



HAL
open science

Hétérocycles fluorescents pour la détection des protéines carbonylées associées au vieillissement et à l'inflammation

Anthony Nina Diogo

► **To cite this version:**

Anthony Nina Diogo. Hétérocycles fluorescents pour la détection des protéines carbonylées associées au vieillissement et à l'inflammation. Chimie organique. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS355 . tel-02865500

HAL Id: tel-02865500

<https://theses.hal.science/tel-02865500>

Submitted on 11 Jun 2020

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale de chimie moléculaire de Paris Centre – ED406

Institut Parisien de Chimie Moléculaire / Equipe ChemBio

Institut de Biologie de Paris-Seine / Adaptation Biologique et Vieillesse

Hétérocycles fluorescents pour la détection des protéines carbonylées associées au vieillissement et à l'inflammation

Par Anthony Nina Diogo

Thèse de doctorat de Chimie Moléculaire

Dirigée par Candice BOTUHA et Bertrand FRIGUET

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2018

Devant un jury composé de :

Dr Dominique URBAN, Chargée de recherche – HDR, Rapporteur

Pr Gilles LEMERCIER, Professeur, Rapporteur

Pr Fernando RODRIGUES-LIMA, Professeur, Examineur

Pr Chahrazade EL AMRI, Professeur, Examinatrice

Dr Candice BOTUHA, Maître de conférence – HDR, Directrice de thèse

Pr Bertrand FRIGUET, Professeur, Directeur de thèse

Pr Serge THORIMBERT, Professeur, Invité

Liste des abréviations

AcOEt : acétate d'éthyle	NMP : N-méthyl-2-pyrrolidone
cat. : catalyseur	
CCM : chromatographie sur couche mince	PET : Photoinduced Electron Transfer
DCM : dichlorométhane	
DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine	Ph : phényle
DMF : diméthylformamide	
DMSO : diméthylsulfoxyde	ppm : parties par million
équiv. : équivalent	S _E Ar : substitution électrophile Aromatique
EA : électroattracteur	
ED : électrodonneur	S _N Ar : substitution nucléophile Aromatique
ESIPT : Excited State Intramolecular Proton Transfer	
EtOH : éthanol	
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer	RMN : résonance magnétique nucléaire
HOMO : highest occupied molecular orbital	
HRMS : spectrométrie de masse à haute Résolution	RX : rayons-X
ICT : Intramolecular Charge Transfer	
IR : infrarouge	ta : température ambiante
LCMS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	THF : tétrahydrofurane
LiTMP : tétraméthylpiperidide de lithium	
LUMO : lowest unoccupied molecular orbital	TMS : triméthylsilyle
MeCN : acétonitrile	
MeOH : méthanol	UV : ultra-violet
MW : micro-onde	

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer les travaux réalisés durant cette thèse : Dr Dominique Urban, Pr Gilles Lermercier, Pr Fernando Rodrigues-Lima ainsi que Pr Chahrazade El Amri.

Je souhaite remercier profondément mes encadrants et directeurs(trice) de thèse : le Dr Candice Botuha, le Pr Serge Thorimbert et le Pr Bertrand Friguet pour m'avoir guidé et encadré durant ces trois années de recherches au sein de l'IPCM et de l'IBPS.

Je remercie sincèrement le Dr Janek Hyzewicz pour sa patience, sa bonne humeur quotidienne et son implication qui m'ont permis de développer mes compétences en biologie de laboratoire et d'ouvrir les perspectives de ce projet.

Mes remerciements vont aussi à Sehr Nasseem-Khan, au Dr. Julia Contreras-Garcia et au Dr. Eleonora Luppi du LCT qui ont réalisé les études théoriques sur les molécules développés dans ce projet et leur collaboration dans ce projet. Je remercie aussi Sabrina Ait Amiri et Elodie Bosc de l'IBPS pour les études biologiques qu'elles ont réalisées sur les triazoles.

Je tiens aussi à remercier Claire Troufflard pour son aide et ses conseils en RMN ainsi que Jérémy Forté pour les analyses RX réalisées durant cette thèse.

Je remercie également les stagiaires de licence professionnelle Mathilde Lambert et Céline Demesse qui ont contribué à ce projet et qui m'ont permis de développer ma pédagogie et mon encadrement.

Un grand merci au Dr Jérémy M. Zimbron pour son soutien, ses conseils et sa bonne humeur contagieuse pendant une année 2016-2017 assez compliquée.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe ChemBio pour leur accueil, et plus particulièrement le Dr Nathalie Fischer-Durand et le Dr Michèle Salmain pour leur bonne humeur et leur conseil scientifique à l'interface entre la chimie et la biologie. Mes remerciements vont aussi au Dr Luc Dechoux pour nos nombreuses discussions scientifiques et philosophiques. Je remercie particulièrement le Dr Vincent Corsé, camarade motard, pour sa bonne humeur et ses connaissances mécaniques et scientifiques. Enfin, je remercie tous les docteurs ou futurs docteurs que j'ai côtoyé pendant ces trois années : Lucrèce Pocquet, Liang Chang et Kévin Passador pour leurs bonnes humeurs et nos échanges scientifiques.

Enfin je tiens à remercier mes amis qui m'ont soutenu pendant trois ans. Je remercie plus particulièrement Chloé Vigliotti, pour tout (soutien, sciences, judo) et nos déjeuners à Jussieu.

Je remercie ma compagne Mandy Billault, pour son aide, sa patience, sa compréhension et son soutien, sans qui je n'aurais pas avancé aussi loin.

Pour finir, j'adresse tous mes remerciements à ma sœur, ma grand-mère et mes parents sans qui je ne serais jamais arrivé jusqu'ici dans mes études. Je les remercie pour leurs encouragements, leur soutien et leur écoute même dans les moments compliqués.

Table des matières

I. CHAPITRE I : Introduction générale

1. La fluorescence	17
A. La fluorescence par absorption monophotonique	18
B. La fluorescence par absorption biphotonique	20
C. La fluorescence retardée et la phosphorescence.....	21
D. Les paramètres de la fluorescence.....	23
E. Les sondes fluorescentes en milieu biologique.....	26
2. Les fluorophores organiques	28
3. Les mécanismes de fluorescence	31
A. Transfert d'électron photoinduit (PET).....	31
B. Transfert de charge intramoléculaire (ICT).....	33
C. Transfert d'énergie par résonnance (FRET).....	35
D. Transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (ESIPT).....	37
4. La détection de protéines carbonylées grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes.....	40
A. Le stress oxydant à l'origine de la carbonylation des protéines.....	41
B. La genèse des protéines carbonylées	42
C. La technique de détection et de quantification des protéines carbonylées 2D-Oxi DIGE	44
5. Objectifs du projet.....	47
A. Origine du projet.....	47
B. Conceptions de nouvelles sondes pour le marquage biologique.....	49

II. CHAPITRE II : Synthèse de nouveaux hétérocycles fluorescents à partir de 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones

1. Synthèse et fonctionnalisation des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones.....	55
A. Etat de l'art sur les 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones: synthèse des précurseurs	55
B. Résultats précédents: Préparation des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones par <i>O</i> -arylation intramoléculaire.....	59
a. Synthèse des 4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one à partir des anions sodés des séries 1 et 2.....	59
b. Synthèse des 4H-pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-ones à partir des anions sodés de la série 3	60
2. Fonctionnalisation des 4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones par réactions de couplage carbone-carbone pallado-catalysées de type Sonogashira et Stille	62
A. Fonctionnalisation des 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3] oxazin-4-one 2-substitué par couplage de Stille.....	63
a. La réaction de couplage croisé de Stille	63
b. Introduction de groupements aryles sur les 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 2-substitué par couplage de Stille.....	63
B. Fonctionnalisation des 2-(4-bromophenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones et 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones 2-substituées par couplage de Sonogashira	64
a. La réaction de couplage croisé de Sonogashira.....	64
b. Introduction de groupements éthynylaryles sur les pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one bromés par couplage de Sonogashira	65
3. Synthèse d'hétérocycles azotés par cyclocondensation puis déshydratation sur les 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones.....	68
A. Etat de l'art: Synthèse de 1,3,5-triazines à partir des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones par attaque nucléophile d'amidines	68
a. Généralités sur les 1,3,5-triazines.....	68

b.	Synthèses de 1,3,5-triazines 2,4,6-trisubstitués avec un fragment pyridol à partir de dérivés amidines	69
B.	Etat de l'art : synthèse de 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués à partir des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones.....	70
a.	Généralités sur les 1,2,4-triazoles.....	70
b.	Synthèses des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués avec un fragment 3-pyridol	72
C.	Discrimination des 1,2,4-triazoles vis à vis des 1,3,5-triazines par propriétés de fluorescence	76
a.	Synthèses des triazines et triazoles cibles.....	76
b.	Discrimination des familles d'hétérocycles par mesure de fluorescence..	79
D.	Optimisation de la solubilité en milieu biologique des 1,2,4-triazoles	80
a.	Etat de l'art : amélioration de la solubilité par obtention d'une forme chargée	80
b.	Tentatives d'insertion d'un bras solubilisant à partir de la butanesultone.	81
E.	Optimisation de la solubilité par ajout de chaîne PEG sur le fragment pyridol	82
4.	Propriétés optiques et fluorescence des 1,2,4-triazoles-1,3,5-trisubstitués : caractérisation et mise en évidence des propriétés photophysiques.....	85
A.	Etude du pKa du proton du fragment pyridol des 1,2,4-triazoles par mesure de fluorescence.	85
B.	Variation de la fluorescence en fonction du solvant : validation du mécanisme de type ESIPT	88
a.	Variations des propriétés de fluorescence des 1,2,4-triazoles en fonction du solvant.....	90
b.	Modifications du fragment hydroxypyridine : effet sur les propriétés de fluorescence dans le dichlorométhane	95

c. Les spectres d'excitations : outils prouvant la présence de plusieurs formes d'une molécule	98
d. Influence du fragment aromatique en position 3 des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués sur les propriétés de fluorescence	99
e. Neutralisation de la fluorescence des 1,2,4-triazoles en milieu aqueux..	102
f. Cas particulier de la fluorescence des 1,2,4-triazoles à fragment 5-[2-(3-pyridyl)ethynyl]pyridin-3-ol	104
C. Rationalisation des résultats expérimentaux par comparaison entre analyses & calculs théoriques	106
a. Représentation schématique des orbitales moléculaires des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués	106
b. Mise en relation des longueurs d'onde d'émission avec les niveaux d'énergies des orbitales moléculaires : prédiction de la fluorescence des nouvelles structures	110
D. Récapitulatif des données de fluorescence et conclusion	111

III. CHAPITRE III : Synthèse de nouvelles sondes fluorescentes de type BODIPY pour la détection de protéines carbonylées

1. Etat de l'art sur les BODIPY : Synthèse, fonctionnalisation et propriétés photophysiques	117
A. Généralités sur les BODIPY : synthèse et fluorescence	117
B. Réactions de post-fonctionnalisation du cœur BODIPY : Etat de l'art	120
a. Substitutions électrophiles aromatiques (S_EAr)	120
b. Substitutions nucléophiles aromatiques (S_NAr)	122
c. Réactions de couplage croisé pallado-catalysées	124
d. Modification du squelette BODIPY par réaction d'activation de la liaison C-H	126
e. Condensation de Knoevenagel	128

2. Stratégie de synthèse de BODIPY pour le marquage et la détection des protéines carbonylées avec la technique 2D-Oxi DIGE.....	129
A. Introduction sur les BODIPY-hydrazides : Etat de l'art.....	129
B. Approche rétrosynthétique des BODIPY-hydrazides proche IR.....	132
3. Conception de BODIPY hydrazides 3,5-disubstitués par des groupements aryles et hétéroaryles pour une émission dans le proche IR	133
A. Introduction de groupements aryles sur le BODIPY plateforme par réaction de couplage croisé de Suzuki	134
B. Introduction de groupements thiényles sur le BODIPY plateforme par réaction de couplage croisé de Stille	138
C. Synthèse de BODIPY dissymétriques par double couplage croisé séquentielle en un pot	143
D. Vers des BODIPY-hydrazides pour le marquage des protéines carbonylées	144
4. Propriétés de fluorescence des BODIPY esters et hydrazides	146
A. Fluorescence des BODIPY esters dans le méthanol.....	146
a. Mesures de fluorescence des BODIPY esters 3,5-disubstitués par des groupements aryles	147
b. Mesures de fluorescence des BODIPY esters 3,5-disubstitués par des groupements hétéroaryles	150
c. Mesures de fluorescence des BODIPY esters dissymétriques issus des réactions de couplages séquentielles.....	151
d. Tableau récapitulatif des propriétés optiques des BODIPY esters	154
B. Fluorescence des BODIPY hydrazides dans le méthanol.....	155

IV. CHAPITRE IV : Applications biologiques : Utilisation des nouvelles sondes fluorescentes pour le marquage des protéines

1. Les 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués en tant qu'inhibiteurs potentiels des kallibréines	163
A. Introduction sur les kallibréines KLK6 et KLK8	163
2. Marquage des protéines carbonylées par les nouveaux hétérocycles fluorescents fonctionnalisés avec un groupement hydrazide	171
A. Introduction sur la carbonylation des protéines comme biomarqueur du vieillissement et du stress oxydant	171
B. Résultats relatifs à la préparation de sérum albumine bovine (BSA) carbonylée	172
C. Marquage de la BSA-CHO avec les nouveaux fluorophores	174
a. Marquage de la BSA-CHO avec le triazole hydrazide T04.....	174
b. Marquage de la BSA-CHO avec le BODIPY hydrazide 163	176
3. Utilisation des sondes fluorescentes pour la technique 2D-Oxi DIGE : validation et marquage différentiel des échantillons.....	178
A. Présentation du protocole d'électrophorèse bidimensionnelle avec les cyanines hydrazides	178
B. Les nouvelles sondes BODIPY: premiers essais en électrophorèse bidimensionnelle.....	181
a. Validation de la compatibilité des nouvelles sondes BODIPY 2S et 3S hydrazide avec l'électrophorèse bidimensionnelle	181
b. Modification du protocole expérimental	188
C. Comparaison entre des cellules myoblastes murins C2C12 contrôle et soumis à un stress oxydant	190
4. Utilisation des BODIPY hydrazides en microscopie à fluorescence et cytométrie en flux avec des cellules C2C12.....	194

A. Détection des protéines carbonylées en microscopie à fluorescence après marquage des myoblastes murins C2C12 par les BODIPY hydrazides	195
B. Détection des protéines carbonylées en cytométrie en flux après marquage des myoblastes murins C2C12 par les BODIPY hydrazides	197
a. Introduction à la cytométrie en flux	198
b. Comparaison des populations de cellules C2C12 oxydées marquées par la cyanine Cy5 et le BODIPY 2S.....	199
c. Comparaison des populations de cellules C2C12 soumises à un stress oxydant puis perméabilisées et marquées par la cyanine Cy5 et le BODIPY 2S	202
d. Conclusion du chapitre sur les applications biologiques	204

Conclusion générale

General materials and methods	211
Experimental section : Chapter II.....	213
Experimental section : Chapter III	238
Experimental section : Biology protocol.....	252

Chapitre I

Introduction Générale

I. Introduction générale

Ce premier chapitre est une introduction à la fluorescence et aux concepts de sondes biologiques. Nous allons rappeler les définitions de la fluorescence ainsi que les mécanismes physiques principaux de la majorité des fluorophores (entités fluorescentes). Nous aborderons ensuite les caractéristiques nécessaires pour créer une sonde fluorescente pour la chimie du vivant. Enfin, nous détaillerons les objectifs de ce projet, les moyens et outils qui interviendront dans la réalisation de ces travaux.

1. La fluorescence

La fluorescence est un mécanisme particulier de photoluminescence. Une entité chimique ou biologique possédant ces propriétés a la capacité d'absorber un ou plusieurs photons pour les réémettre à de plus grandes longueurs d'onde.¹ Le diagramme ci-dessous (figure 1.1) est le diagramme de Perrin-Jablonski, qui représente les états électroniques d'une molécule. On retrouve l'état électronique fondamental, appelé S_0 , ainsi que les états électroniques excités, appelés S_1 , S_2 ou T_1 . Les traits pleins représentent les états vibrationnels les plus stables à l'inverse des traits fins qui représentent les états vibrationnels de plus hautes énergies pour une même multiplicité de spin (singulet ou triplet). Les détails de ces états excités seront développés dans la suite de ce chapitre. On peut remarquer les transitions symbolisées avec des flèches de différentes couleurs pour différencier les transitions possibles entre les états. Ces transitions représentent les mouvements des électrons rendus possibles par une excitation radiative (lumière, chaleur). Lorsqu'une molécule fluorescente est irradiée, elle absorbe un photon et passe d'un état singulet S_0 à un état excité S_1 ou S_2 . Il existe deux types d'absorption : monophotonique et biphotonique.

¹ Bernard Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck, Chimie, **2004**, 201p.

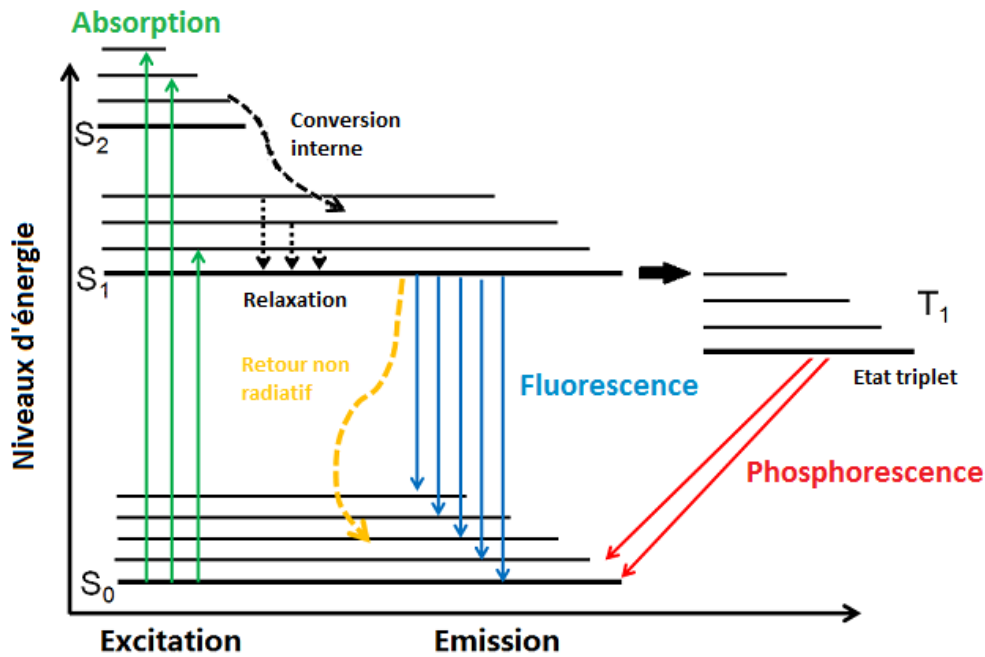


Figure 1.1 : Diagramme de Perrin – Jablonski.¹

A. La fluorescence par absorption monophotonique

Le processus d'absorption s'étend sur une durée de l'ordre de la femtoseconde (10^{-5} seconde). Notons que les bandes d'absorption résultent de la transition électronique d'une orbitale fondamentale à une orbitale excitée. Dans le cas de molécules aromatiques, on observe généralement des transitions $\pi-\pi^*$, issus des doubles liaisons, et des transitions $n-\pi^*$ résultant des doublets non liants des hétéroatomes par exemple. Le mécanisme d'absorption monophotonique est linéaire par la loi de Beer-Lambert,^{2,3} c'est-à-dire que la quantité de lumière absorbée dépend de la quantité de lumière incidente et de la concentration en chromophore.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot [C] \text{ ou } I(l) = I_0 \cdot e^{-\varepsilon[C]l}$$

Avec A l'absorption, ε le coefficient d'absorption molaire, l la longueur de la cuve de mesure, $[C]$ la concentration molaire en chromophore, I l'intensité lumineuse et enfin I_0 l'intensité lumineuse initiale.

² Lambert, J.H., *Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, Sumptibus Viduae Eberhardi Klett, 1760.

³ Beer, A., « Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten, dans *Annalen der Physik und Chemie*, vol. 86, 1852.

A ce moment, une faible quantité d'énergie est perdue au cours d'un phénomène rapide de relaxation. Le composé va alors revenir à son état fondamental en passant de l'état S_1 à l'état S_0 en émettant un photon de plus faible énergie que le photon absorbé sur une durée de l'ordre de la nanoseconde (10^{-9} seconde) : **c'est la fluorescence**. On observe alors une longueur d'onde d'émission plus grande que la longueur d'absorption. L'énergie du photon libéré est proportionnelle à l'inverse de la longueur d'onde d'émission de la fluorescence selon l'équation suivante :

$$\Delta E = E(S_1) - E(S_2) = \hbar\omega_{em} = hv_{em} = \frac{h \cdot c}{\lambda_{em}}$$

Avec h la constante de Planck, \hbar sa forme réduite, ω la pulsation de l'onde émise, ν sa fréquence, λ sa longueur d'onde et c la célérité (vitesse de la lumière).

La fluorescence est un outil optique puissant pour la détection et le suivi biologique. Il existe des molécules fluorescentes utilisées en médecine, notamment le vert d'indocyanine (figure 1.2).⁴ Cette molécule fluorescente est utilisée pour le diagnostic de pathologies cardiaques, hépatiques ou encore ophtalmiques.

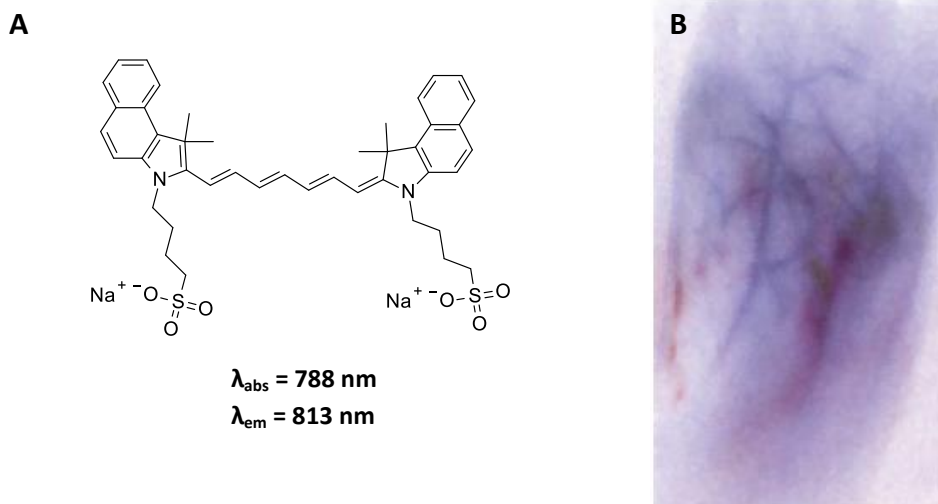


Figure 1.2 : Structure du vert d'indocyanine (A) et Imagerie de fluorescence d'un système vasculaire après injection du fluorophore (en rouge : les artères, en bleu : les veines) (B).

⁴ Alander, J. T.; Kaartinen, I.; Laakso, A.; Pätilä, T.; Spillmann, T.; Tuchin, V. V.; Venermo, M.; Välisuo, P. *Int. J. Biomed. Imaging* **2012**, 2012, 1–26.

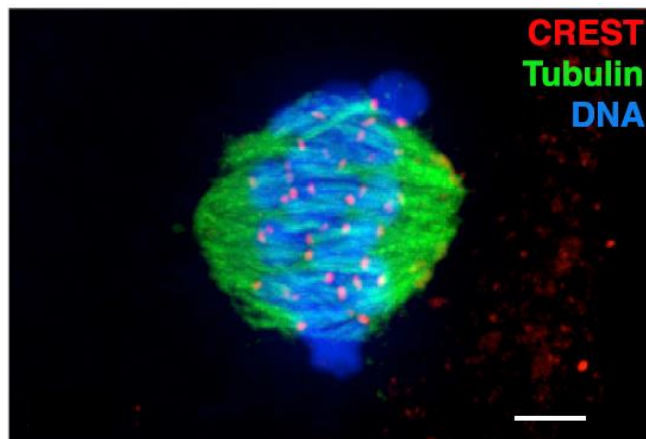
B. La fluorescence par absorption biphotonique

Dans certains cas, il est possible d'avoir une absorption de deux photons à la place d'un seul permettant de passer de l'état fondamentale S_0 à l'état excité S_1 . Les photons possèdent une énergie $\Delta E/2$. Ce phénomène crée un état virtuel entre les deux niveaux d'énergie et conduit à une expression non linéaire d'absorption.⁵

$$I(l) = \frac{I_0}{1 + \beta \cdot [C] \cdot l \cdot I_0}$$

Avec I l'intensité lumineuse, β le coefficient d'absorption biphotonique, l la longueur de la cuve de mesure, $[C]$ la concentration molaire en chromophore et enfin I_0 l'intensité lumineuse initiale.

Bien que la probabilité d'obtenir une absorption biphotonique soit 30 fois plus faible que d'avoir une absorption monophotonique et si l'excitation se fait grâce à une source bien précise il est possible d'augmenter la possibilité d'observer ce phénomène. Une source laser émettant des impulsions de l'ordre de la femtosecondes focalisées sur le fluorophore en solution permet d'avoir un confinement spatio-temporel favorisant l'absorption à 2 photons. Ce nouveau type de fluorescence a permis la création de la microscopie à deux photons en 1997 par W. Denk.⁶ Cette technique permet d'acquérir des images de hautes résolutions en deux dimensions (radiale et axiale) en minimisant la taille de la région étudiée avec des longueurs d'onde d'excitation variables.



⁵ Göpper-Mayer, M. über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik* **1931**, 401, 273-294.

⁶ Denk, W.; Svoboda, K. *Neuron* **1997**, 18, 351-357.

Figure 1.3 : Image microscopie à deux photons de chromosomes.⁷ En bleu : ADN, en vert : microtubes, en rouge : kinetochore avec CREST.

C. La fluorescence retardée et la phosphorescence

La phosphorescence est un mécanisme de photoluminescence qui résulte d'une relaxation du chromophore par un état triplet. Un état triplet est un état fondamental ou excité qui possède deux électrons non appariés avec un spin parallèle contrairement à l'état singulet dont les deux électrons, appariés ou non, ont des spins inversés.

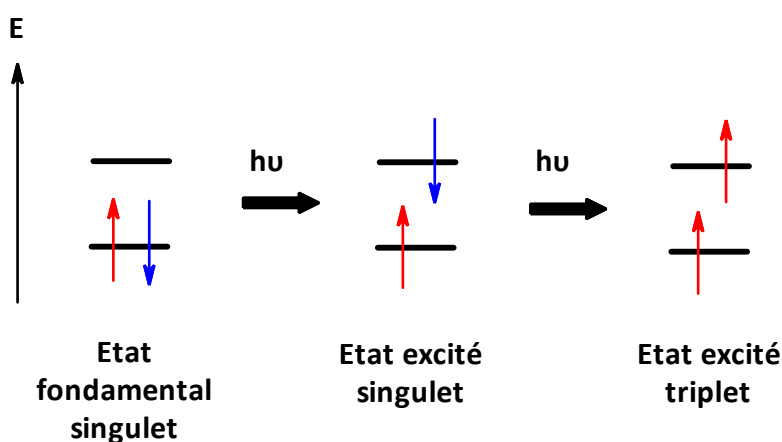


Figure 1.4 : Les états singulet et triplet en chimie quantique.

Dans le phénomène de phosphorescence, la lumière excitatrice fait transiter un électron d'un état S_0 vers un état S_1 . Lors de la relaxation, l'électron va passer à un état de spin plus élevé triplet mais énergétiquement plus bas.

⁷ Vallot, A.; Leontiou, I.; Cladière, D.; El Yakoubi, W.; Bolte, S.; Buffin, E.; Wassmann, K. *Current Biology* **2018**, 28, 130-139.

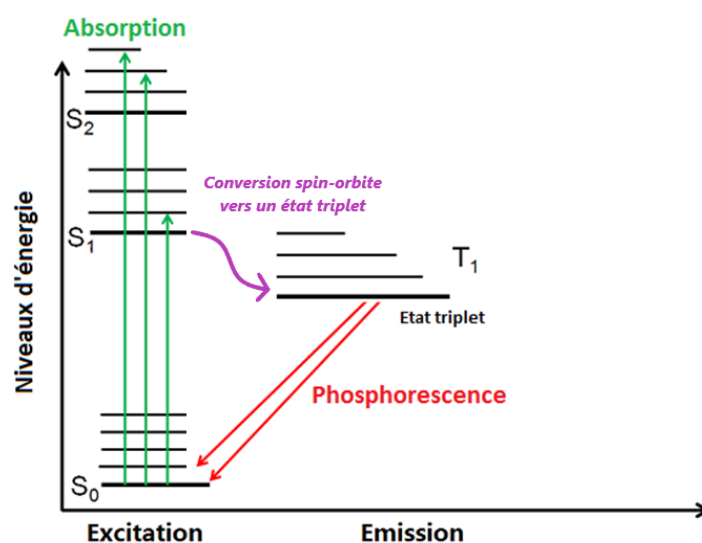


Figure 1.5 : Mécanisme de phosphorescence.

Ces transitions électroniques sont plus longues par rapport aux transitions liées à la fluorescence. La durée de vie de la phosphorescence dépend du composé mais est de l'ordre de plusieurs minutes. Il est possible d'exciter thermiquement certains chromophores pour obtenir une émission radiative sur un temps plus court. En outre, la relaxation du système vers l'état fondamental à partir d'un état triplet est plus faible énergétiquement ce qui induit une longueur d'onde d'émission plus grande dans le cas de la phosphorescence par rapport à la fluorescence.

Cependant, il est possible pour le chromophore de retourner à son état excité singulet de deux manières principales : d'une part, à l'aide d'une activation thermique, l'excitation à l'état triplet retourne à l'état excité singulet pour ensuite se relaxer à travers une émission radiative. Ce phénomène est appelé fluorescence retardée de type E. D'autre part, par l'intermédiaire d'une collision avec un second chromophore à l'état excité triplet résultant un retour à l'état fondamental S_0 pour l'un et un retour à l'état excité singulet S_1 pour le second. Ce phénomène est appelé fluorescence retardée de type P.

La fluorescence retardée^{1,8} est un processus plus long que la fluorescence classique car la durée de vie est de l'ordre de la milliseconde. Hormis ce paramètre de temps, il n'y a aucun

⁸ Kim, D.-H.; D'Aléo, A.; Chen, X.-K.; Sandanayaka, A. D. S.; Yao, D.; Zhao, L.; Komino, T.; Zaborova, E.; Canard, G.; Tsuchiya, Y.; et al. *Nature Photonics* **2018**, *12*, 98–104.

autre changement sur les émissions ni sur les énergies radiatives émises ce qui implique des spectres de fluorescence identique dans les deux cas.

C'est un phénomène que l'on retrouve dans la recherche sur de nouvelles diodes électroluminescentes organiques (OLED) car la particularité de ce mécanisme activable thermiquement permettrait théoriquement de conserver une efficacité quantique EQ (rapport entre l'énergie électrique et l'énergie lumineuse) proche de 100%.⁹ Cependant, les efficacités des matériaux développés jusqu'à présent ne dépassent pas les 20% (figure 1.6).¹⁰

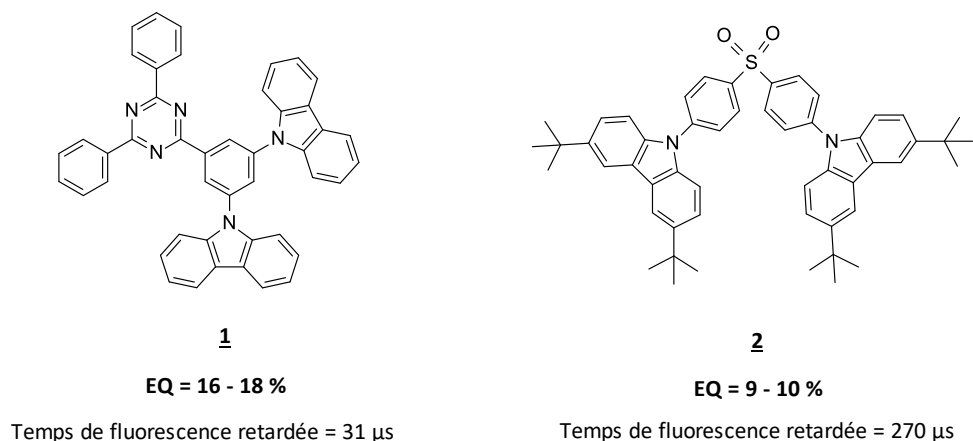


Figure 1.6 : Exemples de molécules à fluorescence retardée.

D. Les paramètres de la fluorescence

Pour caractériser un fluorophore, il est nécessaire de connaître plusieurs paramètres photophysiques. Généralement, il est possible d'accéder aux paramètres suivants grâce aux appareils de mesure comme le spectromètre UV-visible et le spectrofluorimètre : l'absorption λ_{abs} , l'excitation λ_{ex} , l'émission λ_{em} , le coefficient d'absorption molaire (ou coefficient d'extinction molaire) ϵ , le rendement quantique ϕ , la brillance B, le temps de vie de la fluorescence τ et le photoblanchiment.

Il est important de noter que les longueurs d'onde d'absorption et d'excitation, bien que parfois confondues, ne correspondent pas au même paramètre. Le spectre d'absorption regroupe les longueurs d'onde excitations de toutes les formes (conformères, tautomères etc.) de l'entité fluorescente. Le spectre d'excitation, quant à lui, est dépendant d'une seule

⁹ Zhang, Q.; Li, J.; Shizu, K.; Huang, S.; Hirata, S.; Miyazaki, H.; Adachi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14706–14709.

¹⁰ Kim, M.; Jeon, S. K.; Hwang, S.-H.; Lee, J. Y. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 2515–2520.

forme du fluorophore. Si le spectre d'émission présente 2 longueurs d'onde d'émission, il est possible de déterminer si les bandes sont dues à une seule entité ou plusieurs grâce à la mesure des spectres d'excitation aux deux longueurs d'onde d'émission. De manière générale, pour un composé fluorescent à viser thérapeutique, il est intéressant d'avoir une bande d'absorption dans le domaine du visible (figure 1.7) entre 380 nm et 800 nm pour éviter les interactions optiques avec les tissus biologiques (voir figure 1.9).

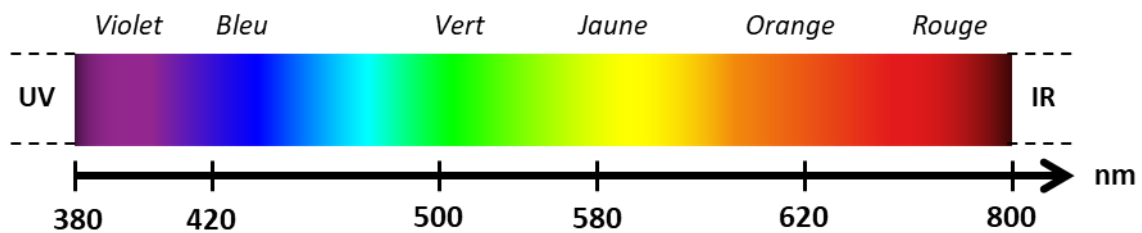


Figure 1.7 : Spectre de la lumière blanche.

Le spectre d'émission, quant à lui, correspond au spectre de fluorescence et dépend naturellement de la longueur d'onde d'excitation du composé. En excitant le fluorophore à la longueur d'onde maximum d'absorption λ_{abs} on enregistre le spectre de fluorescence le plus intense. L'écart entre les maxima d'absorption et d'émission est appelée déplacement de Stokes $\Delta\lambda$,¹ mesuré en nm ou en cm^{-1} . Plus le déplacement de Stokes est grand, plus les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont clairement distinctes ce qui permet d'éviter les phénomènes de superposition. On évalue la viabilité du déplacement de Stokes selon l'objectif d'utilisation du fluorophore donc même si, par exemple, ce déplacement est faible (<10 nm) il peut être suffisant pour ce que l'on souhaite étudier.

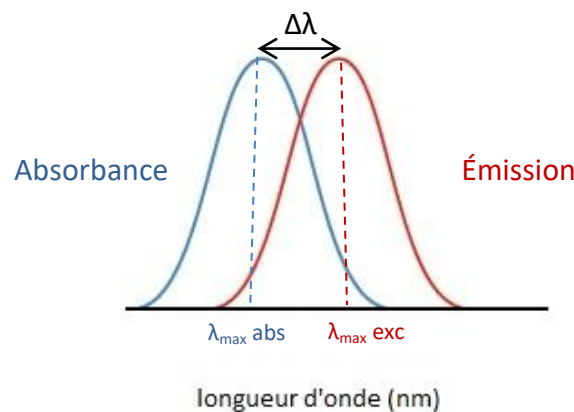


Figure 1.8 : Représentation schématique du déplacement de Stokes.

Le coefficient d'extinction représente la capacité d'une entité à absorber la lumière à une longueur d'onde donnée et se mesure grâce à une courbe d'étalonnage et la loi de Beer-Lambert précédemment citée. Le rendement quantique représente le rapport entre le nombre de photons reçus et le nombre de photons émis, caractérisant l'efficacité de l'entité.

$$\phi = \frac{N_{\text{photon émis}}}{N_{\text{photon reçu}}} \text{ donc } 0 < \phi < 1$$

Le rendement quantique ϕ s'exprime en unité de 0 à 1 ou en pourcentage de 0% à 100%. Un rendement quantique parfait impliquerait que le fluorophore émet autant de lumière qu'il en reçoit. Il n'existe pas d'entité chimique présentant un tel rendement.

La meilleure manière de mesurer le rendement quantique est d'utiliser un fluorimètre permettant de faire une intégration de sphère pour mesurer le nombre de photon émis. L'appareil de mesure étant très onéreux, les chimistes ont développé une méthode indirecte. Pour cela, le rendement quantique peut être mesuré par comparaison avec un fluorophore déjà caractérisé dans la littérature. Le choix de cette référence est crucial pour effectuer une mesure fiable. La référence est choisie en tenant compte de la gamme spectrale de mesure semblable ou identique au fluorophore à caractériser. Dans les chapitres II et III, le rendement quantique est mesuré par comparaison avec une référence selon le protocole décrit dans la partie expérimentale.

Avec le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique, nous avons accès à la brillance (avec l'équation ci-dessous), paramètre moins connu que les deux autres mais permettant de caractériser l'intensité d'émission d'un fluorophore.

$$B = \epsilon \cdot \phi \text{ donc } 0 < B < \epsilon$$

La durée de vie de fluorescence τ représente le temps d'émission de l'onde fluorescente qui est de l'ordre de la nanoseconde pour de la fluorescence classique. Dans le cas de la fluorescence retardée, ce temps peut être 10^3 fois plus long. Enfin, le photoblanchiment est un phénomène apparenté à l'extinction de la fluorescence du système. Sous une excitation prolongée, le fluorophore peut se relaxer avec des transitions radiatives ou intervenir dans

des réactions photochimiques (avec l'oxygène par exemple créant des radicaux libres) réduisant ainsi son émission.

E. Les sondes fluorescentes en milieu biologique

Pour être considéré comme une sonde, un fluorophore doit obéir à plusieurs contraintes dans le cadre d'étude *in vivo*. Ces limites sont imposées par les milieux biologiques qui causent certains phénomènes optiques comme l'autofluorescence, l'absorption et la diffusion.

L'autofluorescence est un processus qui permet à certaines protéines d'émettre une onde fluorescente sous l'effet de la lumière. Ce phénomène dépend de la longueur d'onde d'excitation et peut s'étendre sur tout le domaine du visible (390 nm – 710 nm). Les propriétés d'autofluorescence peuvent dépendre de la température comme dans le cas du collagène.¹¹ Il est de moins en moins présent à mesure que l'on déplace l'excitation vers les zones proche infrarouge (IR). C'est l'intérêt majeur du développement de sondes avec des propriétés spectrales dans le proche IR ou l'IR.

Lors de l'excitation de la sonde *in vivo*, l'onde radiative doit d'abord traverser les tissus biologiques (membranes, organes...). Les coefficients d'absorption molaire des tissus biologiques sont tous différents et dépendent de la longueur d'onde d'excitation. De plus, ils n'absorbent pas tous sur la même gamme ce qui peut introduire des variations optiques selon la localisation de la sonde. La zone correspondant au meilleur domaine optique de travail pour l'imagerie optique est située entre 650 nm et 1350 nm et est appelée fenêtre optique.

¹¹ Menter, J. M. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, 5, 403-410.

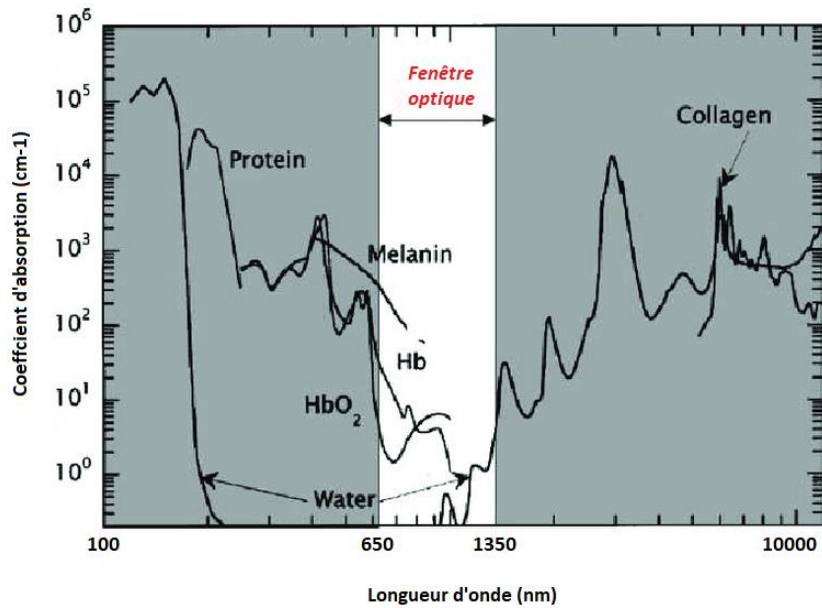


Figure 1.9 : Absorption des principaux tissus biologiques.¹²

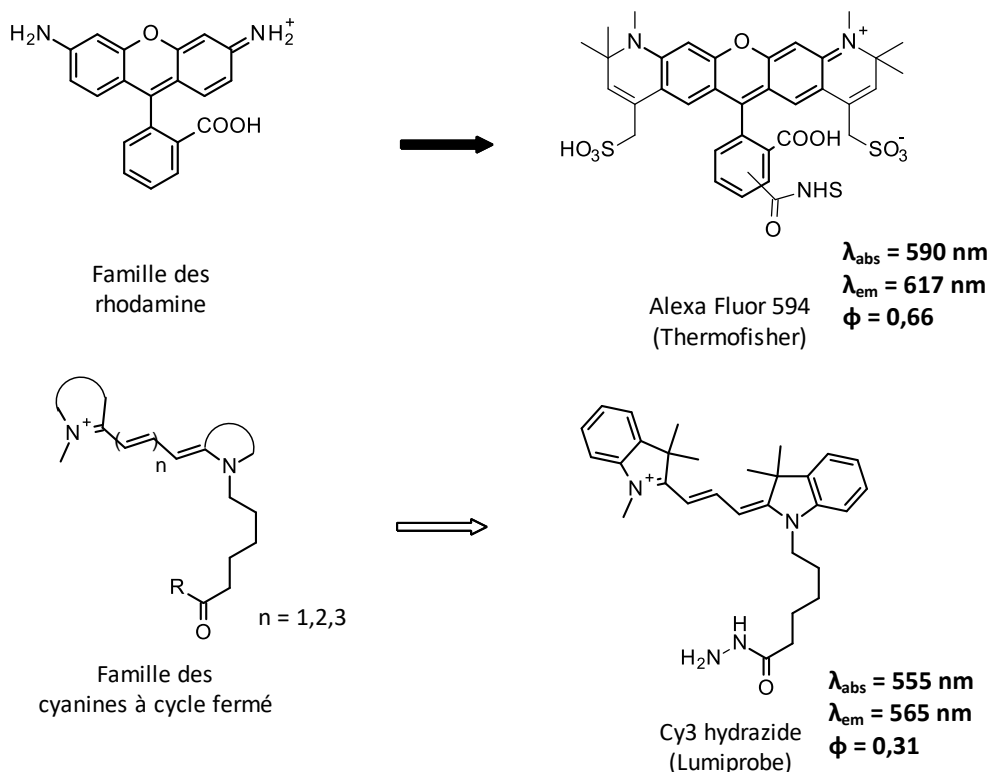
Enfin, on retrouve aussi des phénomènes de diffusion, réflexion, réfraction et/ou diffraction dans les milieux biologiques. La lumière émise par les sondes se retrouve diffusée sur une zone plus étendue autour de la position du fluorophore. La diffusion empêche la localisation précise d'un objet lumineux dans les tissus, il en ressort une mauvaise résolution spatiale en technique d'imagerie optique.

Finalement une sonde fluorescente utilisable en biologie doit absorber dans le visible et de manière idéale dans le proche IR ou l'IR. Elle doit émettre une bande fluorescence sur une gamme distincte de la bande d'absorption pour éviter les phénomènes de superposition. Il faudrait donc un déplacement de Stokes de minimum 10 nm – 20 nm pour au moins limiter ces superpositions. Cependant, on retrouve dans le commerce des sondes qui ont des déplacements de Stokes plus faibles entre 5 nm et 6 nm. La fonction réactive de marquage est essentielle lorsque l'on souhaite effectuer un marquage covalent. Un coefficient d'absorption supérieur à $100000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ est enregistré pour de nombreux fluorophores commerciaux mais le plus important reste un rendement quantique si possible le plus proche de 1. Enfin une solubilité du fluorophore en milieu biologique est également nécessaire. Avec ces caractéristiques, on obtient un suivi optique optimal pour l'étude de pathologies ou le diagnostic médical.

¹² Denneval, C. *Design, Synthesis and Evaluation of Bimodal Contrastophores for Two-Photon Microscopy and Positron Emission Tomography*; 2014.

2. Les fluorophores organiques

Il existe plusieurs famille de molécules fluorescentes qui ont été développées et commercialisées pour des applications en biologique (cellulaire, génomique).^{13,14} Il existe plusieurs familles de marqueurs fluorescents dont les nano-cristaux de semi-conducteurs, les protéines fluorescentes ou encore les petites molécules organiques. Depuis le 19^e siècle, ces molécules sont devenues indispensables dans les domaines biologiques et chimiques pour l'étude des mécanismes biochimiques et des diverses pathologies. On retrouve 3 grandes familles disponibles commercialement avec des longueurs d'onde d'émission couvrant de larges gammes du visible à l'infrarouge : les cyanines à cycle fermé, les BODIPY et les rhodamines (figure 1.10).^{15,16}



¹³ Luo, S.; Zhang, E.; Su, Y.; Cheng, T.; Shi, C. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7127-7138.

¹⁴ Yin, J.; Hu, Y.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4619-4644.

¹⁵ Umezawa, K.; Citterio, D.; Suzuki, K. *Anal. Sci.* **2014**, *30*, 327-349.

¹⁶ Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855-866.

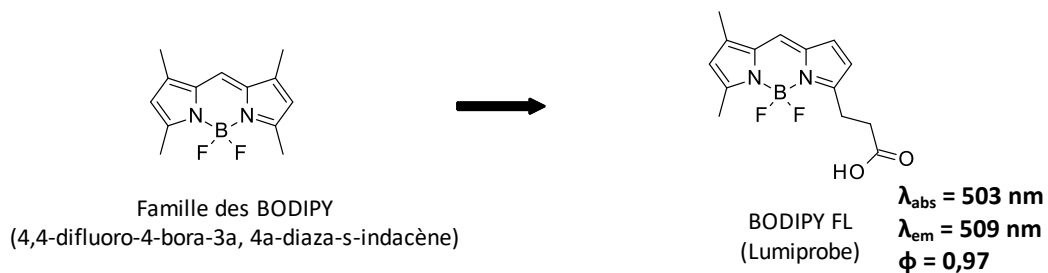


Figure 1.10 : Famille de fluorophore disponible commercialement.

La fluorescéine, de la famille des rhodamines, est la molécule la plus connue en fluorescence et présente plusieurs avantages comme sa solubilité en milieu aqueux ainsi que plusieurs formes prototropiques qui rend son utilisation possible dans la détection des ions. Ces propriétés de fluorescence varient selon le pH. La fluorescéine est un fluorophore utilisé couramment en recherche médicale et biologique. Elle possède une absorbance de 495 nm et une émission de 521 nm ($\Delta\lambda = 24 \text{ nm}$, valeur commune pour les bonnes sondes fluorescentes) pour une durée de vie de fluorescence entre 3 et 4 ns. Le tout avec une intensité lumineuse très correcte, avec un coefficient d'extinction molaire de $80\,000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et un rendement quantique de 0,79.¹⁷

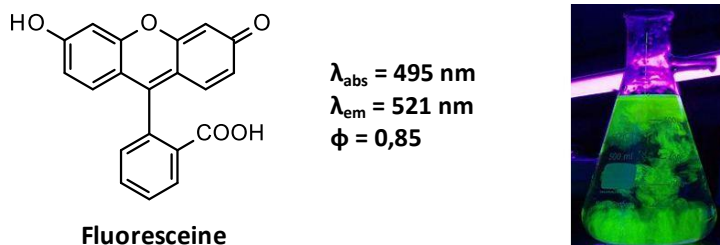


Figure 1.11 : Structure et aspect de la fluorescéine.

