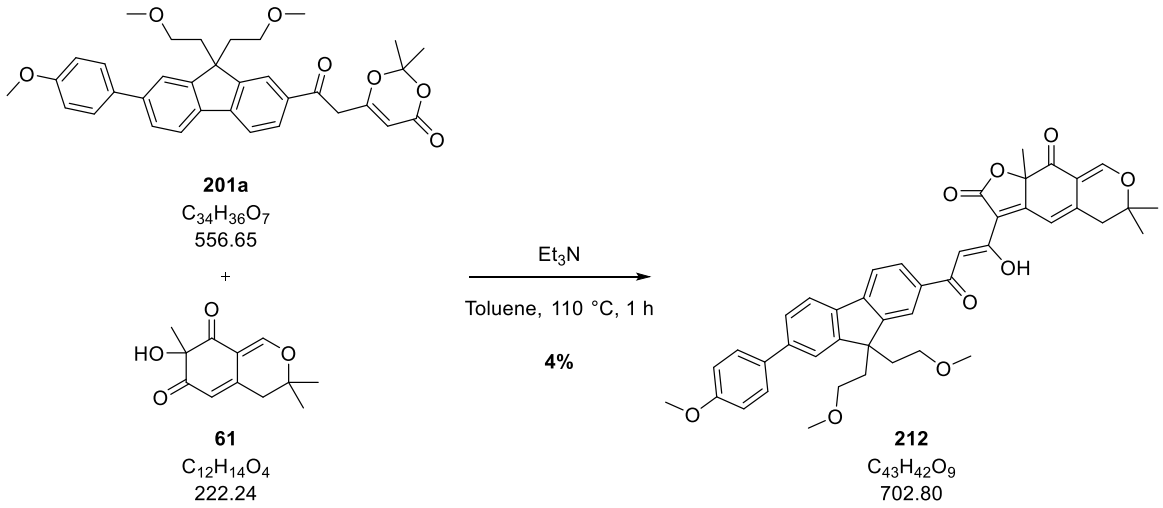
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.4 (**C**), 189.9 (**C**), 174.1 (**C**), 168.4 (**C**), 167.9 (**C**), 158.9 (**C**), 150.5 (**C**), 149.6 (**C**), 145.6 (**C**), 141.2 (**C**), 139.3 (**C**), 134.9 (**C**), 129.0 (**C**H), 128.1 (**C**H), 127.8 (**C**H), 123.4 (**C**H), 122.4 (**C**H), 121.1 (**C**H), 120.0 (**C**H), 114.8 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 97.5 (**C**H), 86.7 (**C**), 81.4 (**C**), 68.5 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_3), 51.6 (**C**), 40.1 (**C**H_2), 39.5 (2x**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 26.6 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2929 (w), 1755 (s), 1711 (m), 1587 (s), 1449 (m), 1354 (w), 1266 (s), 1178 (m), 1113 (s), 1092 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 597 $[M+H]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{36}H_{37}O_8]^+$ 597.2488, found 597.2499.

(Z)-3-(3-(9,9-bis(2-methoxyethyl)-7-(4-methoxyphenyl)-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 212



To a solution of dioxinone **201a** (0.13 g, 0.23 mmol) and alcohol **61** (44 mg, 0.20 mmol) in toluene (2 mL) was added 4Å M.S. (25 mg). After 45 min at 110 °C Et_3N (56 µL, 0.4 mmol) was added. After 15 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a solution of 1 M HCl (5 mL) was added. The mixture was vigorously stirred for 15 min at RT and extracted with EtOAc (3x20 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (6 mg, 0.009 mmol, 4%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar**H**), 8.05 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, C**H**), 7.97-7.91 (m, 1H, Ar**H**), 7.82-7.74 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.65-7.58 (m, 4H, 4xAr**H**), 7.57 (s, 1H, C**H**), 7.14 (s, 1H, C**H**), 7.02 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H, 2xAr**H**), 3.88 (s, 3H, C**H$_3$**), 3.01 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.77-2.71 (m, 6H, 3xC**H$_2$**), 2.46-2.40 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.75 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.48 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 3H, C**H$_3$**).

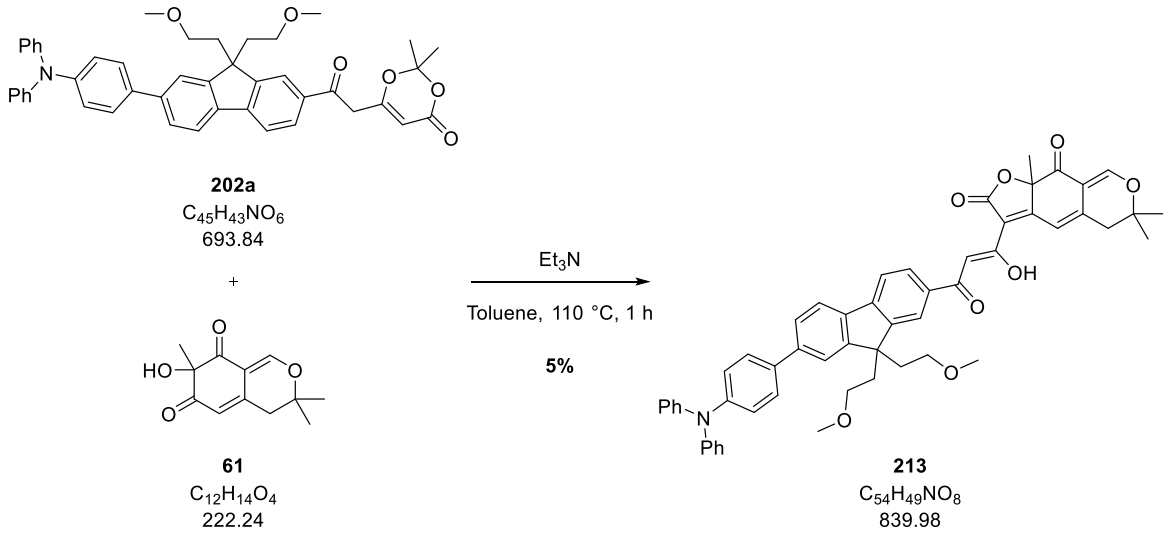
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 190.3 (**C**), 189.9 (**C**), 174.1 (**C**), 167.9 (**C**), 159.6 (**C**), 158.9 (**C**), 151.2 (**C**), 149.9 (**C**), 145.4 (**C**), 141.7 (**C**), 141.2 (**C**), 137.9 (**C**), 134.7 (**C**), 133.6 (**C**), 128.4 (2x**C**H), 128.2 (**C**H), 122.3 (**C**H), 121.5 (**C**H), 121.3 (**C**H), 120.0 (**C**H), 114.8 (**C**), 114.5 (2x**C**H), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 97.5 (**C**), 86.6 (**C**), 81.3 (**C**), 68.5 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_3), 55.6 (**C**H_3), 51.6 (**C**), 40.2 (**C**H_2), 39.6 (**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 26.6 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2928 (w), 1727 (s), 1601 (m), 1558 (w), 1464 (m), 1452 (w), 1272 (s), 1203 (w), 1121 (m), 1073 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 703 $[M+H]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{43}H_{43}O_9]^+$ 703.2907, found 703.2922.