Les rhodamines sont des analogues structuraux des fluorescéines. Il présente une plus faible sensibilité aux pH que la fluorescéine. L'introduction de divers substituants, comme pour le fluorophore Alexa Fluor 594 (figure 1.10), ont permis aussi d'améliorer leur stabilité photophysique avec des longueurs d'onde déplacées vers le proche IR. Ils sont utilisés pour

¹⁷ Kellogg, R.E.; Bennett, R.G. *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 3042-3045.

la détection d'ions (Fe^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}), de radicaux libres (HO^\cdot) ou de thiols, mais aussi pour le marquage covalent d'acides aminés sur les protéines en milieu biologique.^{18,19,20}

Les BODIPY, ou bore-dipyrométhène, représentent une famille de fluorophores qui ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Ils présentent plusieurs avantages comme une charge neutre, une bonne stabilité chimique dans tous les types de solvant. Il ressort aussi une grande stabilité photophysique. Ils sont utilisés pour l'étude des interactions protéine-protéine ou encore le marquage de molécules bioactives. Il existe une grande variabilité du squelette des BODIPY ce qui permet de faire varier leurs propriétés spectrales de multiples façons, du proche UV au proche IR. Cependant, ils conservent un déplacement de Stokes faible ($\Delta\lambda < 70 \text{ nm}$). Ces fluorophores seront plus détaillés dans le chapitre III.

Les cyanines à cycle (ou chaîne) fermé sont basées sur deux motifs indoles séparés par une chaîne polyméthine. En faisant varier le nombre de motif vinylique de la chaîne, on augmente la conjugaison du système et donc on modifie les spectres de fluorescence. Certaines cyanines ont été commercialisées avec des motifs sulfoindocyanines et sont appelées « CyDye ». Ces sondes présentent une bonne photostabilité, un grand rendement quantique et dans certains cas, une bonne solubilité en milieu aqueux. Le groupement R présent sur la partie marquage de la sonde permet de fixer les fluorophores sur différents acides aminés des protéines ainsi que sur l'ADN. Cette fonction de marquage ne modifie pas les propriétés spectrales des sondes. Les plus populaires sont les CyDyes Cy3 ($\lambda_{\text{abs}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$) et Cy5 ($\lambda_{\text{abs}} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) qui varient de par leur longueur de la chaîne polyméthine. Ces fluorophores sont régulièrement utilisés en biologie pour le marquage des protéines, la détection d'anion...^{21,22,23}

La fluorescence est une technique d'analyse qui présente de nombreux avantages par rapport à d'autres techniques d'imagerie du vivant (RX, radioactivité...). En plus de permettre l'étude de composés biologiques à de très faibles concentrations (du micromolaire au nanomolaire), cette technologie présente une haute sensibilité avec une bonne résolution

¹⁸ Tang, B.; Xing, Y.; Li, P.; Zhang, N.; Yu, F.; Yang, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11666–11667.

¹⁹ Zhang, X.; Shiraishi, Y.; Hirai, T. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5455–5459.

²⁰ Kapanidisa, A.N.; Weiss, S. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10953-10964.

²¹ Guo, Z.; Kim, G.-H.; Shin, I.; Yoon, J. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7818–7827.

²² Chen, X.; Nam, S.-W.; Kim, G.-H.; Song, N.; Jeong, Y.; Shin, I.; Kim, S. K.; Kim, J.; Park, S.; Yoon, J. *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 8953-8954.

²³ Yin, J.; Kwon, Y.; Kim, D.; Lee, D.; Kim, G.; Hu, Y.; Ryu, J.-H.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5351–5358.

spatiale. Il est aussi possible de suivre le mouvement des protéines, ADN ou molécules bioactives *in vivo* et *in vitro* en temps réel. Il existe différents types de mécanisme physico-chimique décrivant le phénomène de fluorescence que nous allons détailler dans les prochaines parties.

3. Les mécanismes de fluorescence

Il existe de nombreux fluorophores que l'on présente « à effet push-pull ». Ce terme repose sur la présence de deux parties ou fonctions chimiques ayant d'un côté un effet électronique donneur (mésomère avec des doublets non liants, charge négative) et de l'autre un effet électronique accepteur ou attracteur (lacune électronique, charge positive). Il existe donc un mouvement des électrons de la fonction donneuse vers la fonction attractrice à travers plusieurs mécanismes.

On observe 4 mécanismes principaux : le PET (Photoinduced Electron Transfer), le ICT (excited-state Intramolecular Charge Transfer), le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et l'ESIPT (Excited State Intramolecular Proton Transfer).

A. Transfert d'électron photoinduit (PET)

Le PET est un mécanisme de fluorescence que l'on retrouve dans plusieurs familles de sondes fluorescentes comme les cyanines, les rhodamines ou encore les BODIPY. Ces sondes sont généralement composées de 3 parties : le fluorophore, un site de reconnaissance possédant différents potentiels d'oxydation et enfin une chaîne reliant les deux parties. Le site de reconnaissance possède plusieurs potentiels d'oxydation et peut ainsi agir en tant que donneur ou accepteur d'électron.²⁴ On rappelle que généralement les états S_0 et S_1 sont respectivement les orbitales HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital).

²⁴ Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768-7817.

Il existe deux types de transfert d'électron photoinduit, le « a-PET » ou le « d-PET ». Lorsque les orbitales HOMO (état S_0) et LUMO (état S_1) du fluorophore sont plus basses en énergie que celles du site de reconnaissance, le transfert d'électron se fait du site de reconnaissance au fluorophore, résultant une inhibition de la fluorescence : c'est le a-PET. Dans le cas inverse, on observe une émission de fluorescence lors du transfert de l'électron du fluorophore au site de reconnaissance, c'est le d-PET (figure 2.12). Concrètement, on observe une extinction de la fluorescence avec le premier type et une apparition de fluorescence dans le deuxième.

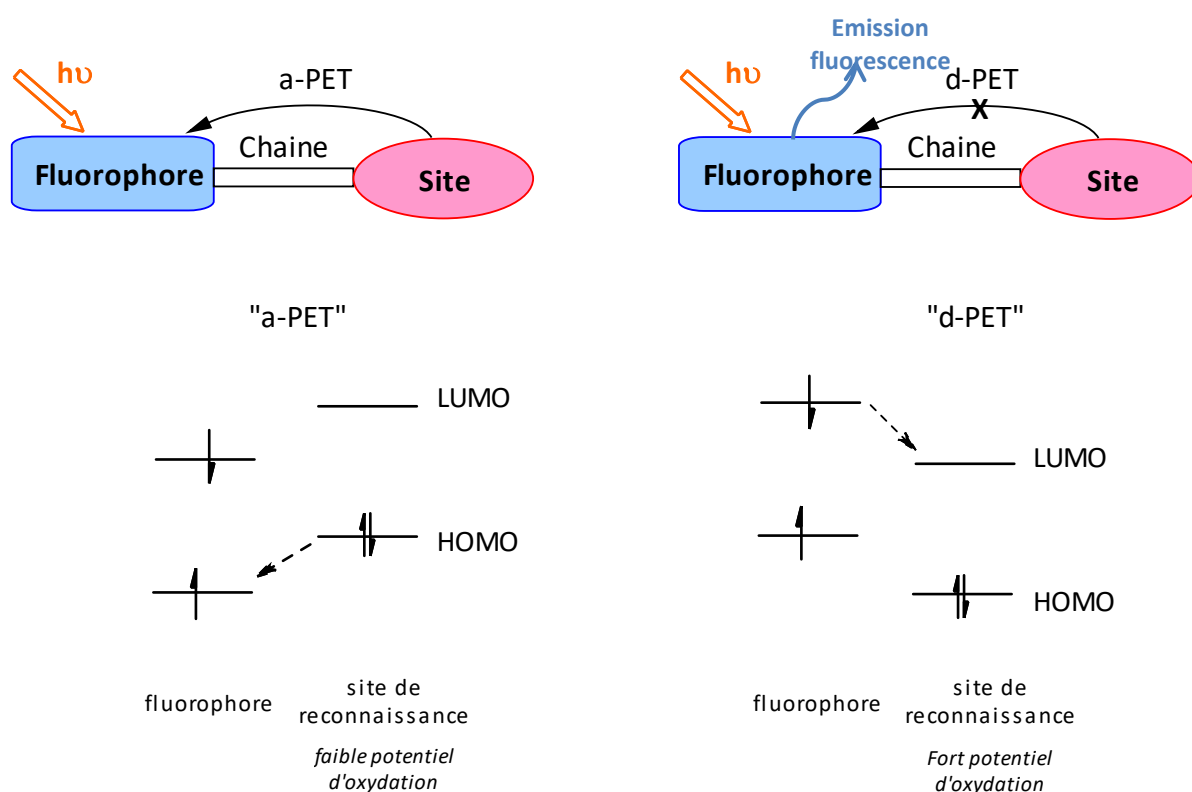


Figure 1.12 : Représentation des « a-PET » et « d-PET ».

Ce mécanisme intervient dans des fluorophores sur toutes les gammes du spectre du visible ainsi que dans le proche IR.²⁵ Si on prend l'exemple des cyanines, on retrouve le transfert d'électron entre les deux motifs indoles reliés par une chaîne vinylique sous excitation.

²⁵ Zhang, W.; Ma, Z.; Du, L.; Li, M. *Analyst*, **2014**, *139*, 2641–2649.

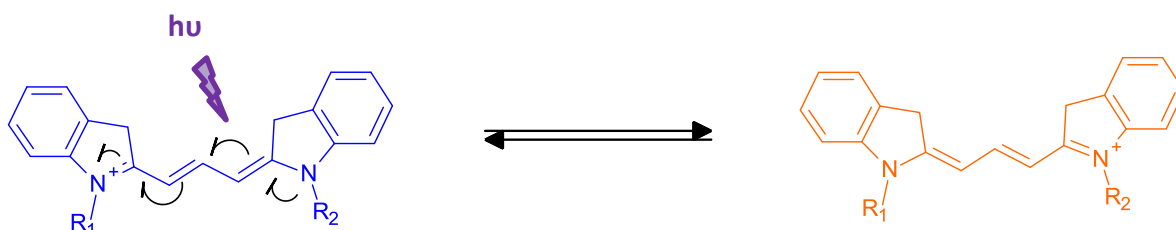


Figure 1.13 : Transfert d'électron photoinduit sur les cyanines.

B. Transfert de charge intramoléculaire (ICT)

Le mécanisme ICT implique la présence de deux fonctions chimiques sur la sonde, l'une avec un effet donneur et l'autre avec un effet attracteur. En variant les groupements donneurs et/ou accepteurs il est possible d'amplifier ce phénomène de transfert de charge ce qui peut modifier les spectres d'absorption et d'émission du fluorophore. La figure 1.14 ci-dessous représente le schéma général du mécanisme ICT.

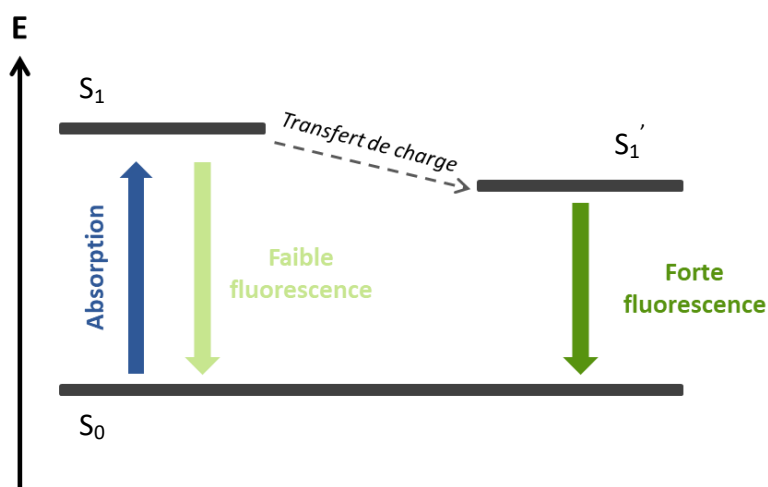


Figure 1.14 : Représentation du transfert de charge intramoléculaire.

Le transfert de charge intramoléculaire peut varier selon le solvant de mesure en fonction de sa polarité et de son caractère protique ou non. L'énergie du transfert de charge dépend des capacités donneuses ou acceptrices des groupements présents sur le fluorophore.^{26,27} C'est sur ce caractère électronique que se basent certains travaux comme ceux de l'équipe de C.

²⁶ Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Biochemistry*, W.H. Freeman and Compagny, New York, 6th édition, 2007.

²⁷ Panja, S.K.; Dwivedi, N.; Saha, S. *RSC Advances* **2016**, 6, 10586-105794.

Chang.²⁸ Ces travaux décrivent la synthèse d'un fluorophore à base 1,8-naphthalimide. La présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) coupe la fonction carbamate électro-attractrice pour obtenir une amine électro-donneuse. Ce clivage entraîne un déplacement de l'émission du bleu (475 nm) au vert (540 nm).

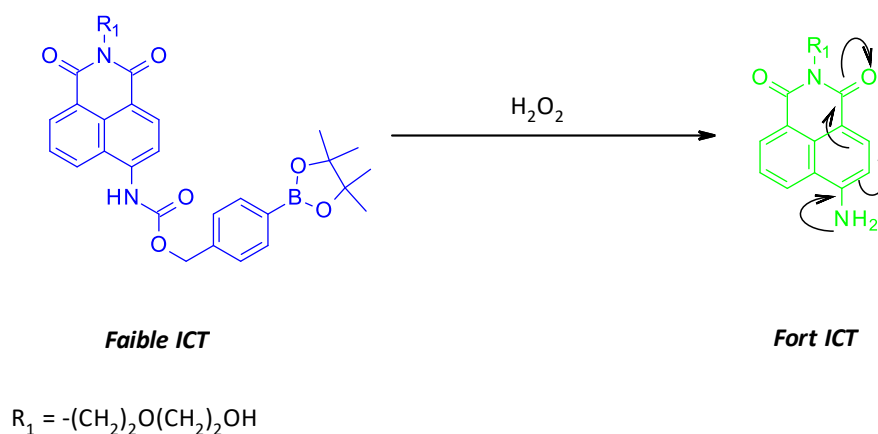


Figure 1.15 : Modification du transfert de charge intramoléculaire en présence de H₂O₂.

Les propriétés de fluorescence peuvent être modifiées lors de la chélation de métaux sur un fluorophore. Dans le cas d'un fluorophore possédant une fonction éther couronne, l'interaction avec un métal va perturber l'ICT et l'émission du substrat. Par exemple, M. Baruah et ses collaborateurs ont mis au point un BODIPY-éther couronne qui permet de détecter sélectivement le potassium K⁺.²⁹ Le potassium chélaté à l'amine de la couronne va réduire le caractère électro-donneur de l'azote et va ainsi réduire l'ICT entre la couronne et le noyau BODIPY entraînant une augmentation de l'intensité de fluorescence.

²⁸ Srikun, D.; Miller, E. W.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4596–4597.

²⁹ Baruah, M.; Qin, W.; Vallée, R. A. L.; Beljonne, D.; Rohand, T.; Dehaen, W.; Boens, N. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4377–4380.

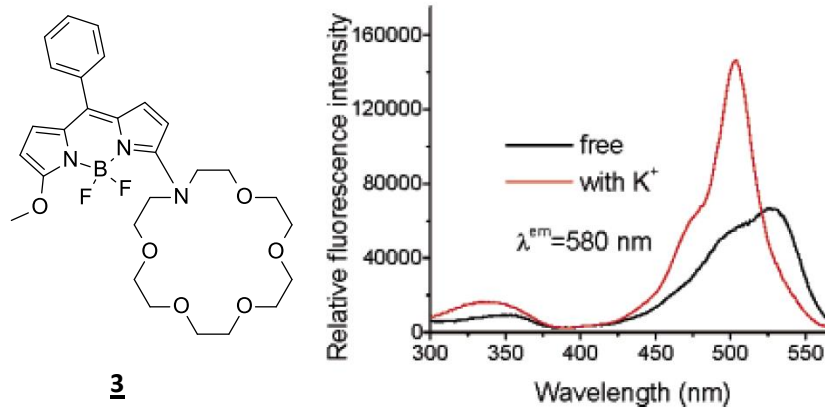


Figure 1.16 : Détection de potassium avec un BODIPY.

C. Transfert d'énergie par résonance (FRET)

Le FRET, aussi appelé transfert d'énergie par résonance de type Förster, est un phénomène qui se traduit par un transfert d'énergie entre deux dipôles fluorescents, un accepteur d'énergie et un donneur d'énergie. Ce transfert n'est possible que si les deux molécules sont compatibles énergétiquement, c'est-à-dire que le spectre d'émission du donneur se recouvre avec le spectre d'excitation de l'accepteur. De plus, la distance réelle entre les deux fluorophores ne doit pas dépasser une 1,8 fois le rayon de Förster. Ce rayon est défini comme la distance donneur-accepteur pour laquelle le transfert d'énergie non radiatif sur l'accepteur est de 50 %. Si la distance est supérieure, on observe la fluorescence du dipôle donneur ce qui parasite l'acquisition des données. Sur la figure ci-dessous, la représentation schématique des orbitales montre que la molécule va absorber l'excitation avec le motif donneur, la relaxation de ce même motif entrainera une émission fluorescence. Cette fluorescence sera absorbée par le motif accepteur dont la relaxation entrainera la seconde émission de fluorescence à plus haute longueur d'onde.

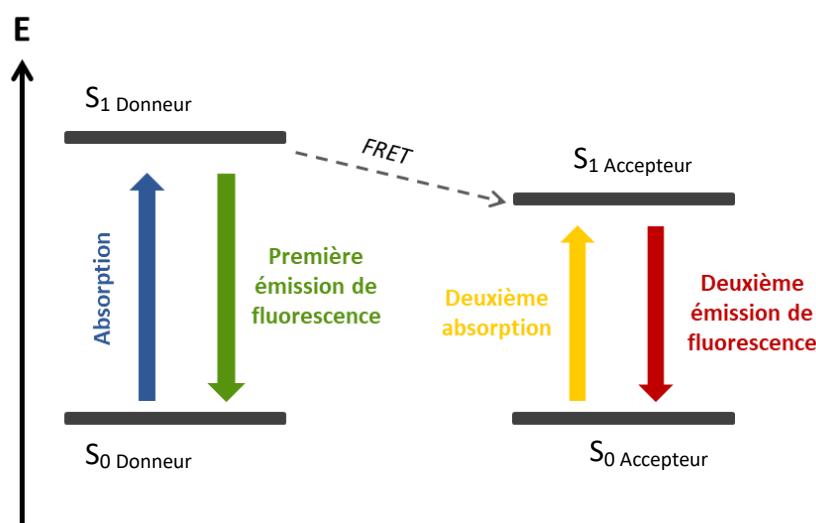
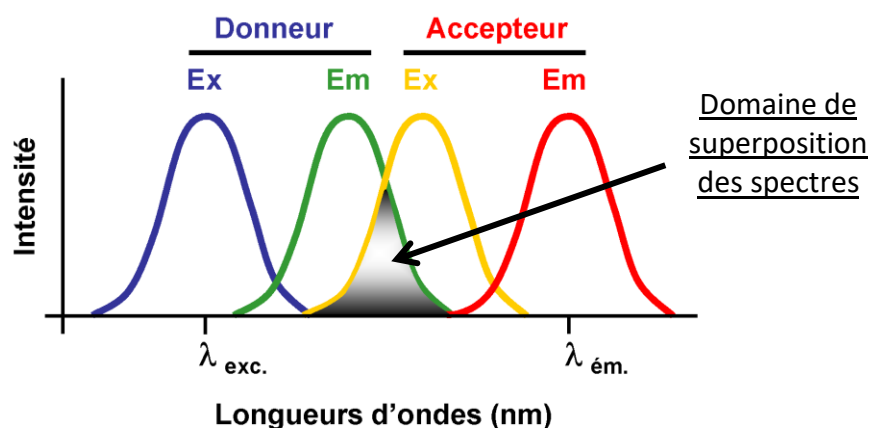


Figure 1.17 : Recouvrement des spectres d'émission et d'excitation³⁰ et représentation orbitale du FRET.

A titre d'exemple, la figure 1.18 ci-dessous représente le fluorophore **4**, possédant une partie cyanine à cycle fermée et une autre partie type rhodamine, synthétisé pour détecter l'hypoxie (diminution du taux d'oxygène dans l'organisme).³¹ L'hypoxie entraîne une réponse du système immunitaire avec l'augmentation des réactions de réductions. Le milieu va donc réduire le composé **4** au niveau du méthylène (entouré en rouge) entraînant une neutralisation de la fluorescence de la partie rhodamine. En conséquence, le FRET est neutralisé et la cyanine émet avec une forte émission de fluorescence.

³⁰ Sasaki, S.; Drummen, G.P.C.; Konishi G. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2731-2743.

³¹ Takahashi, S.; Piao, W.; Matsumura, Y.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Kamachi, T.; Kohno, M.; Nagano, T.; Hanaoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19588–19591.

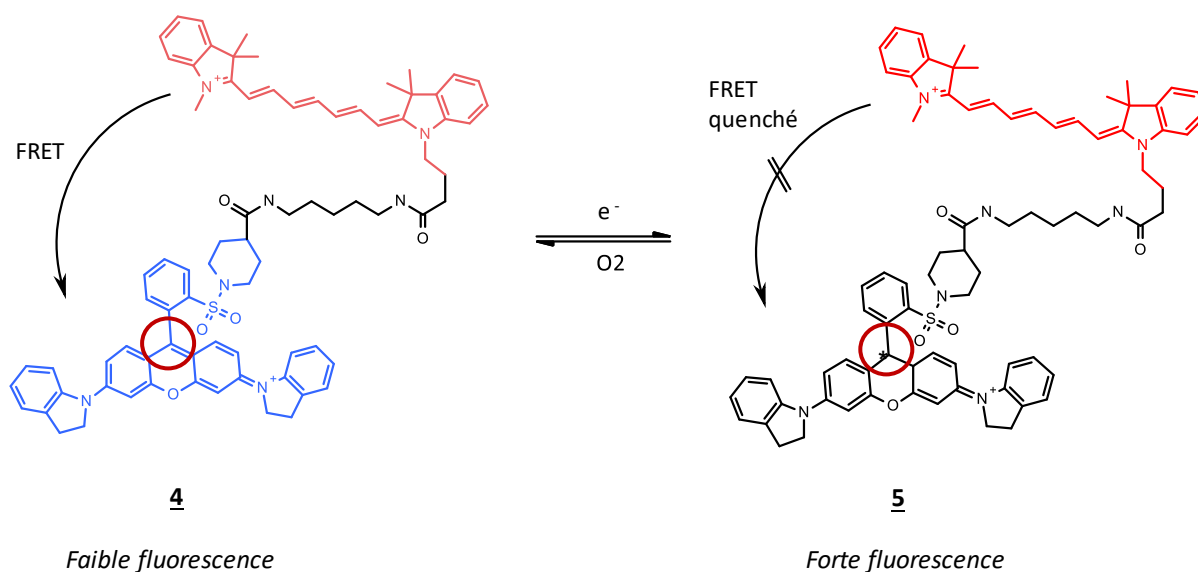


Figure 1.18 : Exemple de sonde fluorescente à mécanisme FRET.

Ce processus de fluorescence est aussi utilisé en biologie pour la détection de cations métalliques toxiques comme le mercure^{32,33} ou encore pour le marquage de protéines.³⁴

D. Transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (ESIPT)

Le transfert de proton à l'état excité est un processus intervenant lors de l'excitation d'un fluorophore ayant une fonction avec un proton acide (généralement un phénol) conjuguée avec un hétéroatome possédant un doublet non liant basique (généralement un atome d'azote ou de soufre) pouvant capter un proton.³⁵ Il est important de noter que ce transfert ne peut s'observer que lorsque la distance interatomique X-H entre l'hétéroatome et le proton est inférieure à 2Å et si les deux atomes ne sont pas engagé dans d'autres interactions avec le solvant par exemple.³⁶

Sous l'effet d'une onde radiative d'excitation, la molécule passe d'un état fondamental S_0 à un état excité S_1 . A l'état excité, on distingue deux formes : la forme éno (en vert sur la

³² Zhang, X.; Xiao, Y.; Qian, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8025–8029.

³³ Ono, A.; Togashi, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4300–4302.

³⁴ Boeneman, K.; Mei, B. C.; Dennis, A. M.; Bao, G.; Deschamps, J. R.; Mattoussi, H.; Medintz, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3828–3829.

³⁵ Zhao, J.; Ji, S.; Chen, Y.; Guo, H.; Yang, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803–8817.

³⁶ Strandjord, A. J. G.; Barbara, P. F. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 2355–2361

figure 1.19), et la forme céto ou *keto* (en rouge sur la figure 1.19). Sous irradiation, l'acidité du proton est exacerbée³⁷ et il y a alors un transfert de proton à l'état excité pour passer de la forme énol à la forme céto. Le système passe d'un état excité S_1 à un état excité S_1' puis il va se relaxer sous sa forme céto vers un état S_0' . Le proton va alors être capté par l'oxygène et la molécule retourne à son état fondamental S_0 . C'est le transfert réversible du proton.

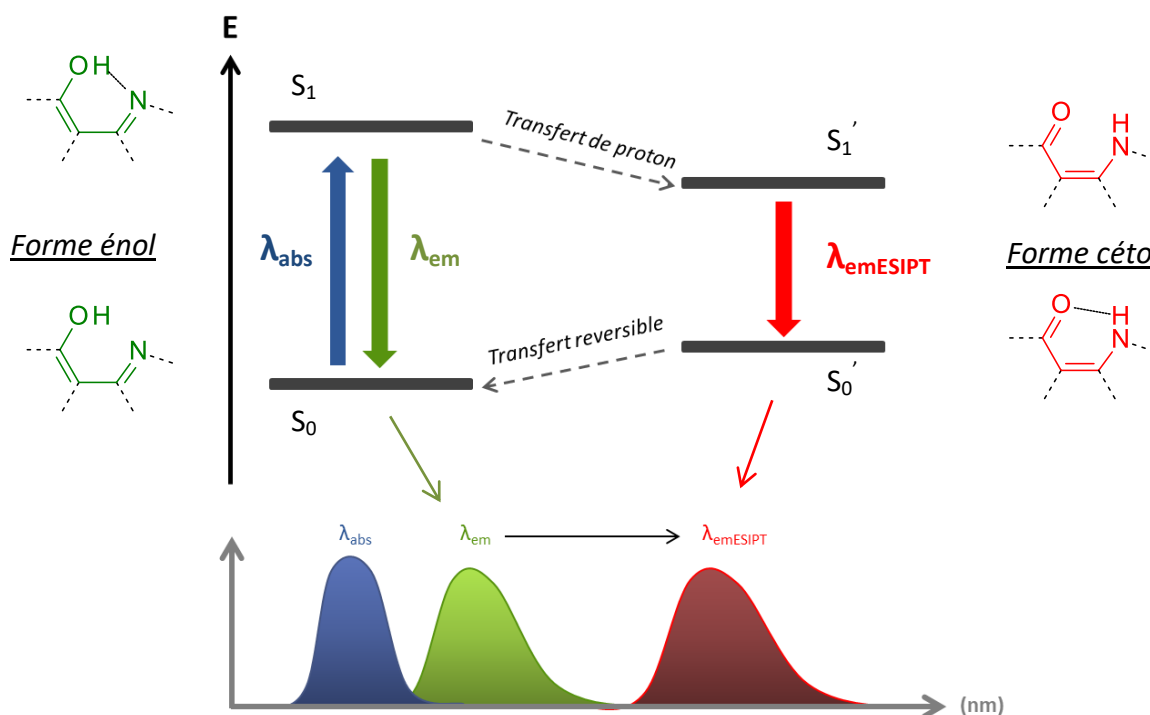


Figure 1.19 : Représentation schématique du mécanisme de l'ESIPT.

La forme céto est plus haute en énergie car ce n'est pas la forme la plus stable thermodynamiquement. Il en résulte un gap (différence d'énergie entre S_1' et S_0') qui est plus faible pour la forme céto que pour la forme énol. Généralement, la différence énergétique est de l'ordre de 1 eV ou 2 eV. En conséquence, d'après l'équation présentée ci-dessus (partie 1.A.), la longueur d'onde d'émission $\lambda_{emESIPT}$ de la forme céto est plus grande.

$$\Delta E_{\text{énol}} > \Delta E_{\text{céto}} \leftrightarrow \lambda_{em-\text{énol}} < \lambda_{em-ESIPT}$$

Avec ΔE les énergies des gap et λ les longueurs d'onde d'émission.

Le mécanisme ESIPT est connu en particulier pour cette augmentation sur la longueur d'onde d'émission et du déplacement de Stokes. Ce phénomène est connu pour être perturbé par les variations de solvants ou de pH. Le mécanisme peut être inhibé dans un

³⁷ Solntsev, K. M.; Laptinok, S. P.; Naumov, P. J. *Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16452–16455.

milieu protique car l'interaction avec le solvant empêche le changement de structure.³⁸ Ainsi on retrouve seulement l'émission de la forme énol. A l'inverse, dans le cas d'un solvant apolaire, on observera les deux bandes avec la bande céto généralement prédominante.³⁹ On retrouve donc l'ESIPT dans plusieurs applications dans le recherche de nouveaux matériaux pour l'optique,⁴⁰ de nouveaux fluorophores solvatochromiques,⁴¹ de détecteurs de pH,⁴² d'émetteurs de lumière blanche⁴³ ou encore de détecteurs de métaux.⁴⁴ L'application de ce processus dans le cas de nouvelles molécules émettrices de lumière blanche est connue depuis 2009.⁴³ Les travaux de S. Park et de ses collaborateurs ont décrit le développement d'une molécule **6** avec deux ESIPT qui n'interagissent pas entre eux durant le mécanisme de fluorescence et produisent 2 bandes sur le spectre de fluorescence.

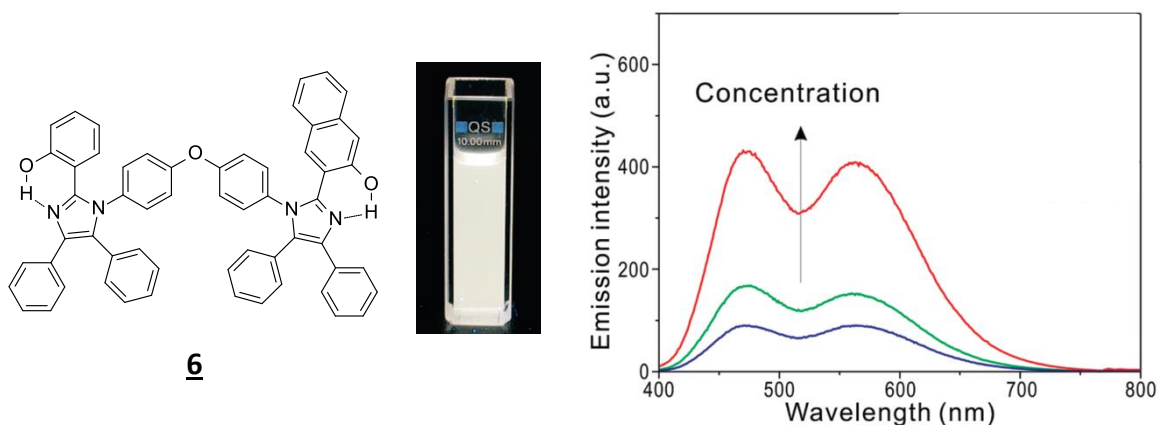


Figure 1.20 : Double ESIPT d'un émetteur de lumière blanche organique.

De gauche à droite : Structure du fluorophore, aspect sous excitation à 365nm, Spectre de fluorescence en fonction de la concentration (entre 10^{-3} M et 10^{-5} M dans le CHCl_3).

L'un des paramètres caractéristique de l'ESIPT est un rendement quantique faible (en dessous de 20% généralement) car nous sommes en présence d'un mécanisme qui fait intervenir des processus de transfert d'hydrogène non radiatif. Par conséquent, l'énergie résiduelle pour la fluorescence est plus faible. Par ailleurs, il est possible d'améliorer ce

³⁸ Seo, J.; Kim, S.; Park, S.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11154-11155.

³⁹ Kim, Y. H.; Roh, S.-G.; Jung, S.-D.; Chung, M.-A.; Kim, H. K.; Cho, D. W. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 722-729.

⁴⁰ Zhang, W.; Yan, Y.; Gu, J.; Yao, J.; Zhao, Y. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7125-7129.

⁴¹ Seo, J.; Kim, S.; Park, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11154-11155.

⁴² Patil, V. S.; Padalkar, V. S.; Phatangare, K. R.; Gupta, V. D.; Umape, P. G.; Sekar, N. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 536-545.

⁴³ Park, S.; Kwon, J. E.; Kim, S. H.; Seo, J.; Chung, K.; Park, S.-Y.; Jang, D.-J.; Medina, B. M.; Gierschner, J.; Park, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14043-14049.

⁴⁴ Bian, G.-F.; Guo, Y.; Lv, X.-J.; Zhang, C. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1111*, 1-8.

rendement en couplant l'ESIPT avec un autre mécanisme de fluorescence comme l'ICT.⁴⁵ L'intérêt majeur de ce mécanisme reste le large déplacement de Stokes lié à la forme céto. Une sonde à ESIPT pour le vivant doit avoir une émission dans le proche IR, une bande céto majoritairement avec le meilleur rendement quantique possible. Il existe une sonde à ESIPT pour la détection de H₂O₂ découverte récemment, utilisable *in vivo*. Elle se base sur le même type de clivage décrit sur la figure 1.15 mais elle absorbe et émet respectivement à 312 nm et 669 nm.⁴⁶ Nous allons revenir sur ce mécanisme de fluorescence dans le chapitre II.

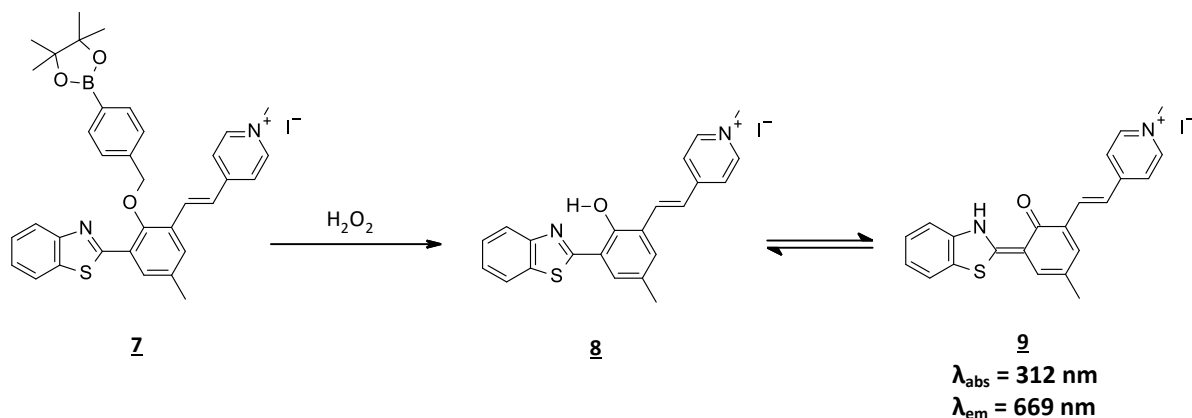


Figure 1.21 : Nouvelle sonde à ESIPT proche IR pour la détection du peroxyde d'hydrogène.

En résumé, il existe de nombreux mécanismes permettant de décrire la fluorescence des molécules. La fluorescence est largement utilisée en biologie à travers la microscopie à fluorescence, la microscopie confocale, l'immunofluorescence ou encore le suivi en temps réel en imagerie cellulaire d'un agent thérapeutique marqué avec une entité fluorescente. Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéressons à la carbonylation des protéines, plus particulièrement à la synthèse de nouvelles molécules fluorescentes pour le marquage des protéines carbonylées qui sont surexprimées dans le cadre de diverses pathologies.

4. La détection de protéines carbonylées grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes

⁴⁵ He, L.; Dong, B.; Liu, Y.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6449-6461.

⁴⁶ Tang, L.; Tian, M.; Chen, H.; Yan, X.; Zhong, K.; Bian, Y. *Dyes and Pigments* **2018**, *158*, 482-489.

La carbonylation des protéines est l'un des principaux biomarqueurs du stress oxydant. On observe une augmentation de ces protéines dans les cellules soumises à un environnement stressant ou dans le cadre du vieillissement. Dans cette partie nous allons présenter les origines et la genèse de ces protéines carbonylées.

A. Le stress oxydant à l'origine de la carbonylation des protéines

Le stress oxydant est un facteur lié à diverses pathologies comme le cancer,⁴⁷ les neurodégénérescence,^{48,49} l'athérosclérose...⁵⁰ Ses effets peuvent être importants car il est considéré, de plus en plus, comme une cause et non une conséquence de certains cancers, de mutagénèse ou encore d'inflammation.⁵¹ Il a été découvert que le stress oxydant joue un rôle important dans la maladie d'Alzheimer^{52,53} et dans le diabète.⁵⁴ Ce phénomène se produit à l'intérieur des cellules et également au niveau extracellulaire lorsque qu'il y a apparition d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS en anglais), d'Espèces Azotées Réactives (RNS en anglais) ou encore d'espèces électrophiles. Ces entités peuvent provenir de plusieurs facteurs endogènes (ex : oxydations microsomale et mitochondriale) ou exogènes (ex : tabac, alcool). Le stress oxydant devient une situation pathologique dès que les systèmes de protection sont submergés par les ROS et les RNS. Il s'agit d'une agression qui peut se déclarer de différentes façons, par exemple une production plus importante de ROS dû à un rejet de greffe ou un contact prolongé avec des produits chimiques.

Le stress oxydant est délétère du fait de l'action des espèces réactives de l'oxygène qui entraînent diverses modifications des protéines. Parmi ces ROS, on trouve le radical

⁴⁷ Tas, F.; Hansel, H.; Belce, A.; Ilvan, S.; Argon, A.; Camlica, H.; Topuz, E. *Med. Oncol.* **2005**, *22*, 11-15.

⁴⁸ Kim, G. H.; Kim, J. E.; Rhie, S. J.; Yoon, S. *Experimental Neurobiology* **2015**, *24*, 325-340.

⁴⁹ Floor, E.; Wetzel, M.G. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 268-275

⁵⁰ Yang, X.; Li, Y.; Li, Y.; Ren, X.; Zhang, X.; Hu, D.; Gao, Y.; Xing, Y.; Shang, H. *Frontiers in Physiology* **2017**, *8*, 1-16.

⁵¹ Choi, J.; Malakowsky, C.A.; Talent, J.M.; Conrad, C.C.; Gracy, R.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1566-1570.

⁵² H. Kumar, I. Kim, S. V. More, B. Kim, D. Choi, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 109-139.

⁵³ Conrad, C. C.; Marshall, P. L.; Talent, J. M.; Malakowsky, C. A.; Choi, J.; Gracy, R. W. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2000**, *275*, 678-681.

⁵⁴ Dominguez, C.; Ruiz, E.; Gussinye, M.; Carrascosa, A. *Diabetes care* **1998**, *21*, 1736-1742.

superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 dans le système cardiovasculaire⁵⁵ mais de manière générale, il y a aussi le radical hydroxyle HO^{\cdot} et autres dérivés peroxydés. A partir du dioxygène, le superoxyde $O_2^{\cdot -}$ est généré dans la mitochondrie mais il est modifié majoritairement sous une forme plus stable en présence de superoxide dismutase pour obtenir du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Cette molécule est soit reconvertie en dioxygène grâce à une enzyme comme la catalase ou la glutathion peroxydase, ou alors convertie en radical hydroxyle et ion hydroxyde grâce au fer (II) naturellement présent⁵⁶ (réaction de Fenton).

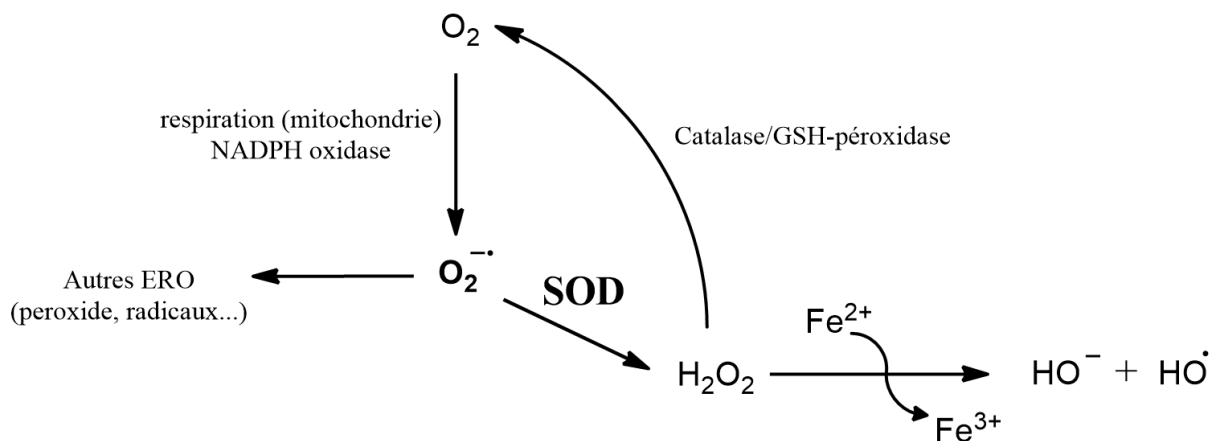


Figure 1.22 : Génération des ROS. SOD : *Superoxide dismutase*, GSH : *glutathion*.

Tous ces ROS présents dans les cellules conduisent à la modification de certains acides aminés voire le clivage des protéines^{57,58} mais aussi indirectement à l'addition de produits de peroxydation lipidique sur les protéines.⁵⁹ Ces modifications génèrent des protéines carbonylées qui sont l'un des marqueurs majeurs et reconnus du stress oxydant.

B. La genèse des protéines carbonylées

Les protéines carbonylées proviennent de la modification d'acides aminés comme les Pro, Arg, Lys, Thr, Glu ou Asp par les EROs. Sur la figure 1.23 ci-dessous, le mécanisme

⁵⁵ Papaharalambus, C.; Griendling, K. *Trends Cardiovasc. Med.* **2007**, *17*, 48-54.

⁵⁶ Kehrer, J. *Toxicologie* **2000**, *149*, 43-50.

⁵⁷ Amici, A.; Levine, R.L.; Tsai, L.; Stadtman, E.R. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3341-3346.

⁵⁸ Madian, A. G.; Regnier, E. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 3766-3780.

⁵⁹ Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Cecilian, F.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Milzani, A. *Redox Proteomics* **2006**, 487-525.

radicalaire d'oxydation est détaillé sur des argines et des lysines.⁶⁰ Ce mécanisme peut aussi se produire sur les prolines.

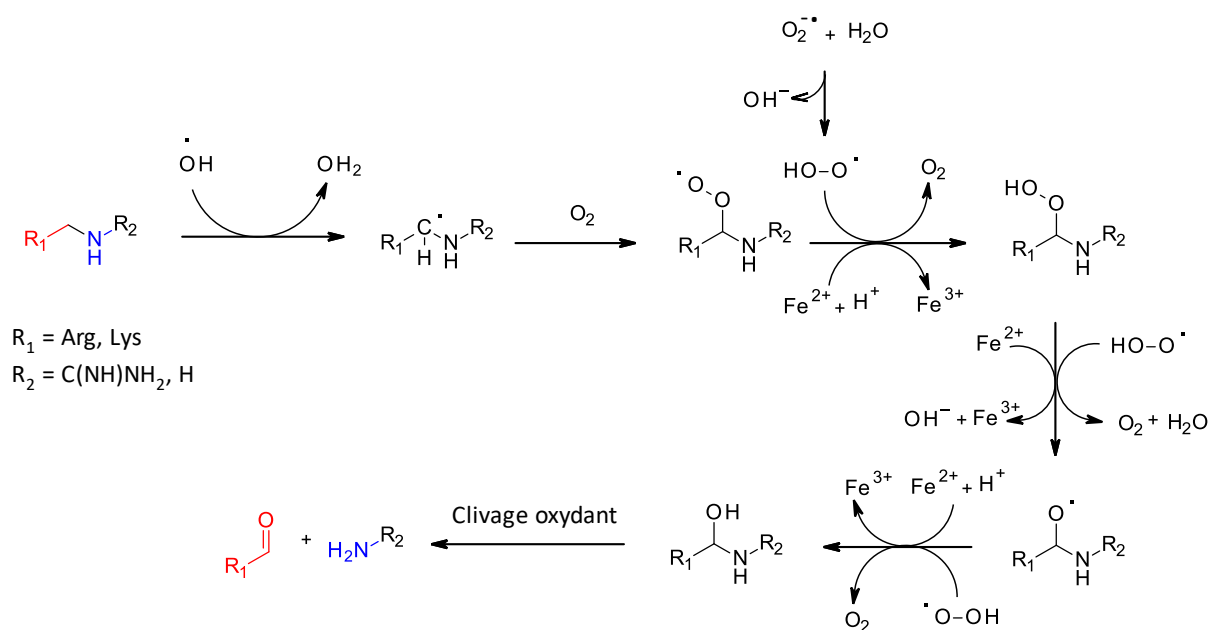


Figure 1.23 : Formation d'adduits de carbonylation des acides aminés.

Il est à noter que la majorité des mécanismes d'oxydation des acides aminés sont radicalaires. Cependant il existe une autre voie pour obtenir des carbonyles sur les protéines, par addition de Michael de lipides oxydés ou produits de peroxydation lipidique sur certains acides aminés des protéines. On notera qu'avec un mécanisme radicalaire, les lipides insaturés sont modifiés pour obtenir des produits de peroxydation lipidique tels que l'acroléine, le malondialdéhyde (MDA) et le 4 hydroxynonenal (HNE) qui réagissent avec des acides aminés comme les cystéines, les histidines ou les lysines (figure 1.24).

Les cellules ne possèdent pas de mécanisme interne permettant de réparer toutes les modifications induites par les ROS sur les protéines, à l'exception de certaines formes oxydées de la cystéine (pont dissulfure et acide sulfénique) et de la méthionine (méthionine sulfoxide). Les protéines oxydées de manière irréversible sont dégradées par des processus protéolytiques cellulaires. Cependant au cours du vieillissement ou dans le cadre de certaines pathologies, ces mécanismes sont moins performants. On observe alors

⁶⁰ Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 20313–20316

La fonction hydrazide réagit avec les fonctions carbonyles des protéines ce qui permet de marquer chaque carbonyle pour la quantification.

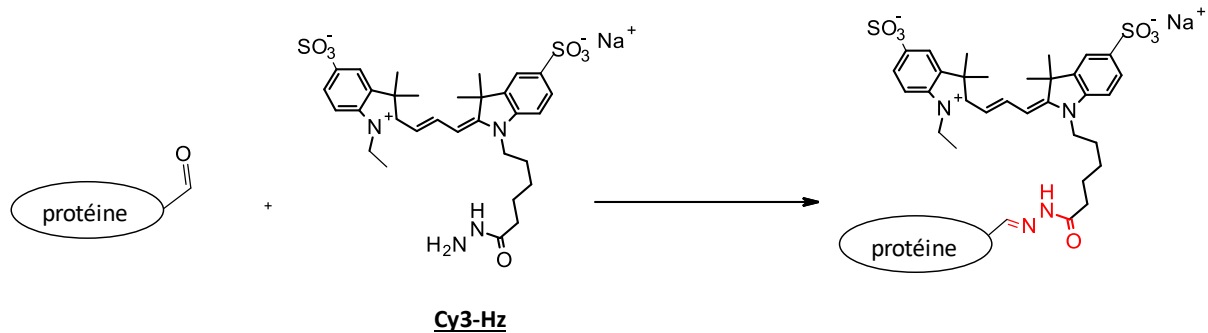


Figure 1.25 : Marquage des fonctions carbonyles par Cy3-Hz.

Le principe de cette technique est le suivant : deux échantillons de protéines extraites par exemple de cellules jeunes et de cellules sénescents sont marqués séparément par deux fluorophores différents : Cy3-Hydrazide et Cy5-Hydrazide. Une partie de ces deux extraits cellulaires sont mélangés pour former un étalon interne et marqués avec une troisième cyanine Cy2-Hydrazide, et analysés par électrophorèse bidimensionnelle. Ces trois échantillons vont alors migrer en deux dimensions pour séparer les protéines selon leur point isoélectrique (en abscisse) et selon leur poids moléculaire (en ordonnée) dans un gel dénaturant en présence de SDS. Le point isoélectrique correspond à la valeur du pH pour lequel la charge globale de la protéine est nulle et s'arrête de migrer sur un gradient de pH immobilisé sur gel soumis à un champ électrique pour la séparation en première dimension. Après la seconde dimension, le gel est ensuite révélé aux trois longueurs d'onde d'émission des trois cyanines hydrazides et par comparaison des plaques, il est possible de différencier la quantité de protéines carbonylées présentes dans les échantillons cellulaires. Afin de les identifier, il est possible de découper les zones du gel où sont localisées les protéines désirées et de les identifier après traitements et analyses par spectrométrie de masse.

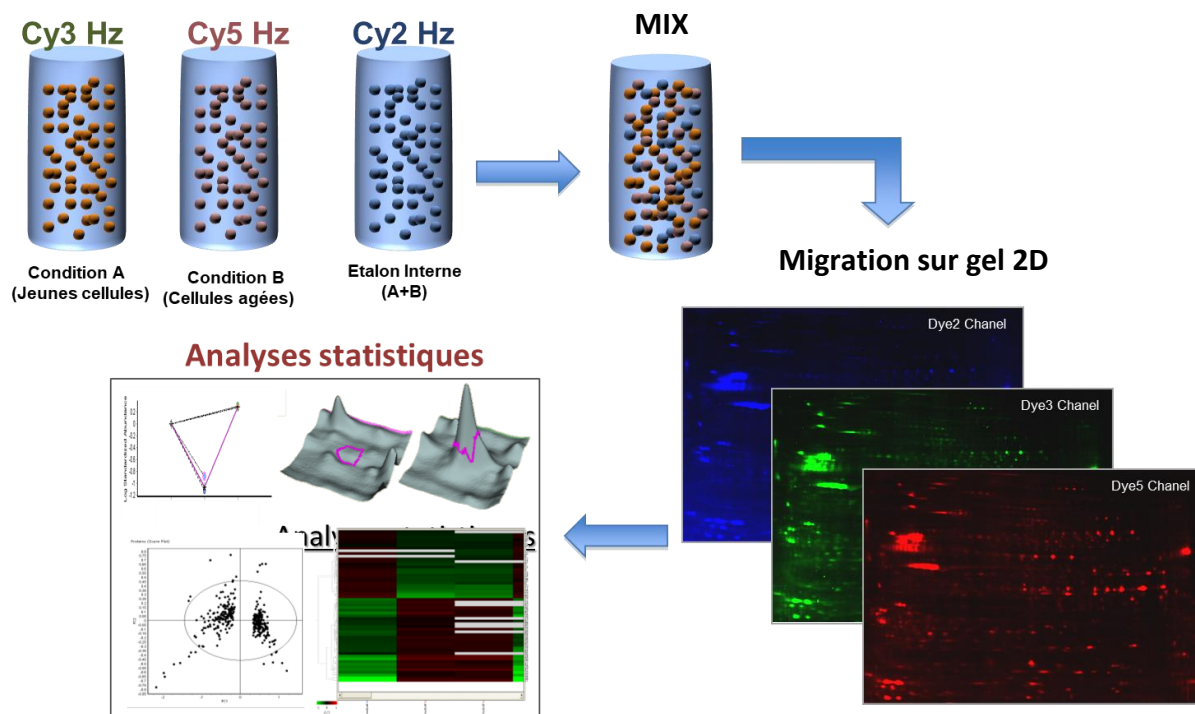


Figure 1.26 : Principe de la 2D-Oxy DIGE.

Les cyanines hydrazides ont des charges identiques et des poids moléculaires proches (nécessaire pour l'utilisation de la 2D-Oxy DIGE). Ces marqueurs présentent deux avantages importants : une haute sensibilité, une bonne stabilité à différents pH. Cependant, leur mauvaise solubilité en milieu biologique entraîne des problèmes de marquages des carbonyles. Les cyanines commerciales émettent dans le visible et l'IR pour des longueurs d'onde comprises entre 500 nm et 700 nm et possèdent des déplacements de Stokes assez faibles, de l'ordre de 20 nm. Ces caractéristiques entraînent des phénomènes de superposition et oblige l'utilisation de filtres spéciaux pour l'analyse.

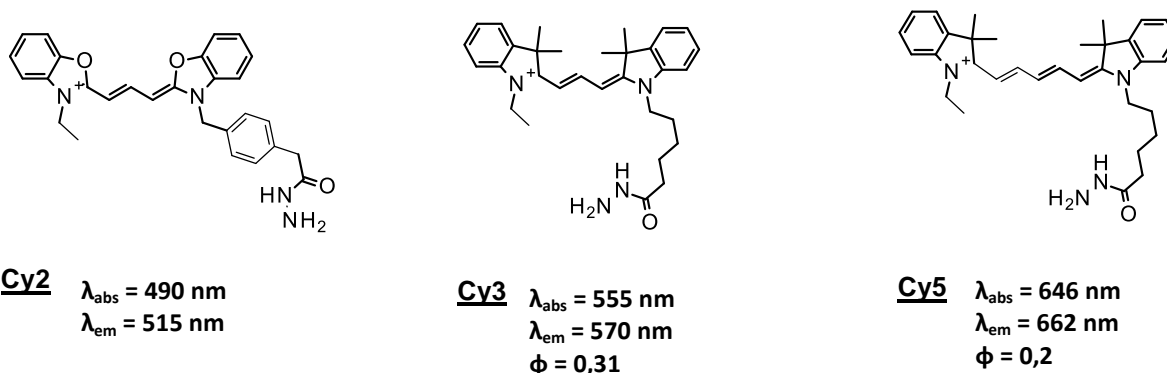


Figure 1.27 : Structure des cyanines hydrazides et propriétés optiques (Biotium pour Cy2 et Lumiprobe pour Cy3 et Cy5).

Pour résoudre ces inconvénients dans le but d'améliorer la technique 2D-Oxy DIGE et plus généralement la détection et la quantification des protéines carbonylées, l'équipe de Bertrand Friguet a montré un grand intérêt pour l'utilisation de nouveaux fluorophores originaux de type pyridooxazinones développés par L. Le Falher, C. Botuha et S. Thorimbert dans l'équipe Chembio en 2012. Une collaboration entre l'équipe ChemBio et celle de B. Friguet a débuté ayant pour but de synthétiser des fluorophores « maison » dont on peut moduler la fluorescence pour une utilisation en électrophorèse bidimensionnelle différentielle quantitative (2D Oxi DIGE) et également pour d'autres méthodes de détection des protéines carbonylées à l'aide de nouvelles sondes fluorescentes (microscopie et cytométrie en flux).

5. Objectifs du projet

A. Origine du projet

En 2009, l'équipe du Dr W. Pitt d'UCB Celltech en Angleterre, a publié une étude⁶⁴ *in silico* d'un ensemble de composés chimiques hétérocycliques d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique, la chimie et la biochimie. Cette publication, « Heteroaromatic Rings of the Future » a permis de constituer une bibliothèque virtuelle de plus de 200 nouveaux hétéroaromatiques bicycliques appelé VEHICLE (Virtual Exploratory Heterocyclic Library). La modélisation de ces nouvelles entités s'est faite en se basant sur des critères cruciaux comme leur faisabilité synthétique mais aussi leur application biologique potentielle. Le Dr Pitt et ses collaborateurs ont présenté 22 structures et a lancé à la communauté scientifique de nouveaux défis synthétiques pour obtenir des bicycles hétéroaromatiques jusqu'alors inconnus.

⁶⁴ Pitt, W. R.; Parry, D. M.; Perry, B. G.; Groom, C. R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2952-2963.

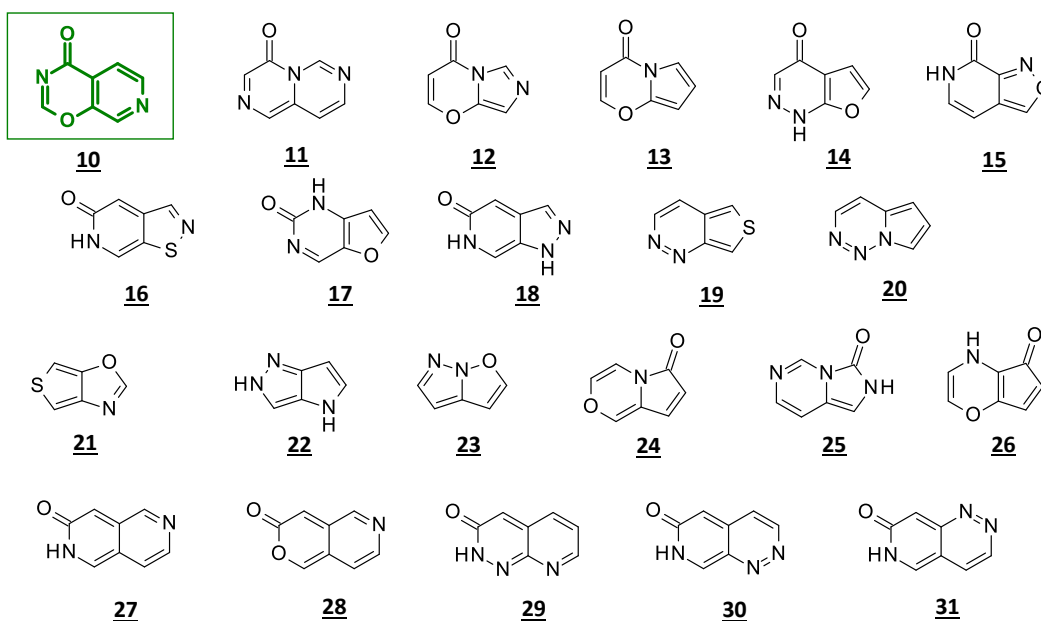
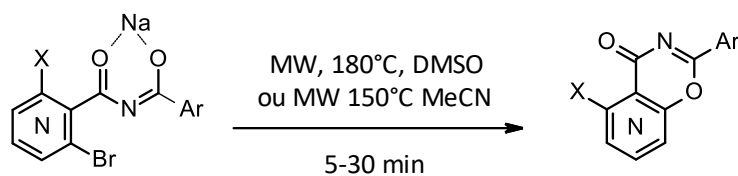


Figure 1.28 : Librairie virtuelle des 22 molécules aromatiques de Pitt.

L'équipe ChemBio s'est concentré sur la synthèse de la pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **1** et a décrit en 2013, en collaboration avec l'entreprise Sanofi, la synthèse de 40 dérivés structuraux de la molécule **10** via une synthèse par *O*-arylation intramoléculaire à partir de *N*-aryl ou *N*-hétéroaryl-(iso)nicotinamide de sodium sous irradiation micro-ondes (MW).⁶⁵



Ar = aryl, hétéroaryl
X = H, Br

Figure 1.29 : Synthèse des 4H-Pyrido[1,3]oxazin-4-ones par *O*-arylation intramoléculaire.

Durant sa thèse, le Dr L. Le Falher (2010-2014) a synthétisé une large bibliothèque de pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones et étudié plusieurs voies de dérivatisation avec des nucléophiles (figure 1.29).^{66,67} Nous détaillerons ces synthèses dans le prochain chapitre.

⁶⁵ Slowinski, F.; Ben Ayad, O.; Ziyaret, O.; Botuha, C.; Le Falher, L.; Aouane, K.; Thorimbert, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3494–3497.

⁶⁶ Le Falher, L.; Ben Ayad, O.; Ziyaret, O.; Mamontov, A.; Botuha, C.; Thorimbert, S.; Slowinski, F. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6579–6589.

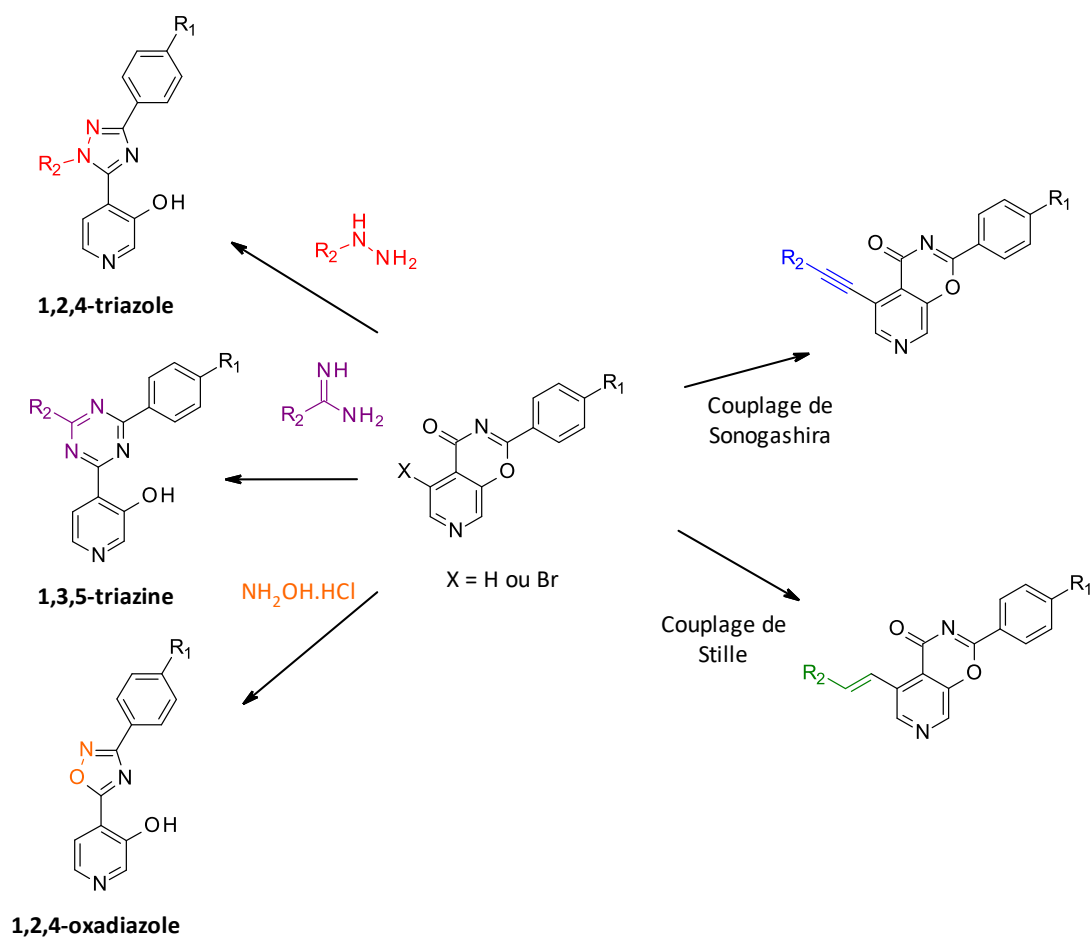


Figure 1.30 : Dérivatisation des pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one.

B. Conceptions de nouvelles sondes pour le marquage biologique

Le marquage des protéines est nécessaire pour déterminer leur fonction dans les cellules. Il est important de noter que l'introduction d'une sonde fluorescente sur une entité moléculaire ou biologique permet le suivi de celles-ci *in vitro* ou *in vivo*. Nous pouvons ainsi observer et comprendre l'action thérapeutique ou biologique de ces nouveaux agents. Le marquage de protéine est un outil indispensable à l'analyse et a ouvert l'accès à des technologies optiques d'intérêt comme la microscopie à fluorescence. Dans notre cas, nous souhaitons créer un marqueur de carbonylation efficace qui posséderait tous les critères requis pour une utilisation en 2D-OxyDIGE.

⁶⁷ Le Falher, L.; Ben Ayad, O.; Ziyaret, O.; Botuha, C.; Thorimbert, S.; Slowinski, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *17*, 3830–3840.

Pour cela, les fluorophores doivent posséder les caractéristiques suivantes : une partie permettant de moduler la fluorescence par l'intermédiaire de systèmes π -conjugués, une deuxième partie avec une fonction hydrazide pour le marquage des protéines et une dernière partie introduisant l'hydrosolubilité du fluorophore. D'un point de vue optique, ils devront si possible démontrer une absorption dans le visible, une émission dans le proche infrarouge voir l'infrarouge et un large déplacement de Stokes. L'ensemble n'excédant pas un poids moléculaire de 900 g.mol^{-1} pour ne pas modifier de façon trop importante la masse des protéines et ainsi conserver l'homogénéité de leur séparation sur gel.

Tout d'abord, nous pensions utiliser les pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones car elles présentaient des propriétés de fluorescence mais constatant qu'elles sont sensibles aux attaques nucléophiles (H_2O ou hydrazines NH_2NH_2) nous avons sélectionné les 1,2,4-triazoles et les 1,3,5-triazines comme molécules à préparer. Ces hétérocycles azotés peuvent être synthétisés à partir des pyrido-oxazinones et grâce aux stratégies de synthèses développées précédemment au labo, il est possible de moduler les positions 2, 4 et 6 pour les triazines et 1, 3 et 5 pour les triazoles modulant ainsi la fluorescence. Nous avons donc choisi de concevoir ces nouvelles sondes de manière à satisfaire tous les critères à l'aide d'une synthèse courte et divergente.

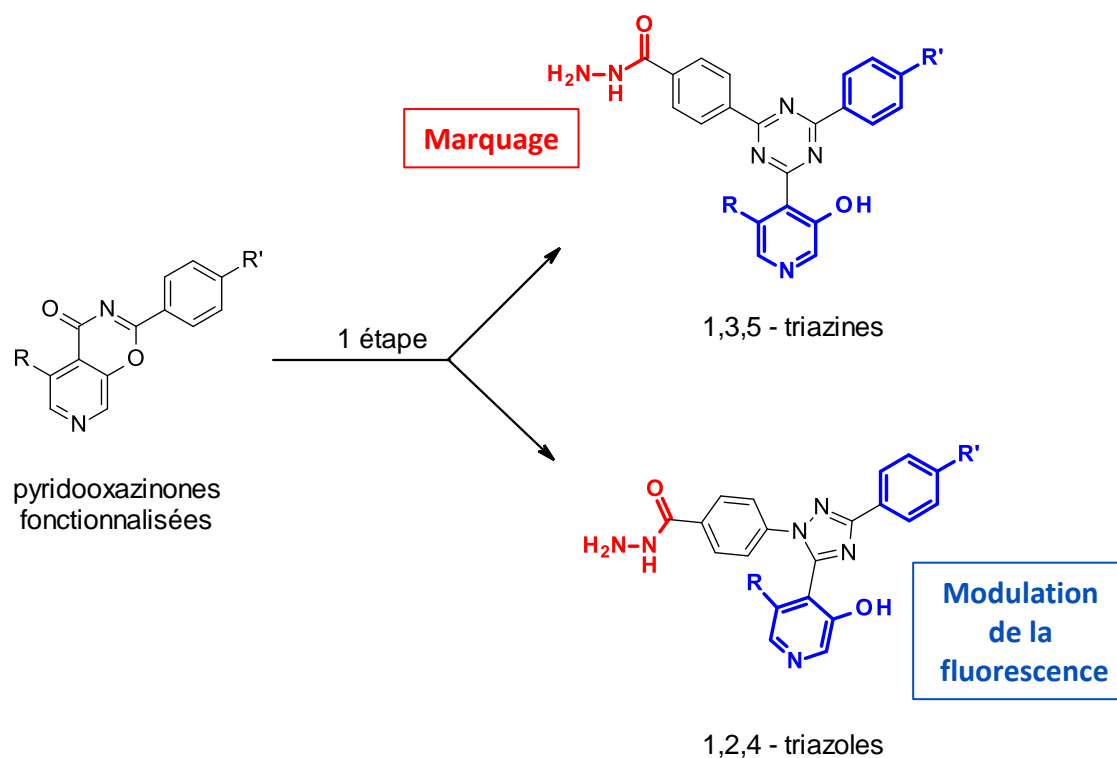


Figure 1.31 : Squelette des fluorophores envisagés

Nous présenterons, dans le prochain chapitre, les résultats des différentes synthèses des précurseurs aux produits finaux. Nous débuterons par la présentation de la synthèse de la plateforme pyridooxazinones venant compléter les travaux réalisés par L. Le Falher durant sa thèse. Puis, nous détaillerons les fonctionnalisations par couplage C-C et enfin l'obtention des nouveaux 1,3,5-triazines et 1,2,4-triazoles trisubstitués. Deux voies de fonctionnalisation seront parallèlement envisagées pour améliorer la solubilité des composés en milieu biologique.

Dans un second temps, nous détaillerons les caractéristiques optiques de ces nouvelles sondes potentielles pour le vivant. La présentation des spectres dans plusieurs solvants sera associée à la description du mécanisme de fluorescence observé. Puis, une étude *in silico*, menée par des collaborateurs du Laboratoire de Chimie Théorique (LCT) de Sorbonne Universités, sera aussi ajoutée afin de rationaliser nos résultats expérimentaux.

Dans un troisième chapitre, nous présenterons la synthèse et le développement de nouvelles sondes fluorescentes biocompatibles à base de BODIPY-Hydrazide (BODIPY-Hz) pour la détection de protéines carbonylées. Ce deuxième projet vient s'inscrire dans la thématique de recherche en complément du projet sur les nouvelles sondes à base triazoles pour la détection des protéines carbonylées.

Enfin, dans le quatrième et dernier chapitre, nous présenterons les résultats prometteurs obtenus avec les nouveaux BODIPY hydrazides pour le marquage de protéine et la détection du stress oxydant.

Chapitre II

*Synthèse de nouveaux hétérocycles
fluorescents à partir de 4H-pyrido[e]
[1,3]oxazin-4-ones*

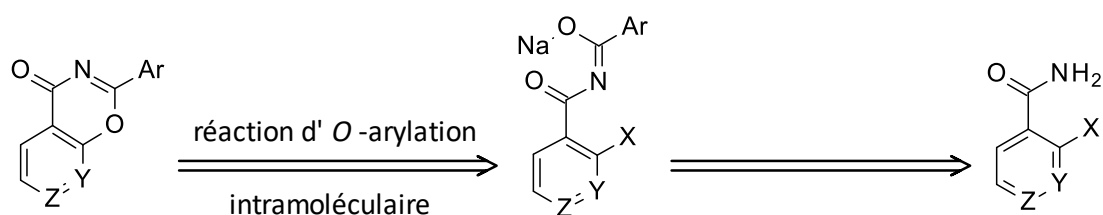
II. Synthèse de nouveaux hétérocycles fluorescents à partir de 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones

Dans ce chapitre, nous allons aborder la synthèse et l'évaluation photophysique de nouveaux hétérocycles fluorescents comportant un noyau 1,2,4-triazole et 1,3,5-triazine. Dans un premier temps, la synthèse complète de ces nouveaux fluorophores à partir des molécules plate-forme de la famille des pyrido-oxazinones sera détaillée. Puis, nous aborderons la fonctionnalisation de ceux-ci par des réactions de couplage carbone-carbone pallado-catalysées. Dans un second temps, les propriétés optiques des nouvelles molécules fluorescentes seront présentées avec une étude du mécanisme de fluorescence. L'étude de leurs propriétés photophysiques dans plusieurs solvants et dans différents milieux (pH...) sera abordée. Enfin, nous terminerons par les calculs théoriques permettant la rationalisation des données expérimentales.

1. Synthèse et fonctionnalisation des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones

A. Etat de l'art sur les 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones: synthèse des précurseurs

L'équipe ChemBio a réussi à synthétiser un nouvel hétérocycle de type 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-one substituées en position 2 en utilisant comme étape clé une réaction d'*O*-arylation intramoléculaire d'un imide sodé, synthétisé à partir des isonicotinamides **32** et **34** correspondantes. Dans le paragraphe suivant, nous allons détailler la préparation des précurseurs ainsi que la mise au point de l'étape clé de la synthèse des pyrido-oxazinones.



32 : Z = N, Y = CH et X = Br

34 : Z = CH, Y = N et X = Cl

Schéma 2.1 : Rétrosynthèse des pyrido-oxazinones.

Les réactions de *O*-arylation intramoléculaire en position 3 de la pyridine sont généralement réalisées selon des conditions plus dures que les *O*-arylations en positions 2 et 4.⁶⁸ Il existe de nombreux exemples dans la littérature pour former un éther d'aryle en position 3 d'une 3-halogéno-pyridine utilisant des conditions avec catalyseurs de cuivre,⁶⁹ palladium⁷⁰ ou de bases fortes à hautes températures.⁷¹ Mais aucune d'entre elles ne décrit cette même réaction en présence d'un imide. L'équipe Chembio fut la première équipe à décrire cette *O*-arylation intramoléculaire à partir d'une 3-halogéno-pyridine et d'un imide.⁶⁵

La synthèse de l'imide sodé est réalisée en 1, 2 ou 3 étapes à partir du réactif commercial selon la série de 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones désirée. Concernant la synthèse de la série 1 (Z = N, Y = CH, X = Br), une ortholithiation régiosélective de la 4-cyanopyridine commerciale à l'aide du LiTMP permet d'obtenir un intermédiaire lithié qui piégé par du 1,2-dibromotétrachloroéthane, fournit la 3-bromo cyanopyridine avec un rendement de 62%. L'isonicotinamide **32** est alors obtenu après l'hydrolyse ménagée de la fonction nitrile en présence de KOH avec un rendement de 71%. L'obtention du composé **33** s'effectue selon les mêmes conditions d'hydrolyse que celles utilisées pour la série 1 avec un rendement de 95% à partir de la 3,5-dibromo-4-cyanopyridine. Le 2-chloronicotinamide **34** est quant à lui un composé commercial.

⁶⁸ Joule, J. A.; Mills, K.; *Heterocyclic Chemistry*; John Wiley & Sons, **2010**.

⁶⁹ Chen, C.; Dormer, P. G. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6964–6967.

⁷⁰ Muci, A. R.; Buchwald, S. L. In *Cross-Coupling Reactions*; Miyaura, P. N., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg, 2002; pp. 131–209.

⁷¹ Eller, G.; Wimmer, V.; Haring, A.; Holzer, W. *Synthesis* **2006**, *24*, 4219–4229.

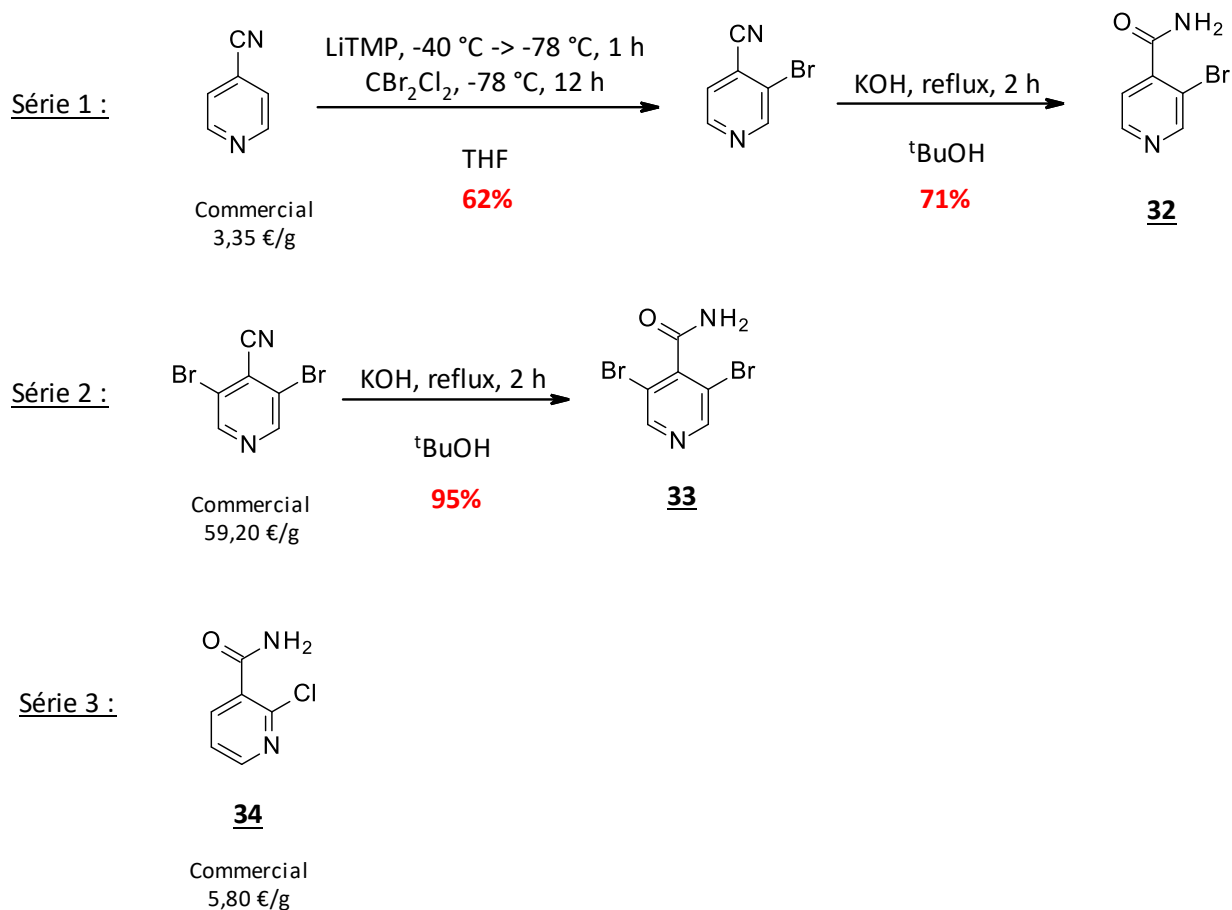
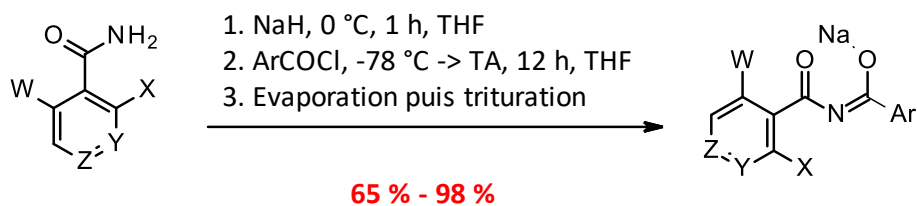
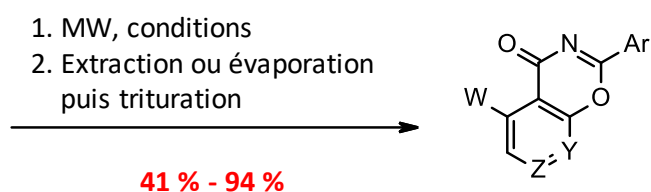


Schéma 2.2 : Les précurseurs **32**, **33** et **34** des trois séries de pyrido-oxazinones.

Pour obtenir les imides sodés attendus, les différents (iso)nicotinamides **32**, **33** et **34** précurseurs sont mis à réagir avec des chlorures d'acyle aromatiques différemment substitués en *ortho*, *para* ou *meta*, et de deux équivalents d'hydrure de sodium NaH. Les imides sodés correspondants ont ainsi été obtenus après simple filtration, trituration et évaporation avec des rendements compris entre 30% et 99%.



Y = N, Z = CH ou Y = CH, Z = N
 W = H, Br
 X = Cl, Br



Ar : aryle, N-méthylpyrrole, thiényle, naphthyle

Schéma 2.3 : Synthèse générale des pyrido-oxazinones à partir des dérivés (iso) nicotinamides.⁷²

La structure de ces anions a été confirmée par diffraction aux RX, montrant notamment que l'atome de sodium est à équidistance des deux atomes d'oxygènes de l'imide (figure 2.4).

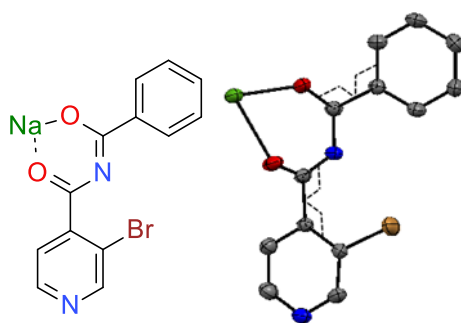


Figure 2.4 : Structure RX des anions sodés.

A partir du (3-bromoisonicotinoyl)benzamide de sodium (série 1), plusieurs conditions de cyclisation et de *O*-arylation intramoléculaire ont été tentées dont certaines avec des

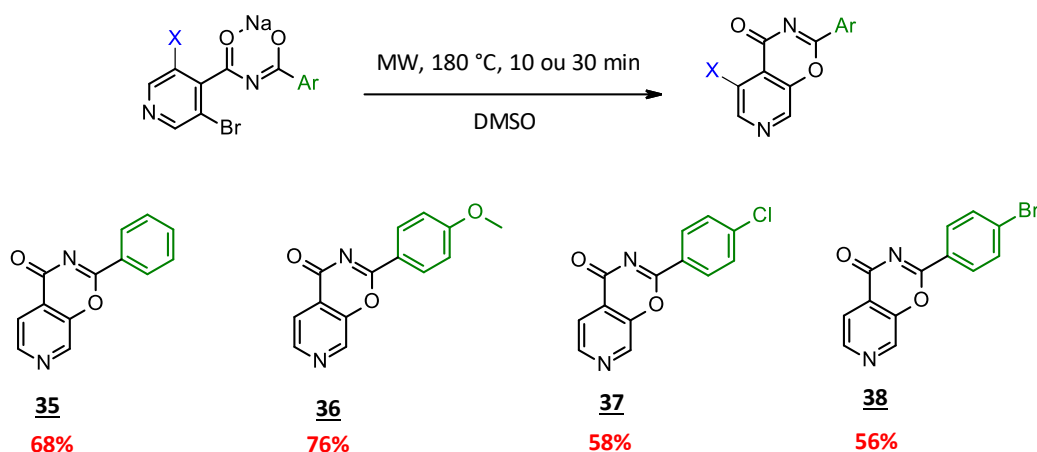
⁷² Slowinski, F.; Ben Ayad, O.; Ziyaret, O.; Botuha, C.; Le Falher, L.; Aouane, K.; Thorimbert, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3494–3497.

catalyses au cuivre ou au palladium. Ces conditions n'ont pas permis d'observer l'apparition de la 2-phenylpyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one attendu. En revanche, l'utilisation de micro-ondes dans des solvants polaires de type DMSO ou acétonitrile rend cette étape possible quel que soit les séries utilisées.

B. Résultats précédents: Préparation des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones par *O*-arylation intramoléculaire

a. Synthèse des 4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one à partir des anions sodés des séries 1 et 2

La *O*-arylation intramoléculaire s'effectue sous activation MW dans le DMSO à 180 °C pendant 30 min pour les composés de la série 1 et en seulement 10 min dans le DMSO pour les composés de la série 2 comportant un brome supplémentaire. L'effet inductif augmenterait la réactivité de l'anion sodé précurseur lors de l'étape d'*O*-arylation. Nous obtenons ainsi une bibliothèque de plus de 18 exemples pour la série 1 et de plus de 13 exemples pour la série 2. Plus de 40 exemples différents de pyrido-oxazinones toutes séries confondues ont été synthétisés par L. Le Falher pendant sa thèse. On observe des rendements allant de 51% à 76% pour les 4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones et de 80% à 96% pour les 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones. Les nouvelles structures synthétisées durant cette thèse sont caractérisées dans la partie expérimentale.



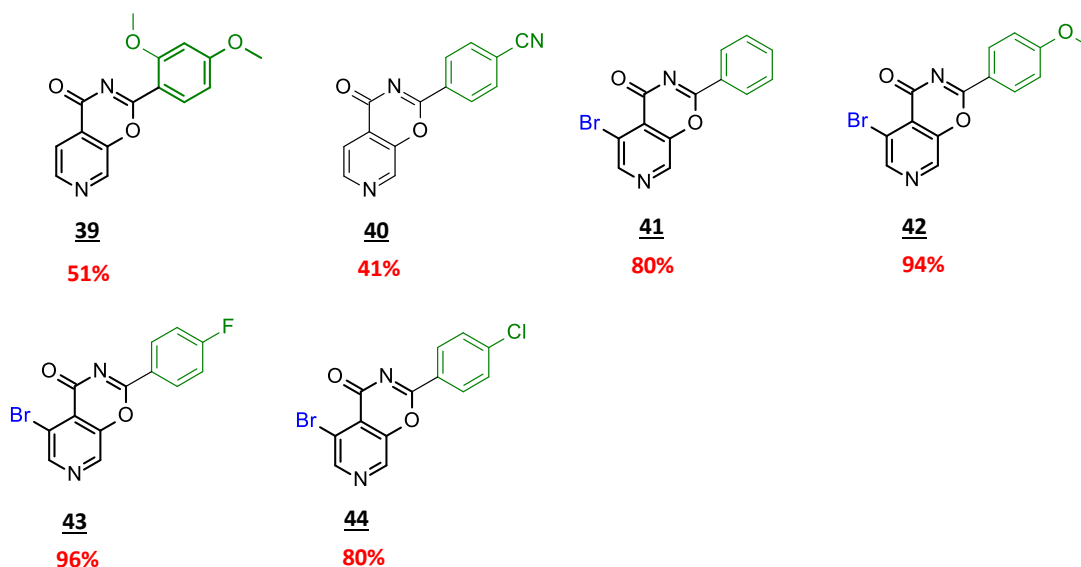
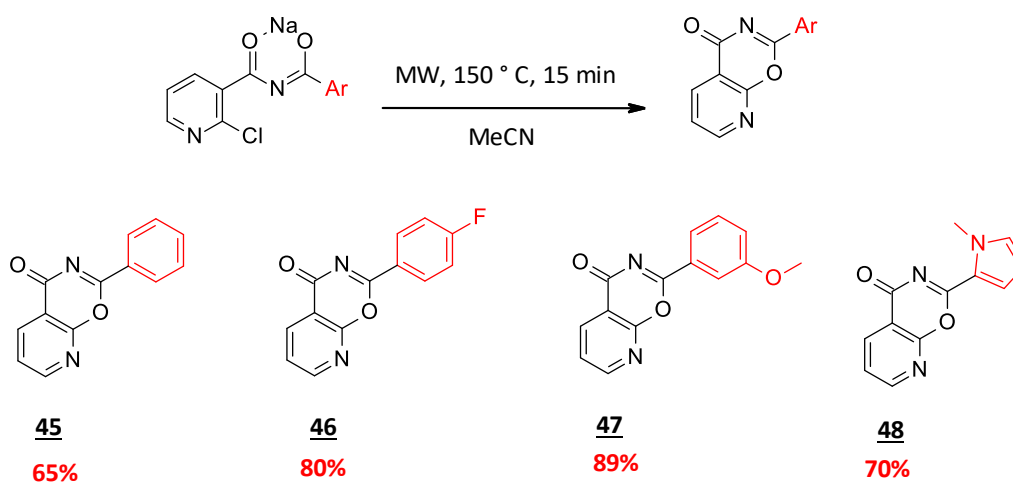


Schéma 2.5 : Quelques exemples 4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one substitués et de 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones substitués.

b. Synthèse des 4H-pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-ones à partir des anions sodés de la série 3

Dans le cas de la série 3, les anions sodés sont bien solubles dans l'acétonitrile, un solvant plus pratique à manipuler, ce qui a permis la réaction d'*O*-arylation à 150 °C toujours sous MW. Les 4H-pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-ones correspondantes sont obtenues avec des rendements compris entre 58% et 94% (schéma 2.6).



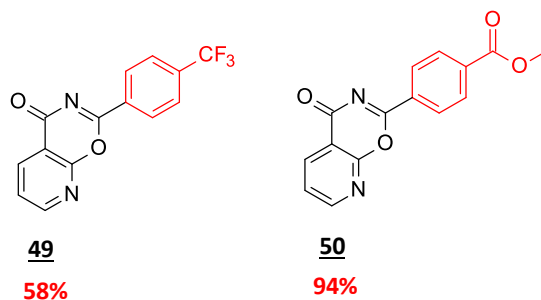
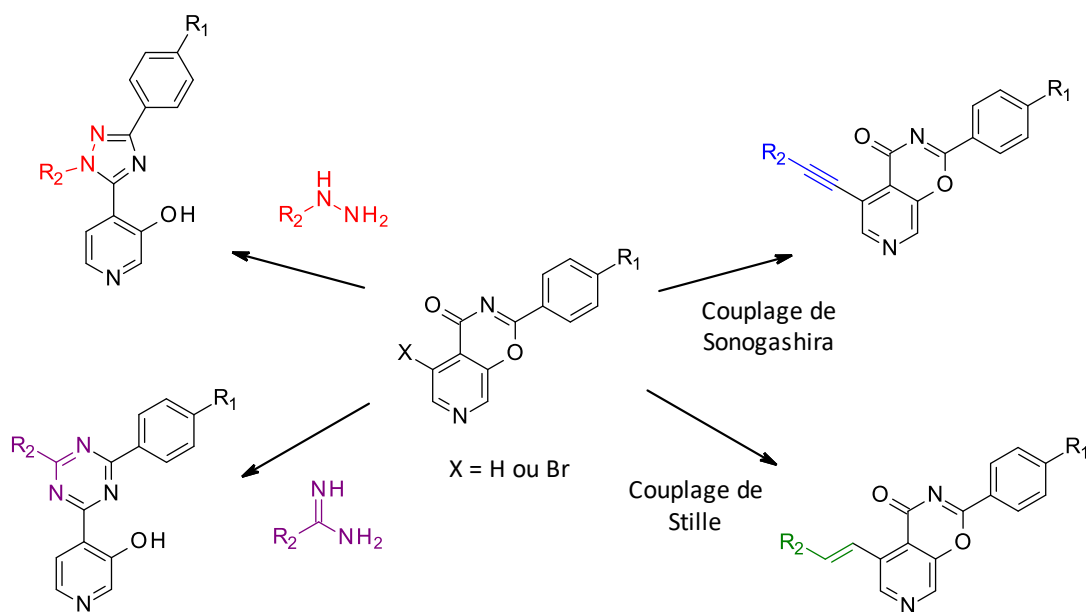


Schéma 2.6 : Synthèse de quelques exemples 4H-pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-ones.

Les premières études des propriétés photophysiques des pyrido-oxazinones ont montré que celles-ci possédaient des propriétés de fluorescence. Cependant, bien que prometteuses pour une utilisation en tant que nouvelles sondes fluorescentes, les pyrido-oxazinones se sont montrés sensibles aux attaques nucléophiles, ce qui limite leur utilisation pour une application en milieu biologique par exemple. Ceci a conduit à orienter notre intérêt vers les hétérocycles azotés triazoles et triazines facilement accessibles à partir des pyrido-oxazinones (schéma 2.7).

Ainsi les pyrido-oxazinones halogénés ont été utilisés comme molécules plateformes pour préparer divers hétérocycles azotés.^{66,67} Des 1,2,4 triazoles et 1,3,5 triazines polyfonctionnalisés ont été obtenus en 1 étape, par réaction des pyrido-oxazinones avec respectivement des hydrazines et des amidines.



Pour ma part, j'ai réalisé des expériences photophysiques sur les 1,3,5-triazines et 1,2,4-triazoles et étudiées précisément leur propriétés en absorption et en fluorescence. Nous avons souhaité comparer les deux systèmes d'hétérocycles et comprendre les variations apportées par chacun des deux hétérocycles azotés d'une part, et d'autre part l'impact de la fonction hydroxyle présent en position 3 ou 2 selon les séries sur la pyridine.

D'après la littérature, des hétérocycles de type benzimidazole par exemple comportant une fonction hydroxyle permettent de générer des fluorophores comportant un large déplacement de Stokes grâce à un phénomène de transfert de proton intramoléculaire de la fonction hydroxyle vers l'atome d'azote de noyau hétérocyclique comme nous l'avons expliqué dans le premier chapitre. Ce phénomène est bien connu et peut se produire sur d'autres types de fluorophores comportant les mêmes fonctions. Par conséquent, nous avons voulu déterminer si ce phénomène était aussi observable sur nos composés. De plus, nous souhaitons aussi déterminer si la position de l'azote sur la pyridine avait une quelconque influence sur les propriétés de fluorescence des composés.

Pour effectuer une étude complète, nous avons au préalable synthétisé une bibliothèque représentative de pyrido-oxazinones, pour ensuite obtenir divers triazoles et triazines. Nous avons introduit de la diversité chimique via des réactions de couplages carbone-carbone nous permettant d'introduire de nouveaux systèmes π -conjugués (aryles, éthynyl-aryles).

2. Fonctionnalisation des 4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones par réactions de couplage carbone-carbone pallado-catalysées de type Sonogashira et Stille

Tout d'abord, les arylations et alkenylation des pyrido-oxazinones bromés dans les conditions des réactions de type Suzuki-Miyaura ou Heck n'ont pas permis d'obtenir les produits de couplage correspondants, malgré un grand nombre d'essais et avec différents dérivés boroniques ou avec l'acrylate d'éthyle. Nous avons obtenu de faibles conversions et/ou la dégradation des pyrido-oxazinones. Nous avons donc concentré nos efforts sur les

réactions de couplage de type Sonogashira et Stille dont les premiers essais ont été fructueux.

A. Fonctionnalisation des 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3] oxazin-4-one 2-substitué par couplage de Stille

a. La réaction de couplage croisé de Stille

Cette réaction de couplage a été découverte en 1979 par J.K. Stille⁷³ fait intervenir un stanane et un composé possédant une fonction halogénée ou un groupement triflate. Cette réaction est très utilisée en synthèse organique car elle permet la synthèse de molécules complexes avec une bonne sélectivité sur un large panel de réactif avec de très bons rendements.^{74,75} En revanche, les dérivés à l'étain sont connus pour être toxiques ce qui limite leur utilisation en industrie. Les catalyseurs généralement utilisés sont le Pd(PPh₃)₄ et le Pd(PPh₃)₂Cl₂.

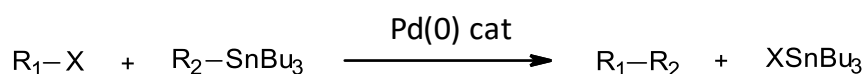


Schéma 2.8 : Couplage carbone-carbone pallado-catalysé de Stille.

b. Introduction de groupements aryles sur les 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 2-substitué par couplage de Stille

Après optimisation des conditions expérimentales, le couplage de Stille a été réalisé sur les composés 5-bromo-pyrido-oxazinones en présence de 4 mol% de Pd(PPh₃)₂Cl₂ dans le toluène à 110°C pendant 21h. Ces conditions nous ont permis d'obtenir une bibliothèque de dérivés vinyles, allyles et hétéroaryles (furane, N-méthylpyrazole) à partir du 5-bromo-2-(méthoxyphényl)-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one.⁷⁶ Durant ce travail de thèse, j'ai eu à compléter la diversification structurelle en modifiant le groupement aryle en position 2 de la

⁷³ Milstein, D. ; Stille, J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 4992-4998.

⁷⁴ Cordovilla, C.; Bartolomé, C.; Martínez-Ilarduya, J.; Espinet, P. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3040-3053.

⁷⁵ Farina, V.; Krishnan, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9585-9595.

⁷⁶ Le Falher, L.; Mumtaz, A.; Nina Diogo, A.; Thorimbert, S.; Botuha, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 827-832.

pyrido-oxazinone avec des groupements électro-donneurs (MeO) et électro-attracteurs (F, Cl). Ainsi, nous avons obtenu des adduits de couplages avec des rendements entre 21% à 71%. Outre la dégradation partielle des produits qui intervient lors des purifications sur silice, on remarque qu'avec les groupements attracteurs les rendements sont plus faibles (21% et 54%) (Schéma 2.9).

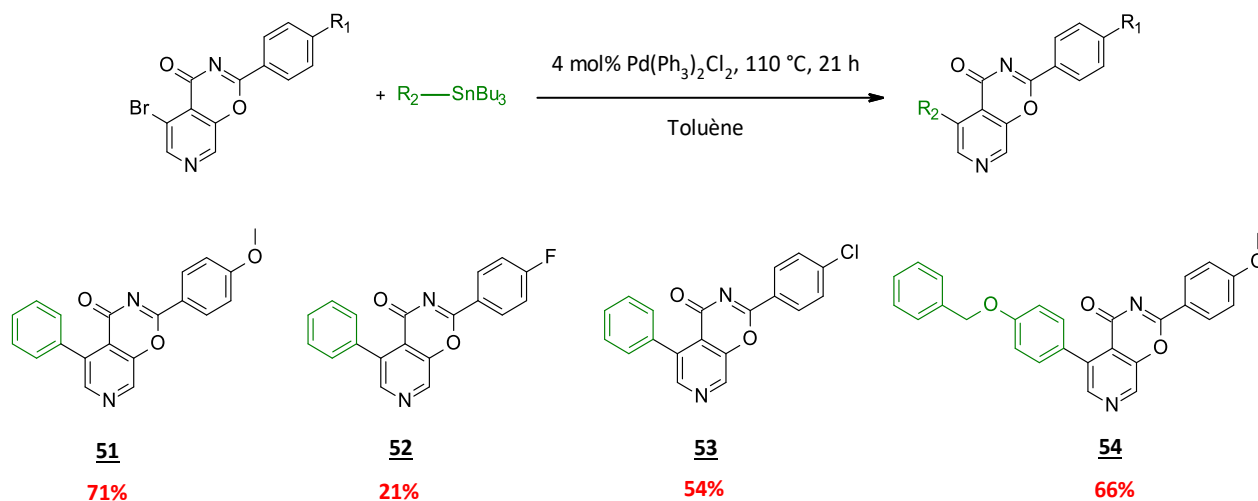


Schéma 2.9 : Produit de couplage de Stille sur les 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones 2-substitués.⁷⁶

B. Fonctionnalisation des 2-(4-bromophenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones et 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones 2-substituées par couplage de Sonogashira

a. La réaction de couplage croisé de Sonogashira

La réaction de couplage croisé de Sonogashira s'effectue entre un alcyne vrai et un dérivé halogéné ou un dérivé comportant un groupement triflate en présence d'un catalyseur au palladium, d'iodure de cuivre CuI et d'une base.⁷⁷

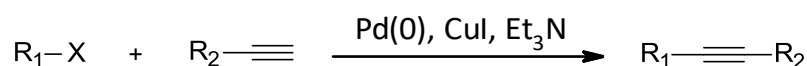


Schéma 2.10 : Couplage carbone-carbone pallado-catalysé de Sonogashira.

⁷⁷ Sonogashira, M.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *50*, 4467-4470.

b. Introduction de groupements éthynylaryles sur les pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one bromés par couplage de Sonogashira

Ces réactions de couplage ont été réalisées sur deux séries de pyrido-oxazinones : la 2-(4-bromophényl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (série 1) et les 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 2-substitué (série 2). En présence de 3% d'iodure de cuivre, de 4% de Pd(PPh₃)₂Cl₂ et de triéthylamine dans du toluène à 80 °C pendant 2 h 30, nous avons obtenu une bibliothèque de systèmes π-conjugués.