(Z)-3-(3-(7-(4-(diphenylamino)phenyl)-9,9-bis(2-methoxyethyl)-9H-fluoren-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione 213



202a
$C_{45}H_{43}NO_6$
693.84

61
$C_{12}H_{14}O_4$
222.24

213
$C_{54}H_{49}NO_8$
839.98

To a solution of dioxinone **202a** (0.2 g, 0.21 mmol) and alcohol **61** (47 mg, 0.21 mmol) in toluene (2 mL) was added 4Å M.S. (20 mg). After 45 min at 110 °C Et_3N (60 µL, 0.42 mmol) was added. After 15 min at 110 °C the reaction mixture was cooled down to RT and a solution of 1 M HCl (5 mL) was added. The mixture was vigorously stirred for 15 min at RT and extracted with EtOAc (3x20 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (20%-30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (9 mg, 0.011 mmol, 5%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar**H**), 8.05 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, Ar**H**), 7.82-7.76 (m, 3H, 2xAr**H** + C**H**), 7.66-7.61 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.58 - 7.55 (m, 3H, 2xAr**H** + C**H**), 7.31-7.29 (m, 4H, 4xAr**H**), 7.19-7.14 (m, 7H, 6xAr**H** + C**H**), 7.08-7.03 (m, 2H, 2xAr**H**), 3.01 (s, 6H, 2xC**H$_3$**), 2.81-2.67 (m, 6H, 3xC**H$_2$**), 2.52-2.34 (m, 4H, 2x**C**H_2), 1.75 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.48 (s, 3H, C**H$_3$**), 1.43 (s, 3H, C**H$_3$**).

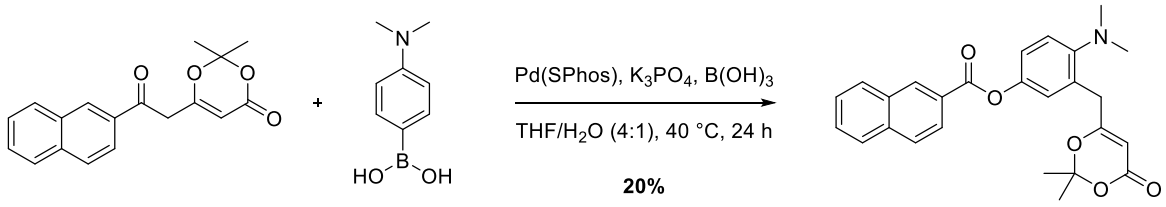
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 192.3 (**C**), 189.9 (**C**), 174.1 (**C**), 168.4 (**C**), 167.9 (**C**), 158.9 (**C**), 151.2 (**C**), 149.9 (**C**), 147.7 (2x**C**), 145.4 (**C**), 141.5 (**C**), 141.2 (**C**), 138.1 (**C**), 134.8 (**C**), 134.7 (**C**), 129.5 (4x**C**H), 128.2 (**C**H), 128.0 (2x**C**H), 126.4 (**C**H), 124.7 (2x**C**H), 124.0 (2x**C**H), 123.2 (2x**C**H), 122.3 (**C**H), 121.4 (2x**C**H), 120.0 (**C**H), 114.8 (**C**), 113.6 (**C**H), 110.8 (**C**), 97.5 (**C**H), 86.6 (**C**), 81.4 (**C**), 68.5 (2x**C**H_2), 58.5 (2x**C**H_3), 51.6 (**C**), 40.2 (**C**H_2), 39.6 (**C**H_2), 28.1 (**C**H_3), 27.1 (2x**C**H_2), 26.6 (**C**H_3), 26.3 (**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2932 (w), 1758 (s), 1706 (m), 1590 (s), 1519 (m), 1492 (s), 1269 (m), 1179 (m), 1112 (w), 1109 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 840 $[M+H]^+$ (100%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{54}H_{50}NO_8]^+$ 840.3536, found 840.3530.

3-((2,2-dimethyl-4-oxo-4H-1,3-dioxin-6-yl)methyl)-4-(dimethylamino)phenyl 2-naphthoate 203



82
$C_{18}H_{16}O_4$
296.32

195
$C_8H_{12}BNO_2$
165.00

203
$C_{26}H_{25}NO_5$
431.49

To a solution of dioxinone **82** (100 mg, 0.34 mmol) and boronic acid **195** (112 mg, 0.68 mmol) in degassed THF/H_2O was added K_3PO_4 (144 mg, 0.68 mmol). After 1 h at 40 °C boronic acid **195** (112 mg, 0.68 mmol) was added at 40 °C. After 2 h at 40 °C boronic acid **195** (112 mg, 0.68 mmol) and Pd(SPhos) (36 mg, 0.03 mmol). After 18 h at 40 °C $B(OH)_3$ (21 mg, 0.34 mmol) was added. After 3 h at 40 °C the reaction mixture was cooled down at RT and a 1 M solution of HCl (20 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (10%-20%-30%40%-50% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (30 mg, 0.07 mmol, 20%) as a pale-yelow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.76 (s, 1H, Ar**H**), 8.17 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, Ar**H**), 8.03-7.89 (m, 3H, 3xAr**H**), , 7.67-7.56 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar**H**), 6.73 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar**H**), 6.60 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar**H**), 5.21 (s, 1H, C**H**), 3.50 (s, 2H, C**H₂**), 2.98 (s, 6H, 2xC**H₃**), 1.55 (s, 6H, 2xC**H₃**).

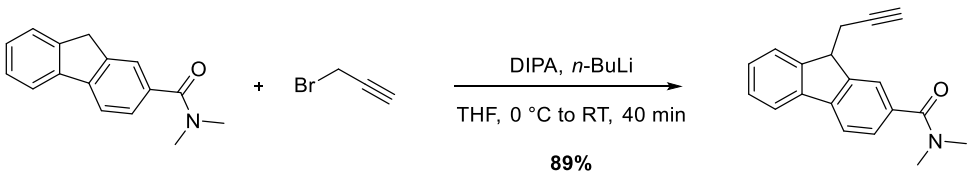
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 169.9 (**C**), 165.7 (**C**), 161.4 (**C**), 149.1 (**C**), 132.7 (**C**), 140.2 (**C**), 136.0 (**C**), 132.7 (**C**), 131.9 (**C**H), 129.6 (**C**H), 128.8 (**C**H), 128.7 (**C**H), 128.0 (**C**H), 127.1 (**C**H), 126.8 (**C**), 126.7 (**C**), 125.5 (**C**H), 123.4 (**C**H), 106.8 (**C**), 94.3 (**C**H), 41.0 (2x**C**H_3), 35.6 (**C**H_2), 24.9 (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 2924 (br), 1718 (w), 1677 (s), 1598 (s), 1524 (s), 1488 (s), 1449 (w), 1314 (m), 1277 (m), 1214 (m), 1166 (m), 1116 (w), 1078 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 454 $[M+Na]^+$ (50%).

HRMS ($^m/_z$, ESI^+) calculated for $[C_{28}H_{29}N_2O_5]^+$ 473.2076, found 473.2072 ($[M+MeCN+H]^+$)

N,N-dimethyl-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-fluorene-2-carboxamide 122''



133
$C_{16}H_{15}NO$
237.30

127
C_3H_3Br
118.96

122"
$C_{19}H_{17}NO$
275.35

To a solution of DIPA (0.58 mL, 4.21 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise at -78 °C *n*-BuLi. After 30 min at 0 °C a solution of the fluorene **133** (1.0 g, 4.21 mmol) in THF (10 mL) was added. After 10 min at 0 °C propargyl bromide **127** (0.47 mL, 4.21 mmol) was added at 0 °C. After 30 min at 0 °C a 1 M solution of HCl (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x80 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.03 g, 3.74 mmol, 89%) as an orange oil.

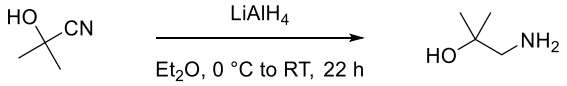
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85-7.66 (m, 4H, 3xAr**H**), 7.51-7.30 (m, 3H, 3xAr**H**), 4.10 (q, *J* = 7.5 Hz, 1H, C**H**), 3.14 (br. s, 3H, C**H$_3$**), 3.06 (br. s, 3H, C**H$_3$**), 2.81-2.61 (m, 2H, C**H$_2$**), 2.06 (t, *J* = 2.6 Hz, C**H**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 171.9 (**C**), 146.4 (**C**), 146.0 (**C**), 142.2 (**C**), 140.0 (**C**), 134.7 (**C**), 127.8 (**C**H), 127.7 (**C**H), 126.9 (**C**H), 124.7 (**C**H), 123.7 (**C**H), 120.3 (**C**H), 119.7 (**C**H), 82.4 (**C**), 70.1 (**C**H), 45.7 (**C**H), 39.8 (**C**H_3), 35.5 (**C**H_3), 23.2 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3289 (br), 2928 (br), 2242 (w), 1716 (m), 1610 (s), 1504 (m), 1445 (m), 1393 (s), 1261 (m), 1211 (w), 1180 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 276 $[M+H]^+$ (30%).

1-amino-2-methylpropan-2-ol 277



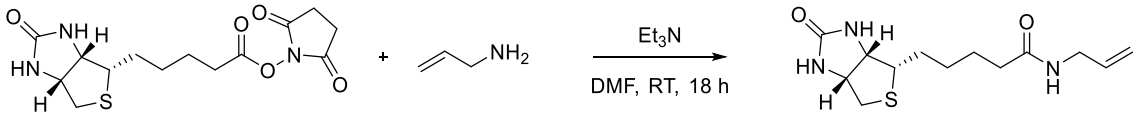
100%

277
$C_4H_{11}NO$
89,14

To a suspension of $LiAlH_4$ (4.75 g, 0.10 mol) in Et_2O (100 mL) was added dropwise at 0 °C over 1 h a solution of acetone cyanohydrin (4.73 g, 50.0 mmol) in Et_2O (25 mL). After 22 h at RT the reaction mixture was cooled down to 0 °C then H_2O (5 mL), a 15% NaOH solution (5 mL) and H_2O (15 mL) were added dropwise sequentially in this order. After 20 min at 0 °C the reaction mixture was filtered on a short pad of Celite® with Et_2O and the filtrate was concentrated *in vacuo* affording the product (4.46 g, 50.0 mmol, 100%) as a colourless oil.

^{1}H NMR	(300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.57 (s, 2H, C**H_2**), 1.96 (br. s, 2H, N**H_2**), 1.16 (s, 6H, 2xC**H_3**).
^{13}C NMR	(76 MHz, $CDCl_3$) δ 70.0 (**C**), 55.2 (**C**H_2), 26.8 (2x**C**H_3).
IR (neat, cm^{-1})	3366 (br), 2969 (s), 1595 (w), 1471 (m), 1382 (m), 1364 (m), 1221 (m), 1168 (m), 1114 (m).
LRMS ($^m/_z$, ESI^+)	190 $[2M+H]^+$ (100%).

N-allyl-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamide 291



276
$C_{14}H_{19}N_3O_5S$
341.38

90%

291
$C_{13}H_{21}N_3O_2S$
283,39

To a solution of the biotin-NHS **276** (0.5 g, 1.46 mmol) in DMF (5 mL) were added at RT Et_3N (0.61 mL, 4.38 mmol) and allylamine (0.22 mL, 2.92 mmol). After 18 h at RT the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH (10 mL). Precipitation from Et_2O afforded the product (0.37 g, 1.31 mmol, 90%) as a white solid.

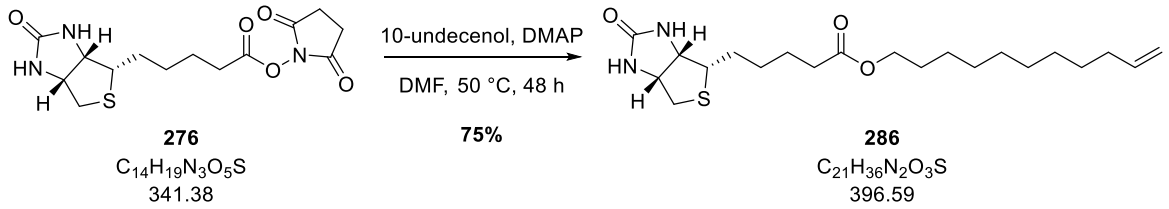
^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 5.90-5.77 (m, 1H, C**H**), 5.21-5.07 (m, 2H, C**H$_2$**), 4.49 (ddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.8 Hz, 1H, C**H**), 4.30 (dd, *J* = 7.9, 4.5 Hz, C**H**), 3.79 (dt, *J* = 5.4, 1.6 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.24-3.18 (m, 1H, C**H**), 3.00-2.86 (m, 2H, C**H**H + CH**H**), 2.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.82-1.29 (m, 6H, 3xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, MeOD) δ 176.0 (**C**), 175.0 (**C**), 135.7 (**C**H), 116.3 (**C**H$_2$), 63.5 (**C**H), 61.8 (**C**H), 57.1 (**C**H), 42.8 (**C**H$_2$), 41.2 (**C**H$_2$), 36.9 (**C**H$_2$), 29.9 (**C**H$_2$), 29.6 (**C**H$_2$), 27.0 (**C**H$_2$), 26.4 (**C**H$_2$).

IR (neat, cm^{-1}) 3294 (br), 2944 (br), 1690 (s), 1637 (s), 1538 (m), 1478 (w), 1418 (w), 1263 (w), 1212 (s), 1077 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 284 $[M+H]^+$ (100%).

Undec-10-en-1-yl 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate 286



276
$C_{14}H_{19}N_3O_5S$
341.38

286
$C_{21}H_{36}N_2O_3S$
396.59

To a solution of biotin-NHS **276** (1.0 g, 2.92 mmol) in dry DMF (30 mL) were added 10-undecenol **286** (0.58 mL, 2.92 mmol) and DMAP (0.36 g, 2.92 mmol). After 2 days at 50 °C the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (5% MeOH/CH_2Cl_2) afforded the product (0.87 g, 2.19 mmol, 75%) as a white solid.