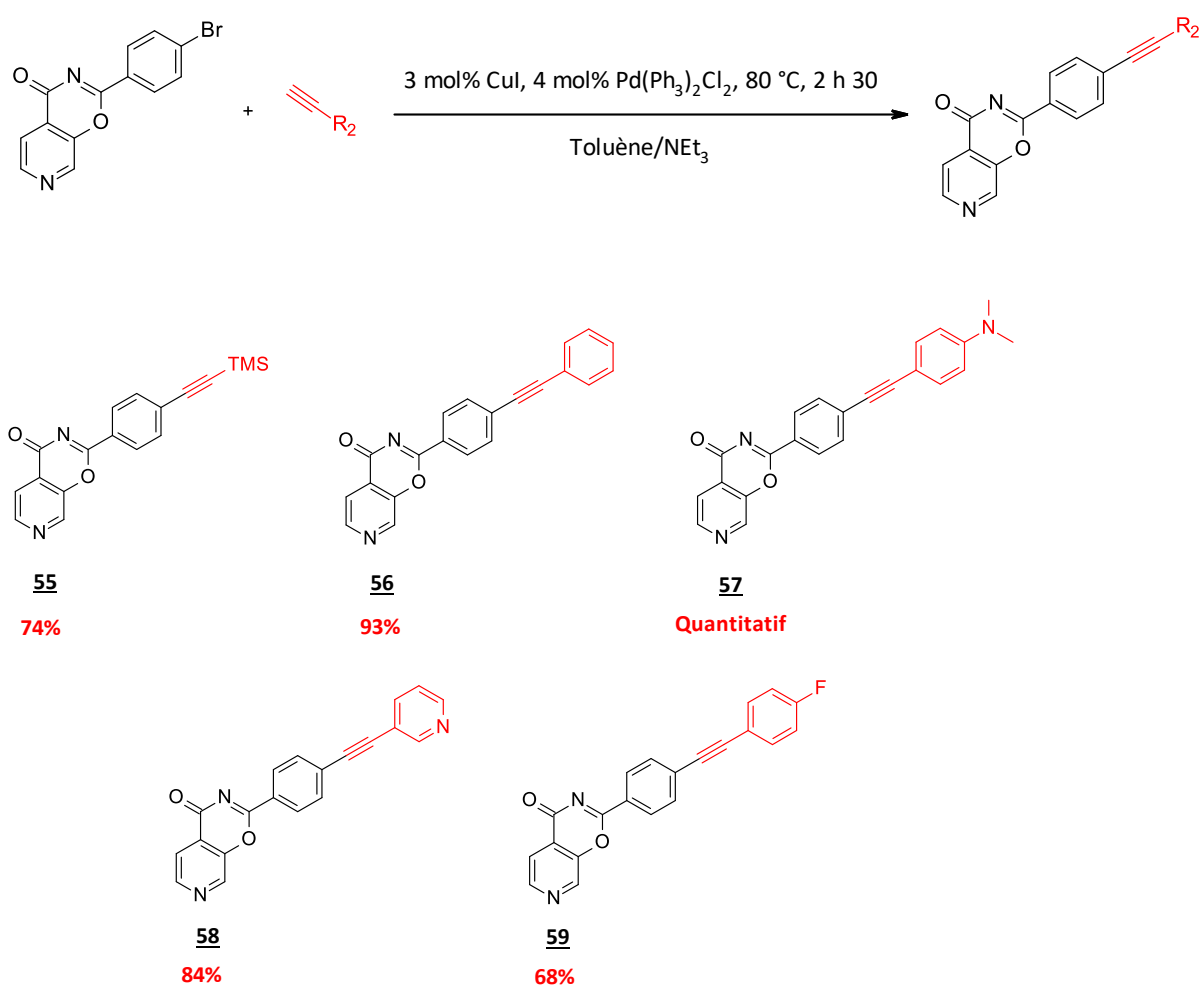


Schéma 2.11 : Produit de couplage de Sonogashira sur la 2-(4-bromophényl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one.⁷⁶

Par rapport aux résultats précédemment obtenus, j'ai amélioré les rendements de certains couplages (produit **55** de 67% à 74%) en optimisant la purification ou ajouter un autre exemple avec un aryle désactivé telle que la molécule **59**. Les composés **56**, **57**, **58** et **59** ont

été synthétisés avec des rendements similaires aux résultats précédents. Il est à noter que les rendements sont relativement corrects 68% et 100% quelle que soit la nature électro-donneuse ou électro-attractrice du substituant sur le noyau phényle.

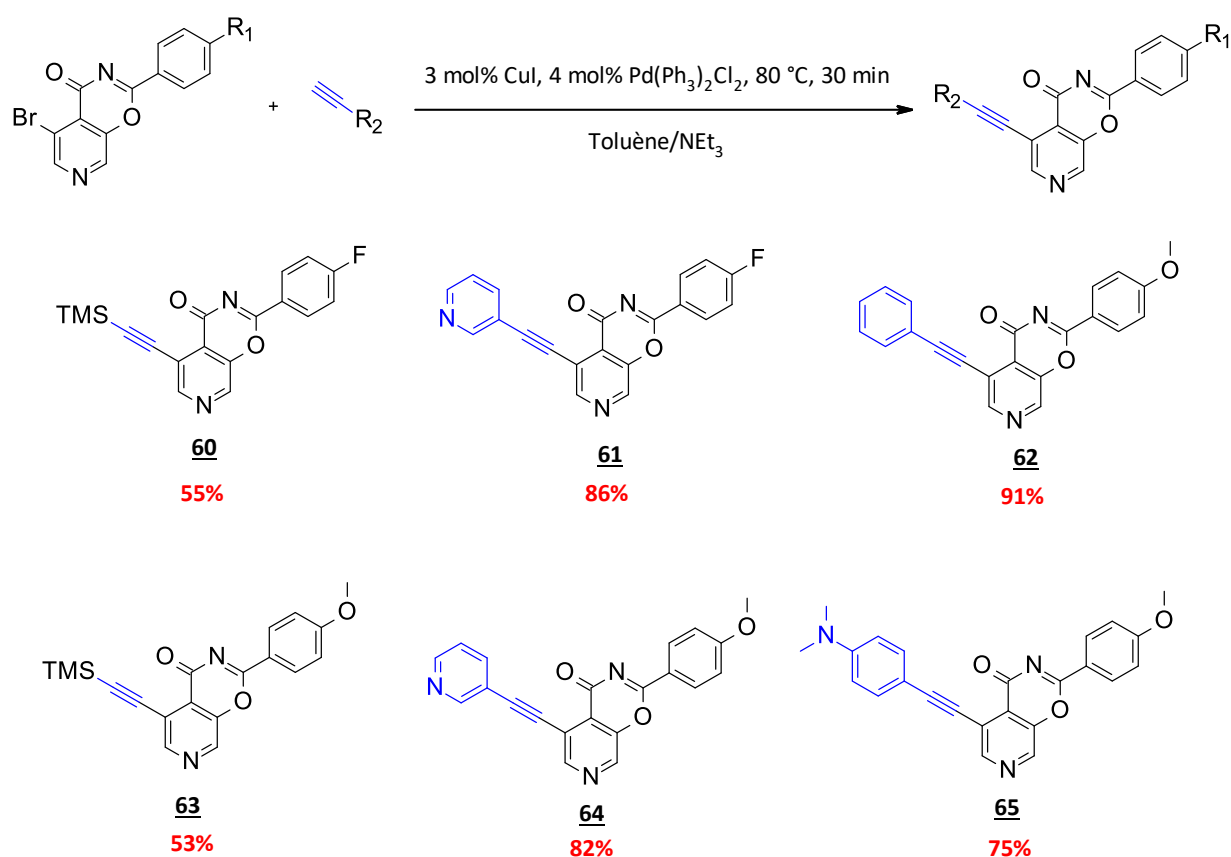


Schéma 2.12 : Produit de couplage de Sonogashira sur les 5-bromo-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 2-substitué.⁷⁶

Concernant la fonctionnalisation des 2-(4-bromophenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones sur le noyau pyridine, la réaction s'effectue en 30 min au lieu des 2h30 nécessaires pour le couplage sur le noyau phényle de la 2-(4-bromophenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one. Les autres conditions expérimentales restent inchangées. Cette différence de réactivité s'explique par une plus faible énergie de dissociation de liaison C-Halogène présent sur une pyridine (environ 89 kcal.mol⁻¹) de nature π -déficiente que sur un phényle (environ 92 kcal.mol⁻¹).^{78,79} La présence d'un fluor ou d'une fonction méthoxy sur la pyrido-oxazinone n'a pas d'influence sur les rendements en produit **60-63** et **61-64**. On remarque que tous les

⁷⁸ Blanksby, S. J.; Ellison, G. B. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 255–263.

⁷⁹ Garcia, Y.; Schoenebeck, F.; Legault, C. Y.; Merlic, C. A.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6632–6639.

couplages de dérivés aromatiques présentent de bons rendements de 75% à 91%. La baisse de rendement des molécules **60** et **63** peut être expliquée par une dégradation partielle des composés de couplage lors de leur purification sur gel de silice.

Avec ces résultats et compte tenu des différences de réactivité des atomes de brome sur les noyaux pyridine et phényl, L. Le Falher a effectué un double couplage séquentiel en « un pot ». Pour cela, à partir du 5-bromo-2-(4-bromophényl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one, la 3-éthynylpyridine et la 4-éthynyl-N,N-diméthylaniline ont été ajoutées successivement (schéma 2.16).

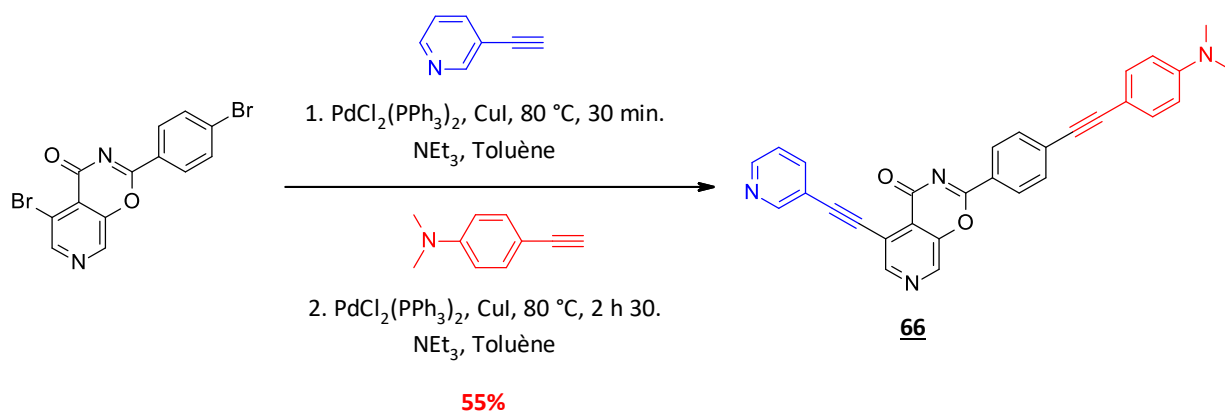


Schéma 2.13 : Double couplage de Sonogashira.⁷⁶

Le produit a été obtenu avec un rendement de 55%. Nous avons tenté de reproduire ce double couplage mais le produit brut n'a pu être purifié. Cependant, d'autres couplages de ce type ont été envisagés pour élargir notre bibliothèque de composés π -conjugués mais ceux-ci n'ont pas été réalisés faute de temps. Par exemple, nous aurions pu essayer le couplage du 4-éthynylpyridine à la place du 3-éthynylpyridine car avec l'azote en position 4 l'acidité du proton de l'alcyne terminal serait augmentée ce qui améliorerait la cinétique de la réaction sur le cuivre dans le cycle catalytique.

En résumé, 16 nouveaux hétérocycles ont été synthétisés grâce aux différentes réactions de couplage carbone-carbone avec des rendements compris entre 21% et 100%. Ceci a permis d'introduire de la conjugaison ainsi que des cycles aromatiques activés ou désactivés sur des bicycles originaux. Ces modifications ont permis d'augmenter notre librairie de composés de type pyrido-oxazinone, molécule plateforme qui servira plus tard à préparer par réaction avec divers nucléophiles aminés, des composés hétérocycliques azotés de type triazoles et triazines.

3. Synthèse d'hétérocycles azotés par cyclocondensation puis déshydratation sur les 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones

A. Etat de l'art : Synthèse de 1,3,5-triazines à partir des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones par attaque nucléophile d'amidines

a. Généralités sur les 1,3,5-triazines

Les 1,3,5-triazines sont des molécules aromatiques hétérocycliques possédant 3 atomes d'azotes alternés avec 3 atomes de carbones. Ces molécules sont synthétisables à partir de dérivés amidines ou biguanides avec des aldéhydes ou des acides carboxyliques activés.^{80,81} Cette famille de molécules chimiques a fait l'objet de nombreuses recherches au cours de la dernière décennie. Elle est connue pour ses propriétés biologiques et/ou optiques. En effet, les triazines montrent des propriétés antivirales,⁸² antitumorales^{83,84} mais aussi en tant que mime de protéine dans le cadre du traitement des maladies auto-immunes.⁸⁵ D'autres dérivés structurels des 1,3,5-triazines sont décrits pour leurs propriétés de fluorescence.⁸⁶ On peut citer les travaux de R. Ziessel et de son équipe qui ont publié un article⁸⁷ concernant la synthèse et les propriétés en fluorescence de nouvelles triazines 2,4,6-trisubstitués avec un motif phénol. Ces triazines présentent un large déplacement de

⁸⁰ Pan, L.; Li, Z.; Ding, T.; Fang, X.; Zhang, W.; Xu, H.; Xu, Y. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 10043-10050.

⁸¹ Oudir, S.; Rigo, B.; Hénichart, J.-P.; Gautret, P. *Synthesis*, **2006**, 2845-2848.

⁸² Bahar, A. A.; Liu, Z.; Garafalo, M.; Kallenbach, N.; Ren, D. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 696-710.

⁸³ Liu, B.; Sun, T.; Zhou, L. *Med. Chem.* **2015**, *5*, 131-148.

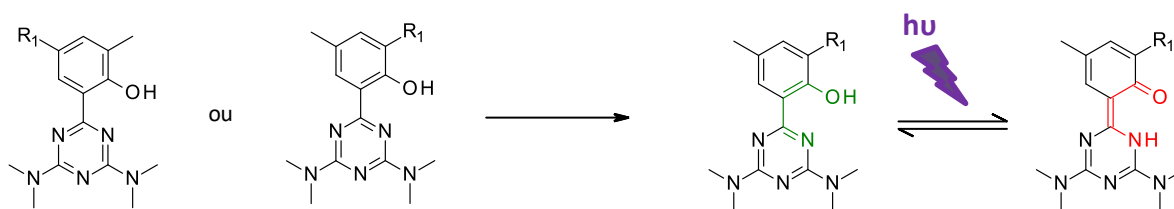
⁸⁴ Cascioferro, S.; Parrino, B.; Spanò, V.; Carbone, A.; Montalbano, A.; Barraja, P.; Diana, P.; Cirrincione, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 523-549.

⁸⁵ Zacharie, B.; Abbott, S. D.; Bienvenu, J.-F.; Cameron, A. D.; Cloutier, J.; Duceppe, J.-S.; Ezzitouni, A.; Fortin, D.; Houde, K.; Lauzon, C.; et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1138-1145.

⁸⁶ Ruiz-Carretero, A.; Noguez, O.; Herrera, T.; Ramírez, J. R.; Sánchez-Migallón, A.; de la Hoz, A. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4909-4919.

⁸⁷ Rihn, S.; Retailleau, P.; De Nicola, A.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8851-8863.

Stokes (entre 50 nm et 180 nm) dû à un mécanisme type ESIPT que nous avons évoqué dans le premier chapitre (schéma 2.14).



R₁ = thienyl, aryl, styryl, éthynylphényl, pyrenyl, perelyl, BODIPY...

Schéma 2.14 : Structures 1,3,5-triazines 2,4,6-trisubstitués fluorescents à mécanisme type ESIPT.

b. Synthèses de 1,3,5-triazines 2,4,6-trisubstitués avec un fragment pyridol à partir de dérivés amidines

Les pyrido-oxazinones, plus précisément le carbone du fragment oxazinone, sont sensibles aux attaques nucléophiles (schéma 2.15). Les précédentes études réalisées par l'équipe ChemBio ont démontré la dérivatisation des pyrido-oxazinones en 1,3,5-triazines avec plus de 30 exemples.⁶⁶ D'autre part, il est à noter que ces hétérocycles azotés peuvent être obtenus directement à partir des anions sodés en une réaction réalisée en un pot (schéma 2.15).

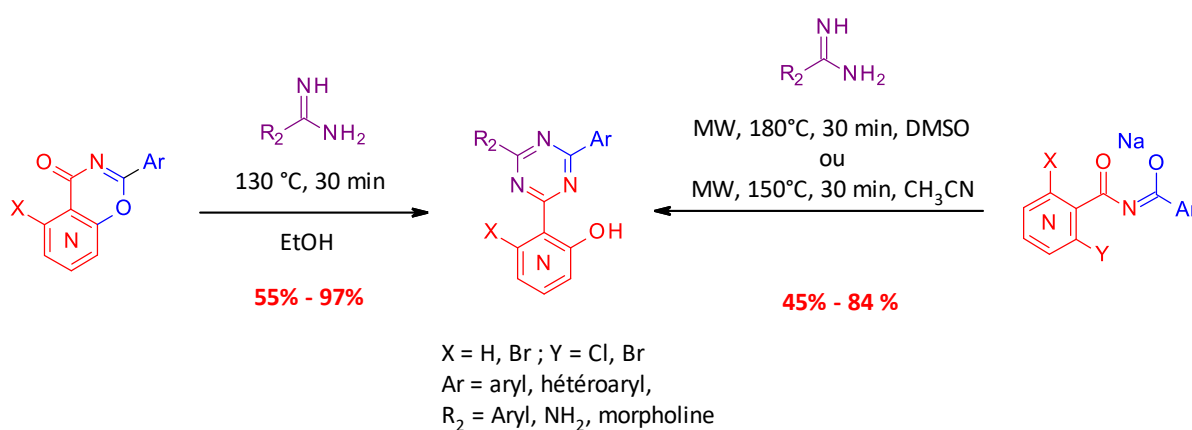


Schéma 2.15 : Synthèse des 1,3,5-triazines 2,4,6- trisubstituées à partir des pyrido-oxazinones et des anions sodés.

Comme expliqué ci-dessus, il existe une bibliothèque de plus de 30 exemples de 1,3,5-triazines à fragment pyridol disponibles au laboratoire. Nous avons par la suite synthétisé par la même méthodologie d'autres exemples utiles pour notre étude en fluorescence, ce qui sera présenté plus tard dans ce chapitre (partie 3.C).

B. Etat de l'art : synthèse de 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués à partir des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones

a. Généralités sur les 1,2,4-triazoles

Les 1,2,4-triazoles sont connus pour leurs propriétés bioactives en tant qu'antibiotiques,⁸⁸ antifongiques⁸⁹ antihypertensifs⁹⁰ ou encore comme antidouleurs⁹¹ et antiasthmatiques.⁹² Certains 1,2,4-triazoles sont utilisés en tant que médicaments comme le déférasirox,^{93,94} commercialisé sous le nom Exjade (Novartis) pour lutter contre la surcharge en fer(III) dans le sang. Il existe aussi un autre médicament possédant un motif triazole comme substance active, le triazolam⁹⁵ vendu par Pfizer sous le nom Halcion jusqu'en 2005. Ce triazole possède des propriétés hypnotiques, sédatives, et myorelaxantes et est utilisé en cas d'insomnie chronique ou sévère. Cependant, il fût jugé trop dangereux et retiré des marchés français en 2005. Un dérivé structurel du triazolam, l'estazolam,⁹⁶ avec des propriétés thérapeutiques similaires est commercialisé par Takeda sous le nom de Nuctalon. Enfin, il existe un autre dérivé plus connu du public, l'alprazolam⁹⁷ commercialisé par Pfizer sous le nom Xanax, médicament contre les troubles de l'anxiété sévères ou invalidantes et contre les effets secondaires du sevrage de l'alcoolisme.

⁸⁸ Battaglia, U.; Moody, C. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1938–1939.

⁸⁹ Kaku, Y.; Tsuruoka, A.; Kakinuma, H.; Tsukada, I.; Yanagisawa, M.; Naito, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1125-1129.

⁹⁰ Al-Soud, Y.; Heydel, M.; Hartmann, R. W. *Tetrahedron Letters*, **2011**, *52*, 6372-6375.

⁹¹ Zhang, Q.; Keenan, S. M.; Peng, Y.; Nair, A. C.; Yu, S. J.; Howells, R. D.; Welsh, W. J. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4044-4047.

⁹² Naito, Y.; Akahoshi, F.; Takeda, S.; Okada, T.; Kaji, M.; Nishimura, H.; Sugiura, M.; Fukaya, C.; Kagitani, Y. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3019-3029.

⁹³ Steinhäuser, S.; Heinz, U.; Bartholomä, M.; Weyhermüller, T.; Nick, H.; Hegetschweiler, K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *2004*, 4177–4192.

⁹⁴ Lattmann, R.; Acklin, P. PCT Int. Appl. 1997 WO9749395 (A1).

⁹⁵ Veldkamp, W.; Straw, R. N.; Metzler, C. M.; Demissianos, H. V. *J. Clin Pharmacol.* **1974**, *14*, 102-111.

⁹⁶ Estazolam, VIDAL, www.vidal.fr, 2018.

⁹⁷ Lahti, R.A.; Gall, M. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 1064-1067.

Ces trois triazoles font partie de la famille des benzodiazépines. Ils interagissent avec des récepteurs (BZD1 et BZD2 des récepteurs à benzodiazépines) eux-mêmes liés au récepteur GABA de type A.⁹⁸ Ces récepteurs sont présents dans les neurones et représentent les canaux ioniques à chlorure. L'ouverture de ces canaux par des substances actives réduit l'activité potentielle des neurones.⁹⁹

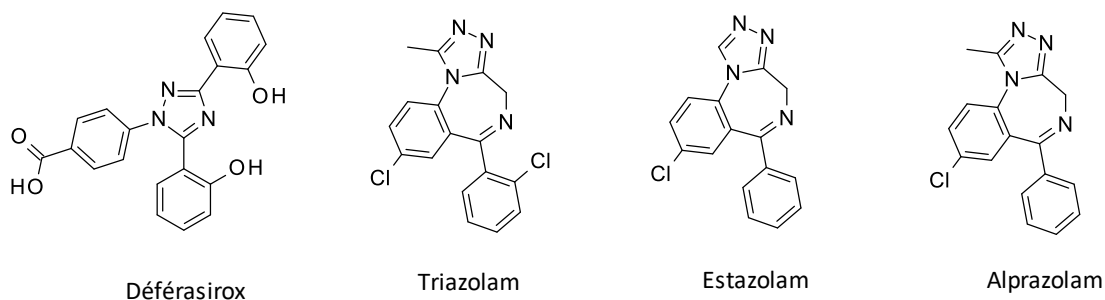


Figure 2.16 : Triazoles commerciaux possédant des activités pharmacologiques.

De plus, certains 1,2,4-triazoles trisubstitués par des systèmes π -conjugués possèdent des propriétés de photoluminescence ou de fluorescence.^{100,101,102} Des 1,2,4-triazoles substitués par un fragment phénol ont été utilisés en tant que sondes fluorescentes pour la détection de cations métalliques comme le zinc (II) ou l'aluminium (III). Il a été montré que la présence de fragment phénol permettait une chélation efficace et sélective de ces cations entraînant des variations sur les spectres de fluorescence. On peut citer notamment les travaux de G. Bian et de ses collaborateurs¹⁰³ qui décrivent la synthèse et la caractérisation optique d'un 1,2,4-triazole avec un fragment trifluorométhylbenzène comme détecteur de Zn^{2+} et Al^{3+} . En outre, ils utilisent une synthèse via une attaque nucléophile d'une hydrazine sur une benzoxazinone suivi d'une cyclocondensation-déshydratation pour obtenir un 1,2,4-triazole 1,3,5-trisubstitué (schéma 2.17).

⁹⁸ Sigel, E.; Steinmann, M. E. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40224–40231.

⁹⁹ Rudolph, U.; Knoflach, F. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 685-697.

¹⁰⁰ Wu, P. L.; Feng, X. J.; Tam, H. L.; Wong, M. S.; Cheah, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 886–887.

¹⁰¹ Li, Z. H.; Wong, M. S.; Fukutani, H.; Tao, Y. *Org. Lett.*, **2006**, *19*, 4271-4274.

¹⁰² Chen, Z.; Li, H.; Dong, W.; Miao, M.; Ren H. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1334–1337

¹⁰³ Bian, G.; Guo, Y.; Lv, X.; Zhang, C. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1111*, 1-8.

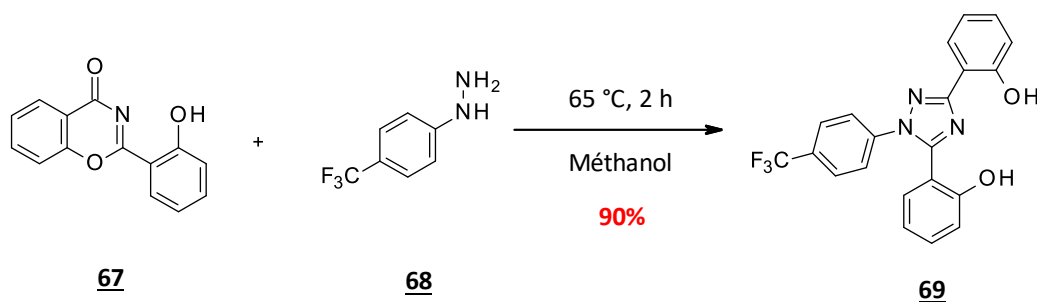
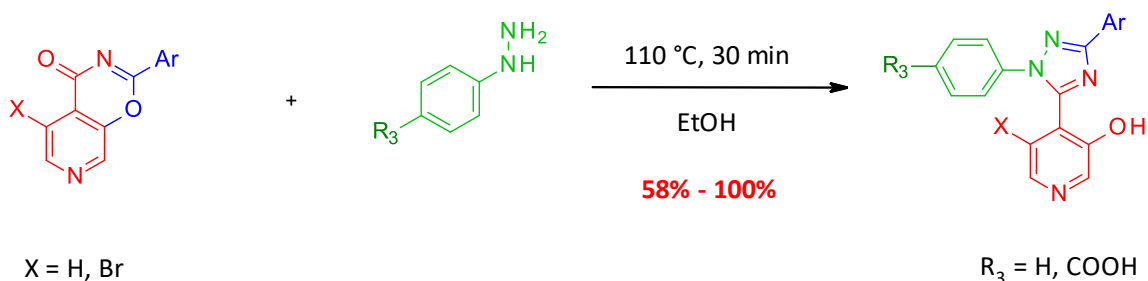


Schéma 2.17 : Synthèse du 2-[5-(2-hydroxyphenyl)-1-[4-(trifluorométhyl)phényl]-1,2,4-triazol-3-yl]phénol **69**.

On peut remarquer que le triazole **69** est un chélateur sélectif du Zn(II) et de l'Al(III) contrairement à son analogue déférasirox qui est un chélateur du fer(III) ce qui démontre l'importance de chaque motif sur la structure. Ceci est dû à la différence du rapport ligand : métal qui est de 1 : 1 pour le triazole **69** avec Al³⁺ ou Zn²⁺, alors qu'il est de 2 : 1 pour le déférasirox avec Fe³⁺.

b. Synthèses des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués avec un fragment 3-pyridol

Les conditions précédemment décrites pour la réaction des benzoxazinones ont été utilisées sur les pyrido-oxazinones des séries 1 et 2. La réaction se fait en présence d'hydrazine à 110 °C dans l'éthanol pendant 30 min. L'attaque nucléophile de l'hydrazine sur le carbone C=N va provoquer l'ouverture du cycle oxazinone puis une étape de cycloaddition et enfin une étape de déshydratation permet de générer le noyau 1,2,4-triazole.



X = H, Br

Ar = Ph, 4-Br-Ph, 4-MeO-Ph, N-méthylpyrrole.

R₃ = H, COOH

Schéma 2.18 : Synthèse des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués à partir des pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-ones de la série 1 et 2.

A la bibliothèque de triazoles existants, nous avons ajouté 4 nouveaux triazoles intéressants structurellement, avec des substituants désactivant fluor et nitrile, en *para* sur le phényle, pour les triazoles **70** et **71**, thiénylène pour le triazole **73** et disubstitué en position 2 et 4 par des groupements méthoxy pour le triazole **72**. D'autre part, nous avons aussi synthétisé la molécule **74** avec un motif phénol à la place du pyridol (Schéma 2.19). Les triazoles **75** et **76** ont été obtenus avec respectivement 58% et 60% de rendement à partir des pyrido-oxazinones **61** et **64**. Enfin, nous utilisons l'acide 4-hydrazinobenzoïque de manière à insérer la fonction hydrazide à la place de la fonction acide pour le marquage des protéines carbonylées.

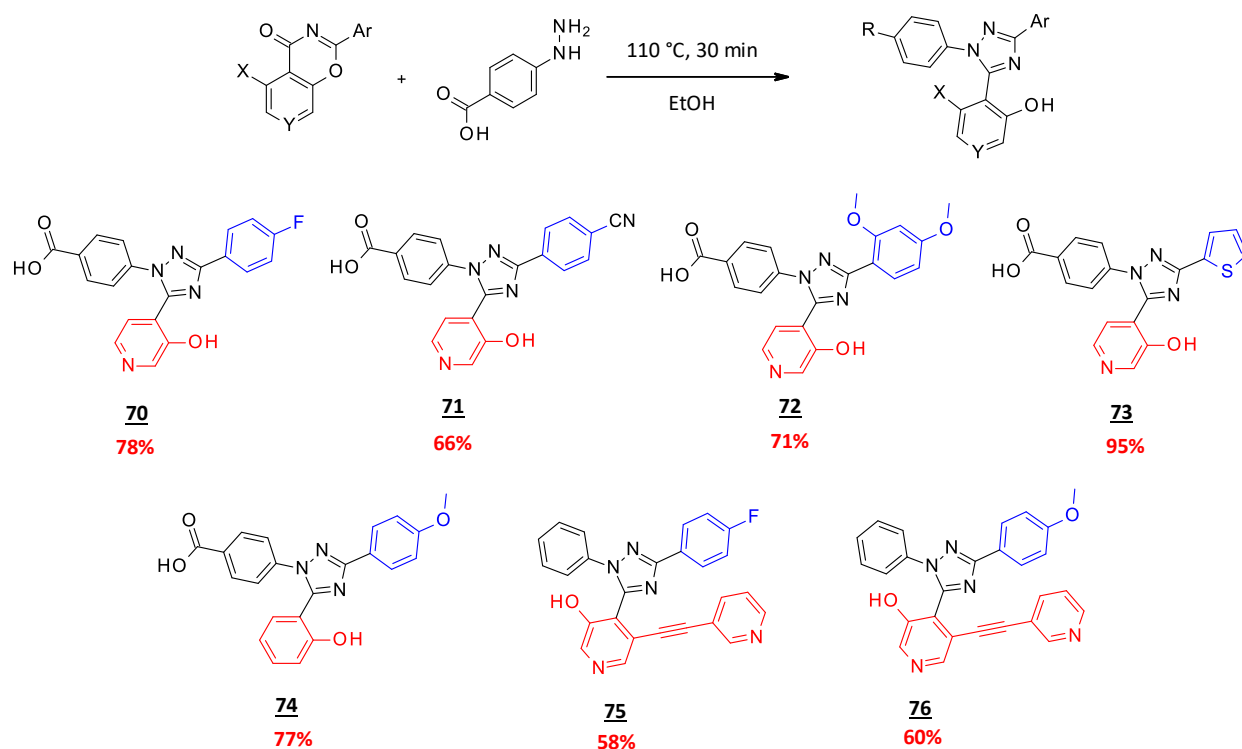


Schéma 2.19 : Nouveaux triazoles trisubstitués synthétisés.

Les conditions réactionnelles ont été légèrement modifiées pour la synthèse des triazoles à partir des 4H-pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one de la série 3. En effet, dans les conditions décrites sur le schéma précédent (schéma 2.19), la réaction est stoppée après la formation de l'intermédiaire ouvert (schéma 2.20) après l'étape d'addition nucléophile. Ce phénomène a été observé par L. Le Falher pendant sa thèse. Elle a donc ajouté de l'acide acétique au milieu (10% volumique) en tant qu'assistant électrophile afin d'effectuer la cyclisation. Celui-ci protone l'amide augmentant le caractère électrophile du carbone du carbonyle et permet

aussi de casser les liaisons hydrogènes intramoléculaires qui doivent stabiliser l'intermédiaire ouvert. Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu obtenir ces intermédiaires ouverts lors de la synthèse des triazoles de la série 3 (schéma 2.20). Les molécules **77**, **78** et **79** ont été isolées pour être testées en tant qu'inhibiteurs d'enzymes dans le cadre d'une étude de la relation structure/réactivité biologique.

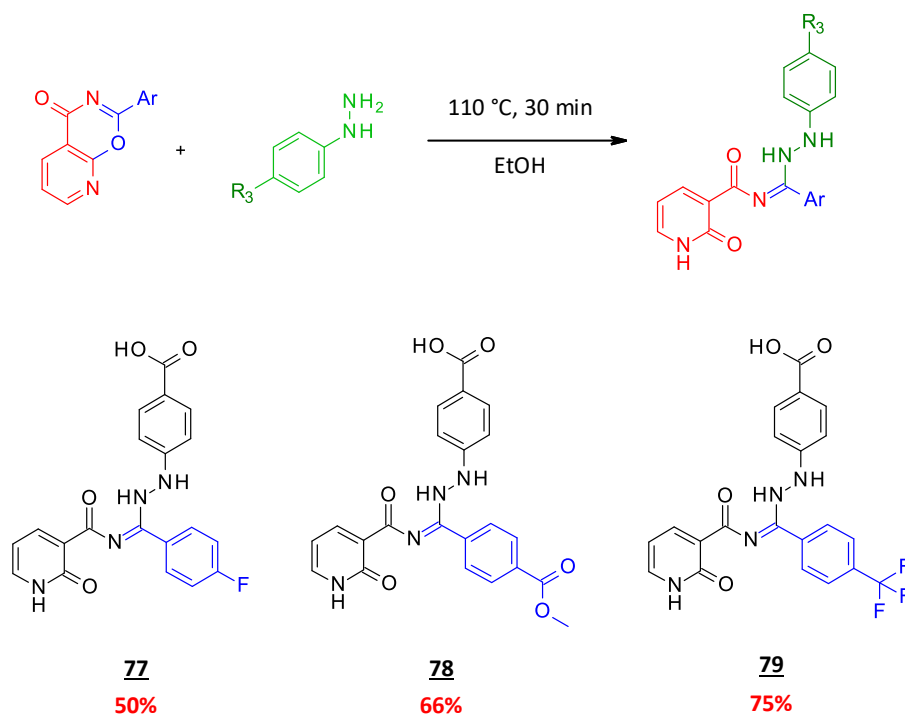


Schéma 2.20 : Intermédiaires ouverts après attaque nucléophile.

Ces nouveaux triazoles possédant un fragment 2-pyridone ont été synthétisés avec pour objectif final d'être étudiés en tant qu'inhibiteur d'enzyme en collaboration avec l'équipe du Dr C. El Amri. Tous les triazoles synthétisés n'ont pas encore été évalués, ces travaux sont détaillés dans le chapitre IV de ce manuscrit. Pour cette étude biologique, les intermédiaires de synthèse ont été transmis pour les essais d'inhibition. Nous présentons ci-dessous (schéma 2.21) les nouveaux triazoles à fragment 2-pyridone qui ont été ajoutés à la bibliothèque existante. Les rendements sont compris entre 48% et 100% et ne semblent pas dépendre de la nature électronique du substrat sur l'aryle. D'autre part, il est possible d'introduire de la diversité chimique vis-à-vis du dérivé 4-hydrazinoaryle (en vert sur le schéma 2.21).

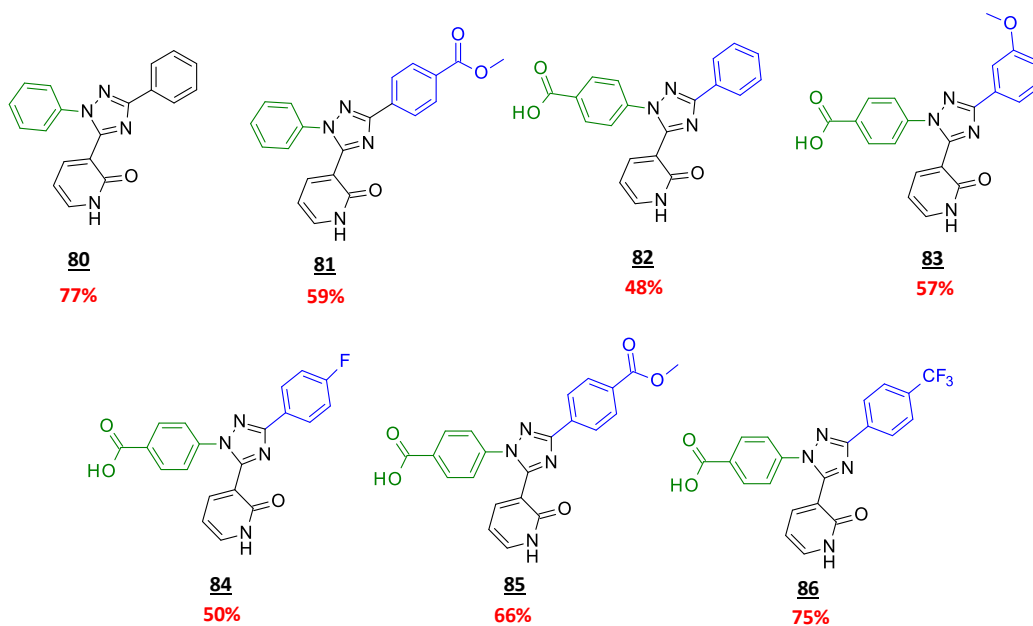
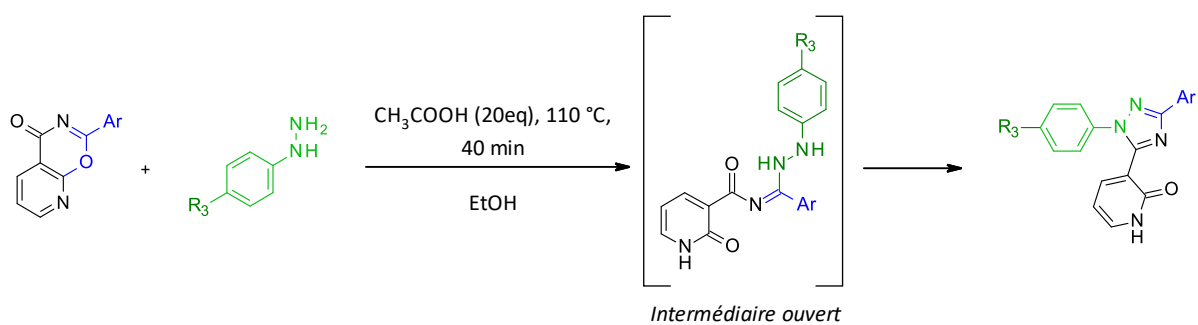
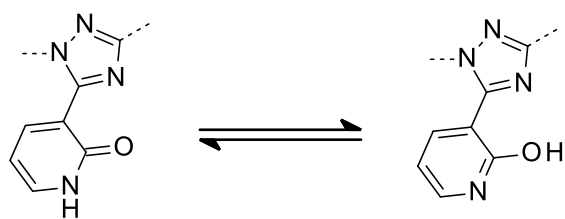


Schéma 2.21 : Nouveaux 1,2,4-triazoles avec un motif 2-pyridone.

Il est à noter que les composés **84**, **85** et **86** ont été obtenus à partir de leur forme ouverte respectivement **77**, **78** et **79** dans les conditions décrites sur le schéma 2.21. L'étape de cyclisation s'est achevée avec un rendement quantitatif pour tous les composés. Les rendements présentés pour **84**, **85** et **86** (schéma 2.21) sont ceux obtenus sur les deux étapes.

Pour cette série d'hétérocycles, il est important de noter que le fragment 2-pyridone peut aussi être considéré comme un fragment 2-pyridol (schéma 2.22). Ces deux formes tautomères seront importantes pour les résultats de la partie 4 de ce chapitre.



Forme pyridone

Forme 2-pyridol

Schéma 2.22 : Forme tautomère du fragment 2-pyridone.

Nous allons conserver la forme 2-pyridol dans l'écriture des dessins de cette thèse pour les prochaines parties pour aider à la compréhension du cheminement de ces travaux même si le lecteur doit être conscient de l'équilibre plus ou moins déplacé en fonction des conditions de solvatation ou pH.

Nous avons donc accès, grâce à cette méthodologie de synthèse courte et efficace permettant l'introduction de divers substituants, à deux familles de molécules hétérocycliques d'intérêt : les 1,3,5-triazines et les 1,2,4-triazoles. L'objectif est maintenant de déterminer les propriétés de fluorescence de ces composés et *in fine* de sélectionner les structures les plus adaptées à nos recherches futures pour la conception de nouvelles sondes fluorescentes pour le marquage des protéines carbonylées. Nous avons donc commencé par effectuer une sélection de la famille la plus intéressante pour nos objectifs.

C. Discrimination des 1,2,4-triazoles vis à vis des 1,3,5-triazines par propriétés de fluorescence

a. Synthèses des triazines et triazoles cibles

Nous avons accès à une vaste chimiothèque d'hétérocycles azotés grâce à la chimie développée autour des pyrido-oxazinones. Les 1,2,4-triazoles et les 1,3,5-triazines sont connus dans la littérature pour avoir de multiples applications biologiques (comme nous l'avons présenté dans la première partie de ce chapitre notamment en tant que sondes fluorescentes). Nous avons donc commencé par déterminer quelle serait la famille du fluorophore la plus adaptée à nos objectifs.

Dans un premier temps, 4 molécules ont été envisagées (figure 2.23) avec des variations de structures à plusieurs niveaux : le noyau azoté central (triazine ou triazole) et la substitution de l'hétérocycle centrale par un noyau pyridol ou un noyau pyridine. Des phényles non substitués ont été choisis sur les autres positions des triazines et triazoles de manière à éviter toute variation liée à un transfert photophysique quelconque (PET, ICT etc.) sur la fluorescence originelle.

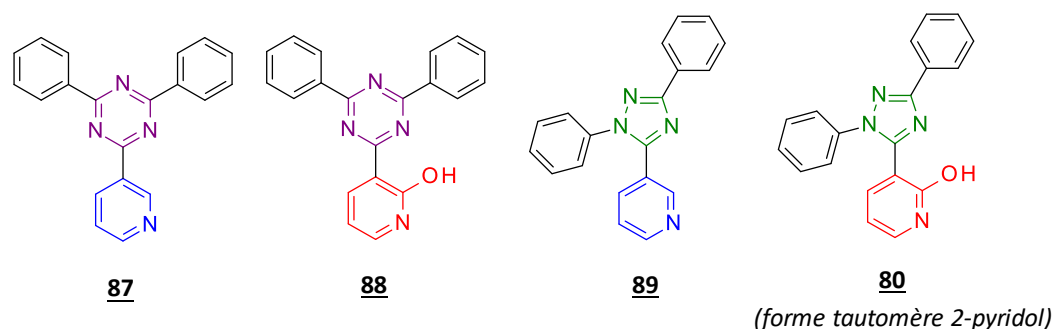
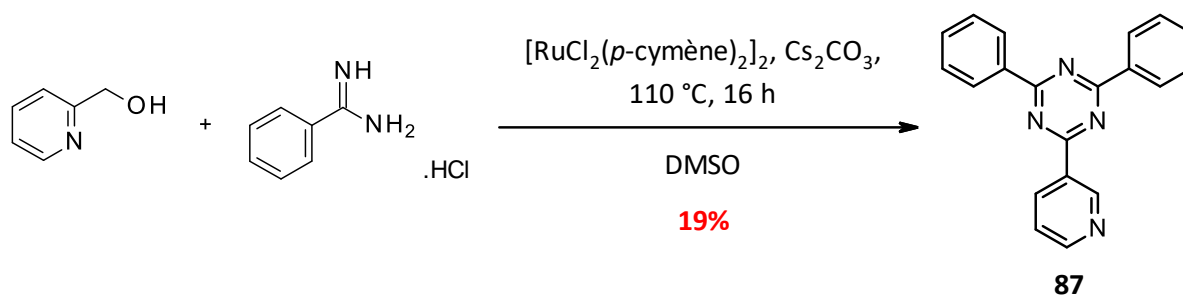


Figure 2.23 : Hétérocycles azotés cibles pour l'évaluation des propriétés de fluorescence.

La 2,4-diphenyl-6-(3-pyridyl)-1,3,5-triazine **87** a été synthétisée avec un rendement de 19% suivant une méthode décrite dans la littérature,¹⁰⁴ par réaction entre la 3-pyridinemethanol la benzamidine hydrochlorée en présence de carbonate de césium Cs_2CO_3 et d'un catalyseur au ruthénium dans le DMSO à 110 °C pendant 16 h. Quant à la 3-(4,6-diphenyl-1,3,5-triazin-2-yl)pyridin-2-ol **88**, elle a été obtenue avec un rendement de 66% via notre méthodologie en « un pot » dans l'acétonitrile à partir de l'anion sodé **90** et de la benzamidine.



¹⁰⁴ Xie, F.; Chen, M.; Wang, X.; Jiang, H.; Zhang, M. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2761-2768.

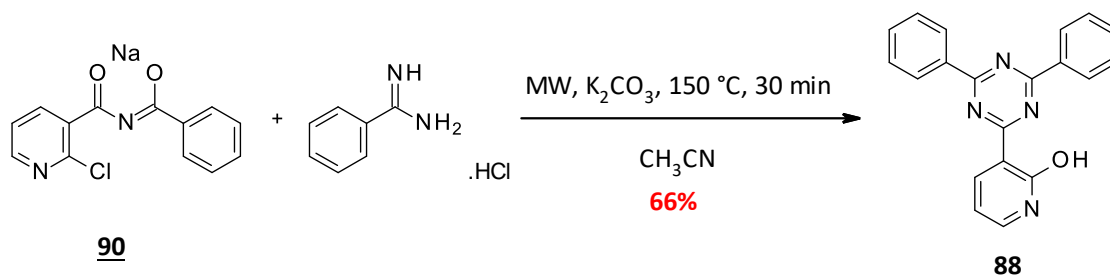


Schéma 2.24 : Synthèse de la 2,4-diphenyl-6-(3-pyridyl)-1,3,5-triazine **87** et de la 3-(4,6-diphenyl-1,3,5-triazin-2-yl)pyridin-2-ol **88**.

La synthèse des triazoles fait intervenir plus d'étapes que la synthèse des triazines à partir des réactifs commerciaux, en particulier pour le triazole **89**. A partir des travaux de l'équipe de R. Hale¹⁰⁵ d'une part et de l'équipe de R.W. Hartmann¹⁰⁶ d'autre part, nous avons pu accéder à la 3-(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)pyridine **89** avec un rendement global de 18% sur 3 étapes (schéma 2.25).

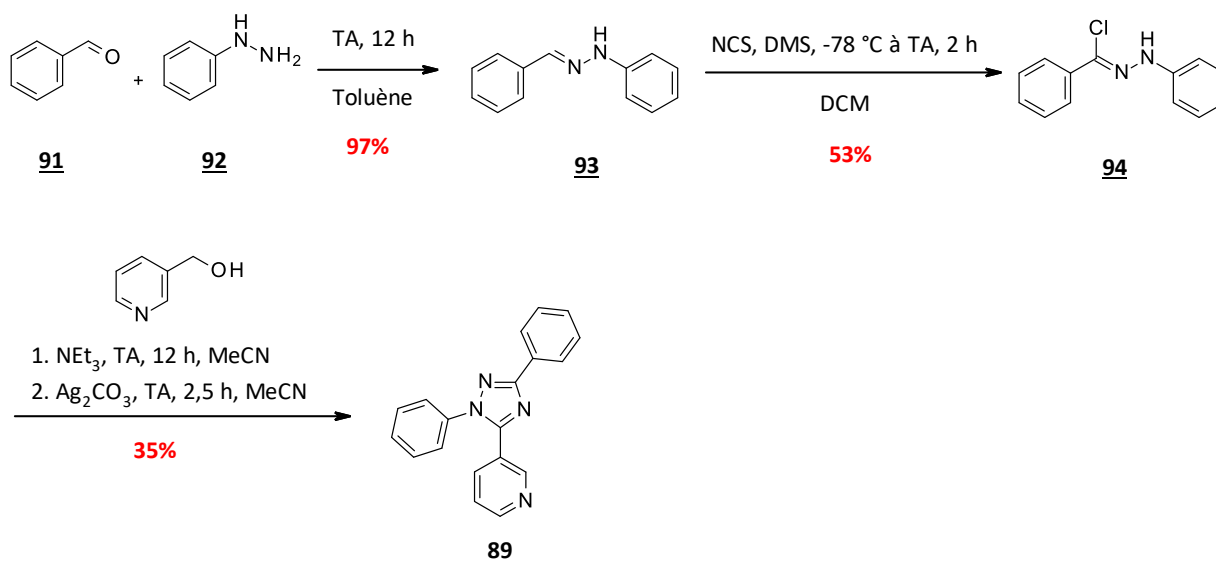


Schéma 2.25 : Synthèse du 3-(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)pyridine **89**.

Enfin, le 3-(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)pyridin-2-ol **89** a été obtenu à partir de la pyrido-oxazinone **45** et de la phénylhydrazine avec un rendement de 79% (figure 2.26) sous irradiation micro-ondes dans l'EtOH en présence d'une catalyse acide.

¹⁰⁵ Paulvannan, K. ; Chen, T. ; Hale, R. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 8071-8076.

¹⁰⁶ Al-Soud, Y. A. ; Heydel, M. ; Hartmann, R. W. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 6372-6375.

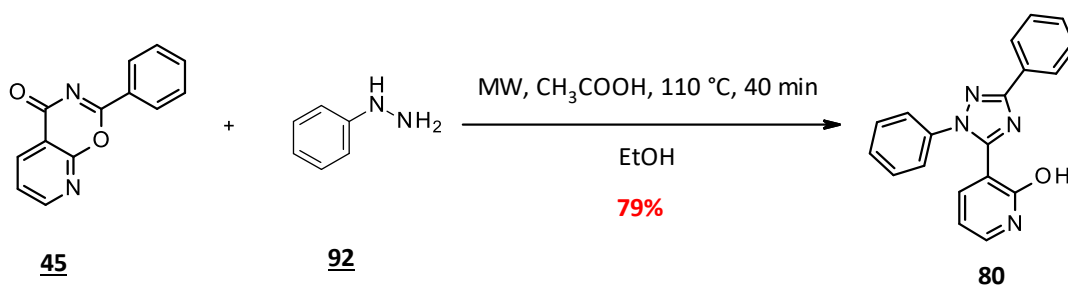
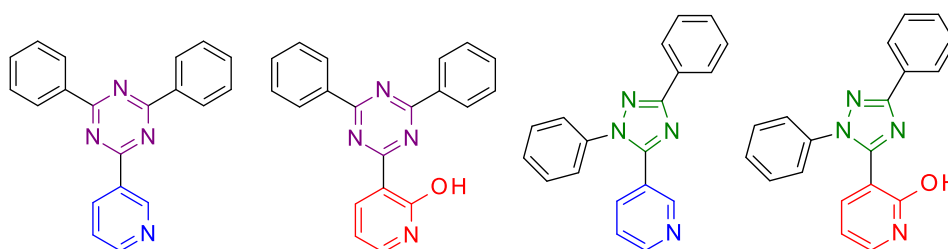


Schéma 2.26 : Synthèse du 3-(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)pyridin-2-ol **80**.

b. Discrimination des familles d'hétérocycles par mesure de fluorescence

Nous avons pu évaluer les propriétés de fluorescence des molécules **87**, **88**, **89** et **80**. Pour cela nous avons mesuré les critères principaux tels que les longueurs d'onde d'absorption, d'émission et les coefficients d'extinction molaire.