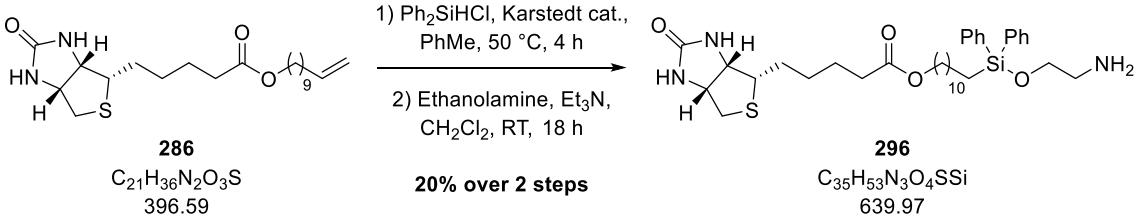
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.33 (s, 1H, N**H**), 6.07 (s, 1H, N**H**), 5.75 (ddt, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H, C**H**), 5.02-4.77 (m, 2H, C**H$_2$**), 4.51-4.38 (m, 1H, C**H**), 4.30-4.18 (m, 1H, C**H**), 3.99 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.09 (dd, *J* = 11.9, 7.2 Hz, 1H, C**H**), 2.84 (dd, *J* = 12.8, 4.9 Hz, 1H, C**H**H), 2.72-2.60 (m, 1H, CH**H**), 2.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.98 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.71-1.53 (m, 6H, 3xC**H$_2$**), 1.46-1.23 (m, 14H, 7xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 173.8 (**C**), 164.2 (**C**), 139.1 (**C**H), 114.1 (**C**H_2), 64.5 (**C**H_2), 62.0 (**C**H), 60.2 (**C**H), 55.6 (**C**H), 40.5 (**C**H_2), 34.0 (**C**H_2), 33.8 (**C**H_2), 29.4 (2x**C**H_2), 29.2 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 28.9 (**C**H_2), 28.6 (**C**H_2), 28.4 (**C**H_2), 28.2 (**C**H_2), 25.9 (**C**H_2), 24.8 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3274 (br), 2923 (m), 2855 (w), 1688 (s), 1473 (w), 1260 (m), 1046 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 397 $[M+H]^+$ (100%), 793 $[2M+H]^+$ (20%).

12-((2-aminoethoxy)diphenylsilyl)dodecyl 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate 296



286
$C_{21}H_{36}N_2O_3S$
396.59

296
$C_{35}H_{53}N_3O_4SSi$
639.97

To a solution of Ph_2SiHCl (42 µL, 0.17 mmol) in degassed toluene (0.3 mL) were added biotin ester **286** (50 mg, 0.13 mmol) and one drop of Karstedt catalyst. After 4 h at 60 °C the resulting mixture was added to a solution of ethanolamine (16 µL, 0.26 mmol) and Et_3N (0.24 mL, 1.69 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL). After 18 h at RT the reaction mixture was purified by flash column chromatography (100% CH_2Cl_2 then 5% MeOH/CH_2Cl_2) affording the product (10 mg, 16 µmol, 20% over 2 steps) as a yellow oil.

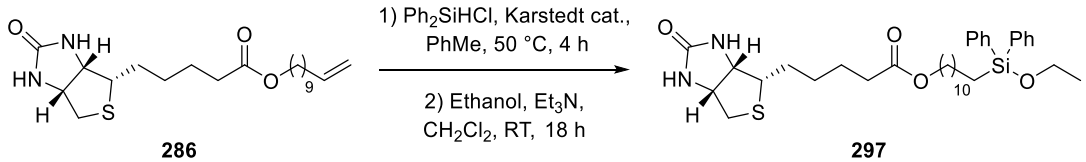
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.63-7.51 (m, 4H, 4xAr**H**), 7.43-7.36 (m, 6H, 6xAr**H**), 5.98 (s, 1H, N**H**), 5.68 (s, 1H, N**H**), 5.49-5.46 (m, 1H, C**H**), 4.29-4.25 (m, 1H, C**H**), 4.08 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, C**H₂**), 3.90 (br. s, 2H, C**H₂**), 3.10 (d, *J* = 6.9 Hz, C**H₂**), 2.87 (dd, *J* = 12.6, 4.4 Hz, 1H, CH**H**), 2.76 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, C**H**H), 2.33 (t, *J* = 2H, C**H₂**), 1.78-1.56 (m, 6H, 3xC**H₂**), 1.52-1.10 (m, 20H, 10xC**H₂**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9 (**C**), 164.1 (**C**), 134.9 (4x**C**H), 134.2 (4x**C**H), 130.3 (2x**C**), 128.2 (4x**C**H), 64.5 (**C**H_2), 62.0 (**C**H), 60.4 (**C**H), 60.1 (**C**H_2), 55.6 (**C**H), 46.0 (**C**H_2), 42.0 (**C**H_2), 40.6 (**C**H_2), 34.3 (**C**H_2), 33.6 (**C**H_2), 29.8 (**C**H_2), 29.5 (**C**H_2), 29.4 (**C**H_2), 29.2 (**C**H_2), 28.7 (**C**H_2), 28.5 (**C**H_2), 28.4 (**C**H_2), 26.0 (**C**H_2), 25.0 (**C**H_2), 23.0 (**C**H_2), 13.6 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 3257 (br), 2923 (s), 2853 (m), 1687 (s), 1461 (m), 1428 (m), 1367 (w), 1331 (w), 1262 (m), 1158 (m), 1116 (s), 1068 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 641 $[M+H]^+$ (100%).

12-(ethoxydiphenylsilyl)dodecyl 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate 297



286
$C_{21}H_{36}N_2O_3S$
396.59

297
$C_{36}H_{54}N_2O_4SSi$
638,98

To a solution of Ph_2SiHCl (42 µL, 0.17 mmol) in degassed toluene (0.3 mL) were added biotin ester **286** (50 mg, 0.13 mmol) and one drop of Karstedt catalyst. After 4 h at 60 °C the resulting mixture was added to a solution of ethanol (15 µL, 0.26 mL) and Et_3N (0.24 mL, 1.69 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL). After 18 h at RT the reaction mixture was purified by flash column chromatography (100% CH_2Cl_2 then 2%-5% MeOH/CH_2Cl_2) afforded the product (40 mg, 54 µmol, 80% over 2 steps) as a yellow oil.

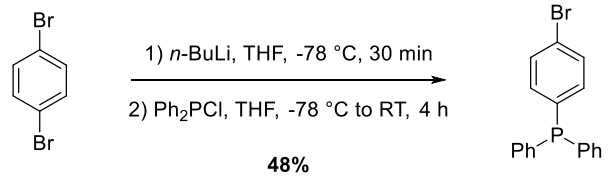
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61-7.57 (m, 4H, 4xAr**H**), 7.40-7.33 (m, 6H, 6xAr**H**), 5.89 (s, 1H, N**H**), 5.58 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H, N**H**), 4.47-4.41 (m, 1H, C**H**), 4.28-4.22 (m, 1H, C**H**), 4.31-4.20 (m, 1H, C**H**), 4.04 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, C**H₂**), 3.76 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, C**H₂**), 3.16-3.09 (m, 1H, C**H**), 2.89-2.84 (m, 1H, C**H**H), 2.72-2.67 (m, 1H, CH**H**), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C**H₂**), 1.51-1.19 (m, 6H, 3xC**H₂**), 1.48-1.20 (m, 20H, 10xC**H₂**), 1.18-1.09 (m, 3H, C**H₃**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9 (**C**), 163.8 (**C**), 137.1 (**C**), 135.6 (**C**), 134.8 (4x**C**H), 134.3 (**C**H), 129.7 (**C**H), 127.9 (4x**C**H), 64.6 (**C**H_2), 62.0 (**C**H), 60.2 (**C**H), 59.3 (**C**H_2), 55.5 (**C**H), 46.0 (**C**H_2), 40.6 (**C**H_2), 34.1 (**C**H_2), 33.5 (**C**H_2), 29.6 (**C**H_2), 29.5 (**C**H_2), 29.4 (**C**H_2), 29.3 (**C**H_2), 28.7 (**C**H_2), 28.5 (**C**H_2), 28.4 (**C**H_2), 23.1 (**C**H_2), 18.5 (**C**H_3), 15.3 (**C**H_2), 14.0 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2920 (s), 2864 (w), 1689 (s), 1461 (s), 1434 (m), 1371 (w), 1343 (m), 1265 (m), 1053 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 640 $[M+H]^+$ (100%).

(4-bromophenyl)diphenylphosphane 266



265
$C_6H_4Br_2$
235.91

266
$C_{18}H_{14}BrP$
341.19

To a solution of dibromobenzene **265** (2.9 g, 12.2 mmol) in THF (60 mL) was added dropwise at -78 °C a solution of *n*-BuLi in hexanes (2.5 M, 5.1 mL, 12.8 mmol). After 30 min at -78 °C Ph_2PCl (2.2 mL, 12.2 mmol) was added and the mixture was allowed to warm up at RT. After 4 h at RT H_2O (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (2.0 g, 6.0 mmol, 48%) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.46 (dq, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.38-7.26 (m, 10H, 10xAr**H**), 7.20-7.10 (m, 2H, 2xAr**H**).

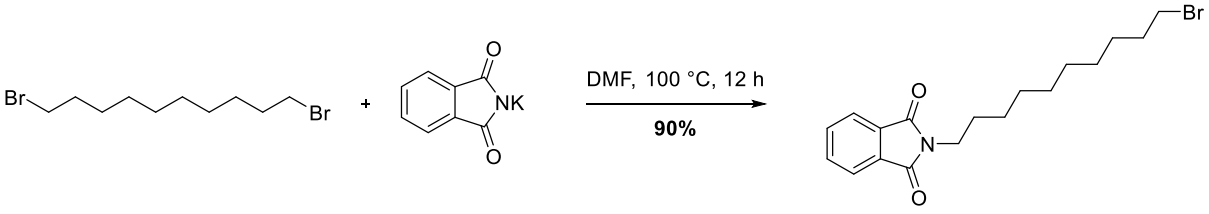
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 136.7 (d, *J* = 1.7 Hz, 3x**C**), 135.4 (d, *J* = 20.0 Hz, 2x**C**H), 133.9 (d, *J* = 19.7 Hz, 4x**C**H), 131.8 (d, *J* = 6.9 Hz, 2x**C**H), 129.1 (2x**C**H), 128.8 (d, *J* = 7.0 Hz, 4x**C**H), 123.5 (**C**).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ -6.38 (h, *J* = 5.9 Hz, 1P, **P**Ar_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1575 (m), 1477 (m), 1436 (s), 1383 (m), 1191 (s), 1117 (s), 1068 (m), 1009 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 409 [M(^{79}Br)+EtOH+Na] (50%), 411 [M(^{81}Br)+EtOH+Na] (50%).

2-(10-bromodecyl)isoindoline-1,3-dione 269



267
$C_{10}H_{20}Br_2$
300.08

268
$C_8H_4KNO_2$
185.22

269
$C_{18}H_{24}BrNO_2$
366.30

To a solution of dibromodecane **267** (15 g, 50.0 mmol) in DMF (25 mL) was added potassium phtalimide **268** (1.86 g, 10.0 mmol). After 12 h at 100 °C the reaction mixture was cooled down at RT and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (2.5%-5%-10% EtOAc/PE) afforded the product (3.3 g, 9.0 mmol, 90%) as a white solid.

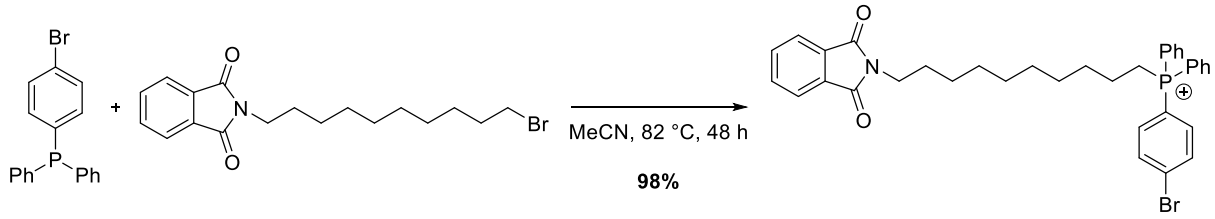
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.71 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2xAr**H**), 3.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H₂**), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, C**H₂**), 1.90-1.77 (m, 2H, C**H₂**), 1.72-1.60 (m, 2H, C**H₂**), 1.47-1.37 (m, 2H, C**H₂**), 1.35-1.22 (m, 10H, 5xC**H₂**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6 (2x**C**), 134.0 (2x**C**H), 132.4 (2x**C**), 123.3 (2x**C**H), 38.2 (**C**H_2), 34.2 (**C**H_2), 33.0 (**C**H_2), 29.5 (2x**C**H_2), 29.3 (**C**H_2), 28.9 (**C**H_2), 28.7 (**C**H_2), 28.3 (**C**H_2), 26.7 (**C**H_2).

IR (neat, cm^{-1}) 2928 (br), 2850 (w), 1713 (s), 1396 (m), 1073 (w).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 388 [M(^{79}Br)+Na] (30%), 390 [M(^{81}Br)+Na] (30%).

(4-bromophenyl)(10-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)decyl)diphenylphosphonium 270



266
$C_{18}H_{14}BrP$
341.19

269
$C_{18}H_{24}BrNO_2$
366.30

270
$C_{36}H_{38}BrNO_2P^+$
627.58

To a solution of phosphine **266** (0.5 g, 1.47 mmol) in MeCN (6 mL) was added phtalimide **269** (0.56 g, 1.47 mmol). After 48 h at 82 °C the reaction mixture was cooled down to RT and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% CH_2Cl_2 then 5%-10% EtOH/CH_2Cl_2) afforded the product (0.9 g, 1.44 mmol, 98%) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.86-7.77 (m, 12H, 12xAr**H**), 7.74-7.64 (m, 6H, 6xAr**H**), 3.87 (br. s, 2H, C**H₂**), 3.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H₂**), 1.77 (br. s, 2H, C**H₂**), 1.59 (br. s, 4H, 2xC**H₂**), 1.21 (br. d, *J* = 19.1 Hz, 10H, 5xC**H₂**).