Il est important de noter que les deux triazoles **80** et **89** ont des propriétés de fluorescence, contrairement à la triazine **88**. La triazine **87** émet à 333 nm avec un substrat pyridine. La présence de la fonction alcool sur la molécule **88** annule cette fluorescence. On peut remarquer dans un second temps que les déplacements de Stokes sont plus grands dans le cas des triazoles avec un écart de respectivement 68 et 93 nm avec les molécules **89** et **80**. En revanche, les triazines présentent un meilleur coefficient d'absorption molaire, environ deux fois plus important ($\sim 40000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et des longueurs d'onde d'absorption plus grandes (262 nm pour **87** et 260 nm pour **88**). Notons tout de même que la fonction alcool sur le triazole **80** permet d'augmenter le déplacement de Stokes de 25 nm.



Molécules	87	88	89	80
λ_{abs} (nm)	262	260	240	238
λ_{em} (nm)	333	-	379	402

$\Delta\lambda$ (nm)	71	-	139	164
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	44300	42140	20197	23376

Mesures effectuées à $10^{-5}M$ dans l'acétonitrile

Figure 2.27 : Propriétés de fluorescence des molécules **87**, **88**, **89** et **80**.

Au final, notre choix s'est porté sur les triazoles à la place des triazines car malgré les longueurs d'onde d'absorption et les coefficients d'extinction molaire plus faible, le large déplacement de Stokes des triazoles est un meilleur atout dans le cadre de nos objectifs. De plus, nos triazoles possèdent tous des fragments pyridols en fin de synthèse, fragment qui semble jouer un rôle important dans le mécanisme de fluorescence et qui sera discuté plus tard dans ce chapitre.

D. Optimisation de la solubilité en milieu biologique des 1,2,4-triazoles

a. Etat de l'art : amélioration de la solubilité par obtention d'une forme chargée

Les expériences présentées dans cette partie résument les tentatives visant à augmenter la solubilité des triazoles en milieu aqueux. Nos triazoles sont très peu solubles ou insolubles dans tous les solvants organiques usuels (cyclohexane, AcOEt, MeOH, EtOH, DCM, toluène...) hormis le DMSO. Les 1,2,4-triazoles, essentiellement constitués de cycles aromatiques, ne sont pas assez lipophiles, et bien que la plupart possèdent des fonctions hydrophiles (acide, alcool...), ces molécules ne sont pas solubles dans les solvants protiques ou aqueux. Pour cela, nous avons choisi d'introduire une fonction sulfonate connue dans la littérature pour augmenter la solubilité de différentes familles de fluorophores par fonctionnalisation d'une fonction amine¹⁰⁷ ou alcool¹⁰⁸ (schéma 2.28).

¹⁰⁷ Jacquemet, A.; Rihn, S.; Ulrich, G.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Ziessel, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *8*, 1664-1669.

¹⁰⁸ Wu, D.; O'Shea, D.F. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3392-3395.

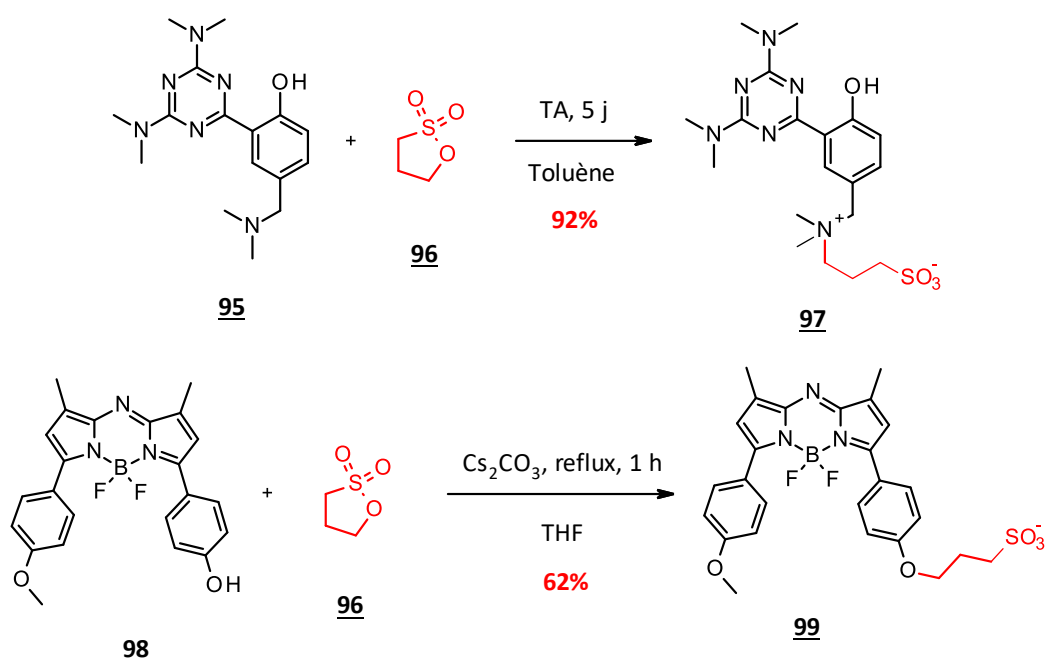


Schéma 2.28 : Exemples de synthèse de fluorophores possédant un bras solubilisant type propanesulfonate.

Dans le cas de la triazine, R. Ziessel et ses collaborateurs ont introduit une chaîne carbonée possédant une fonction sulfonate sur leurs fluorophores, obtenant ainsi un zwitterion sans modifier les propriétés de fluorescence de leurs composés.

b. Tentatives d'insertion d'un bras solubilisant à partir de la butanesultone.

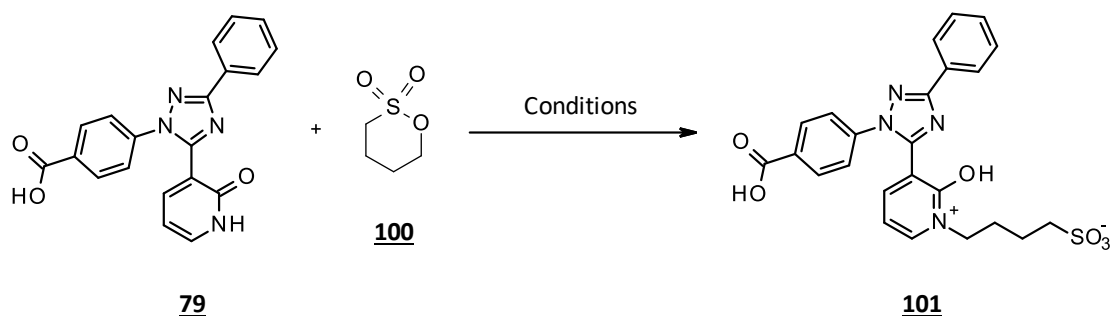
Nous avons tenté plusieurs approches pour insérer une chaîne carbonée type butyl sulfonate à partir de la butanesultone sur le triazole **79**. Nous avons choisi d'utiliser la butanesultone car il existe des exemples pour synthétiser des liquides ioniques,¹⁰⁹ solubiliser des cyclodextrines¹¹⁰ ou directement sur les cyanines pour obtenir un indicateur de pH fluorescent.¹¹¹ Ces exemples sont décrits sur des structures différentes des triazoles mais l'objectif final est le même et la butanesultone **100** est peu onéreuse.

¹⁰⁹ Paape, N.; Wei, W.; Bösmann, A.; Kolbeck, C.; Maier, F.; Steinrück, H.; Wasserscheid, P.; Schulz, P. *Chem. Commun.* **2008**, 3867-3869.

¹¹⁰ Ma, D.; Zhang, Y.; Xu, J. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 3105-3112.

¹¹¹ Wycisk, V.; Achazi, K.; Hillman, P.; Hirsch, O.; Kuehne, C.; Dervedde, J.; Haag, R.; Licha, K. *ACS Omega* **2016**, *1*, 808-817.

Les essais sont résumés dans le tableau ci-dessous (schéma 2.29). Malgré toutes les tentatives, le composé **101** n'a pu être synthétisé. En présence de base, par chauffage standard ou microondes, aucune conversion du triazole **79** ainsi qu'une dégradation du réactif sont observés.



Entrée	Conditions	Solvant	Résultats
1	TA, 18 j	Toluène	Récupération du SM
2	Cs ₂ CO ₃ , reflux, 12 h	THF	Récupération du SM
3	Reflux, 20 h	DMF	Dégradation
4	MW, reflux, 20 min	DMF	Dégradation

Schéma 2.29 : Tentatives d'insertion du bras solubilisant.

Nous aurions pu tenter ces synthèses avec la 1,3-propane sultone comme décrit dans la littérature. Cependant, la possibilité d'ajouter une chaîne PEG (polyéthylène glycol) peut être envisagée pour optimiser la solubilité des triazoles. Nous nous sommes donc orientés vers cette nouvelle approche.

E. Optimisation de la solubilité par ajout de chaîne PEG sur le fragment pyridol

L'utilisation de chaîne type polyéthylène glycol permet d'améliorer la solubilisation des molécules organiques, polymères et autres nanoparticules en milieu biologique.^{112,113,114}

Nous avons envisagé d'insérer la chaîne PEG sur la fonction alcool du pyridol. En outre, ce type de modification sur le squelette des 1,2,4-triazoles trisubstitués aura sans doute moins de conséquences sur la fluorescence. La quaternarisation de la pyridine avec les méthodes précédentes auraient modifié les transferts de charge potentiel intervenant dans le mécanisme de fluorescence.

En s'appuyant sur des conditions de réactions décrites dans la littérature, nous avons essayé d'introduire un fragment TEG-OMe via la réaction de Mitsunobu¹¹⁵ ou par substitution nucléophile.¹¹⁶

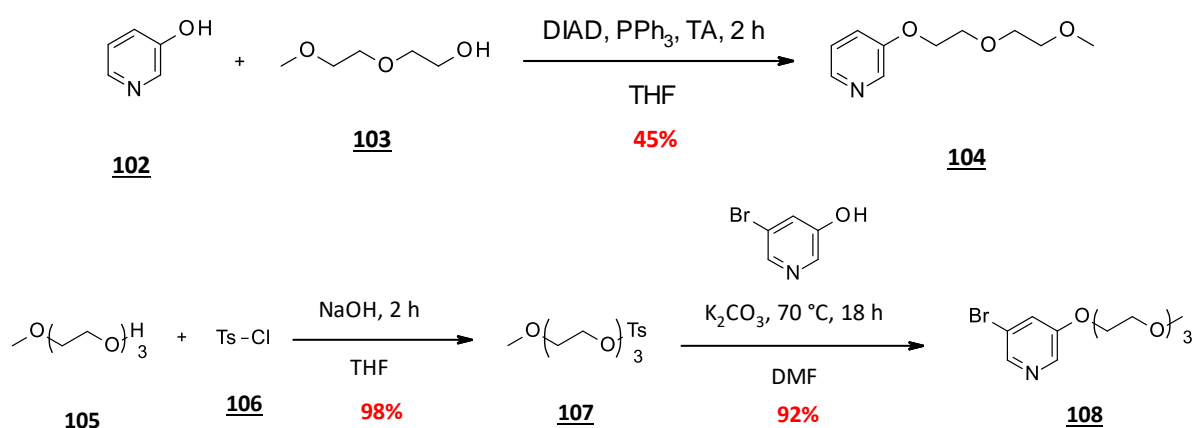


Schéma 2.30 : Formation d'éther-oxyde sur les cycles aromatiques type 3-pyridol.

En utilisant ces conditions, nous avons essayé de synthétiser les adduits correspondant à partir du triazole **T01**. Dans les conditions de Mitsunobu, le triazole **T01** a été mis à réagir avec le triéthylène glycol en présence de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) et de PPh₃. Cependant, nous avons observé la dégradation du triazole **T01**. D'autre part, la substitution nucléophile entre le triazole **T01** sur le TEG-OTs a permis d'obtenir une faible conversion (environ 25%) en produit **109**. L'expérience a généré de nombreux sous-produits ce qui a généré un mélange brut complexe à purifier. Malgré toutes nos tentatives de purification, le

¹¹² Huang, H.; Li, D-M.; Wang, W.; Chen, Y-C.; Khan, K.; Songa, S.; Zheng, Y-S. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 729-735.

¹¹³ Lottner, C.; Bart, K. C.; Bernhardt, G.; Brunner, H. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2079-2089.

¹¹⁴ Pengo, P.; Polizzi, S.; Battagliarin, M.; Pasquato L.; Scrimin, P. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2471-2478.

¹¹⁵ Nanashima, Y.; Yokoyama, A.; Yokozawa, T. *Polymer Science* **2012**, *50*, 1054-1061.

¹¹⁶ Frank, M.; Ahrens, J.; Bejenke, I.; Krick, M.; Schwarzer, D.; Clever, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8279-8287.

produit **109** pur n'a pu être isolé. Cependant cette approche synthétique pour optimiser la solubilisation semble être meilleure que l'approche vers une forme chargée.

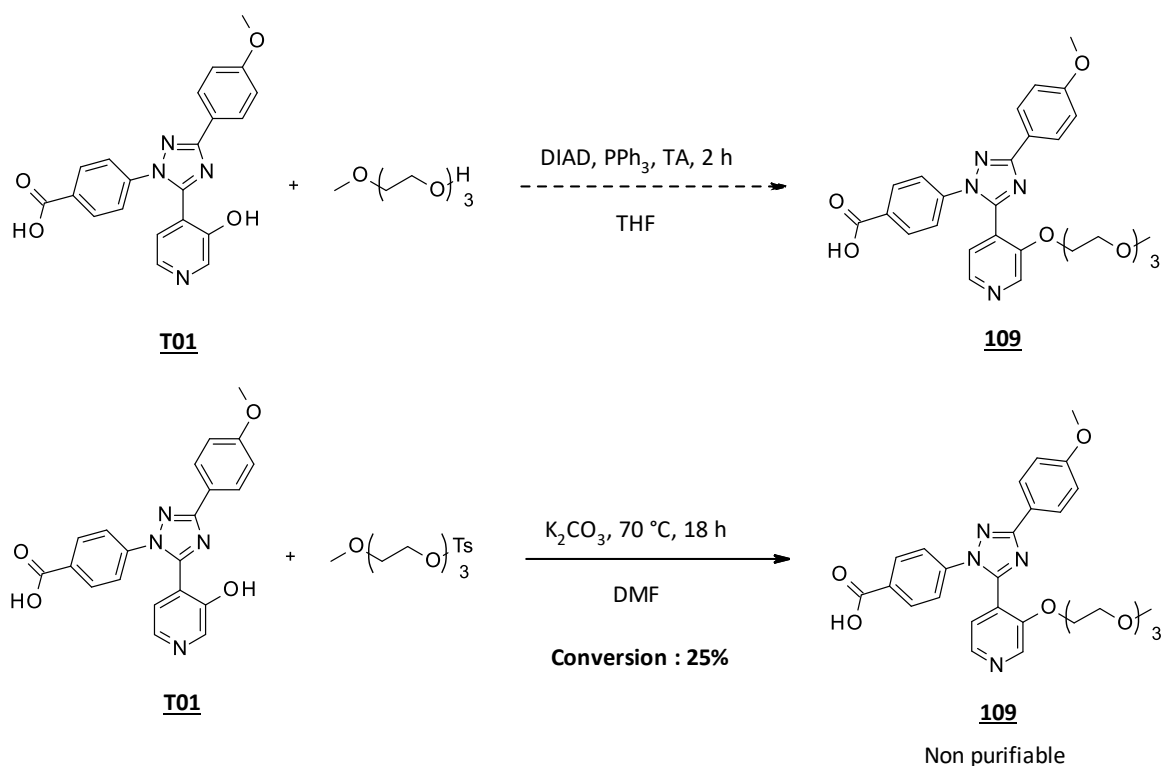


Schéma 2.31 : Introduction de la chaîne TEG sur le triazole **T01**.

Finalement, les 4 cycles aromatiques composant les 1,2,4-triazoles trisubstitués sont un frein à cette solubilisation car ils sont peu lipophiles et il y a de fortes probabilités que des interactions de type π -stacking intermoléculaires empêchent la solubilisation. Nos essais visant à optimiser la solubilité des structure triazoles n'ont pas donné les résultats envisagés même si d'autres voies auraient pu être tentées comme la quaternarisation de la pyridine avec un alkyle,^{117,118,119} l'insertion de groupement sulfate comme pour les cyanines, ou de chaîne PEG^{120,121} sur le phényle en 3 des triazoles.

Les CyDyes (cyanines hydrazines) commerciales utilisées pour la technique 2D-Oxi DIGE pour la détection des protéines carbonylées sont concentrées (avant utilisation) dans du DMSO à

¹¹⁷ Shapiro, S. L.; Weinberg, K.; Freedman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5140–5145.

¹¹⁸ Pernak, J.; Branicka, M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, *43*, 1966–1974.

¹¹⁹ Narang, U.; Zhao, C.; Bhawalkar, J.; Bright, F.; Prasad, P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *11*, 4521–4525.

¹²⁰ Oar, M. O.; Serin, J. M.; Dichtel, W. R.; Fréchet, J. M. *J. Chem. Mater.* **2005**, *17*, 2267–2275.

¹²¹ Nielsen, C.; Johnsen, M.; Arnbjerg, J.; Pittelkow, M.; McIlroy, S.; Ogilby, P.; Jorgensen, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7065–7079.

10 mM avant d'en ajouter 1 μ l de cette solution de cyanines aux échantillons. Par conséquent, le fait d'avoir les fluorophores dissous dans le DMSO n'est donc pas un frein à l'utilisation des sondes en 2D-Oxi DIGE. Les recherches menées sur l'optimisation de la solubilité ont donc été stoppées à ce stade car les triazoles sont solubles dans le DMSO. Cette étude sera continuée dans le cadre de l'utilisation des triazoles en tant qu'inhibiteur biologiques.

4. Propriétés optiques et fluorescence des 1,2,4-triazoles-1,3,5-trisubstitués : caractérisation et mise en évidence des propriétés photophysiques

Dans cette partie, nous allons détailler les résultats des mesures de fluorescence des 1,2,4-triazoles que nous avons synthétisés. Ces molécules possèdent deux formes tautomères énol et céto, qui interviennent dans un mécanisme de fluorescence type ESIPT. Pour rappel, lors de son passage à l'état excité la molécule sous sa forme énol passe sous sa forme tautomère céto et retourne à un état excité plus bas en énergie sous forme céto. La désexcitation de cette forme est plus basse en énergie que celle de la forme énol ce qui induit une longueur d'onde d'émission plus haute. Ce phénomène est appelé transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (ESIPT) qui entraîne un déplacement de Stokes plus large. Dans un premier temps, nous avons donc étudié le pKa du proton lié à l'ESIPT, puis la variation de la fluorescence selon le solvant de mesure. Enfin, nous avons complété la rationalisation des résultats avec une étude de modélisation théorique.

A. Etude du pKa du proton du fragment pyridol des 1,2,4-triazoles par mesure de fluorescence.

Tout d'abord, nous avons souhaité étudier le pKa du proton du groupement pyridol présent sur les triazoles car avec les résultats obtenus lors des expériences de discrimination triazoles-triazines, nous avons constaté que ce proton jouait certainement un rôle dans le mécanisme de fluorescence. Nous avons donc choisi deux triazoles pour cette analyse, le 3-

(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)-1H-pyridin-2-one **89** et le 4-(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)pyridin-3-ol **110** possédant un seul proton acide, celui du groupement pyridol. Pour rappel, la série 2-hydroxypyridine présente une forme tautomère 2-pyridone.

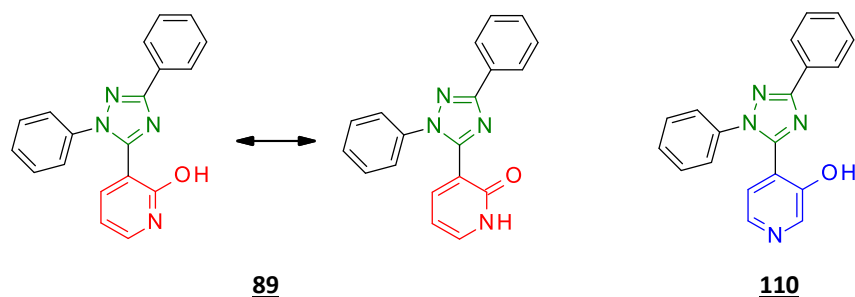


Figure 2.32 : Structure des triazoles **89** et **110** pour l'étude pH-métrique.

Les mesures ont été réalisées en milieu tampon aqueux sur une gamme de pH allant de 2.6 à 10.8. La gamme a été réalisée avec des solutions mères aqueuses d'acide citrique à 0,1M, de TRIS (2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) à 0,1M, de Na_2CO_3 à 0,1M et de Na_2HPO_4 à 0,2M. Ces mesures montrent que la fluorescence des composés varie selon le pH. Les composés **89** et **110** ont été excités à leur longueur d'onde d'excitation maximale, respectivement 333 nm et 269 nm. Pour le composé **89**, la longueur d'onde d'émission est modifiée à partir d'un pH de 10 (figure 2.33). La fluorescence varie peu en fonction du pH jusqu'au milieu à pH 10 pour lequel on a une légère baisse d'intensité et un déplacement du maximum d'émission de 392 nm à 400 nm. Dans un milieu à pH 10,8, la longueur d'onde d'émission se déplace encore jusqu'à 411 nm. Avec ces résultats, on peut postuler que le pKa du proton du triazole **89** se situerait entre 9 et 10.

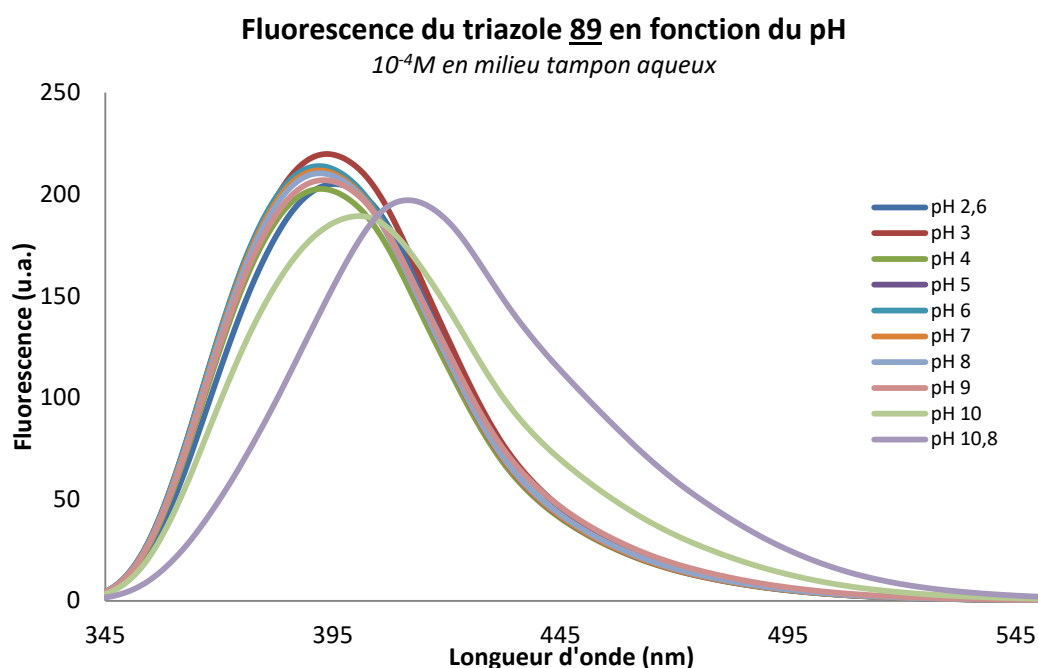


Figure 2.33 : Spectres de fluorescence du triazole 89 en milieu tampon pH 2,6 à pH 10,8.

La fluorescence de la structure 110 est quant à elle modifiée en fluorescence avec deux « groupes » de courbes, on remarque que pour un pH supérieur à 7, la fluorescence est 5 fois plus intense (figure 2.34). En outre, l'intensité de fluorescence commence à augmenter à partir des milieux à pH 4 et pH 5. Enfin, lorsque le milieu atteint un pH de 9, l'intensité de fluorescence ne varie plus et on peut considérer que nous avons uniquement la forme basique du triazole 110. Il est à noter que cette variation d'intensité démontre d'une part que le proton joue bien un rôle dans le mécanisme de fluorescence et d'autre part que c'est très probablement un mécanisme à transfert de charge ESIPT ou ICT selon la forme acide ou basique. On peut évaluer le pKa du proton du 3-pyridol entre 4 et 5 (zone pH = pKa) ce qui correspond au pKa des protons intervenant dans un mécanisme type ESIPT.¹²²

¹²² Barman, S.; Mukhopadhyay, S. K.; Gangopadhyay, M.; Biswas, S.; Dey, S.; Singh, N. D. P. *J. Mat. Chem. B* **2015**, *3*, 3490–3497.

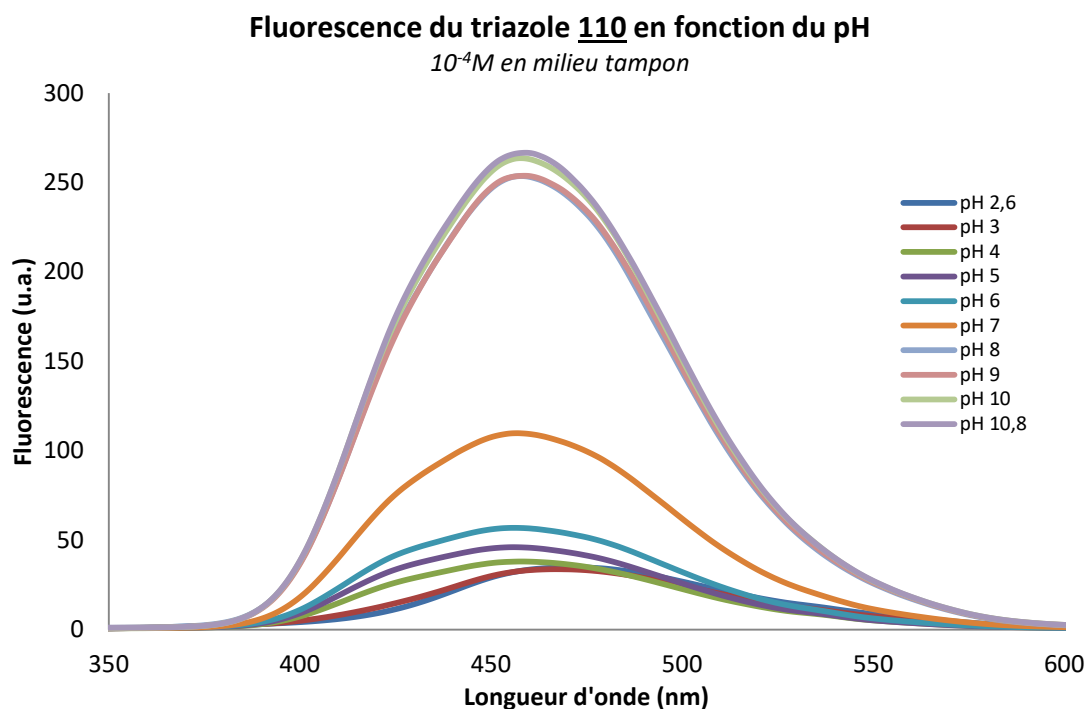


Figure 2.34 : Spectres de fluorescence du triazole 110 en milieu tampon pH 2,6 à pH 10,8.

Pour définitivement conclure sur un mécanisme de fluorescence de type ESIPT, il a été choisi d'effectuer des mesures optiques dans plusieurs solvants de polarités distinctes car l'ESIPT est perturbé par la nature du solvant, comme expliqué dans le premier chapitre.

B. Variation de la fluorescence en fonction du solvant : validation du mécanisme de type ESIPT

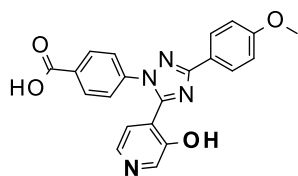
Une liaison hydrogène existerait entre la fonction hydroxyle de la fonction pyridol et l'azote en position 4 du triazole ce qui est décrit dans la littérature pour des hétérocycles azotés similaires comme les triazines,⁶⁶ les triazoles,¹²³ les thiazoles¹²⁴ et les imidazoles.¹²⁵ Pour valider cette hypothèse, les propriétés de fluorescence ont été mesurées à partir d'une bibliothèque de 15 triazoles judicieusement sélectionnés parmi toutes les structures obtenues ces 4 dernières années. Pour mener cette étude, certains triazoles possèdent un

¹²³ Bian, G-F.; Guo, Y.; Zhang, C. *Journal of Molecular Structure*, **2016**, 1111, 1-8.

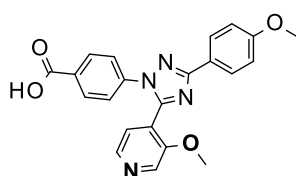
¹²⁴ LeGourriérec, D. ; Kharlanov, V. A. ; Brown, R. G. ; Rettig, W. J. *Photochem. Photobio.* **2000**, 130, 101-111.

¹²⁵ Park, S.; Kwon, O-H.; Kim, S.; Park, S.; Choi, M-G.; Cha, M.; Park, S. Y.; Jang, D-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10070-10074.

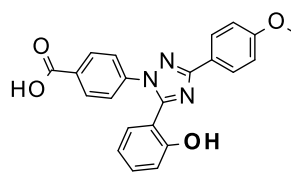
groupement pyridol, d'autres possèdent un groupement phénol et 3-methoxypyridine afin de mesurer d'une part l'influence de la liaison hydrogène entre le proton de la fonction hydroxyl et l'azote en position 4 du triazole et d'autre part l'influence du noyau pyridine (vs phénol) sur le mécanisme de fluorescence.



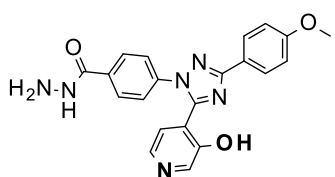
T01



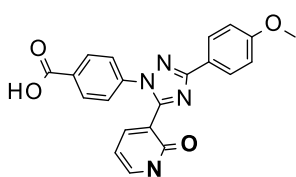
T02



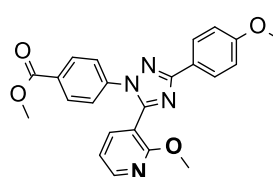
T03



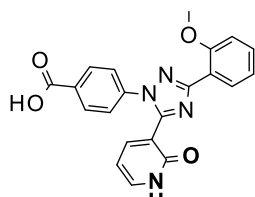
T04



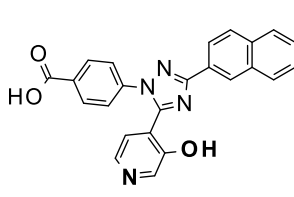
T05



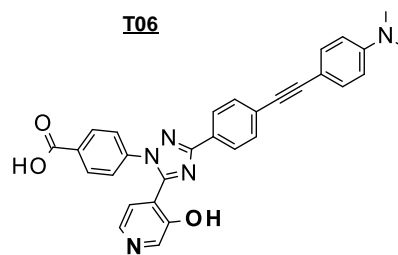
T06



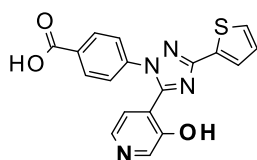
T07



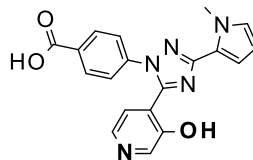
T08



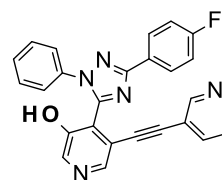
T09



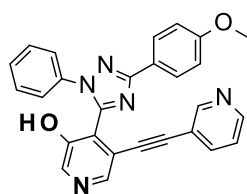
T10



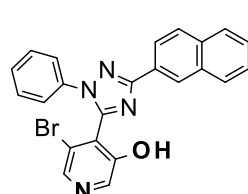
T11



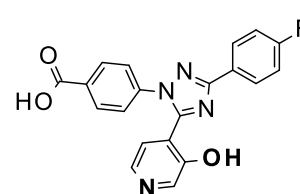
T12



T13



T14



T15

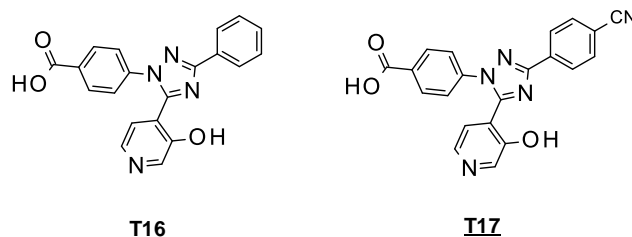


Figure 2.35 : Bibliothèque des triazoles **T01-T17** sélectionnés pour l'étude de la fluorescence.

Nous avons pu mettre ce phénomène en évidence en provoquant la perturbation de l'ESIPT et en modifiant la polarité du solvant utilisé pour les mesures de fluorescence. Nous avons fait les essais dans 4 solvants différents : l'acétonitrile (polaire, $\epsilon = 36,6$),¹²⁶ l'éthanol (polaire/protique, $\epsilon = 24,6$), le dichlorométhane (peu polaire, $\epsilon = 9,08$) et l'eau (polaire, $\epsilon = 78,5$).

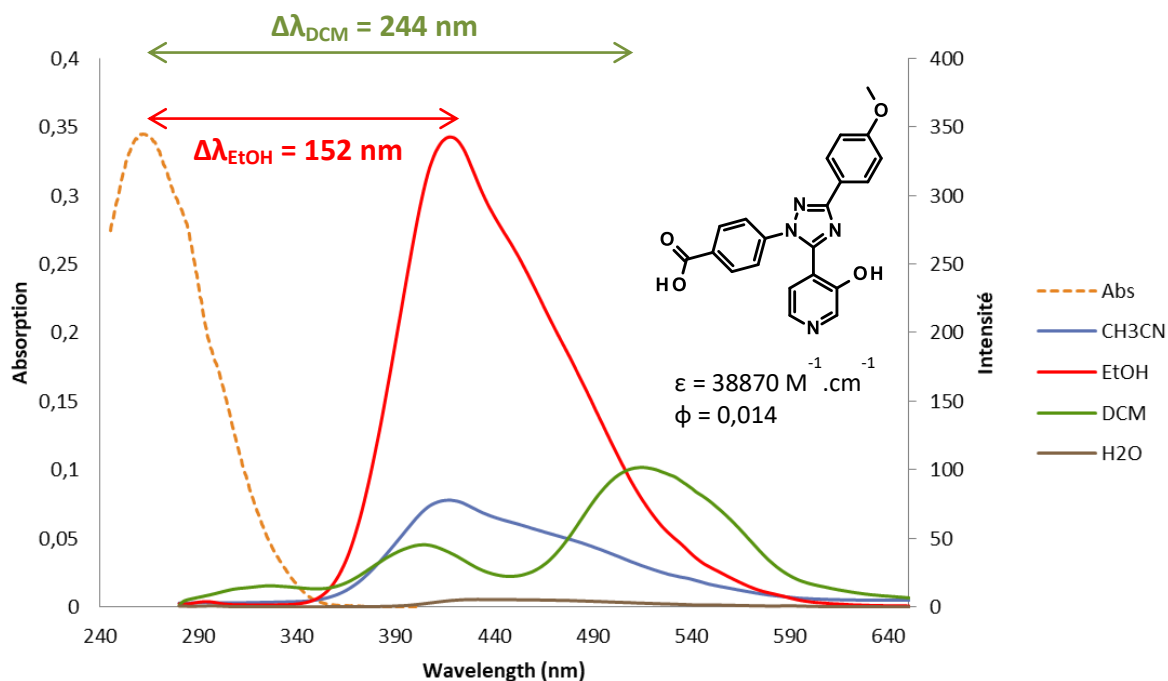
a. Variations des propriétés de fluorescence des 1,2,4-triazoles en fonction du solvant

Avec toutes ces analyses optiques, une tendance générale a été observée en fonction du milieu de mesure. De façon générale, pour une structure donnée, (voir schéma 2.36 ci-dessous pour le triazole **T01**) on enregistre des spectres de fluorescence avec une seule longueur d'onde d'émission dans l'acétonitrile et l'éthanol entre 370 nm et 420 nm. Les maxima sont généralement distant de quelques nm (<10 nm) selon le milieu et les allures des spectres sont identiques. L'intensité de fluorescence varie selon le milieu mais est généralement plus forte dans l'éthanol (figure 2.39).

D'autre part, en milieu peu polaire comme le DCM, on observe deux longueurs d'onde d'émission, une bande dans la zone des 380 – 420 nm comme pour l'acétonitrile et l'éthanol, et une seconde bande majoritaire vers les 500 nm. L'écart entre les deux bandes est d'environ 100 nm. Il existe 3 exceptions à ce phénomène de double bande, les triazoles **T02** (avec un fragment 3-méthoxypyridine), **T05** (avec un fragment 2-pyridone) et **T06** (avec un fragment 2-méthoxypyridine). Ces particularités font l'objet d'un étude dans la prochaine partie.

¹²⁶ Vogel, A.I., Tatchell, A.R., Furnis, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., 1989, *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 5th Edition, UK, 1514.

Enfin, dans l'eau, la fluorescence de la majorité des triazoles est neutralisée. Il existe cependant quelques exceptions comme les triazoles **T04** (possédant une fonction hydrazide et un fragment 3-pyridol), **T09** (avec un fragment ethynyl-4-diméthylaminophényl) et **T15** (avec un fragment 4-fluorophényl) dont on retrouve une faible intensité de fluorescence.



Mesures effectuées à 10^{-5} M. Coefficient d'absorption molaire (à 270 nm) et rendement quantique mesurés dans l'acétonitrile.

Figure 2.36 : Spectres d'absorption (acétonitrile) et de fluorescence du triazole **T01** en fonction des solvants.

Les spectres présentés ne sont pas normalisés et les intensités relatives entre les fluorescence dans les solvants du composé **T01** sont représentatives des données optiques des autres triazoles (figure 2.36). De part cette tendance spectrale et de la structure des triazoles à fragment pyridol, nous avons émis l'hypothèse que nous étions en présence d'un mécanisme type ESIPT (détaillé dans le chapitre I). Un autre facteur venant confirmer cette hypothèse est le faible rendement quantique mesuré à 1,4% dans l'acétonitrile pour **T01**, une valeur que l'on retrouve généralement pour ce type de phénomène.

Nous avons tenté de rationaliser ces résultats et déduit plusieurs informations. Le caractère polaire et/ou protique du solvant influence l'ESIPT car il existe des liaisons hydrogènes

intermoléculaires qui empêche le proton du pyridol de s'engager pour faire un ESIPT (figure 2.37).

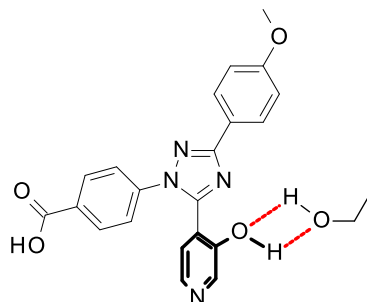
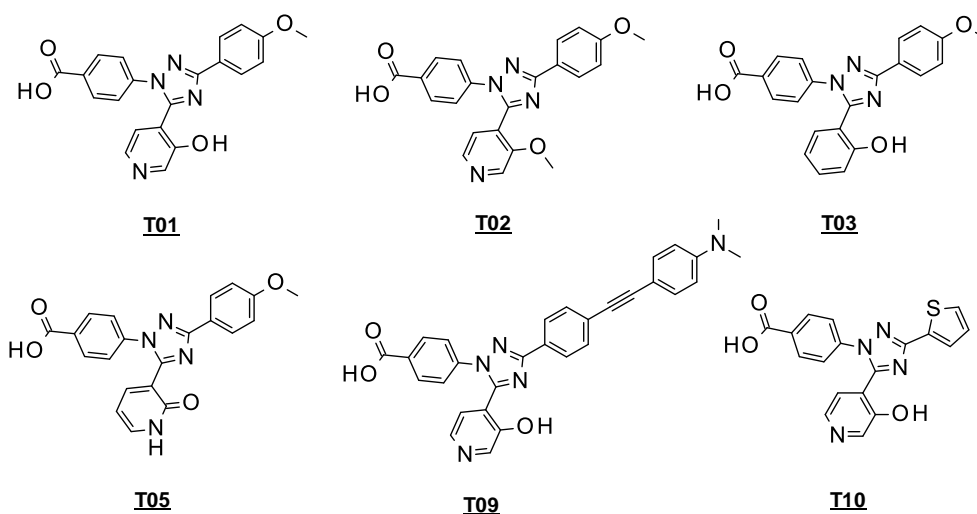


Figure 2.37 : Représentation schématique des interactions intermoléculaires avec l'éthanol.

D'autre part, le DCM étant moins polaire, le proton du pyridol de la forme énol peut effectuer le transfert sur l'azote du triazole et ainsi permettre une émission majoritaire vers 500 nm de la forme tautomère céto. Ce qui génère l'émission duale, une émission de la forme énol et une émission de la forme céto.

On peut supposer que dans un milieu totalement apolaire comme le cyclohexane, on observerait majoritairement la seconde bande de la forme céto. Malgré cette hypothèse, les mesures dans le cyclohexane n'ont pu être réalisées car la solution mère de chaque triazole (à 10^{-3} M) est faite dans le DMSO qui n'est pas miscible avec le cyclohexane.

Par la suite, nous avons souhaité expliquer les différences d'émission observées (duale ou unique) entre nos différents triazoles. Pour cela, nous avons repris l'étude de nos 12 structures **T01** à **T17**, incluant des variations de fonctions sur les groupements aryles en position 3 du triazole et avec différents noyaux aromatiques en position 5.



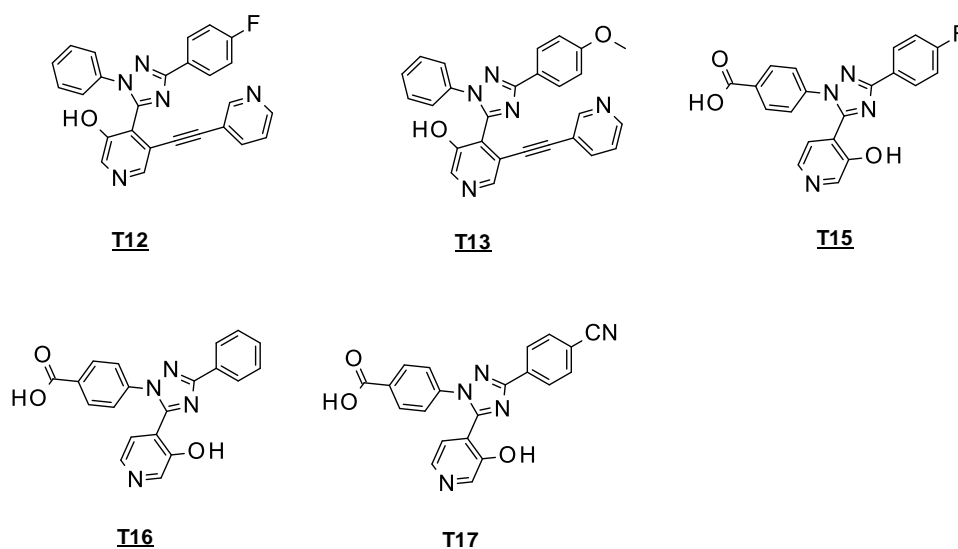
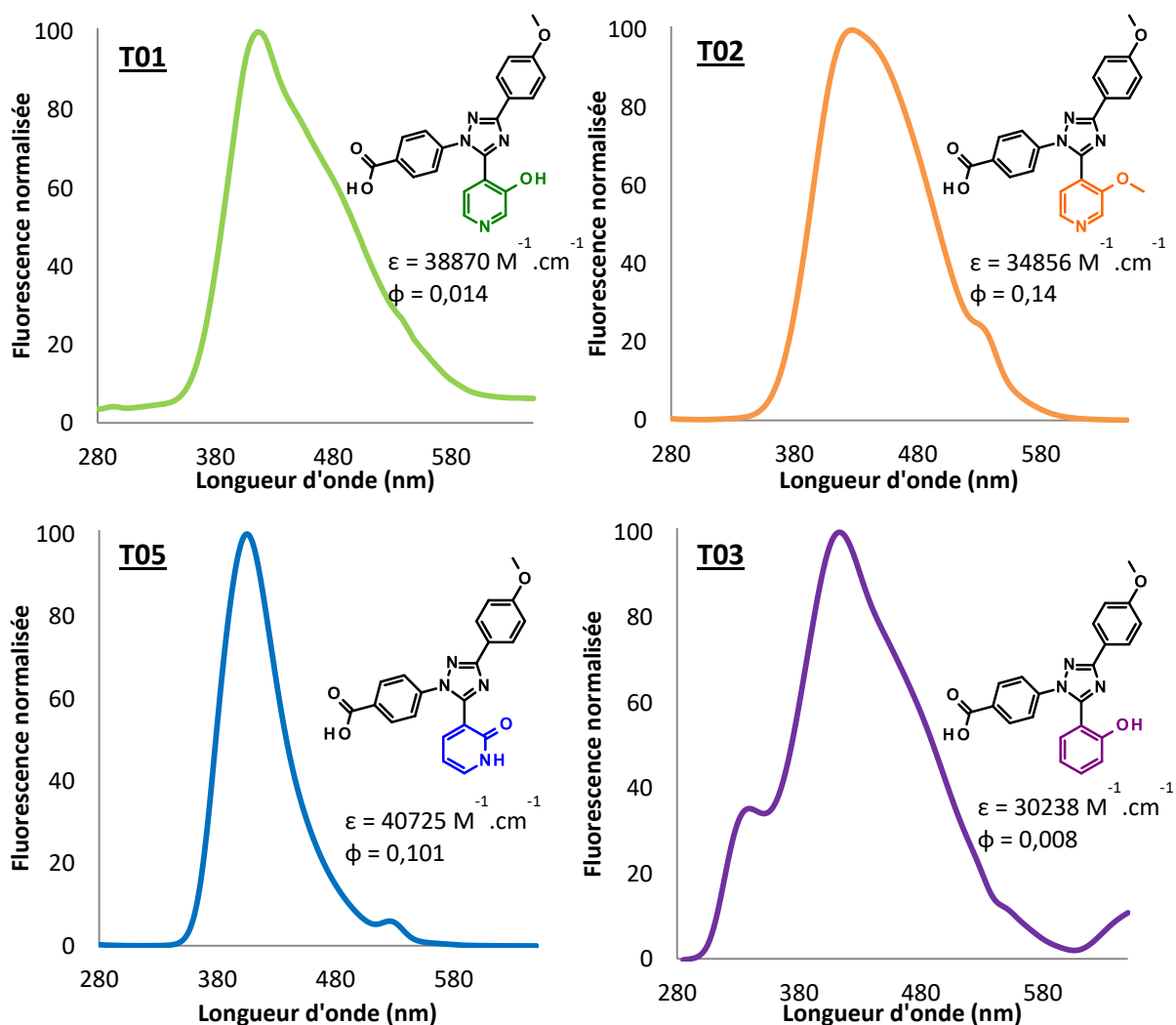


Figure 2.38 : Chimiothèque des triazoles d'intérêt pour l'étude mécanistique de la fluorescence.

Tous les spectres (absorption, excitation et émission) de tous les triazoles sélectionnés (figure 2.38) pour les études de fluorescence sont disponibles en annexes.

b. Modifications du fragment hydroxypyridine : effet sur les propriétés de fluorescence dans l'acétonitrile

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur les spectres des triazoles **T01**, **T02**, **T03**, et **T05**. En faisant varier la structure du motif aromatiques en position 5 des triazoles (phénol, 3-methoxy pyridine et 3-pyridol), nous avons constaté des différences de fluorescence dans les différents milieux. Dans l'acétonitrile, on retrouve une seule bande d'émission, similaire pour les 4 triazoles.



Mesures effectuées à 10^{-5} M dans l'acétonitrile.

Figure 2.39 : Spectres de fluorescence des triazoles **T01**, **T02**, **T03**, et **T05** dans l'acétonitrile.

Les longueurs d'onde d'émission sont respectivement de 422 nm, 423 nm, 412 nm et 405 nm pour les molécules **T01**, **T02**, **T03**, et **T05**. Il n'y a pas de variations de fluorescence dans l'acétonitrile, les composés émettent tous dans la même zone. Cette bande peut être attribuée à une transition électronique $\pi\text{-}\pi^*$ du noyau triazole.¹²⁷

Les coefficients d'extinction molaire sont compris entre $30000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $40000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ce qui implique qu'ils absorbent beaucoup moins la lumière que les CyDyes commerciales ($>100000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).¹²⁸ En revanche, ces coefficients sont relativement bons pour ce type de mécanisme car ils sont généralement compris entre $7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $60000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nous avons aussi mesuré les rendements quantiques de ces molécules dans l'acétonitrile par

¹²⁷ Xu, L.; Guo, G.; Liu, B.; Fu, M.; Huang, J. *Acta Cryst.* **2004**, *60*, 1060-1062.

¹²⁸ Cyanines dyes, www.lumiprobos.com, 2018.

comparaison avec la quinine sulfate ($\phi = 0,54$).¹²⁹ Ces rendements sont faibles pour des molécules fluorescentes, on mesure respectivement des valeurs de 1,4%, 14%, 0,8% et 10,1% pour **T01**, **T02**, **T03**, et **T05**. Pour cet ordre de grandeur de longueurs d'onde d'émission, les rendements quantiques devraient être supérieurs sauf en cas de mécanisme de type ESIPT.