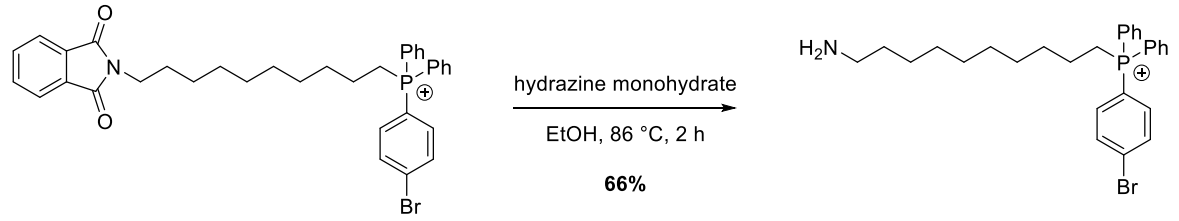
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6 (2x**C**), 135.3 (d, *J* = 8.2 Hz, 2x**C**H), 135.2 (2x**C**H), 134.0 (2x**C**H), 133.9 (d, *J* = 8.7 Hz, 4x**C**H), 133.8 (2x**C**H), 132.3 (2x**C**), 131.0 (d, *J* = 3.7 Hz, **C**), 130.7 (d, *J* = 12.5 Hz, 4x**C**H), 123.3 (2x**C**H), 117.6 (d, *J* = 86.1 Hz, 2x**C**), 117.1 (d, *J* = 87.3 Hz, **C**), 38.1 (**C**H_2), 30.4 (d, *J* = 15.7 Hz, **C**H_2), 29.4 (**C**H_2), 29.2 (**C**H_2), 29.1 (**C**H_2), 28.6 (**C**H_2), 26.9 (**C**H_2), 23.1 (**C**H_2), 22.7 (d, *J* = 4.5 Hz, **C**H_2), 22.5 (**C**H_2).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 25.1-24.7 (m, **P**$^+$$Ar_3$Alk).

IR (neat, cm^{-1}) 3362 (br), 2970 (w), 2927 (w), 1770 (w), 1704 (s), 1482 (w), 1466 (w), 1437 (s), 1397 (s), 1113 (s), 1068 (m), 1046 (m), 10087 (w), 1007 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 626 [M(^{79}Br)]$^+$ (100%), 628 [M(^{81}Br)]$^+$ (100%).

(10-aminodecyl)(4-bromophenyl)diphenylphosphonium 264



270
$C_{36}H_{38}BrNO_2P^+$
627.58

264
$C_{28}H_{36}BrNP^+$
497.48

To a solution of phtalimide **270** (0.4 g, 0.64 mmol) in EtOH (5 mL) was added hydrazine monohydrate (120 µL, 1.28 mmol). After 2 h at 86 °C the reaction mixture was cooled down to RT and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo* affording the product (0.25 g, 0.42 mmol, 66%) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.13 (br. s, 2H, N**H$_2$**), 7.89-7.75 (m, 10H, 10xAr**H**), 7.73-7.59 (m,5H, 5xAr**H**), 3.82 (br. s, 2H, C**H$_2$**), 2.80 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.55 (br. d, *J* = 5.9 Hz, 6H, 3xC**H$_2$**), 1.32-1.02 (m, 10H, 5xC**H$_2$**).

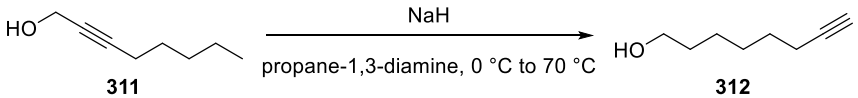
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 135.7 (d, *J* = 3.0 Hz, 2x**C**H), 135.6 (d, *J* = 10.8 Hz, 2x**C**H), 134.5 (2x**C**H), 134.2 (d, *J* =10.1 Hz, 4x**C**H), 131.4 (d, *J* = 3.4 Hz, **C**), 131.1 (d, *J* = 12.6 Hz, 4x**C**H), 130.1 (**C**), 118.6 (d, *J* = 85.9 Hz, 2x**C**), 118.2 (d, *J* = 87.5 Hz, **C**), 41.6 (**C**H$_2$), 31.1 (**C**H$_2$), 30.9 (**C**H$_2$), 30.7 (**C**H$_2$), 29.4 (2x**C**H$_2$), 23.4 (**C**H$_2$), 23.2 (**C**H$_2$), 22.7 (**C**H$_2$).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 25.1-24.6 (m, **P**$^+$Ar$_3$Alk).

IR (neat, cm^{-1}) 3390 (br), 2927 (w), 1627 (m), 1573 (m), 1483 (w), 1438 (s), 1387 (m), 1190 (w), 1113 (s), 1069 (m), 1007 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 496 [M(^{79}Br)]$^+$ (90%), 498[M(^{81}Br)]$^+$ (90%).

Oct-7-yn-1-ol 312



311
$C_8H_{14}O$
126.20

55%

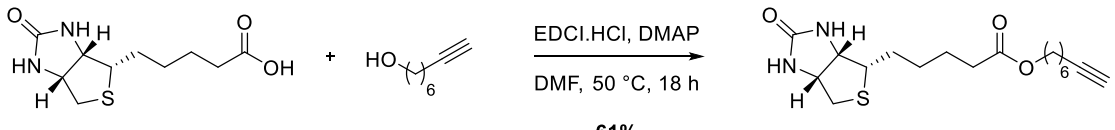
312
$C_8H_{14}O$
126.20

NaH (0.7 g, 17.4 mmol) was suspended in propane-1,3-diamine (40 mL) at 0 °C. After 1 h at 70 °C 2-octyn-1-ol **311** (1 mL, 6.9 mmol) was added. After 1 h 70 °C the reaction mixture was cooled down to 0 °C and H_2O (60 mL) was added. The mixture was extracted with Et_2O (3x50 mL). The organic phases were combined, washed with a saturated solution of NH_4Cl (2x100 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% cyclohexane then 10%-20% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (0.48 g, 3.8 mmol, 55%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.65 (br. s, 1H, O**H**), 2.19 (td, *J* = 6.8, 2.5 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.94 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, C**H**), 1.63-1.50 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.49-1.33 (m, 6H, 3xC**H$_2$**).

Data were in accordance with those reported in : Kojima, N., Suga, Y., Matsumoto, T., Tanaka, T., Akatsuka, A., Yamori, T., Dan, S., Iwasaki, H., Yamashita, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1276-1283.

oct-7-yn-1-yl 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate 313



275
$C_{10}H_{16}N_2O_3S$
244.31

312
C_3H_4O
56.06

313
$C_{18}H_{28}N_2O_3S$
352.49

To a solution of biotin **275** (0.5 g, 2.0 mmol), 7-octyn-1-ol **312** (0.25 g, 2.0 mmol) and EDCI.HCl (0.45 g, 2.4 mmol) in DMF (15 mL) was added DMAP (90 mg, 0.8 mmol). After 18 h at 50 °C the reaction mixture was cooled down to RT and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in $CHCl_3$ (20 mL) and washed with a solution of 1M HCl (2x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Precipitation from Et_2O afforded the product (430 mg, 1.22 mmol, 61%) as a beige solid.

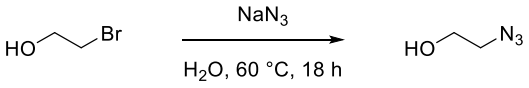
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.81 (s, 1H, N**H**), 4.61 (s, 1H, N**H**), 4.54-4.50 (m, 1H, C**H**), 4.36-4.28 (m, 1H, C**H**), 4.07 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.20-3.11 (m, 1H, C**H**), 2.94 (dd, *J* = 12.8, 5.0 Hz, 1H, C**H**H), 2.73 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, CH**H**), 2.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 2.19 (td, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.94 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, C**H**), 1.75-1.61 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.49-1.32 (m, 8H, 4xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9 (**C**), 163.9 (**C**), 84.6 (**C**), 68.4 (**C**H), 64.5 (**C**H$_2$), 62.1 (**C**H), 60.3 (**C**H), 55.6 (**C**H), 40.7 (**C**H$_2$), 34.1 (**C**H$_2$), 28.6 (**C**H$_2$), 28.5 (**C**H$_2$), 28.4 (2x**C**H$_2$), 25.6 (**C**H$_2$), 24.9 (**C**H$_2$), 18.4 (**C**H$_2$).

IR (neat, cm^{-1}) 3280 (br), 2937 (w), 2859 (m), 1705 (s), 1689 (s), 1464 (m), 1263 (w), 1158 (m), 1045 (s).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 353 $[M+H]^+$ (100%), 705 $[2M+H]^+$ (30%).

2-azidoethan-1-ol 301



300
C_2H_5BrO
124.96

Quant.

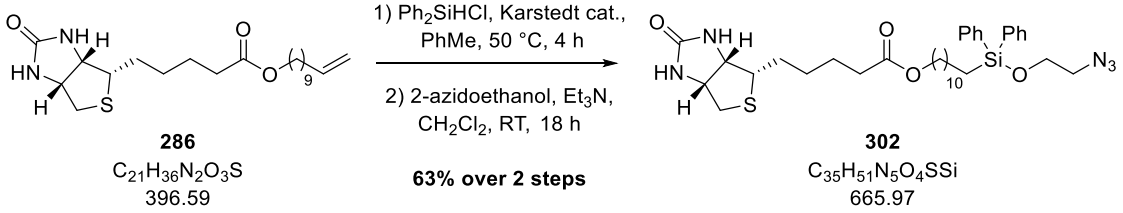
301
$C_2H_5N_3O$
87,08

To a solution of 2-bromoethanol **300** (7 mL, 120.0 mmol) in H_2O (30 mL) was added NaN_3 (7.8 g, 100.0 mmol). After 18 h at 60 °C the mixture was saturated with NaCl and extracted with CH_2Cl_2 (3x40 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording the product (8.7 g, 100 mmol, quantitative) as a colourless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.78 (dd, *J* = 10.2, 5.6 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.45 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.85 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, O**H**).

Data were in accordance with those reported in : Hounsou, C., Margathe, J.-F., Oueslati, N., Belhocine, A., Dupuis, E., Thomas, C., Mann, A., Ilien, B., Rognan, D., Trinquet, E., Hibert, M., Pin, J.-P., Bonnet, D., Durroux, T. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 466-474.

11-((2-azidoethoxy)diphenylsilyl)undecyl 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate 302



286
$C_{21}H_{36}N_2O_3S$
396.59

302
$C_{35}H_{51}N_5O_4SSi$
665.97

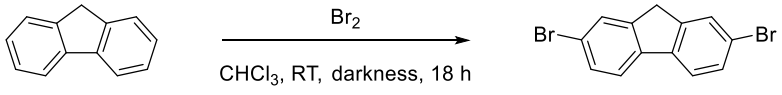
To a solution of biotine **286** (0.2 g, 0.5 mmol) and Ph_2SiHCl (1.0 mmol, 0.2 mL) in toluene (0.5 mL) was added at RT one drop of Karstedt catalyst. After 2 h at 60 °C, the reaction mixture was cooled down to RT and the mixture was added to a solution of 2-azidoethanol **301** (87 mg, 1.0 mmol) and Et_3N (0.7 mL, 5.0 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL). After 18 h at RT, the reaction mixture was partitioned between CH_2Cl_2 (10 mL) and a saturated solution of $NaHCO_3$ (10 mL). The organic phase was separated, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (100% CH_2Cl_2 then 10%-20% EtOH/CH_2Cl_2) afforded the product (0.21 g, 0.32 mmol, 63%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69-7.50 (m, 4H, 4xAr**H**), 7.46-7.30 (m, 6H, 6xAr**H**), 6.03 (s, 1H, N**H**), 5.70 (s, 1H, N**H**), 4.52-4.37 (m, 1H, C**H**), 4.33-4.19 (m, 1H, C**H**), 4.04 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.83 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.29 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, C**H$_2$**), 3.14 (m, 1H, C**H**), 2.86 (dd, *J* = 12.7, 4.4 Hz, 1H, C**H**H), 2.70 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, CH**H**), 2.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**), 1.68-1.61 (m, 6H, 3xC**H$_2$**), 1.46-1.05 (m, 20H, 10xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9 (**C**), 164.0 (**C**), 137.2 (**C**), 134.7 (4x**C**H), 134.6 (**C**), 134.3 (**C**H), 130.0 (2x**C**H), 129.6 (**C**H), 128.0 (4x**C**H), 127.8 (**C**H), 64.6 (**C**H$_2$), 62.8 (**C**H$_2$), 62.0 (**C**H), 60.2 (**C**H), 55.6 (**C**H), 53.0 (**C**H$_2$), 40.6 (**C**H$_2$), 34.1 (**C**H$_2$), 34.0 (**C**H$_2$), 29.6 (**C**H$_2$), 29.5 (**C**H$_2$), 29.3 (**C**H$_2$), 29.2 (**C**H$_2$), 28.9 (**C**H$_2$), 28.5 (**C**H$_2$), 28.3 (**C**H$_2$), 26.0 (**C**H$_2$), 25.0 (**C**H$_2$), 22.9 (**C**H$_2$), 13.6 (**C**H$_2$).

LRMS ($^m/_z$, ESI$^+$) 666 $[M+H]^+$ (30%).

2,7-dibromo-9H-fluorene 164



124
$C_{13}H_{10}$
166.22

85%

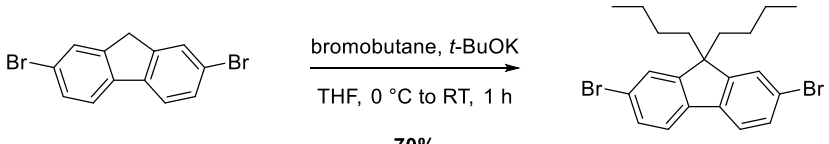
164
$C_{13}H_8Br_2$
324.02

To a solution of fluorene **124** (5.0 g, 30.1 mmol) in $CHCl_3$ was added dropwise at RT and in the darkness a solution of Br_2 (3.6 mL, 60.2 mmol) in $CHCl_3$. After 18 h at RT a solution of saturated $Na_2S_2O_3$ (100 mL) was carefully added at 0 °C and the mixture was stirred until the organic phase turned yellow. The resulting mixture was extracted with $CHCl_3$ (3x30 mL), the organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* affording the product (8.26 g, 25.5 mmol, 85%) as a pale yellow solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.63 (dd, *J* = 1.6, 0.6 Hz, 2H, 2xAr**H**), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2xAr**H**), 7.51-7.45 (m, 2H, 2xAr**H**), 3.80 (s, 2H, C**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 144.8 (2x**C**), 139.7 (2x**C**), 130.2 (2x**C**H), 128.3 (2x**C**H), 121.2 (**C**H), 121.0 (**C**H), 36.6 (**C**H$_2$).