Comme nous l'avons expliqué précédemment les interactions intermoléculaires entre le proton et le solvant polaire, défavorise le transfert de proton intramoléculaire. Ceci est aussi provoqué par la géométrie de la molécule car l'angle dièdre est de 83° (d'après les calculs théoriques réalisés par Sehr Nasseem-Kahn du LCT), or le transfert de proton ne peut s'effectuer que lorsque la molécule est plane. Les solvants polaires protiques solvatent la molécule et particulièrement la fonction alcool réduisant la possibilité d'obtenir un conformère plan lors de l'excitation.

Pour conclure sur la nature du mécanisme, nous allons maintenant développer les résultats concernant les mesures effectuées dans un solvant moins polaire, le DCM.

b. Modifications du fragment hydroxypyridine : effet sur les propriétés de fluorescence dans le dichlorométhane

Les spectres de fluorescence des hétérocycles **T01**, **T02**, **T03**, et **T05** ont été réalisés dans le DCM (figure 2.40). Les 4 analogues triazoles sont identiques au niveau des groupements présents en position 1 et 3 du triazoles mais diffèrent au niveau du substituant en 5.

¹²⁹ Melhuish, W.H. *J. Phys. Chem.* **1961**, 65, 229–235.

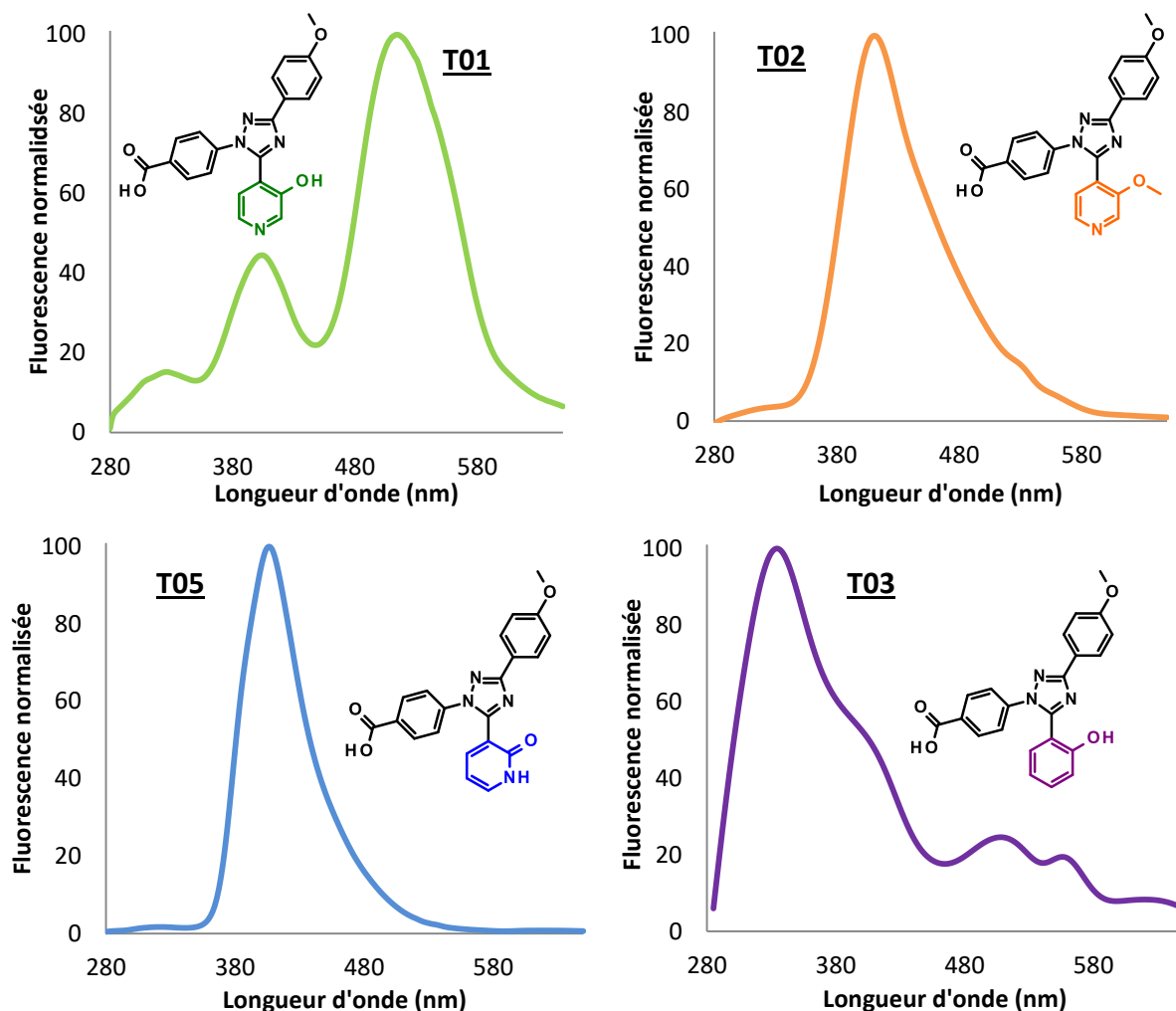


Figure 2.40 : Spectres de fluorescence des triazoles **T01**, **T02**, **T03**, et **T05** dans le DCM.

Pour le triazole **T01**, notre référence, nous observons deux bandes d'émission : une à 404 nm l'autre à 514 nm. Par la suite, on peut remarquer que lorsque l'on modifie la fonction alcool par une fonction éther méthylique, on retrouve la transition π - π^* à 410 nm pour le fluorophore **T02**. Ne possédant plus de proton disponible pour observer un ESIPT, la bande d'émission vers les 510 nm n'est pas présente. Finalement, les spectres du triazole **T02** dans les différents solvant de mesure sont très similaires.

D'autre part, si on modifie la position de l'azote de la pyridine, c'est à dire si on remplace un motif 3-pyridol (**T01**) par un 2-pyridol (**T05**), on remarque la disparition de la seconde bande présente à 500 nm. De plus, d'après nos observations, le triazole **T05** ne semble pas être solvatochromique contrairement aux triazoles possédant un motif 3-pyridol. Ce composé ne présente donc qu'une seule forme tautomère quel que soit le solvant. En revanche, sa fluorescence est neutralisée dans l'eau.

Enfin, le spectre d'émission du triazole à substrat phénol **T03** montre une bande d'émission majoritaire à 334 nm, bien plus basse que la longueur d'onde d'émission obtenue dans l'acétonitrile à 412 nm. Au vu de ces résultats, on peut supposer qu'il y a bien un phénomène d'ESIPT pour ce triazole mais la forme énol est majoritaire car sa relaxation est peut être plus rapide que le transfert de proton. La bande majoritaire observée à 334 nm est issue de l'émission de la forme énol et ceci peut s'expliquer par un ESIPT cette fois plus lent que l'émission de la forme énol.

A la lumière de ces résultats, on peut affirmer que la fonction pyridol est essentielle pour obtenir le phénomène d'ESIPT et les propriétés particulières en fluorescence qui en découle. En tenant compte des études pH-métriques de la partie précédente, nous pouvons conclure que la fonction pyridine augmente l'acidité du proton de la fonction alcool. Grâce à cela, l'ESIPT peut être observé dans le DCM pour les triazoles à fragment 3-pyridol. La structure RX du 4-[5-(2,4-diméthoxyphényl)-2-phényl-1,2,4-triazol-3-yl]pyridin-3-ol **111**, à l'état fondamental, montre que le fragment 3-pyridol est plan avec le noyau triazole et nous confirme la présence d'une liaison hydrogène interatomique N-H de 1,841 Å (figure 2.41).

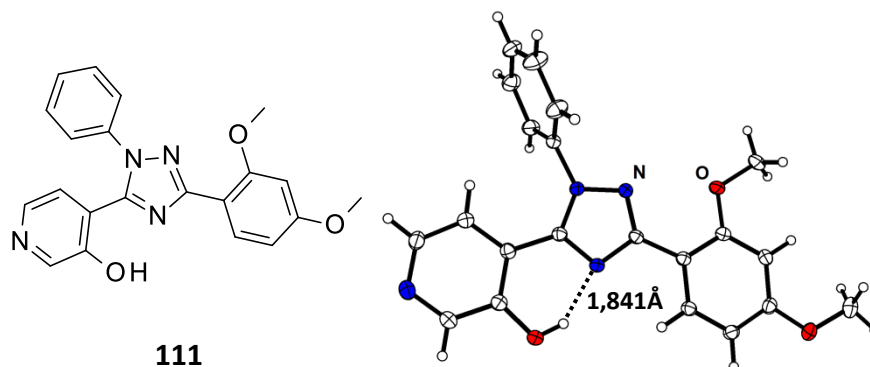


Figure 2.41 : Structure RX du triazole **111**.

Notons aussi, que l'absence de double bande pour le triazole **T05** provient de l'unique forme 2-pyridone que l'on observe à l'état fondamental et non de la forme 2-pyridol. Cette hypothèse a été confirmée grâce à l'analyse par RX du 3-(3-(4-méthoxyphényl)-1-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)pyridin-2(1H)-one **112**. Les molécules **111** et **112** ont été synthétisées récemment par le Dr B. Bertrand lors de son stage postdoctoral en 2018 dans l'équipe (figure 2.42).

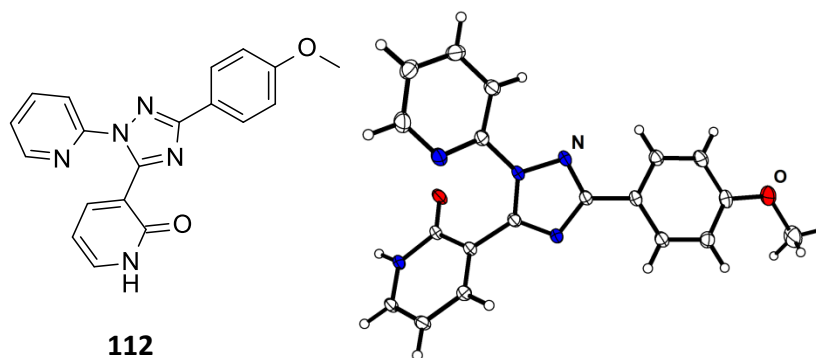


Figure 2.42 : Structure RX du triazole **112** : forme pyridone à l'état fondamental de la série 3.

c. Les spectres d'excitations : outils prouvant la présence de plusieurs formes d'une molécule

Nous avons abordé la différence entre les spectres d'absorption et d'excitation. Le spectre d'absorption d'une molécule montre l'ensemble des longueurs d'ondes pour lesquelles une molécule absorbe la lumière. Dans le cas où il existe plusieurs formes pour une entité, il est possible de mesurer un spectre d'excitation par entité.

Dans le DCM, nous observons une bande d'émission par forme tautomère, nous pouvons donc vérifier grâce à la mesure des deux spectres d'excitation (une pour chaque bande d'émission) la présence physique des deux formes. Nous avons donc pu obtenir les spectres pour le triazole **T16** possédant un fragment 2-pyridone (figure 2.43) et **T17** (en annexe) possédant un fragment 3-pyridol. On peut remarquer que les maxima d'excitation ne sont pas confondus, on mesure respectivement 276 nm et 260 nm pour les formes énol et céto. Si les deux spectres ne sont pas superposables c'est que nous sommes en présence de deux formes d'une même entité ce qui apporte une preuve supplémentaire pour un mécanisme type ESIPT.

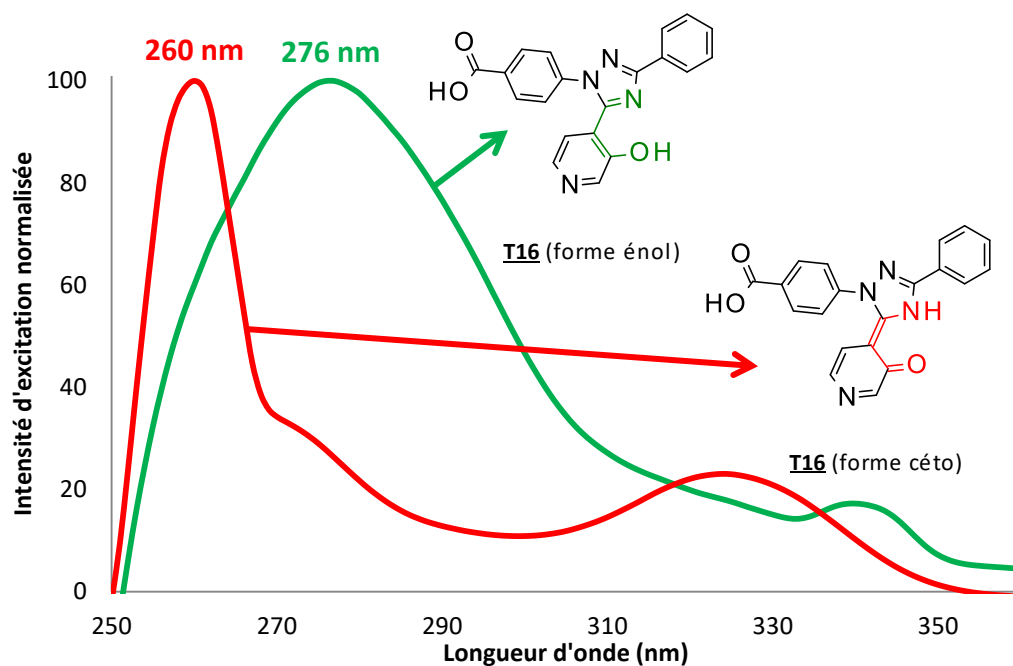


Figure 2.43 : Spectres d'excitation du triazole **T16**.

En fixant l'émission à 377 nm en vert et en fixant l'émission à 515 nm en rouge.

Dans la prochaine sous-partie, nous allons aborder l'influence des aryles substitués par des groupements de différentes natures électroniques (activants ou désactivants).

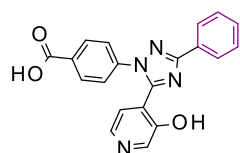
d. Influence du fragment aromatique en position 3 des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués sur les propriétés de fluorescence

Pour déterminer l'influence du motif aromatique sur la position 3 des triazoles sur l'ESIPT, nous allons comparer les spectres d'émission des molécules **T01**, **T09**, **T10**, **T15**, **T16** et **T17**. Nous avons introduit des cycles aromatiques non substitués (**T16**), avec fonctions électro-donneuses (**T01**, **T09** et **T10**) et électro-attractrices (**T15** et **T17**).

Les spectres de fluorescence dans l'acétonitrile présentent pour tous les triazoles une émission majoritaire entre 350 nm et 415 nm. On remarque que les maxima d'émission des structures **T15**, **T16** et **T17** sont respectivement de 377 nm, 378 nm et 372 nm (figure 2.44). La substitution avec des groupements attracteurs fluor, ou nitrile ne modifie pas la fluorescence vis-à-vis d'un cycle non substitué. Par contre, la présence d'un groupement thiényle ou méthoxy apporte un effet bathochromique sur le spectre. Nous supposons qu'avec ces substituants électrodonneurs, nous avons enrichi l'orbitale HOMO du triazole ce qui a pour effet de réduire la différence d'énergie entre HOMO et LUMO (GAP) et par

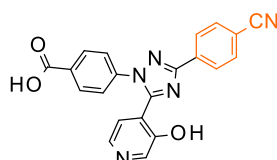
conséquent d'augmenter la longueur d'onde d'émission (voir chapitre I). Il est intéressant de noter que la transition $\pi\text{-}\pi^*$ attribuée précédemment au seul noyau triazole, proviendrait en réalité du motif aryle-triazole entier. Ces hypothèses seront discutées dans une prochaine partie consacrée à la rationalisation par calculs des résultats en fluorescence.

Finalement, l'introduction de conjugaison via un motif éthynyl-4-diméthylaminophényl sur le noyau triazole (**T09**) induit un déplacement de la longueur d'onde d'absorption à 365 nm et d'émission à 501 nm. Ce phénomène physico-chimique mettant en relation l'augmentation de la conjugaison avec un ou plusieurs motifs vinyl ou éthynyl induit une augmentation de la longueur d'onde d'émission d'environ 50 nm.^{130,131} On peut noter que les bandes d'émission majoritaires obtenues dans l'acétonitrile correspondent aux formes énol des 1,2,4-triazoles. Les rendements quantiques des triazoles sont faibles et compris entre 0,5% et 2,6% mais dans le cas d'un ESIPT, les rendements dépassent rarement les 15%.



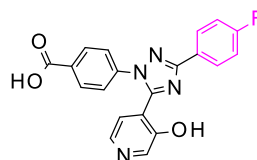
T16

$\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$
 $\epsilon = 12046 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 $\phi = 0,026$



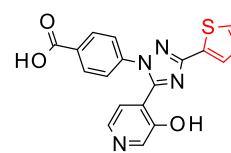
T17

$\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 372 \text{ nm}$
 $\epsilon = 30390 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 $\phi = 0,01$



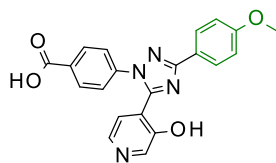
T15

$\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$
 $\epsilon = 22243 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 $\phi = 0,013$



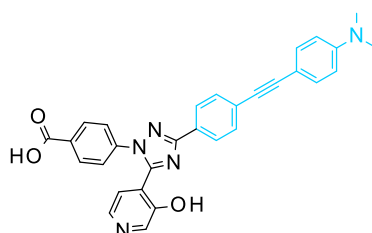
T10

$\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$
 $\epsilon = 35533 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 $\phi = 0,009$



T01

$\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 422 \text{ nm}$
 $\epsilon = 38870 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 $\phi = 0,014$

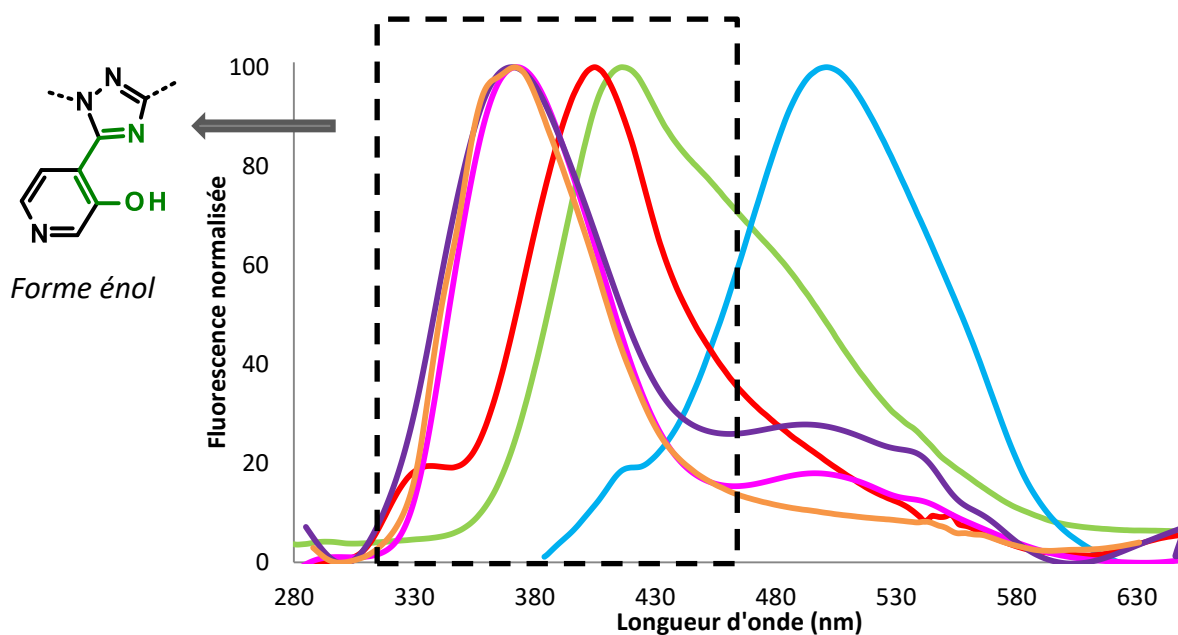


T09

$\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$
 $\epsilon = 38604 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 $\phi = 0,005$

¹³⁰ Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973-2011.

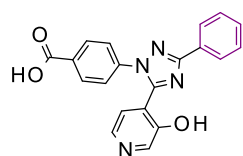
¹³¹ Strekowski, L.; Lipowska, M.; Patonay, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4578-4580.



Mesures effectuées à 10^{-5} M dans l'acétonitrile

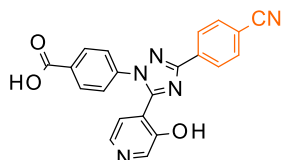
Figure 2.44 : Influence du substrat aromatique en position 3 sur la fluorescence de l'acétonitrile.

Dans le DCM, si on compare les spectres des molécules **T01**, **T09**, **T10**, **T15**, **T16** et **T17**, on remarque que toutes les longueurs d'onde d'émission vers les 400 nm sont devenues minoritaires vis-à-vis de la nouvelle bande majoritaire vers les 500 nm (figure 2.45). Ces nouvelles bandes d'émission correspondent aux formes céto des états excités. Ainsi nous avons une augmentation du déplacement de Stokes d'environ 100 nm en moyenne pour tous les triazoles hormis le triazole **T09**. Il est important de constater que la longueur d'onde d'émission dans le DCM subit moins de variations en fonction des aryles en position 3 du triazole. Le caractère électronique de ce fragment n'influence pas l'ESIPT. Ce phénomène peut s'expliquer grâce aux représentations schématiques des HOMO-LUMO qui seront présentées dans la prochaine partie. Pour l'instant, nous postulons que les HOMO-LUMO ne sont pas impactées par la substitution en 3 car l'aryle ne contribue pas aux énergies des orbitales. Les résultats préliminaires des études théoriques semblent confirmer cette hypothèse.



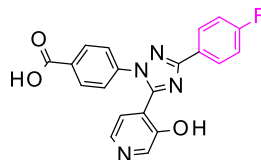
T16

$\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$



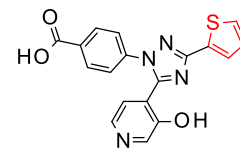
T17

$\lambda_{ex} = 278 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$



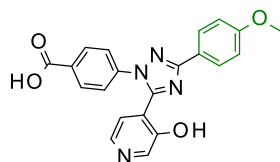
T15

$\lambda_{ex} = 270 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$



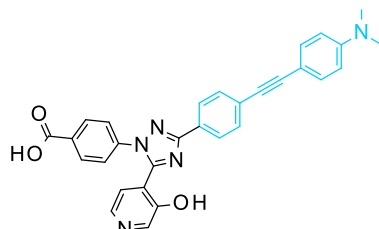
T10

$\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 516 \text{ nm}$



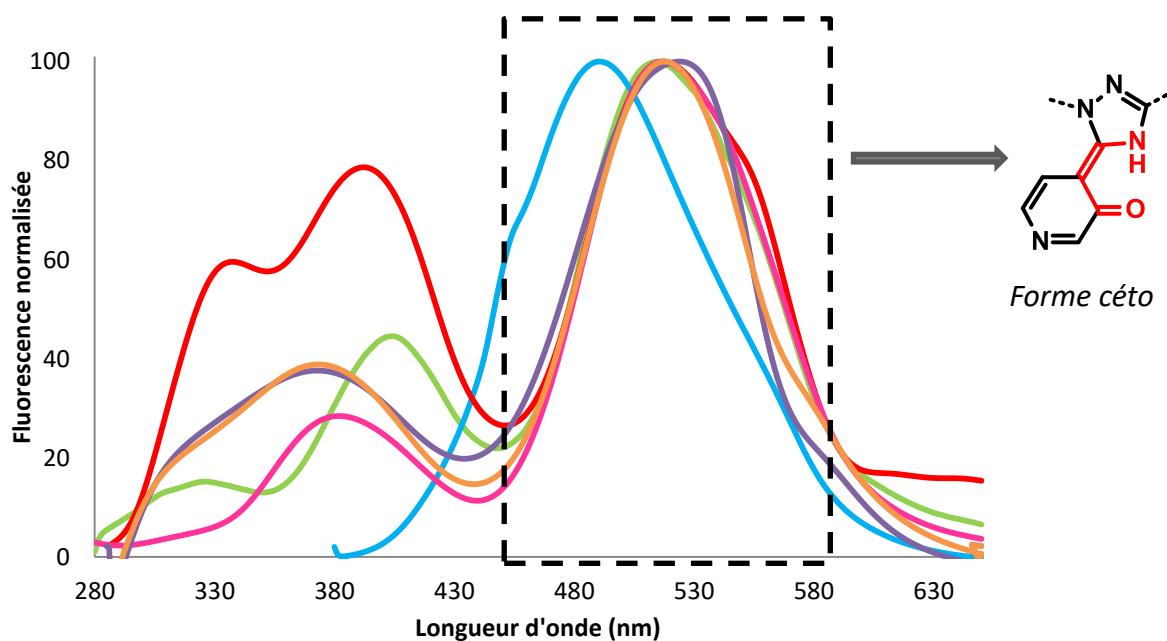
T01

$\lambda_{ex} = 270 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$



T09

$\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = 490 \text{ nm}$

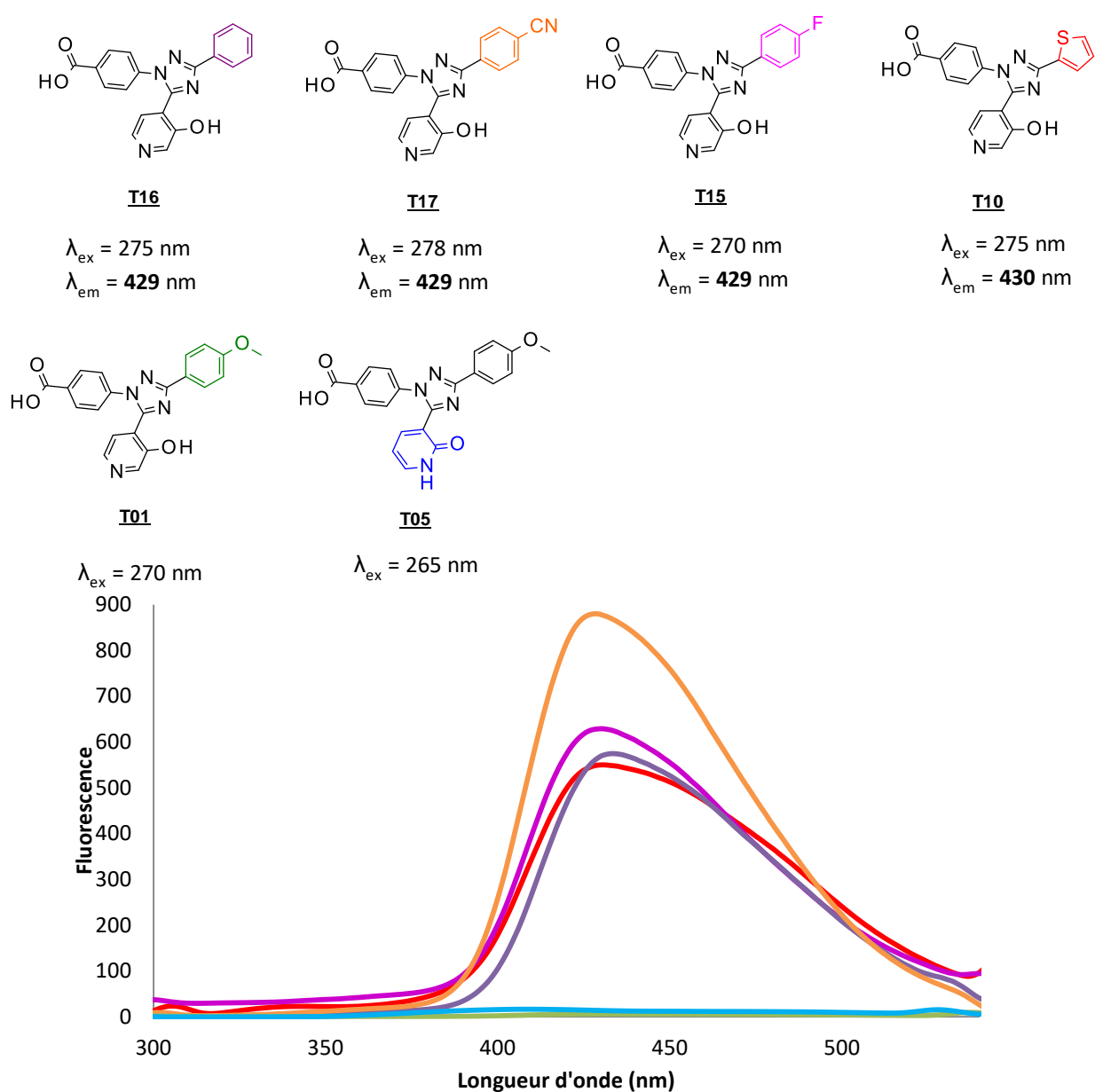


Mesures effectuées à 10^{-5} M dans le DCM

Figure 2.45 : Influence du substrat aromatique en position 3 sur la fluorescence dans le DCM.

e. Neutralisation de la fluorescence des 1,2,4-triazoles en milieu aqueux

Dans l'eau, on observe une neutralisation de la fluorescence mais elle reste faiblement détectable dans la plupart des cas. La longueur d'onde d'émission est différente dans l'eau, elle ne correspond à aucune des longueurs d'ondes d'émission dans les solvants organiques. La bande d'émission se situe entre celle des deux formes tautomères vers les 430 nm (figure 2.46). Le pH de l'eau distillée est de 5,8 donc nous avons la forme déprotonée des triazoles ce qui induit une augmentation de la fluorescence dans le cas des triazoles avec un fragment 3-pyridol (voir partie 4.A). Ce phénomène ne semble se produire que dans le cas des triazoles possédant un motif phényle non substitué ou avec des substituants attracteurs, ou avec le thiophène.



Mesures effectuées à 10^{-5} M dans l'eau

Figure 2.46 : Spectres de fluorescence des triazoles **T10**, **T15**, **T16** et **T17** dans l'eau.

La structure RX du triazole **112** montre une interaction entre la fonction alcool et une molécule d'eau (figure 2.47). Ceci prouve les interactions intermoléculaires avec l'eau ce qui peut aussi donner lieu à des relaxations non radiatives. La viscosité de l'eau, par exemple, peut freiner les changements conformationnels, diminuant ainsi l'énergie de la fluorescence.¹³² D'autre part, la liaison hydrogène entre un proton d'une molécule d'eau et l'oxygène du 3-pyridol déprotoné empêcherait la charge négative d'intervenir dans la fluorescence. Ces hypothèses expliqueraient la neutralisation de la fluorescence dans l'eau.

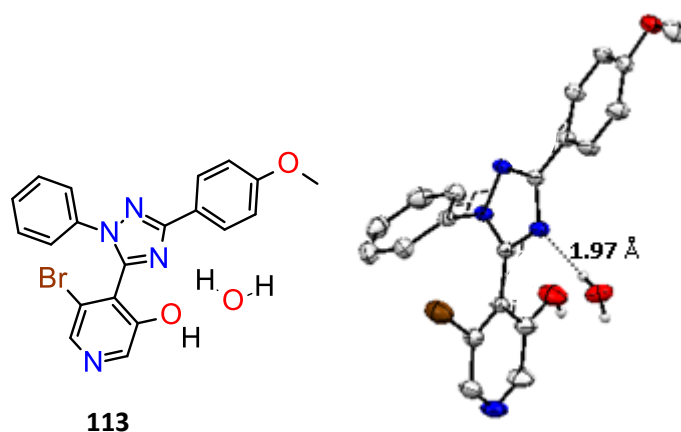


Figure 2.47 : Interactions du triazole **113** avec une molécule d'eau.

f. Cas particulier de la fluorescence des 1,2,4-triazoles à fragment 5-[2-(3-pyridyl)éthynyl]pyridin-3-ol

Sur la bibliothèque réduite de 1,2,4-triazoles (figure 2.38), nous allons aborder le cas des triazoles **T12** (figure 2.48) et **T13** (figure 2.49).

Il est important de remarquer que ces deux molécules présentent les meilleurs rendements quantiques de tous les hétérocycles que nous avons synthétisés de 20,1% et 20,3% pour respectivement **T12** et **T13**. Les coefficients d'absorption molaire, quant à eux, sont compris entre $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $29000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ils possèdent une capacité d'absorption plus faible que la moyenne des triazoles.

Deux bandes de fluorescence sont présentes sur tous les spectres et dans tous les solvants organiques. L'intensité de fluorescence des bandes varie en fonction du milieu. La bande majoritaire devient celle à 510 nm dans l'éthanol. Le fragment 3-éthynylpyridine introduit de

¹³² Dobretsov, G. E.; Syrejschikova, T. I.; Smolina, N. V. *Biophysics* **2014**, 59, 183–188.

la conjugaison entre deux systèmes π , il est possible d'avoir de nouvelles délocalisations lors de la relaxation de la molécule. De plus, on remarque la même bande vers les 380 nm que pour son analogue **T15** possédant un fragment 4-fluorophényl et un fragment 3-pyridol.

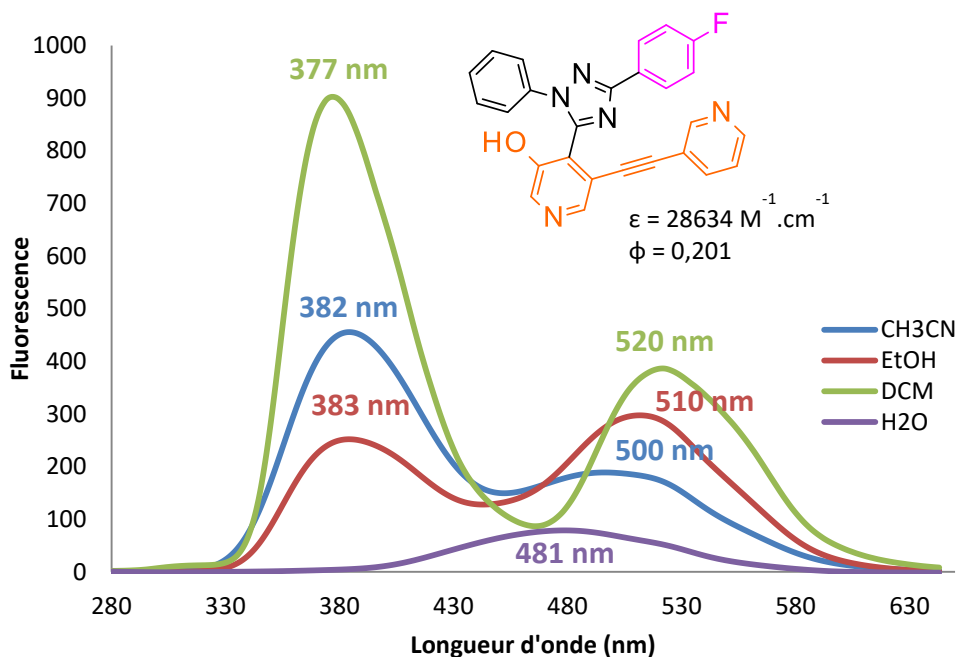


Figure 2.48 : Spectre de fluorescence du triazole **T12** dans les différents solvants.

De la même façon, dans le DCM, on retrouve la bande à 417 nm similaire à celle observée sur le spectre du composé **T01** (figure 2.36). Avec ces spectres, et ceux présentés ci-dessus, on peut considérer que la présence du motif 3-éthynylpyridine sur les triazoles **T12** et **T13** est responsable de la bande vers les 500 nm présentes dans tous les solvants. La présence d'une double bande dans ce cas pourrait provenir respectivement des deux motifs : 5-[2-(3-pyridyl)éthynyl]pyridin-3-ol et 4-fluorophényl-triazole. Cependant, les bandes d'émission correspondent à celles mesurées pour les formes énol et céto de l'ESIPT, il y a donc une possibilité que le fragment 3-éthynylpyridine induise une conformation favorisant l'ESIPT quel que soit le milieu organique.

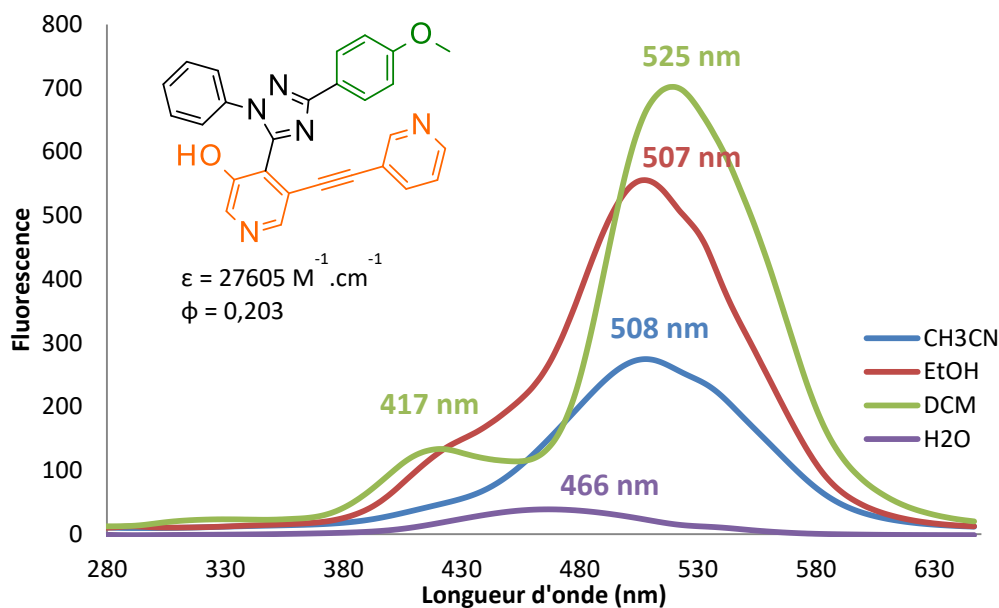


Figure 2.49 : Spectre de fluorescence du triazole **T13** dans les différents solvants.

En parallèle des mesures de fluorescence, nous avons collaboré avec des chercheurs du LCT (Laboratoire de Chimie Théorique) de Sorbonne Université pour rationaliser les propriétés expérimentales mesurées.

C. Rationalisation des résultats expérimentaux par comparaison entre analyses & calculs théoriques

a. Représentation schématique des orbitales moléculaires des 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués

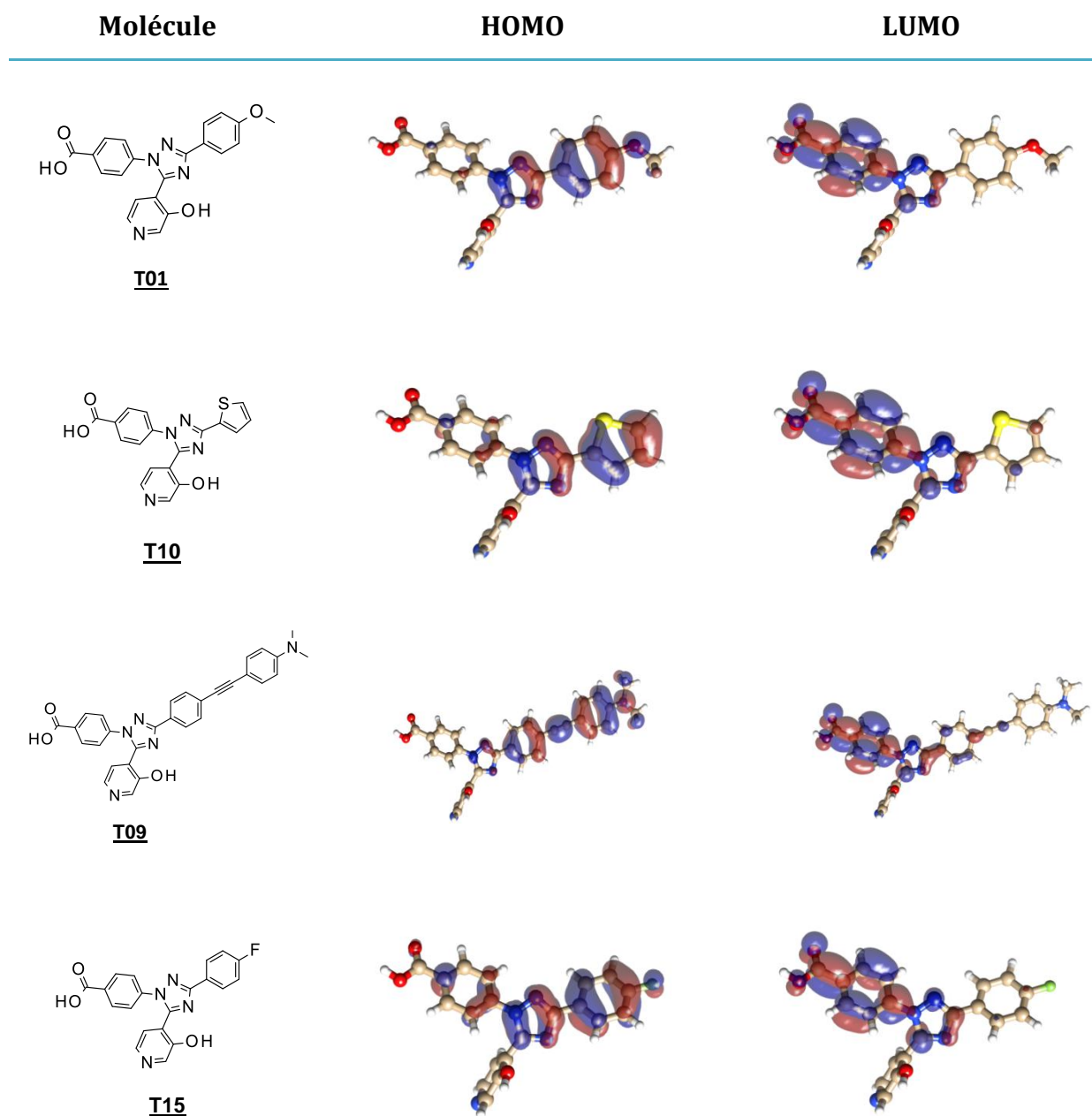
La collaboration avec le LCT a débuté après la synthèse des pyrido-oxazinones en 2014. Les premiers calculs se concentraient sur la modélisation des pyrido-oxazinones et de leurs spectres d'excitations théoriques. Au début du projet sur les 1,2,4-triazoles, nous avons proposé aux chercheurs du LCT de modéliser les orbitales S_0 (état fondamental) et S_1 (premier état excité) respectivement HOMO et LUMO de certains triazoles. Les études théoriques sont centrées sur l'état fondamental, c'est à dire la forme énol des triazoles car les calculs de modélisation des états excités ne convergent pas.

Les représentations schématiques des orbitales moléculaires qui sont présentées dans cette partie ont été calculées avec la DFT (*Density Functional Theory*) à base 6-31G+(d)/B3LYP. La DFT est basée sur le calcul de la densité électronique théorique des molécules et la fonctionnelle hybride B3LYP est une formule complémentaire permettant un calcul plus précis et plus proche des valeurs expérimentales. Les calculs ont été réalisés avec l'acétonitrile comme solvant.

Au début de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que les HOMO et LUMO étaient positionnés respectivement sur le cycle aromatique en 3 et sur le motif pyridol (toute série confondue). Cette hypothèse se basait sur l'idée que le transfert d'énergie pour la fluorescence s'effectuait entre l'aryle en 3 (grâce à son caractère électro-donneur) vers le pyridol en 5 (grâce à son caractère électro-attracteur). Ainsi, pour modifier la fluorescence, nous avons commencé par synthétiser des dérivés avec différents substituants aryles pour augmenter ou abaisser l'énergie de la HOMO.

Les schémas des orbitales de quelques triazoles obtenus après optimisation des structures sont présentés dans la figure ci-dessous (figure 2.50). Toutes les représentations des autres triazoles sont présentées quant à eux en annexes. Il est important de noter que toutes les orbitales HOMO sont bien centrées sur le cycle aromatique en position 3 et que toutes les orbitales LUMO sont centrées sur le fragment acide benzoïque en position 1. Ces informations expliquent pourquoi nous avons une variation sur les longueurs d'ondes d'émission dans l'acétonitrile en fonction du caractère donneur ou attracteur des substituants sur le cycle aryle en position 3.

Les calculs ont montré que le noyau triazole était dans le même plan que le cycle aromatique en position 3 du triazole. On retrouve un angle dièdre entre le triazole central et le fragment pyridol de 83°. Dans ce cas, il n'y a pas d'ESIPT puisque le proton de la fonction alcool distant de plus de 2Å de l'atome d'azote de la fonction triazole, ce qui expliquerait les caractéristiques de fluorescence enregistrées dans l'acétonitrile (unique bande d'émission).



DFT - 6-31G+(d)/B3LYP dans l'acétonitrile – solvant implicite

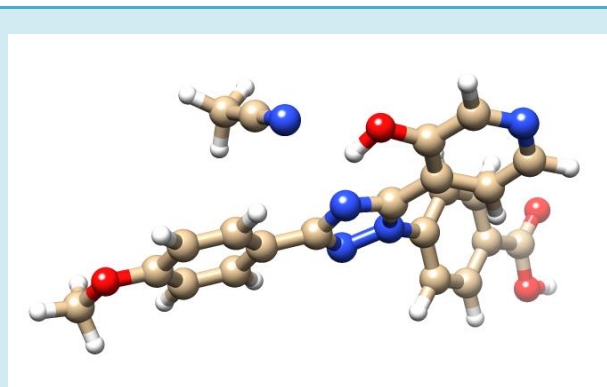
Figure 2.50 : Représentations schématiques de orbitales HOMO-LUMO des 1,2,4-triazoles **T01**, **T10**, **T09** et **T15**.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les calculs sont effectués dans l'acétonitrile en tant que solvant implicite, c'est-à-dire qu'on utilise la valeur de la constante diélectrique du solvant pour modéliser un champ électrostatique autour de la molécule. En revanche, une modélisation en solvant explicite obligerait la modélisation réelle des molécules de

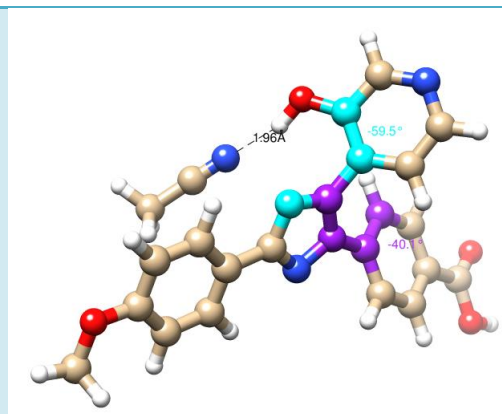
solvant autour de la molécule ciblée. En conséquence, les temps de calculs seraient plus longs car les calculs exploiteraient plus de données variables.

Nos collaborateurs théoriciens ont effectué une nouvelle modélisation du triazole **T01** en solvant implicite plus une molécule d'acétonitrile proche de la fonction alcool. Le triazole **T01** a été modélisé en se basant sur la structure RX du triazole **111** en supposant que les deux structures sont quasiment identiques. Sur la figure 2.54, nous remarquons qu'à partir d'un modèle de pyridol-triazole plan, le système tend vers un état avec un angle dièdre de 59,5° entre le triazole et le 3-pyridol, avec une liaison hydrogène entre le proton et l'acétonitrile de 1,96Å.

Avant optimisation



Après optimisation



DFT - 6-31G+(d)/B3LYP dans l'acétonitrile – solvant implicite + 1 molécule de solvant explicite

Figure 2.51 : Optimisation de structure en solvant implicite + 1 molécule de solvant explicite.

En résumé, dans l'acétonitrile le système pyridol-triazole initialement plan s'oriente vers un état angulaire d'environ 60° entre les motifs. En solvant implicite, on obtient un système perpendiculaire qui empêche un mécanisme de fluorescence type ESIPT. Grâce à l'étude théorique, nous pouvons expliquer l'émission unique dans l'acétonitrile des triazoles avec absence d'ESIPT. Nous supposons que dans le cas du DCM, l'émission duale correspondrait aux deux formes tautomères énol et céto des composés et donc au deux formes dû à un ESIPT.

Concernant le DCM, nous supposons au vu des résultats expérimentaux que la plus faible polarité du solvant n'entraînerait pas de modifications au niveau de la structure fondamentale plane. La liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction alcool et l'atome d'azote du triazole serait donc présente pour permettre un ESIPT. D'autres calculs

sont en cours actuellement pour compléter cette étude théorique tel que la modélisation des triazoles en solvant explicite comme le DCM et l'eau.

b. Mise en relation des longueurs d'onde d'émission avec les niveaux d'énergies des orbitales moléculaires: prédiction de la fluorescence des nouvelles structures

Les calculs théoriques nous permettent d'accéder aux valeurs d'énergies des orbitales moléculaires HOMO-LUMO des formes énol. Pour rappel, les calculs des formes céto (état excité) ne peuvent être pris en compte car ils ne convergent pas.

Avec les valeurs des énergies des orbitales moléculaires (HOMO-LUMO) des triazoles, nous avons pu mettre en relation la valeur énergétique du GAP (différence d'énergie HOMO-LUMO) en fonction du nombre d'onde directement calculé de la longueur d'onde d'émission de la forme énol dans l'acétonitrile. Les valeurs sont reportées dans le tableau ci-dessous. A partir du graphique, une courbe de tendance peut être obtenue et en suivant l'équation de la droite il serait théoriquement possible de déterminer la longueur d'onde d'émission pour une molécule à partir des calculs d'énergie des orbitales moléculaires. Ceci permettrait l'optimisation des recherches pour de nouvelles structures d'intérêt.

Molécules	Energie HOMO (eV)	Energie LUMO (eV)	GAP (eV)	λ_{em} (nm)
T01	-7,502	-1,214	6,287	422
T03	-7,112	-0,705	6,407	412
T09	-6,369	-0,882	5,487	501
T10	-7,540	-0,902	6,639	405
T15	-7,998	-0,971	7,027	377

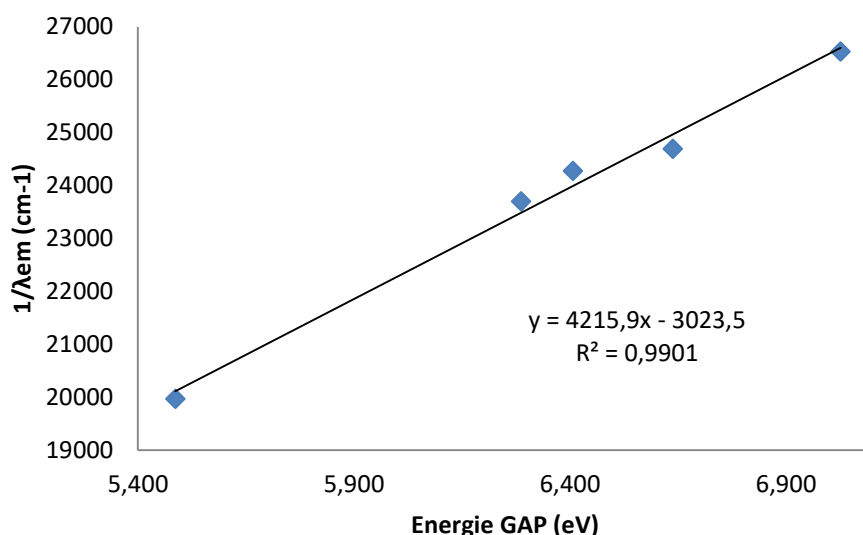


Figure 2.52 : Nombre d'onde des triazoles en fonction de la différence d'énergies des orbitales moléculaires HOMO-LUMO des triazoles, Graphique de prédiction des émissions de fluorescence.

D. Récapitulatif des données de fluorescence et conclusion

Nous avons décrit la synthèse de dix-sept 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués avec un groupement 3-pyridol en position 5. Toutes ces molécules ont été caractérisées en fluorescence dans 4 solvants différents : l'acétonitrile, l'éthanol, le dichlorométhane et l'eau. Les mesures d'absorption et d'excitation ont montré des variations sur les maxima inférieures à 5 nm entre les différents solvants. D'autre part, grâce aux spectres d'excitation du triazole **T16** nous avons pu mettre en évidence la présence de deux formes distinctes lors des mesures de fluorescence dans le dichlorométhane. Ces deux formes tautomères sont les formes énol et céto intervenant dans un mécanisme de fluorescence de type ESIPT (figure 2.43).

Les spectres de fluorescence des triazoles dans l'acétonitrile et l'éthanol sont très similaires sur la forme, seul diffère l'intensité de la fluorescence. L'acétonitrile a été notre solvant de référence durant toutes les analyses complémentaires : coefficient d'extinction molaire et rendement quantique. Les valeurs des paramètres optiques des triazoles d'intérêt sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Entrée	Molécule	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ
1	T01	270	422	152	38870	0,014
2	T02	269	423	154	34856	0,14
3	T03	274	412	138	30238	0,008
4	T05	265	405	140	40725	0,101
5	T09	365	501	136	38604	0,005
6	T10	276	405	129	35533	0,009
7	T12	263	382	119	28634	0,201
8	T13	262	508	246	27605	0,203
9	T15	270	377	107	22243	0,013
10	T16	275	378	103	12046	0,026
11	T17	278	372	94	30390	0,01

Schéma 2.53 : Propriétés de fluorescence des triazoles dans l'acétonitrile.

Les coefficients d'extinction molaire sont compris entre $40000 M^{-1}.cm^{-1}$ et $20000 M^{-1}.cm^{-1}$. Le plus haut est celui du **T05** pour $40725 cm^{-1}$ et le plus faible est celui du **T16** pour $12046 M^{-1}.cm^{-1}$. Ils absorbent beaucoup plus qu'ils n'émettent ce qui induit des rendements quantiques faibles voir très faibles pour certains. Les triazoles **T12** et **T13** montrent des rendements quantiques d'environ 20% et d'autres comme le triazole **T09** n'atteigne que 0,5%. Ce faible rendement quantique serait lié au mécanisme de fluorescence. En effet, le phénomène de l'ESIPT fait intervenir un changement de forme tautomère de la molécule en raison d'un transfert de proton. Ce type de transfert non radiatif utilise la majorité de l'énergie de relaxation de la molécule. La différence d'énergie restante permet la relaxation radiative fluorescente.

La différence mesurée entre les spectres de fluorescence dans l'acétonitrile et le DCM a été rationalisée par les calculs théoriques et la conformation de la molécule dans ces différents solvants. A l'état fondamental, nous avons une liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton de la fonction alcool et l'atome d'azote du triazole d'environ $1,84 \text{ \AA}$. La modélisation en solvant explicite montre la rotation du fragment pyridol, éloignant ainsi le proton du centre triazole, empêchant l'ESIPT. Les calculs en solvant implicite pour le DCM ne

convergent pas pour le moment. Cet écart entre les spectres dans l'acétonitrile et le DCM démontre un ESIPT, corroboré par les mesures des spectres d'excitation du triazole **T16**.

Ce transfert de proton à l'état excité augmente le déplacement de Stokes d'environ 100 nm pour tous les 1,2,4-triazoles sauf pour le **T09** pour lequel nous n'observons pas de modifications. Les cas particuliers des triazoles **T09**, **T12** et **T13** peuvent s'expliquer par la présence de la fonction alcyne qui intervient dans la fluorescence et doit donner lieu à des effets électroniques prépondérants dans leur fluorescence.

La fluorescence est globalement neutralisée en milieu aqueux. Cette neutralisation est certainement due aux interactions intermoléculaires avec le solvant qui donnent lieu à des phénomènes non radiatif. Il existe cependant quelques triazoles dont la fluorescence n'est pas neutralisée, les triazoles **T10**, **T15**, **T16**, **T17**. Ces molécules montrent une nouvelle bande fluorescente vers les 430 nm qui pourrait s'expliquer par un transfert de proton à l'état excité intermoléculaire avec l'eau. Cette hypothèse doit être évaluée par de futures analyses.

Enfin, nous avons pu mettre en relation le déplacement de Stokes avec la longueur d'onde d'émission pour créer un outil de prédiction de fluorescence dans le cas où de nouveaux triazoles seraient imaginés.

L'objectif de ces travaux était de synthétiser trois nouvelles sondes fluorescentes pour la biologie. Cependant, toutes les analyses de fluorescences démontrent que même si les propriétés photophysiques des triazoles synthétisés sont intéressantes (ESIPT, solvant et pH dépendants..), il serait difficile d'obtenir 3 fluorophores à base triazole de couleurs différentes avec des rendements quantiques acceptables pour les utiliser en 2D-Oxy DIGE.

Les longueurs d'onde d'absorption sont toutes comprises entre 260 et 280 nm sauf le T09 qui absorbe à 365 nm. L'absorption dans l'UV est un problème pour une sonde fluorescente car nous nous trouvons dans une zone d'absorption des tissus biologiques dont les longueurs d'onde d'émission sont comprises entre 400 et 500 nm. On observe généralement 2 bandes d'émissions dues à l'équilibre tautomérique entre les formes *enol* et *ceto* qui interviennent pendant l'ESIPT. La fluorescence est neutralisée dans l'eau ce qui ne nous permet pas de les utiliser en milieu biologique.

Des calculs théoriques ont été réalisés pour compléter les résultats expérimentaux. Nous avons réalisé des mesures d'absorption et d'émission dans différents milieux pour mettre en

évidence ce mécanisme de fluorescence et nous avons pu mesurer les rendements quantiques pour déterminer l'efficacité des fluorophores.

Avec toutes ces informations, nous avons conclu qu'il serait compliqué de déterminer une structure synthétisable qui posséderait les propriétés de fluorescence désirées. Les rendements quantiques sont trop faibles malgré les déplacements de Stokes supérieurs à 150 nm. Nous allons donc tenter de répondre aux problématiques du projet à travers la synthèse d'autres molécules fluorescentes de la famille des BODIPY, des molécules moins originales que les triazoles mais connues pour être faciles d'accès avec de hauts rendements quantiques mais peu décrit avec des fonctions hydrazides.

Chapitre III

*Synthèse de nouvelles sondes
fluorescentes de type BODIPY pour la
détection de protéines carbonylées*

III. Synthèse de nouvelles sondes fluorescentes de type BODIPY pour la détection de protéines carbonylées

1. Etat de l'art sur les BODIPY : Synthèse, fonctionnalisation et propriétés photo-physiques

A. Généralités sur les BODIPY : synthèse et fluorescence

Le terme BODIPY est l'abréviation pour 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene. Cette famille de fluorophore a été synthétisée en 1968 par Treibs et Kreuzer.¹³³ Les BODIPY sont des molécules fluorescentes qui absorbent généralement dans l'UV ou le visible avec un bon coefficient d'absorption molaire. Les BODIPY sont considérés comme une plateforme importante pour la conception de sondes fluorescentes de par leur charge neutre, leur rendement quantique important et des bandes d'absorption et d'émission relativement étroites (figure 3.1). La rigidité du système, grâce au motif BF₂, empêche le changement de conformation du système et ainsi toutes variations qui induiraient des relaxations non-radiatives du système. Cette structure conjuguée présente une fluorescence très intense ce qui en fait des outils importants pour le marquage de protéines. De très nombreuses publications relatives aux synthèses, propriétés ou applications des BODIPY paraissent encore de nos jours relevant tout le potentiel de ces molécules (plus de 9800 références d'après SciFinder).^{134,135,136}

¹³³ Treibs, A.; Kreuzer, F. H.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 718, 208-223.

¹³⁴ Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th ed.; Molecular Probes : Eugene, OR, 1996.

¹³⁵ Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4953-4972.

¹³⁶ Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932.

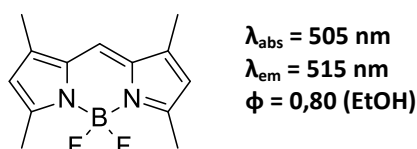


Figure 3.1 : Structure et propriétés optiques du 1,3,5,7-tétraméthyl-BODIPY

Les BODIPY sont généralement stables aux variations de pH (hors présence de fonctions acido-basiques), à la polarité des solvants, et peuvent être utilisés en milieu biologique² en tant que sondes pour l'imagerie optique. Leur structure lipophile permet une bonne insertion dans les cellules.^{133,137} De plus, certains BODIPY sont utilisés dans des lasers,¹³⁸ des cellules photovoltaïques¹³⁹ ou encore en tant que détecteurs de métaux.^{140,141} La numérotation des atomes du noyau BODIPY est représentée ci-dessus, et la position 8 est aussi appelée position *meso*. Dans ce travail, nous nous intéresserons aux BODIPY classiques. Les positions 1, 2, 6 et 7 et les positions 3 et 5 sont souvent appelées respectivement β et α .

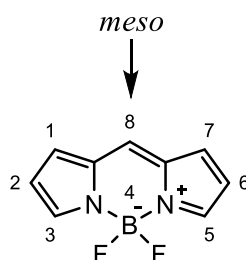


Figure 3.2 : Noyau BODIPY.

Il est à noter que la substitution de la position *més*o par un alkyle ou un phényle n'a pas d'impact majeur sur les longueurs d'onde d'absorption et d'émission mais réduit l'intensité de fluorescence et donc le rendement quantique. Généralement les BODIPY présentent un mécanisme de fluorescence de type PET (voir chapitre I). Il est possible d'obtenir un déplacement des longueurs d'onde vers le rouge (effet bathochromique) en insérant en α ou β des groupements conjugués à effet +M et ainsi enrichir la HOMO du cœur BODIPY.

¹³⁷ Komatsu, T.; Urano, Y.; Fujikawa, Y.; Kobayashi, T.; Kojima, H.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. *Chem. Commun.* **2009**, 45, 7015-7017.

¹³⁸ Ortiz, M. J.; Garcia-Moreno, I.; Agarrabeitia, A. R.; Duran-Sampedro, G.; Costela, A.; Sastre, R.; López Arbeloa, F.; Bañuelos Prieto, J.; López Arbeloa, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 7804-7811.

¹³⁹ Bessette, A.; Hanan, G. S.; *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 3342-3405.

¹⁴⁰ Yin, S.; Leen, V.; Snick, S. V.; Boens, N.; Dehaen, W. *Chem. Comm.* **2010**, 46, 6329-6340.

¹⁴¹ Atilgan, S.; Ozdemir, T.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2010**, 12, 4792-4795.

L'insertion d'un aryle substitué par un groupement attracteur n'a pas d'effet particulier (schéma 3.3).

On peut remarquer que le rendement quantique est plus grand dans le cas du BODIPY **114** (0,80) par rapport au BODIPY **115** (0,2) ou **117** (0,22). Ceci est due à la gêne stérique des méthyles en position 1 et 7 qui perturbent la rotation du fragment tolyle et empêchent la perte d'énergie non-radiative par rotation autour de la liaison C-Tolyl.¹³⁶ On peut remarquer que la présence d'un fluor inductif attracteur n'a pas d'influence majeure sur les propriétés de fluorescence.

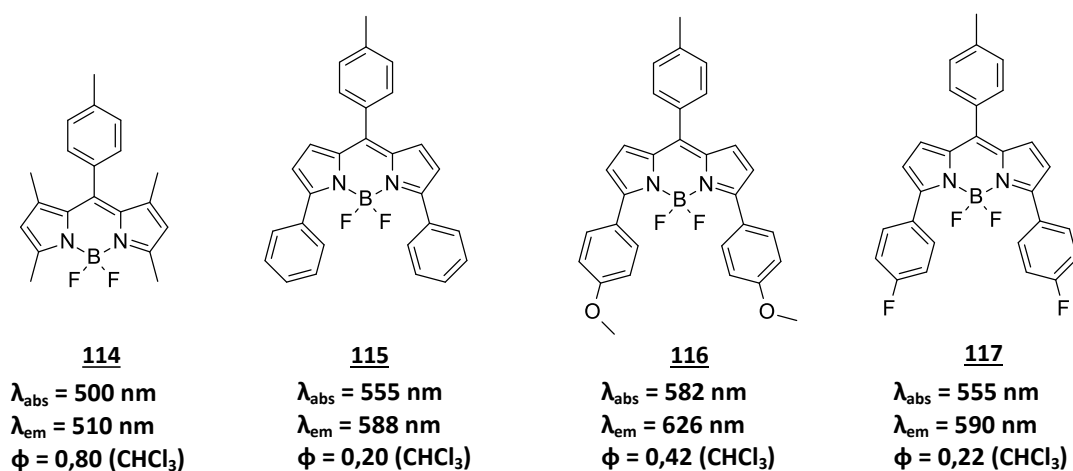


Figure 3.3 : Effet de la substitution par des groupements +M sur la fluorescence.

Par ailleurs, les BODIPY disubstitués présentent des effets bathochromiques plus importants dans le cas de groupements électro-donneurs que pour les BODIPY monosubstitués.

Il est possible de synthétiser le motif dipyrrométhène des BODIPY par condensation d'un aldéhyde ou d'un chlorure d'acide sur un pyrrole puis d'une oxydation en présence de DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) ou de *p*-chloranil dans le cas d'un réactif aldéhyde. Cet intermédiaire est ensuite mis à réagir avec du trifluorure de bore pour former le noyau BODIPY (schéma 3.4). Les rendements de cette synthèse varient selon les substituants sur le pyrrole et sur le dérivé carbonyle mais ils ne dépassent généralement pas les 70%. On retrouve les rendements les plus modestes dans le cas de pyrrole non substitué car on obtient des oligomères en fin de réaction.¹⁴²

¹⁴² Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung, C.-H.; Wagner, R. W.; O'Shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1391-1396.

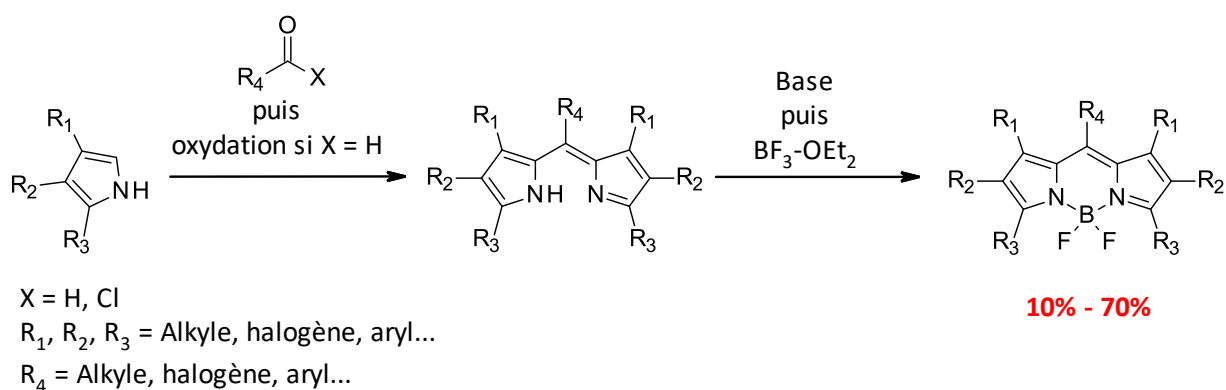


Schéma 3.4 : Synthèse générale du noyau BODIPY.

Il existe deux possibilités pour synthétiser des BODIPY substitués sur les différentes positions : en utilisant des pyrroles et carbonyles déjà fonctionnalisés avant de synthétiser le noyau BODIPY (comme décrit sur le schéma 3.4) ou de faire des modifications de type post-fonctionnalisations comme décrites ci-dessous (figure 3.5).

- A : Couplage pallado-catalysé, S_NAr
- B : Couplage pallado-catalysé, S_EAr, C-H activation
- C : Couplage pallado-catalysé, S_NAr, C-H activation, condensation de Knoevenagel, arylation radicalaire

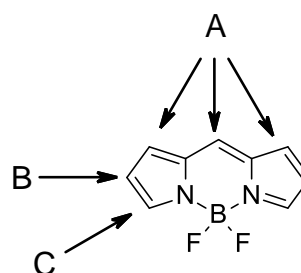


Figure 3.5 : Post-fonctionnalisation des BODIPY.

B. Réactions de post-fonctionnalisation du cœur BODIPY : Etat de l'art

a. Substitutions électrophiles aromatiques (S_EAr)

Les positions 2 et 6 sont réactives vis-à-vis des réactions de substitutions électrophiles comme la nitration,¹⁴³ la sulfonation¹⁴⁴ ou encore l'halogénéation.¹³⁶ Il est

¹⁴³ Gupta, M.; Mula, S.; Tyagi, M.; Ghanty, T. K.; Murudkar, S.; Ray, A. K.; Chattopadhyay, S. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17766–17772.

également possible d'effectuer des chlorations en position 3 et 5 en conditions douces ou à froid. Dans le cas des S_EAr avec des atomes de brome ou d'iode, il est difficile de contrôler la régiosélectivité de la réaction sur les pyrroles et on obtient un mélange complexe de produits di-, tri- ou tétrahalogénés sur les positions 2,3,5 et 6 lorsque celles-ci ne sont pas déjà substituées.

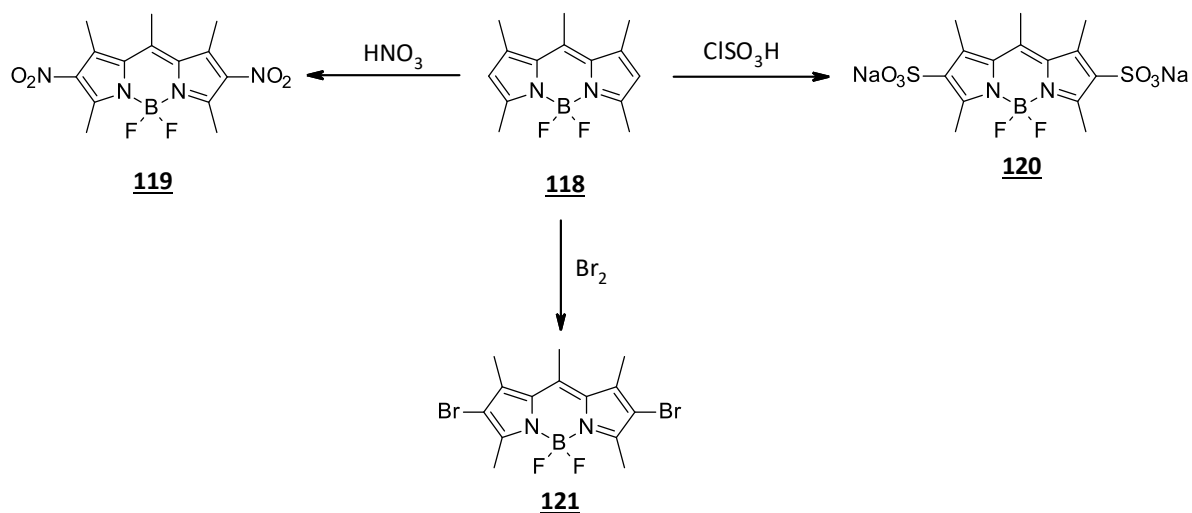


Schéma 3.6 : Substitution électrophile aromatique.

Les réactions d'halogénéation des BODIPY ont fait l'objet de nombreuses recherches^{143,144,145} car elles permettent d'accéder aux précurseurs halogénés et de réaliser ensuite des réactions de substitutions nucléophiles aromatiques ou des réactions de couplages pallado-catalysés.

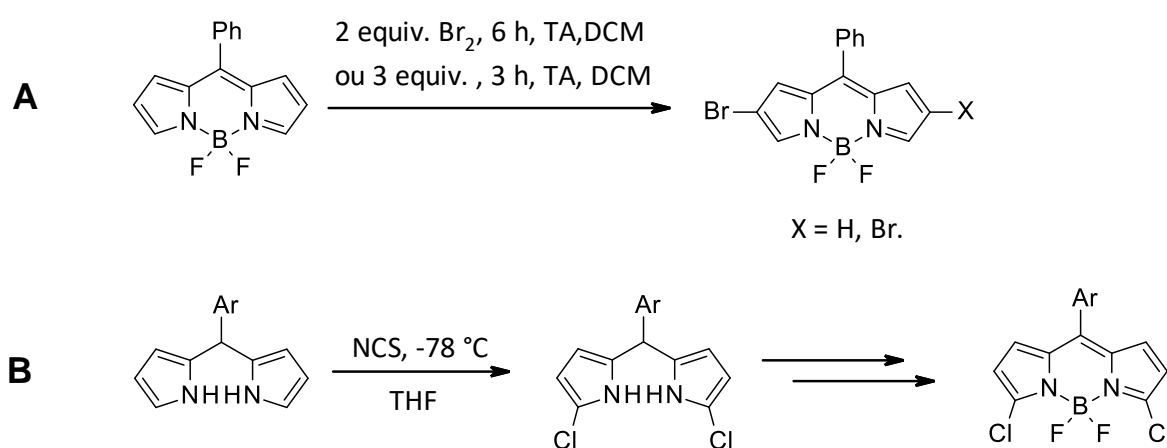
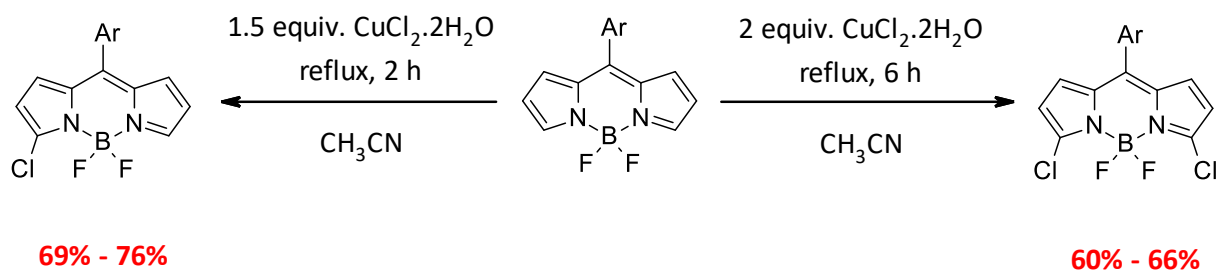


Schéma 3.7 : Halogénéation des BODIPY : bromation¹⁴⁵ (A) et chloration^{146,147} (B).

¹⁴⁴ Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.-L.; Wolford, L. T.; Boyer, J. H.; Politzer, I. R.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroat. Chem.* **1990**, *1*, 389.

¹⁴⁵ Jiao, L.; Pang, W.; Zhou, J.; Wei, Y.; Mu, X.; Bai, G.; Hao, E. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9988–9996.

En 2015, X. Zhou et ses collaborateurs ont décrit une synthèse régiosélective de mono-chloration en position 3 en présence de CuCl_2 dans de l'acétonitrile pendant 1,5 h. Cette réaction peut aussi être contrôlée jusqu'à la double chloration en position 3 et 5 en augmentant les quantités de chlorure de cuivre (2 équivalents) et le temps de réaction à 6h, avec des rendements allant de 60% à 66% (Schéma 3.8).¹⁴⁸



Ar = mesytyl, phényl, 2,6-dichlorophényl, 4-méthoxyphényl, 4-nitrophényl

Schéma 3.8 : α -chloration sélective et contrôlée de BODIPY.

b. Substitutions nucléophiles aromatiques ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$)

L'utilisation d'un BODIPY monosubstitué ou disubstitué par un ou deux atomes de chlore est une approche classique pour insérer de nouvelles fonctions grâce à des substitutions nucléophiles aromatiques. Il est possible d'insérer par cette méthode des fonctions éthers ou thioéthers,¹⁴⁹ des amines secondaires ou tertiaires,^{150,151} des malonates¹⁵² ou encore des nitriles.^{141,153}

E. Fron et ses collaborateurs ont décrit la préparation de BODIPY substitués par des dérivés éthers (schéma 3.9) et ont observé un effet bathochromique de plus en plus important

¹⁴⁶ Litter B. J.; Miller, M. A.; Hung, C-H.; Wagner, R. W.; O'shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1391-1396.

¹⁴⁷ Baruah, M.; Qin, W.; Basarić, N.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4152-4157.

¹⁴⁸ Zhou, X.; Yu, C.; Feng, Z.; Yu, Y.; Wang, J.; Hao, E.; Wei, Y.; Mu, X.; Jiao, L. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4632-4635.

¹⁴⁹ Fron, E.; Coutiño-Gonzalez, E.; Pandey, L.; Sliwa, M.; Van der Auweraer, M.; De Schryver, F. C.; Thomas, J.; Dong, Z.; Leen, V.; Smet, M.; et al. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1490-1496.

¹⁵⁰ Rohand, T.; Baruah, M.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. *Chem. Commun.* **2006**, *3*, 266-268.

¹⁵¹ Zhao, N.; Xuan, S.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 3880-3885.

¹⁵² Qin, W.; Rohand, T.; Baruah, M.; Stefan, A.; der Auweraer, M. V.; Dehaen, W.; Boens, N. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *420*, 562-568.

¹⁵³ Li, L.; Nguyen, B.; Burgess, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3112-3116.

lorsque l'on descend le long de la colonne 16 du tableau périodique, allant jusqu'au proche IR dans le cas du ditellurium.

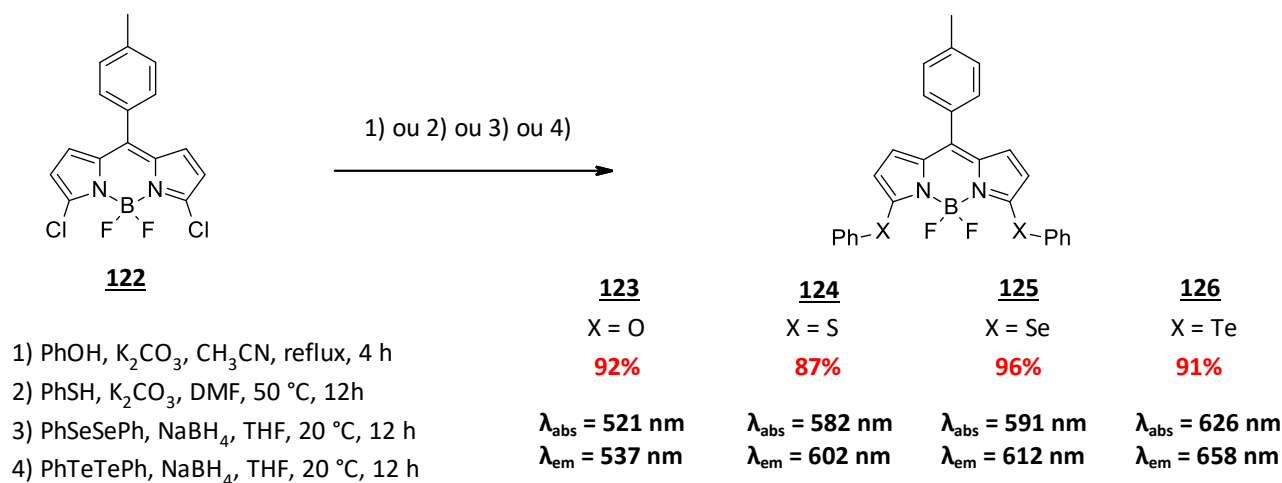


Schéma 3.9 : Substitution nucléophile aromatique.

En contrôlant le nombre d'équivalent comme décrit sur le schéma 3.10 ci-dessous, le produit de mono substitution peut être obtenu exclusivement et engagé dans une autre réaction de substitution ou de couplage pour créer une molécule disubstituée. Les rendements de synthèse sont compris entre 65% et 78% avec des adduits aromatiques, cycliques, avec des fonctions ester. Deux équivalents de nucléophile à TA permettent d'obtenir le produit monosubstitué alors que 4 équivalents sont nécessaires à reflux pour isoler le produit disubstitué.

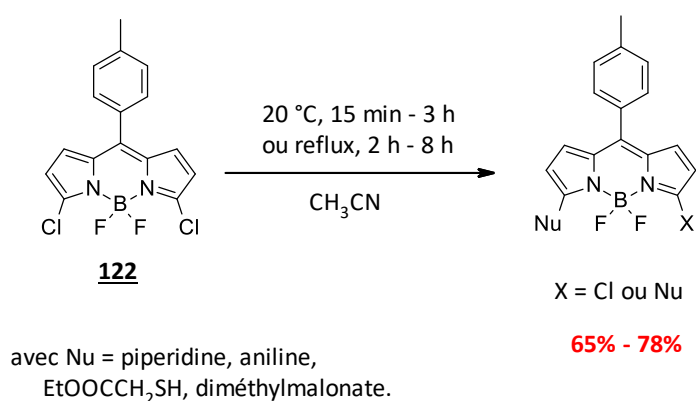


Schéma 3.10 : Substitution nucléophile aromatique sur BODIPY.

c. Réactions de couplage croisé pallado-catalysées.

La post-fonctionnalisation des BODIPY peut s'effectuer également par l'intermédiaire de réactions de couplage C-C de type Suzuki,^{154,155} Sonogashira,^{156,157} Heck,¹⁵⁸ Stille¹⁵⁹ ou encore Negishi.^{160,161} Le groupe de Dehaen a publié un article¹⁶² regroupant ces diverses conditions de couplage que nous utiliserons en partie pour la synthèse de nos BODIPY (Schéma 3.11).

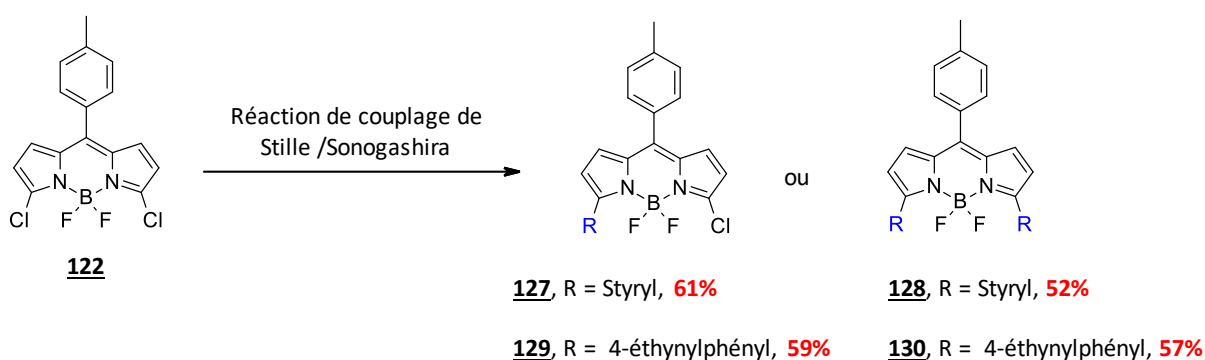


Schéma 3.11 : Exemple de réactions de couplage croisé de Stille et de Sonogashira.

Rappelons que l'introduction de conjugaison et de fonction à effet +M induit un effet bathochromique qui est plus important dans le cas d'une réaction de double couplage que de couplage simple. Ces couplages permettent d'obtenir des BODIPY mono ou disubstitués à l'aide de conditions réactionnelles classiques avec des rendements entre 52% et 61%. Si on compare les propriétés de fluorescence des produits résultant des couplages de Stille et Sonogashira on remarque que l'augmentation de la conjugaison déplace l'émission dans le vert (500 – 550 nm) et l'orange-rouge (580 - 650 nm). A titre d'exemple, le BODIPY

¹⁵⁴Hayashi, Y.; Yamaguchi, S.; Cha, W. Y.; Kim, D.; Shinokubo, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2992–2995.

¹⁵⁵Qin, W.; Rohand, T.; Dehaen, W.; Clifford, J. N.; Driesen, K.; Beljonne, D.; Van Averbeke, B.; Van der Auweraer, M.; Boens, N. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 8588–8597.

¹⁵⁶Donuru, V. R.; Vegesna, G. K.; Velayudham, S.; Green, S.; Liu, H. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2130–2138.

¹⁵⁷Popere, B. C.; Della Pelle, A. M.; Thayumanavan, S. *Macromolecules* **2011**, *44*, 4767–4776.

¹⁵⁸Parisotto, S.; Lace, B.; Artuso, E.; Lombardi, C.; Deagostino, A.; Scudu, R.; Garino, C.; Medana, C.; Prandi, C. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 884–893.

¹⁵⁹Wang, H.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H.; Smith, K. M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10342–10352.

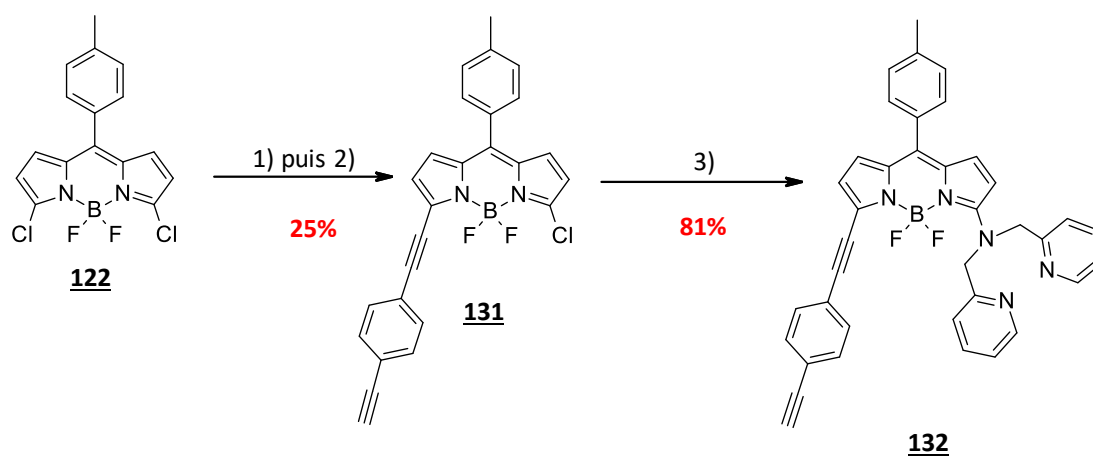
¹⁶⁰Palao, E.; Duran-Sampedro, G.; de la Moya, S.; Madrid, M.; García-López, C.; Agarrabeitia, A. R.; Verbelen, B.; Dehaen, W.; Boens, N.; Ortiz, M. J. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 3700–3710.

¹⁶¹Duran-Sampedro, G.; Palao, E.; Agarrabeitia, A. R.; Moya, S. de la; Boens, N.; Ortiz, M. J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 19210–19213.

¹⁶²Rohand, T.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4658–4663.

symétrique avec deux substituants stryryles absorbe à 626 nm et émet à 639 nm pour un rendement quantique de 0,92 (dans le méthanol) alors que l'analogue de couplage simple absorbe à 564 nm et émet à 579 nm pour un rendement quantique de 0,55 (dans le méthanol).

D'autres types de procédés peuvent être utilisés pour obtenir des molécules dissymétriques, comme la molécule **132**, en effectuant successivement une réaction de couplage puis une substitution nucléophile aromatique afin d'obtenir, par exemple, une molécule utilisée comme détecteur de cuivre émettant dans le proche IR à 650 nm dans l'acétonitrile (figure 3.12).¹⁴⁰



1) 1 equiv. d'alkyne, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, NEt₃, 60 °C, THF.

2) Bu₄NF, -78 °C, THF.

3) Di(2-picolyl)amine, 20 °C, CH₃CN.

Détecteur de Cu²⁺

Schéma 3.12 : Synthèse d'un BODIPY dissymétrique utilisé pour la détection de cuivre (II).

Il est à noter que, de façon générale, les rendements des réactions de couplage excèdent rarement les 70%. Sur la réaction 1) du schéma 3.12, l'étape de couplage de Sonogashira est celle avec le plus faible rendement à 31%. Il existe d'autres processus permettant de former des BODIPY disubstitués sur les positions 2, 3, 5 et 6 du cœur BODIPY tels que les activations C-H et les condensations de Knoevenagel.

d. Modification du squelette BODIPY par réaction d'activation de la liaison C-H

La réaction d'activation de la liaison C-H peut se réaliser par l'intermédiaire d'un catalyseur métallique comme le palladium, le ruthénium ou encore le rhodium.¹⁶³ L'activation C-H peut s'effectuer directement en α ou en β du noyau BODIPY^{164,165} ou préalablement sur le pyrrole avant la formation du BODIPY.^{166,167}

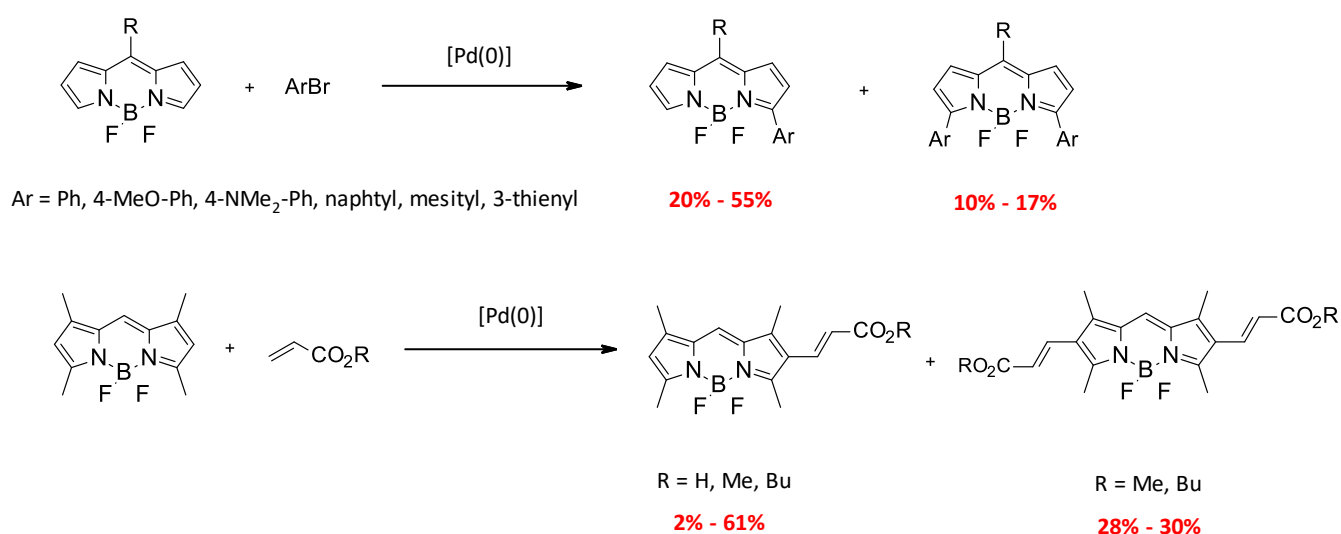


Schéma 3.13 : Introduction de conjugaison par activation C-H.

Cette synthèse permet d'introduire des groupements électro-attracteurs conjugués avec des rendements modérés en produit isolé. Cependant, elle nécessite une grande quantité de catalyseur (20 mol%). Les activations C-H appliquées aux BODIPY offrent aussi la possibilité de rigidifier la structure par cyclisation intramoléculaire sur les pyrroles¹⁶⁸ et aussi de modifier les propriétés photo-physiques. On remarque par exemple, sur le schéma 3.14 que le rendement quantique a augmenté de 50% (de 0,48 à 0,65) par rapport au réactif **133**.

¹⁶³ Ritleng, V.; Sirlin, C.; Pfeffer, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1731-1769.

¹⁶⁴ Verbelen, B.; Leen, V.; Wang, L.; Boens, N.; Dehaen, W. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9129-9131.

¹⁶⁵ Thivierge, C.; Bandichhor, R.; Burgess, K. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2135-2138.

¹⁶⁶ Beck, E. M.; Grimster, N. P.; Hatley, R.; Gaunt, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2528-2529.

¹⁶⁷ Rieth, R. D.; Mankad, N. P.; Calimano, E.; Sadighi, J. P. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3981-3983.

¹⁶⁸ Leen, V.; Qin, W.; Yang, W.; Cui, J.; Xu, C.; Tang, X.; Liu, W.; Robeyns, K.; L. Van Meervelt, L.; Beljonne, D.; Lazzaroni, R.; Tonnelé, C.; Boens, N.; Dehaen, W. *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 2016-2026.

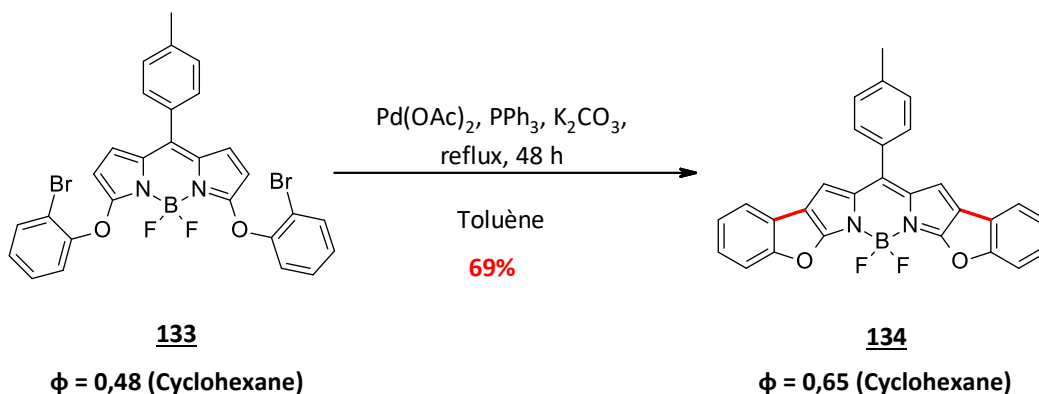


Schéma 3.14 : Amélioration du rendement quantique par rigidification de la structure.

Le rendement quantique n'est pas le seul facteur impacté par la rigidification. En effet, la cyclisation intramoléculaire permet aussi d'améliorer la conjugaison du système BODIPY en plus d'aplanir le squelette. L'équipe de L. Jiao a décrit la synthèse d'un aza-BODIPY **73** ayant des propriétés spectrales dans l'infrarouge (schéma 3.15).¹⁶⁹

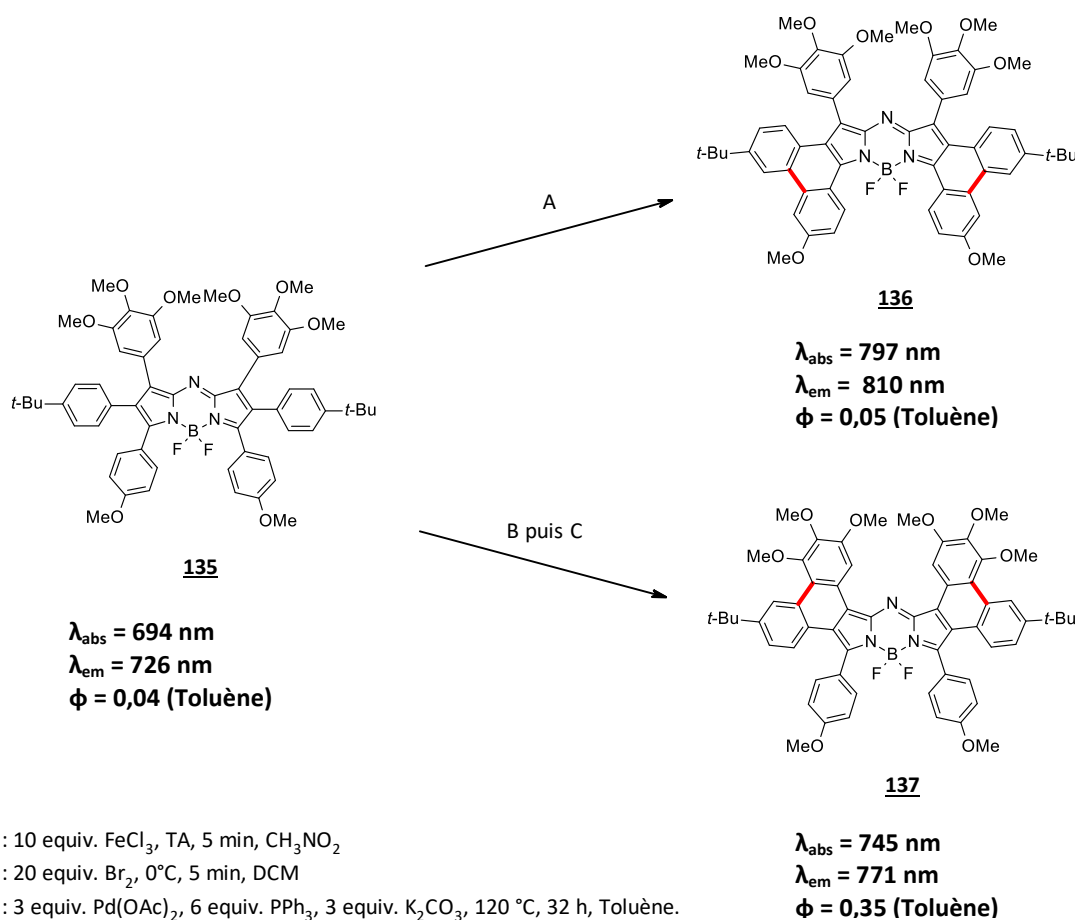


Schéma 3.15 : Cyclisation intramoléculaire par activation C-H.

¹⁶⁹ Sheng, W.; Cui, J.; Ruan, Z.; Yan, L.; Wu, Q.; Yu, C.; Wei, Y.; Hao, E.; Jiao, L. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 10341–10349.

Grâce à la rigidification de son squelette, le BODIPY **136** montre une émission à 810 nm soit près de 90 nm de plus par rapport au composé **135** pour un rendement quantique similaire. En revanche, l'effet bathochromique est moins important pour le produit **137** avec une émission à 771 nm mais le rendement quantique est augmenté atteignant les 35%. Ces fluorophores ont été testés *in vitro* sur des cellules humaines HepG2 ce qui a démontré le caractère non toxique de ces BODIPY ainsi que leurs perméabilités cellulaires.

e. Condensation de Knoevenagel

Enfin, la dernière réaction fréquemment utilisée dans la fonctionnalisation des BODIPY est la condensation de type Knoevenagel qui permet de créer de la conjugaison par l'intermédiaire d'un alcène substitué en partant d'un BODIPY comportant des méthyles en position 3 et 5. Cependant, les rendements observés en produit isolé sont modérés, de l'ordre des 30% à 40%. Malgré cela, cette fonctionnalisation permet d'obtenir des BODIPY avec des propriétés optiques dans le proche IR et l'IR.^{170,171} Cette réaction est utilisée pour synthétiser des BODIPY détecteurs de pH^{172,173} ou possédant des propriétés optiques dépendantes du solvant.¹⁷⁴

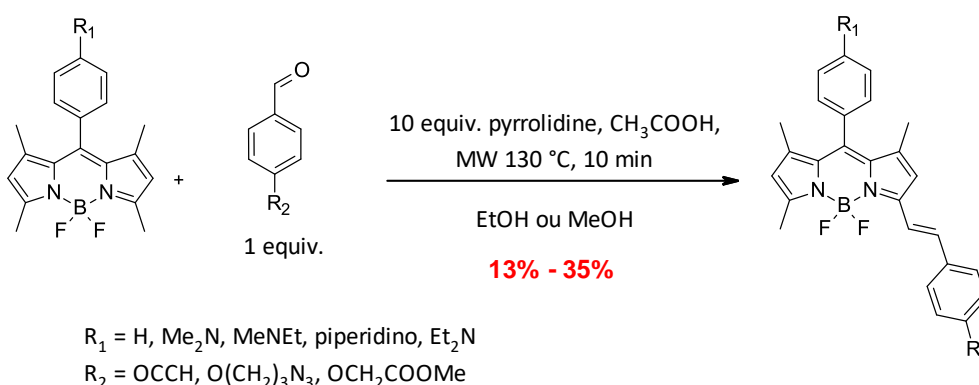


Schéma 3.16 : Condensation de Knoevenagel sur BODIPY tétraméthylé.

¹⁷⁰ Peterson, J. A.; Wijesooriya, C.; Gehrmann, E. J.; Mahoney, K. M.; Goswami, P. P.; Albright, T. R.; Syed, A.; Dutton, A. S.; Smith, E. A.; Winter, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7343–7346.

¹⁷¹ Zhao, N.; Xuan, S.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 3880–3885.

¹⁷² Hoogendoorn, S.; Blom, A. E. M.; Willems, L. I.; Van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5656–5659.