2,7-dibromo-9,9-dibutyl-9H-fluorene 157



164
$C_{13}H_8Br_2$
324.02

157
$C_{21}H_{24}Br_2$
436.23

To a solution of fluorene **164** (2.0 g, 6.0 mmol) and bromobutane (1.3 mL, 12.0 mmol) in THF (40 mL) was added portionwise at 0 °C *t*-BuOK (2.0 g, 18.0 mmol). After 30 min at 0 °C the mixture was allowed to warm up at RT. After 30 min at RT a solution of 1 M HCl (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.83 g, 4.2 mmol, 70%) as an orange oil.

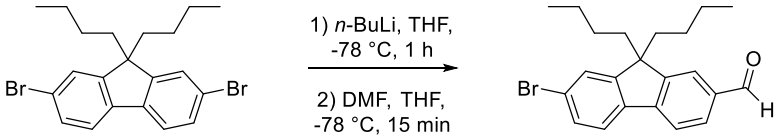
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.55-7.50 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.45 (dd, *J* = 7.2, 1.7 Hz, 4H, 2xAr**H**), 1.96-1.87 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.10 (dt, *J* = 14.8, 7.4 Hz, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.63-0.50 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ 152.7 (2x**C**), 139.2 (2x**C**), 130.3 (2x**C**H), 126.3 (2x**C**H), 121.6 (2x**C**), 121.3 (2x**C**H), 55.8 (**C**), 40.2 (2x**C**H_2), 26.0 (2x**C**H_2), 23.1 (2x**C**H_2), 13. (2x**C**H_3).

IR (neat, cm^{-1}) 1597 (w), 1568 (w), 1448 (s), 1414 (s), 1397 (w), 1130 (w), 1108 (w), 1057 (s), 1005 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 459 $[M+Na]^+$ (10%).

7-bromo-9,9-dibutyl-9H-fluorene-2-carbaldehyde 167



157
$C_{21}H_{24}Br_2$
436.23

60%

167
$C_{22}H_{25}BrO$
385.34

To a solution of fluorene **157** (2.0 g, 4.58 mmol) in THF (40 mL) was added at -78 °C a solution of *n*-Buli in hexanes (2.5 M, 2.1 mL, 5.04 mmol). After 1 h at -78 °C DMF (3.4 mL, 4.58 mmol) was added at -78°C and the mixture was allowed to warm up at RT. After 4 h at RT a solution of saturated NH_4Cl (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (5%-10% EtOAc/cyclohexane) afforded the product (1.06 g, 2.75 mmol, 60%) as an orange oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.06 (s, 1H, C**H**), 7.89-7.84 (m, 2H, 2xAr**H**), 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar**H**), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar**H**), 7.54-7.49 (m, 2H, 2xAr**H**), 2.08-1.90 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 1.16-1.01 (m, 4H, 2xC**H$_2$**), 0.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, 2xC**H$_3$**), 0.62-0.46 (m, 4H, 2xC**H$_2$**).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ

IR (neat, cm^{-1}) 1692 (s), 1605 (s), 1567 (w), 1454 (m), 1340 (m), 1299 (w), 1285 (m), 1263 (m), 1205 (m), 1185 (w), 1098 (w), 1061 (m).

LRMS ($^m/_z$, ESI^+) 385 $[M(^{79}Br)+H]^+$ (30%), 387 $[M(^{81}Br)+H]^+$ (30%).

Résumé

L'étude des phénomènes biologiques et notamment du rôle des protéines au sein d'un mécanisme cellulaire est un défi pour les biologistes. L'avènement de la microscopie de fluorescence à excitation biphotonique et des techniques « super-résolutives » a permis l'amélioration des performances des techniques de microscopie classiques et l'application l'imagerie *in vivo* pour l'analyse des tissus biologiques. Ces techniques requièrent cependant l'emploi de sondes aux propriétés photophysiques optimisées en complément de la spécificité vis-à-vis de la ou des cible(s) biologique(s).

L'epicocconone, une molécule naturelle profluorescente de la famille des azaphilones, est employée en protéomique pour la détection des protéines sur gel d'électrophorèse. Ce composé a la faculté de réagir avec les amines des résidus lysine des protéines pour former un adduit covalent énaminone hautement fluorescent dans le proche infrarouge (610 nm) sous irradiation UV (395 nm) ou visible (520 nm). Différents analogues synthétisés au sein du laboratoire ont permis d'étudier la relation structure-fluorescence de ces composés capables de détecter non spécifiquement les protéines du milieu étudié. Afin d'améliorer la spécificité de ces molécules en vue d'applications en imagerie, la synthèse de sondes polyfonctionnelles, *via* une réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre, associant un analogue de l'epicocconone à un agent de reconnaissance possédant une affinité particulière pour une cible biologique a été étudiée. La synthèse d'analogues de l'epicocconone optimisés pour l'absorption biphotonique a également été réalisée lors de cette thèse. Les propriétés optiques linéaires et non linéaires de ces composés ont été étudiées afin de sélectionner le meilleur composé pour des applications en imagerie par microscopie de fluorescence à excitation biphotonique.

Enfin, la réactivité particulière des azaphilones a servi de point de départ au développement d'une stratégie d'identification et d'isolement de nouvelles molécules naturelles azaphiles grâce à l'utilisation de sondes à produits naturels capables de cibler spécifiquement ce type de composés.

Mots clés : Azaphilones, fluorescence, absorption à deux photons, sondes à produits naturels.

Abstract

Understanding biological processes that involve proteins is a challenge for biologists. Two-photon excitation and super-resolution microscopy have improved drastically bioimaging techniques allowing *in vivo* deep tissue analysis. However those techniques require the use of optimized and selective fluorescent probes.

Epicocconone is a natural profluorescent azaphilone widely used in proteomics for detecting proteins on electrophoresis gels. This compound can react reversibly with primary amines from lysines forming a covalent enaminone adduct that emits near infrared fluorescence light (610 nm) upon UV (395 nm) or visible (520 nm) excitation. Different analogues, that non-selectively bind to proteins, were previously synthesized in order to understand the structure-fluorescence relationship. The synthesis of polyfunctionnal probes was studied using copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition to connect the epicocconone scaffold to a recognition moiety, which can specifically recognise one biological target. New analogues optimized for two-photon absorption were synthesized. Their linear and non-linear optical properties were determined to select the most suitable molecule for two-photon excitation microscopy.

In a last part, the particular reactivity of azaphilones was also regarded as a useful strategy for designing probes which could react specifically with azaphilic natural products in order to identify and isolate new ones.

Keywords : Azaphilones, fluorescence, two-photon absorption, natural product probes.