¹⁷³ Boens, N.; Qin, W.; Baruah, M.; De Borggraeve, W. M.; Filarowski, A.; Smisdom, N.; Ameloot, M.; Crovetto, L.; Talavera, E. M.; Alvarez-Pez, J. M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10924–10934.

¹⁷⁴ Baruah, M.; Qin, W.; Flors, C.; Hofkens, J.; Vallée, R. A. L.; Beljonne, D.; Van der Auweraer, M.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 5998–6009.

Comme la plupart des BODIPY ont un mécanisme de fluorescence de type transfert d'électron photo-induit, le fait d'ajouter des fonctions pH-dépendantes permet de perturber ce phénomène et ainsi obtenir un détecteur pH métrique fluorescent. Les composés décrits dans le schéma 3.14 offrent une détection dans une gamme de pH allant de 2 à 6 Ce type d'indicateur de pH peut être utilisé en biologie pour des études *in vitro* en protéomique ou pour l'étude de l'activité des protéines par exemple.¹⁷⁵

2. Stratégie de synthèse de BODIPY pour le marquage et la détection des protéines carbonylées avec la technique 2D-Oxi DIGE

A. Introduction sur les BODIPY-hydrasides : Etat de l'art

La conception de BODIPY en tant que sondes fluorescentes pour la technique 2D-Oxi DIGE semble être une bonne alternative pour remplacer les sondes à base de triazoles (voir chapitre III). En effet, l'équipe de J. Ros¹⁷⁶ a démontré que l'utilisation d'un BODIPY commercial (Figure 3.17) est compatible avec cette technique sans interactions défavorables avec le gel ou avec les protéines carbonylées. De plus, il n'existe qu'un seul BODIPY commercial possédant une fonction hydrazide et peu de BODIPY hydrasides sont décrits dans la littérature ce qui limite les possibilités de les utiliser en tant que sondes variées pour analyser les échantillons (figure 3.17). Il est à noter que ces sondes BODIPY hydrasides ont été utilisées pour la détection de fonctions carbonyles dans des mélanges complexes comme le marquage de nanotubes ou de polysaccharides.^{177,178,179,180,181} En 2018, Lumiprobe propose 4 BODIPY hydrasides commerciaux.

¹⁷⁵ Hall, M. J.; Allen, L. T.; O'Shea, D. F. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 776-780.

¹⁷⁶ Tamarit, J.; De Hoogh, A.; Obis, E.; Alsina, D.; Cabiscol, E.; Ros, J. *Journal of Proteomic* **2012**, *75*, 3778-3888.

¹⁷⁷ Haugland, R. P.; Kang, H. C. US Patent US4774339, 1988.

¹⁷⁸ Haugland, R. P.; Kang, H. C. US Patent US9208350, 1993.

¹⁷⁹ Giese, R. W.; Wang, P. US Patent US5512486, 1996.

¹⁸⁰ Wang, P.; Giese, R.W. *Journal of Chromatography A* **1998**, *809*, 211-218.

¹⁸¹ Xiong X.; Wanf, H.; Rao, W.; Guo, X.; Zhang, H. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 49-56.

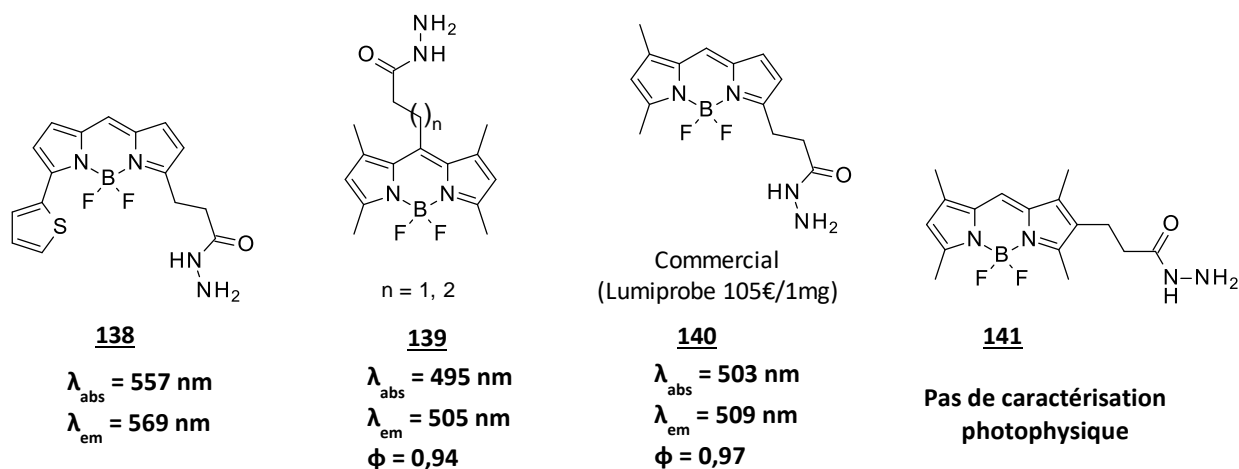


Figure 3.17 : Exemples de BODIPY hydrazides existants.¹⁷⁵⁻¹⁷⁹

Pour atteindre nos objectifs, nous avons décidé de concevoir et de synthétiser différents BODIPY avec toutes les caractéristiques pour la technique 2D-Oxi DIGE. Pour cela, nous souhaitons introduire des substituants électro-donneurs (ED) sur les positions 3 et 5 du BODIPY pour obtenir un effet bathochromique important avec le groupement électroattracteur (EA) en position *méso* et ainsi atteindre le proche IR.

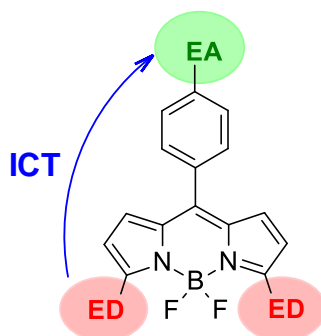
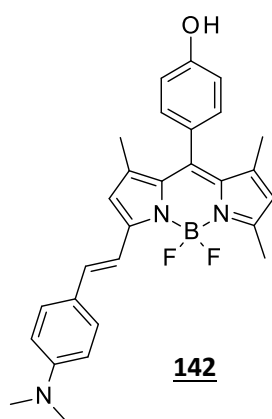


Figure 3.18 : Représentation schématique de l'ICT envisagé sur les BODIPY.

Bien qu'il existe un grand nombre de possibilités pour atteindre les objectifs de ce projet, il y a plusieurs restrictions à appliquer pour synthétiser une sonde utilisable pour la 2D Oxi-DIGE. Pour rappel, il faut : une absorption dans le visible, une émission dans le proche IR voire l'IR, un large déplacement de Stokes, une charge globale neutre, une stabilité entre pH 4 et pH 12, une fonction de marquage hydrazide et enfin un poids moléculaire proche entre les

BODIPY. Enfin, il y a 3 cyanine-hydrzides à remplacer donc il faut 3 nouvelles sondes avec des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission distinctes.

Comme expliqué précédemment, les 3 premiers points peuvent être atteints en utilisant les groupements adaptés. La charge globale d'un BODIPY est neutre donc ce point est déjà validé. La fonction acyle hydrazine sera introduite en tant que groupement électro-attracteur soit directement relié au cycle aromatique soit par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée. La stabilité sur une plage de pH est le critère restrictif qui influence majoritairement le choix des groupements ED. Les fonctions comme les amines primaires, secondaires ou tertiaires ne peuvent pas être utilisées car elles sont protonables et par conséquent confèrent des propriétés de fluorescence dépendantes du pH.¹⁸² L'utilisation de phénol n'est pas possible pour les mêmes raisons. Le groupement diméthylaminophényl aurait pourtant été un excellent choix comme ED compte tenu des propriétés du BODIPY ci-dessous, décrit par E. Akkaya et son équipe, qui est substitué sur une position qui nous intéresse.



THF : $\lambda_{\text{abs}} = 565 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$, $\phi = 0,25$.

THF + H^+ : $\lambda_{\text{abs}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$, $\phi = 0,84$.

THF + OH^- : $\lambda_{\text{abs}} = 565 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$, $\phi = 0,032$.

Figure 3.19 : Exemple de modification de la fluorescence en fonction du pH.

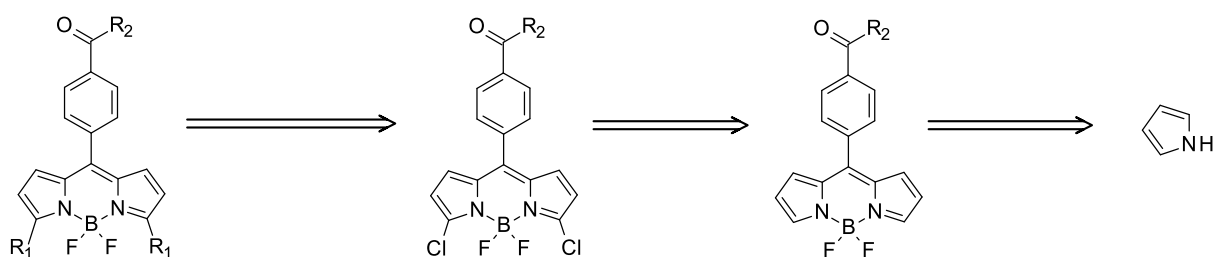
La protonation de l'azote induit un effet hypochromique sur les spectres d'absorption et de fluorescence mais augmente le rendement quantique. En revanche, la déprotonation du phénol entraîne un quench de la fluorescence.

Nous avons donc choisi d'introduire des cycles aromatiques non dépendant du pH comme des fonctions ether de type méthoxy ou des groupements thiényles dont les précurseurs de couplage sont commerciaux.

¹⁸² Coskun, A.; Deniz, E.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5187-5189.

B. Approche rétrosynthétique des BODIPY-hydrzides proche IR

L'objectif est de penser une synthèse divergente pour obtenir une bibliothèque de plusieurs molécules de façon à pouvoir évaluer et sélectionner les 3 fluorophores les plus adaptés pour remplacer les cyanine-hydrzides commerciales et utilisées en 2D-Oxi DIGE. Ayant déjà de l'expérience avec les couplages de Sonogashira et Stille, il a été décidé d'introduire les groupes ED via des réactions de couplage pallado-catalysés sur un squelette dipyrrométhène non substitué.



R₁ = aryle

R₂ = OMe, NHNH₂

Schéma 3.20 : Rétrosynthèse des BODIPY substitués visés.

Pour marquer les carbonyles, il existe plusieurs fonctions réactives possibles : les aminoxy et les hydrzides.

La réaction d'une hydroxylamine sur un carbonyle permet d'obtenir une fonction oxime. Dans le cas d'une fonction hydrzide on forme une liaison hydrzone. D'un point de vue stabilité, la fonction oxime est plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse que la fonction hydrzone.¹⁸³ Pour améliorer le marquage de certaines fonctions carbonyles sur les protéines, il est parfois nécessaire d'utiliser du cyanoborohydrure de sodium pour réduire l'hydrzone en amine secondaire durant l'étape de marquage.

¹⁸³ Kalia, J.; Raines, R. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.

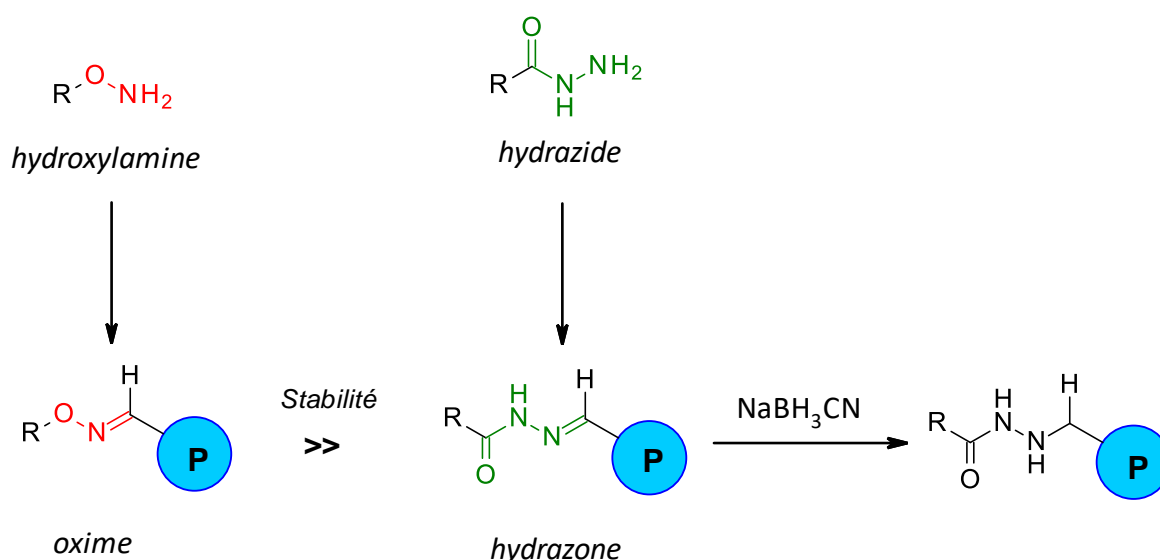


Figure 3.21 : Marquage d'une fonction carbonyle d'une protéine.

L'utilisation d'agents réducteurs n'étant pas un frein à l'utilisation de l'Oxi-DIGE, nous avons choisi d'utiliser une fonction hydrazide plutôt que la fonction aminoxy comme fonction de marquage car celle-ci est plus accessible synthétiquement parlant à partir d'une fonction ester.

3. Conception de BODIPY hydrazides 3,5-disubstitués par des groupements aryles et hétéroaryles pour une émission dans le proche IR

Pour synthétiser des BODIPY symétriques possédant les groupements sur les positions 3 et 5, il est généralement connu d'utiliser préférentiellement les dérivés pyrroles substitués puis de les faire réagir avec un chlorure d'acyle ou un aldéhyde pour obtenir la structure dipyrrométhane. L'objectif de ces travaux est d'obtenir 3 nouveaux BODIPY, or il est économiquement et synthétiquement avantageux de les obtenir grâce à une synthèse divergente. Nous avons par conséquent synthétisé un BODIPY plateforme possédant des atomes de chlore en position 3 et 5 permettant ensuite d'introduire des substituants via des réactions de couplage pallado-catalysées type Suzuki ou Stille.

A. Introduction de groupements aryles sur le BODIPY plateforme par réaction de couplage croisé de Suzuki

Le dipyrrométhane **145** a été obtenu avec un rendement de 58% à partir du pyrrole et du 4-formylbenzoate de méthyle en présence d'une quantité catalytique d'acide trifluoroacétique. La chloration sélective des pyrroles en position 3 et 5 est réalisée en présence de 2 équivalents de NCS à -78 °C pendant 2 h puis à -20 °C en une nuit pour un rendement de 68%. Travailler à basse température permet d'obtenir une substitution régiosélective. Enfin, le BODIPY **147** est obtenu avec un rendement de 55% en deux étapes réalisées en un pot : une oxydation en présence d'un équivalent de chloranil pour former le dipyrrométhène suivie d'une réaction acide-base avec $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ à TA en présence de triéthylamine.¹⁴⁴ Le BODIPY **147** plateforme a donc été synthétisé avec un rendement global sur 3 étapes de 22%.

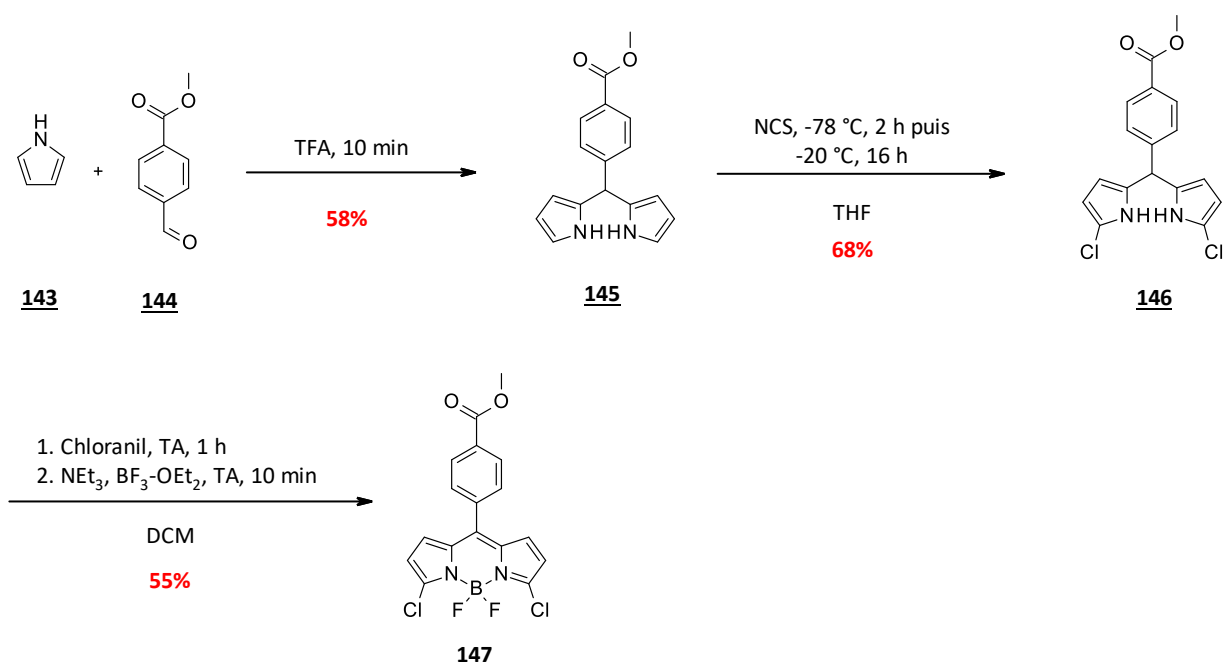
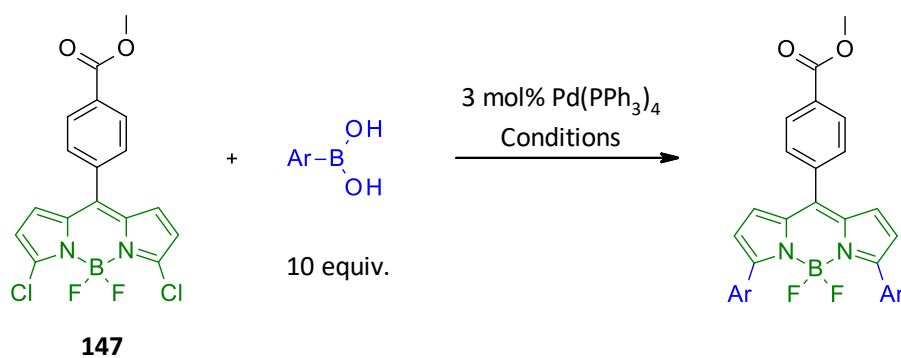


Schéma 3.22 : Synthèse du BODIPY **147** plateforme.

En effectuant des réactions de couplage type Suzuki ou Stille, nous envisagions de modifier les BODIPY de façon à déplacer les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le proche IR tout en ayant un déplacement de Stokes suffisamment grand pour éviter les phénomènes de superposition.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des conditions de couplage de Suzuki décrites dans la littérature pour synthétiser le BODIPY-ester *p*MeO. Celui-ci a été précédemment décrit avec une autre voie de synthèse par l'équipe de C. Im à partir du 2-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrole.¹⁸⁴ Les conditions les plus proches trouvées dans la littérature sont décrites à partir du BODIPY ci-dessous, reportés par l'équipe de C. Prandi.¹⁵⁶ Dans notre cas, ces conditions ne se sont pas révélées optimales puisque seule une conversion de 50% en substrat de départ a été observée, nous avons donc essayé des conditions en chauffage classique en présence de Na₂CO₃ (schéma 3.23).



Entrée	Ar	Conditions	Solvant	Résultats
1	<i>p</i> MeO-Ph	MW 150 °C, 20 min	1,2-DME	Conversion 50% (RMN)
2	<i>p</i> MeO-Ph	MW 150 °C, 40 min	1,2-DME	Conversion 50% (RMN)
3 ¹⁸⁵	<i>p</i> MeO-Ph	Reflux, 30 min, 1M Na ₂ CO ₃ aq.	Toluène	Rdt isolé = 89%
4	2-thienyl	Reflux, 24 h, 1M Na ₂ CO ₃ aq.	Toluène	Pas de conversion

Schéma 3.23 : Essais de différentes conditions de couplage de Suzuki-Miyaura.

Ainsi, les meilleures conditions se sont révélées être celles utilisant 3 mol% de Pd(PPh₃)₄, dans un mélange de toluène et d'une solution aqueuse de Na₂CO₃ 1M et 10 équivalents (5 équivalents par atome de chlore) d'acide 4-méthoxybenzèneboronique pendant 30 min à reflux. Après purification (entrée 3), le produit attendu a été isolé avec un rendement de 89%. Dans ces conditions, l'acide 2-thienylboronique ne conduit à aucun produit de couplage

¹⁸⁴ Cho, D.; Fujitsuka, M.; Ryu, J.; Lee, M.; Kim, H.; Majima, T.; Im, C. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3424-3426.

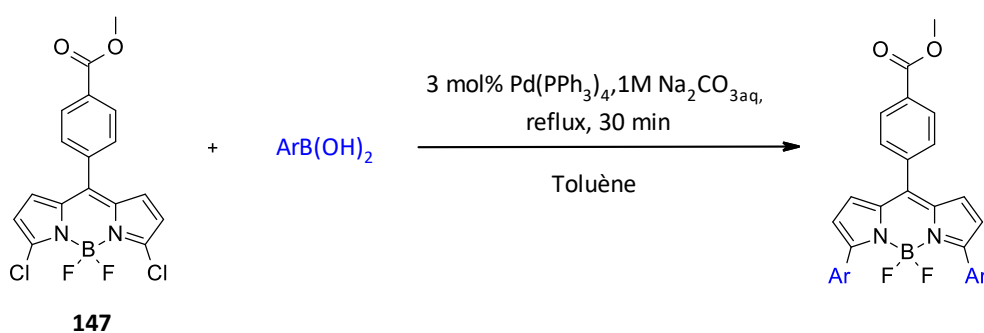
¹⁸⁵ Zhao, N.; Xuan, S.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 8377-8383.

même en augmentant le temps de réaction à 24 h (entrée 4). D'après la littérature,¹⁸⁶ le dérivé thiénylboronique n'est pas assez stable dans les conditions de réaction de Suzuki et est remplacé parfois par l'ester boronique correspondant.

Nous avons ensuite utilisé différents acide benzèneboroniques pour obtenir une bibliothèque suffisante de BODIPY ayant des propriétés optiques proche IR recherchées. Les différents BODIPY substitués par des groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs sont résumés ci-dessous (schéma 3.24).

En faisant varier la position des groupements méthoxy sur le cycle benzénique, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission des BODIPY sont déplacés plus ou moins vers l'IR. Nous avons aussi synthétisé le BODIPY **150** pour évaluer l'effet bathochromique avec deux groupes méthoxy sur chaque phényl. Les BODIPY **151** et **152** ont été aussi synthétisés pour déterminer l'impact de l'augmentation de la conjugaison du système et celui d'un groupement électro-attracteur sur la fluorescence. La synthèse du BODIPY **151** a pu être réalisée dans les mêmes conditions que pour les autres couplages car l'adduit acide benzothiénylboronique est plus stable que son analogue thiényle. On observe des rendements en produit pur entre 41% et 89%. Bien que l'on observe une conversion totale lors des réactions, il y a plusieurs sous-produits de réactions, ce qui a nécessité une recristallisation dans le méthanol puis une purification sur colonne supplémentaire selon les cas.

Les données optiques des BODIPY synthétisés seront présentées dans la partie suivante.



¹⁸⁶ Rihn, S.; Retailleau, P.; Bugsaliewicz, N.; De Nicola, A.; Ziessel, R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7008–7013.

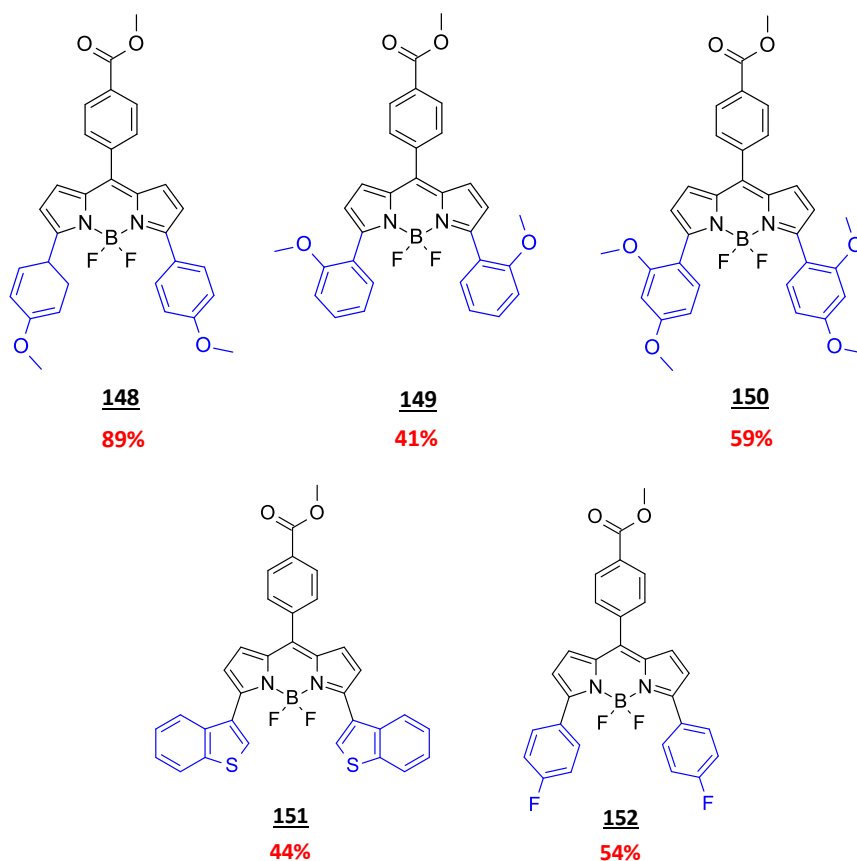
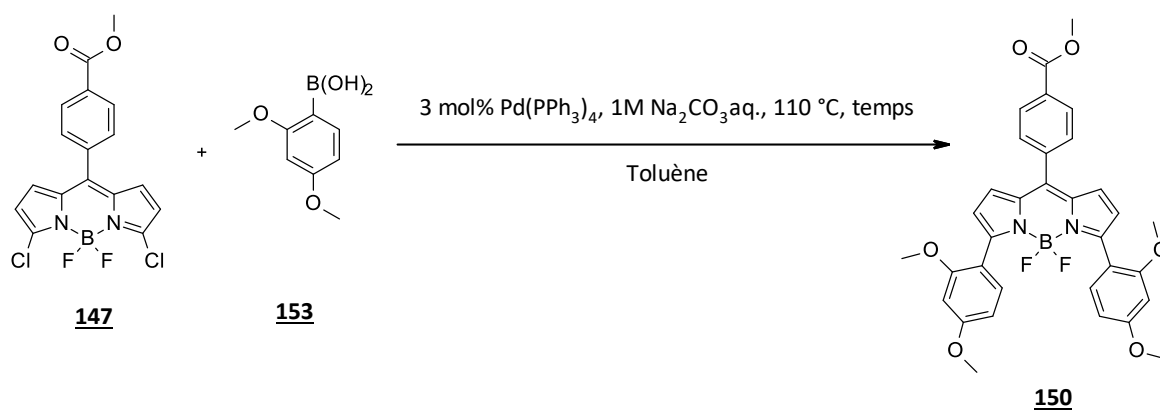


Schéma 3.24 : Synthèse de BODIPY par double couplage croisé de Suzuki.

Au cours de ces synthèses, nous avons tenté de réduire la quantité d'acide boronique de 10 à 4 équivalents, les résultats de cette optimisation sont présentés ci-dessous (schéma 3.25).



Entrée	Equivalents	Temps	Rdt (%)
1	10	30 min	59
2	4	16 h	58
3	5	1 h	58

Schéma 3.25 : Optimisation des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura.

En utilisant 4 équivalents d'acide boronique, nous avons suivi la réaction par CCM jusqu'à observer la conversion totale du **147** ainsi que de son intermédiaire monocouplé. Au bout de 16 h, le produit attendu est isolé avec un rendement de 58% semblable à celui des conditions initiales. En ajoutant 1 équivalent supplémentaire (entrée 3), on atteint un rendement identique en seulement 1 h. Finalement, nous avons choisi de conserver les conditions expérimentales de l'entrée 3 pour les futures réactions de couplages de Suzuki avec 5 équivalents d'acide boronique à 110 °C pendant 1 h.

B. Introduction de groupements thiényles sur le BODIPY plateforme par réaction de couplage croisé de Stille

N'ayant pu synthétiser les BODIPY substitués par des groupements thiényles via la réaction de Suzuki-Miyaura, nous nous sommes tournés vers la réaction de Stille qui est une réaction de couplage efficace bien qu'elle implique l'utilisation de dérivés à l'étain connu pour être toxiques.

En reprenant les conditions expérimentales décrites dans la littérature pour un couplage de Stille sur les positions 2 et 6 d'une autre structure BODIPY chlorée,¹³⁹ le BODIPY **155** a pu être synthétisé avec 66% de rendement à partir du 2-(tributylstannyl)thiophène **154** et du BODIPY **147**, en présence de 3 mol% de Pd(PPh₃)₄.

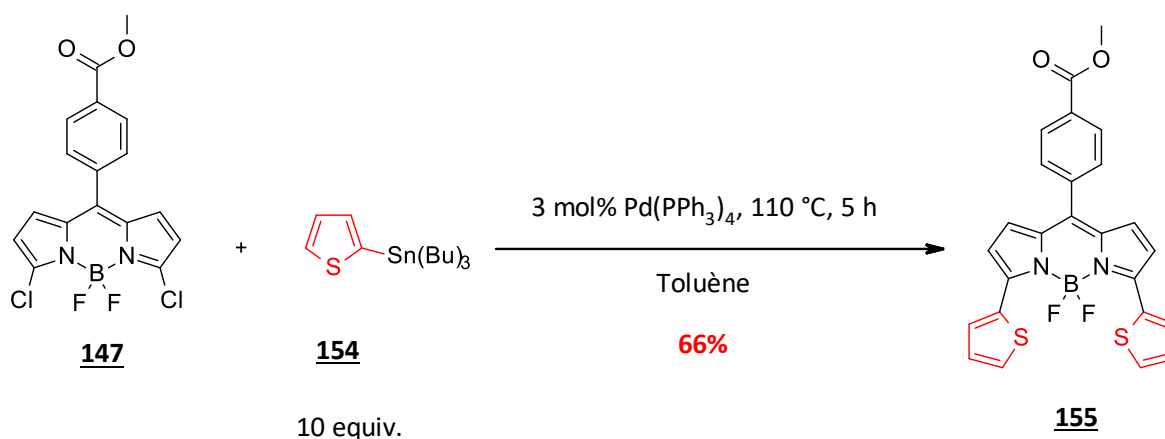


Schéma 3.26 : Synthèse du BODIPY **155**.

Pour vérifier si la position de l'atome de soufre sur le thiophène a une influence sur les propriétés de fluorescence, le BODIPY disubstitué par le groupement 3-thiényle a été synthétisé à partir du 3-(tributylstannyl)thiophène lui-même obtenu à partir du 3-bromothiophène¹⁸⁷ (schéma 3.27). Cette réaction est réalisée en deux étapes : la première est un échange halogène-métal entre le chlore et le lithium pour obtenir le produit **156** suivi d'une S_NAr en présence de 3-bromothiophène pour obtenir le dérivé stannane correspondant **157**.

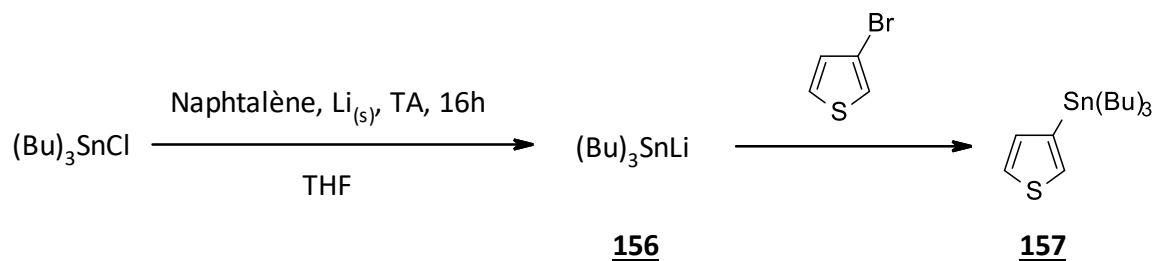


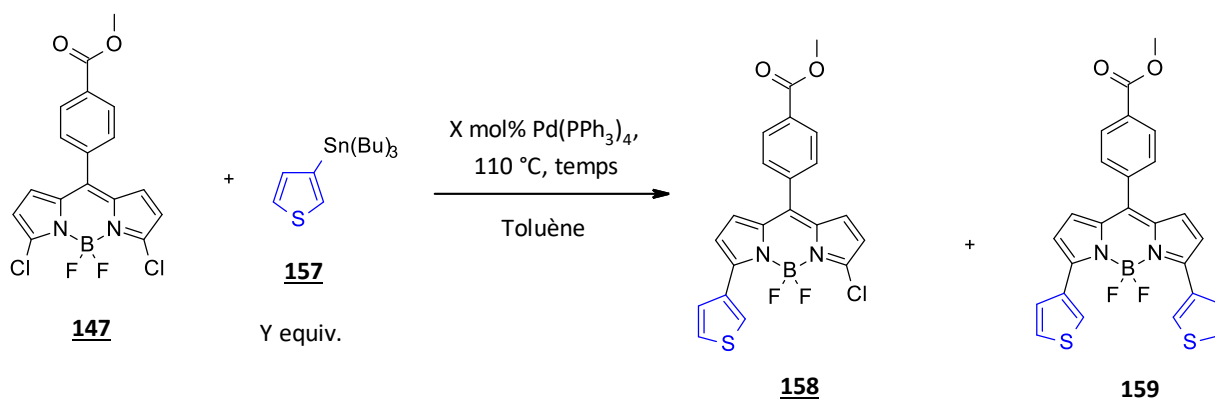
Schéma 3.27 : Synthèse du 3-(tributylstannyl)thiophène **157**.

Une fois le 3-(tributylstannyl)thiophène synthétisé, celui-ci a été mis à réagir avec le BODIPY **147** dans les mêmes conditions de Stille décrites précédemment (schéma 3.26).

Le 3-(tributylstannyl)thiophène **157** semble être moins réactif que son analogue 2-thiophène (entrée 1 du schéma 3.28), même en augmentant la durée de réaction à 15 h au lieu de 5 h, la conversion en substrat de départ est incomplète et le BODIPY **158** est isolé seul avec un rendement de 18%. Ceci nous a conduit à modifier les conditions réactionnelles afin d'obtenir le produit de double couplage.

Pour améliorer la conversion, la quantité de catalyseur a été augmentée à 9 mol% et additionnée en plusieurs fois au cours de la réaction pour compenser la dégradation éventuelle du catalyseur au cours du temps (entrées 2 et 3). Nous avons aussi fait varier l'écart de temps entre les ajouts de catalyseurs et le nombre d'équivalent de stannane (entrée 3). Après optimisation du temps de réaction et du nombre d'équivalents, il a été possible d'obtenir le composé disubstitué **159** avec 52% de rendement en 28 h.

¹⁸⁷ Wang, D.-Y.; Wang, C.; Uchiyama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10488–10491.



Entrée	X mol%	Y equiv.	Temps	Résultats
1	3	10	15 h	Rdt = 18% en 158
2	9 (en 3 fois)	10	48 h	Rdt = 52 % en 159
3	9 (en 3 fois)	8	28 h	Rdt = 52 % en 159

Schéma 3.28 : Optimisation des conditions de couplage croisé de Stille sur BODIPY.

Mais, lors d'une expérience mettant en jeu un nouveau lot de 3-thiophène stannane, nous avons eu la surprise d'obtenir une conversion totale en composé **159** en 1 h seulement. Après vérification du protocole expérimental, il est apparu que des traces de LiCl étaient présentes et pouvaient influencer le cycle catalytique de la réaction de Stille. Après une recherche bibliographique, il est connu que la présence de LiCl lors d'une réaction de couplage de Stille peut influencer la cinétique de deux façons différentes : soit sur l'étape d'addition oxydante, soit sur l'étape de transmétallation du cycle catalytique.¹⁸⁸ L'effet exact de l'addition de LiCl est variable selon le catalyseur et les réactifs utilisés. Il est possible que le lithium cationique aide à l'addition oxydante en captant le chlorure généré ou encore qu'il participe à l'isomérisation *cis-trans* de la transmétallation accélérant la formation du complexe *cis* améliorant en conséquence la cinétique du couplage. D'autre part, il existerait une 3^{ème} possibilité, qui impliquerait l'excès de chlorure. En effet, celui-ci favoriserait une étape de transmétallation ouverte et non cyclique car le chlorure viendrait attaquer l'étain permettant au carbone en α de former une liaison avec le palladium plus rapidement (figure 3.29).

¹⁸⁸ Espinet, P.; Echavarren, A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4704-4734.

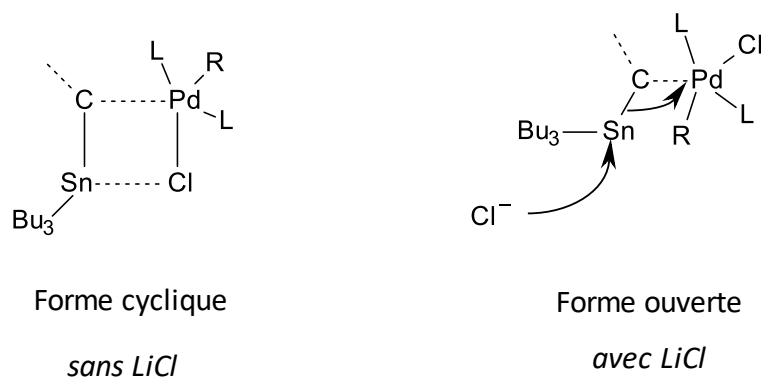


Figure 3.29 : Formes des intermédiaires de transmétallation avec ou sans LiCl.

Avec ces observations sur le rôle du LiCl sur la réactivité, nous avons essayé de réduire le nombre d'équivalent de 3-(tributylstannyl)thiophène de 8 équivalents à 5 équivalents tout en ajoutant 10 équivalents de LiCl dans le milieu. Les conditions optimales de synthèses sont reportées sur le schéma 3.27 ci-dessous. Nous avons obtenu et isolé le BODIPY **159** avec 59% de rendement en présence de 3 mol% de catalyseur et 10 équivalents de LiCl à 110 °C dans le toluène en 1 h.

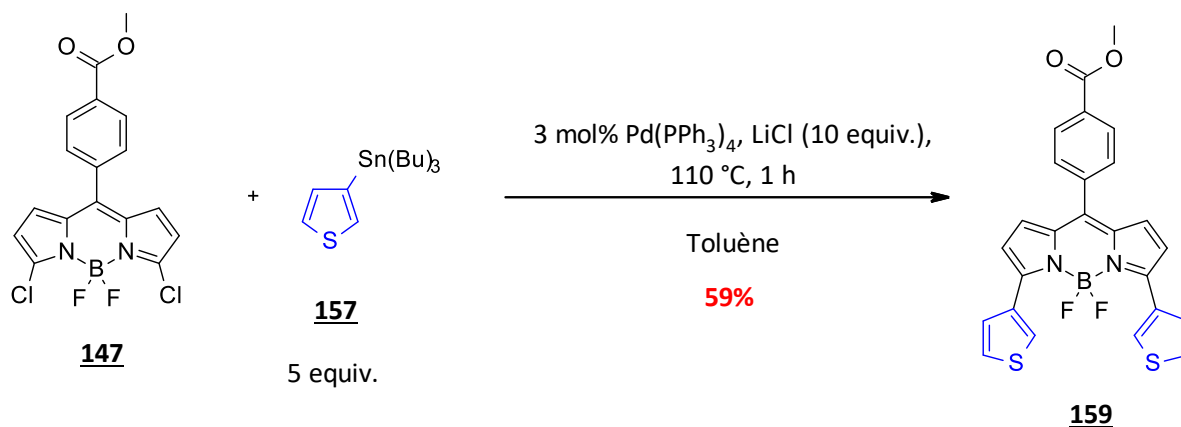


Schéma 3.30 : Synthèse du BODIPY **159**.

Enfin, en tant que défi synthétique mais aussi pour agrandir la bibliothèque de fluorophore, le BODIPY **160** dissymétrique possédant à la fois un groupement 2-thiényle et un autre 3-thiényle, a été synthétisé avec un rendement de 51% par ajout séquentiel en un pot des deux réactifs stannylés correspondants.

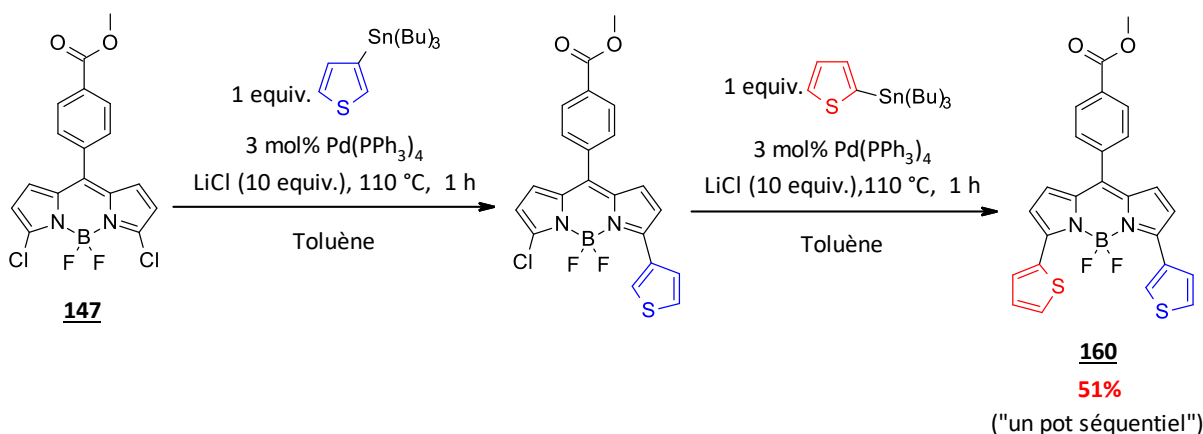


Schéma 3.31 : Synthèse en un pot séquentielle du BODIPY **160** dissymétrique.

Nous avons généré des cristaux de la molécule **160** par précipitation lente en mélange binaire (DCM/Cyclohexane 1/1) pour effectuer une étude structurale en cristallographie. La structure du composé, obtenue par diffraction des rayons-X, montre 3 taux d'occupations (35%, 25% et 40%) sur le thiophène de gauche et 2 taux d'occupation (60% et 40%) pour le thiophène de droite (figure 3.32). Ceci implique une structure cristalline désordonnée à cause de la libre rotation des fragments autour des liaisons A et B. En effet ces taux d'occupations s'expliquent par la rotation autour de l'axe A qui modifie les positions du 2-thiényl ou 3-thiényl. La rotation autour des axes B fait varier la position de l'atome de soufre par conformation. Cette libre rotation autour des axes B est décrite dans la littérature.¹⁸⁹ Ayant tout de même 3 taux d'occupations sur un thiophène et 2 taux sur le second prouve la différence entre les deux fragments et la dissymétrie du composé.

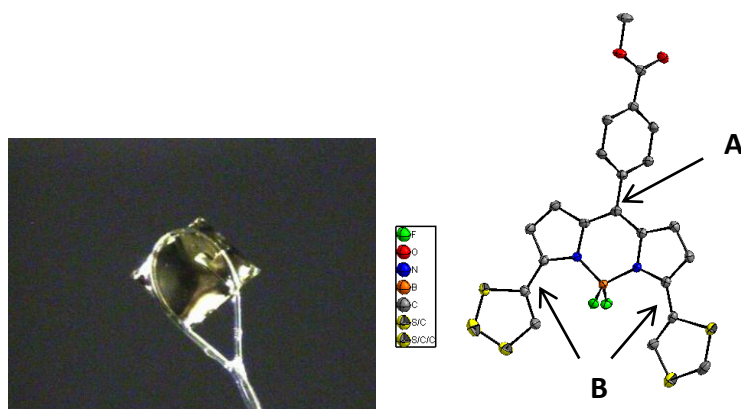


Figure 3.32 : Photo du cristal et structure RX du BODIPY **160**.

¹⁸⁹ Zhao, N.; Vicente, M. G. H.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 6181–6192.

C. Synthèse de BODIPY dissymétriques par double couplage croisé séquentielle en un pot

Comme nous venons de le voir, différentes fonctions ont pu être greffées sur le BODIPY **147** par couplage C-C de Suzuki-Miyaura mais aussi par couplage C-C de Stille. Nous avons donc tenté de synthétiser des BODIPY en faisant intervenir les deux réactions successivement sans purification intermédiaire. Nous avons présenté dans la partie 1 la synthèse de BODIPY dissymétrique en deux étapes distinctes ce qui est la voie de synthèse classique pour les BODIPY dissymétriques.

Pour synthétiser les BODIPY dissymétriques 3-(2-thiényle)-5-(4-méthoxyphényle) et 3-(3-thiényle)-5-(4-méthoxyphényle), nous avons choisi d'effectuer la réaction séquentielle de Suzuki et Stille entre le composé **147** et l'acide 4-méthoxyphénylboronique suivi respectivement du 2-(tributylstannane)thiophène et du 3-(tributylstannane)thiophène. Ne connaissant pas l'effet que pourrait avoir le LiCl sur le couplage de Suzuki, cette dernière sera effectuée en premier. La réaction est suivie par CCM et l'apparition du produit de double couplage de Suzuki, le BODIPY-*p*MeO, est observée avant la conversion totale du BODIPY de départ. Le dérivé stannane est donc introduit dans le milieu réactionnel à ce moment ce qui impliquera aussi la formation du BODIPY **155** (possédant 2 groupements 2-thiényle) ou du BODIPY **159** (possédant 2 groupements 3-thiényle). Un excès de stannane est ajouté pour avoir une conversion totale du réactif. Les BODIPY **161** et **162** ont alors été isolés avec des rendements optimisés de respectivement 32% et 24%.

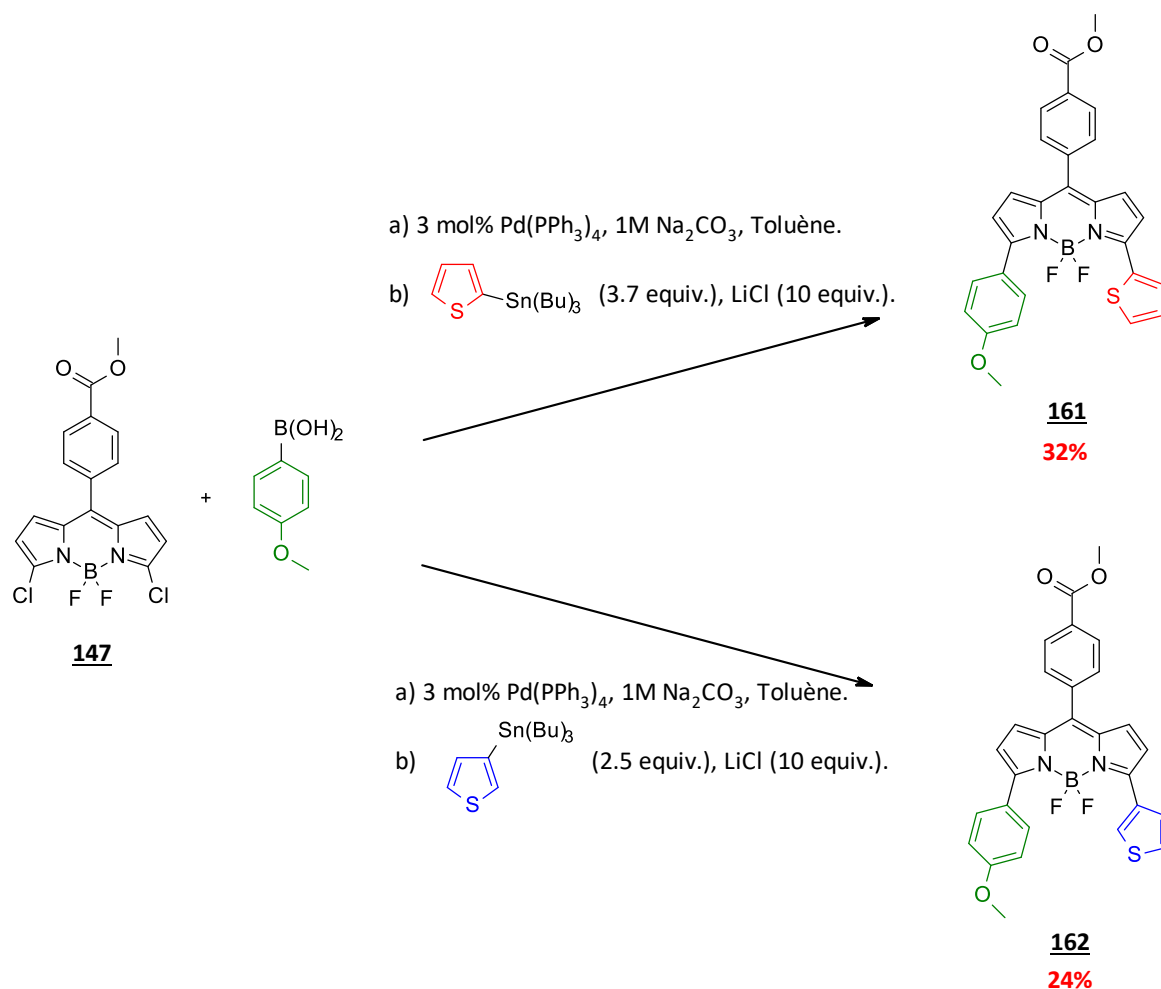


Schéma 3.33 : Synthèse des BODIPY dissymétriques **161** et **162** séquentielle en un pot.

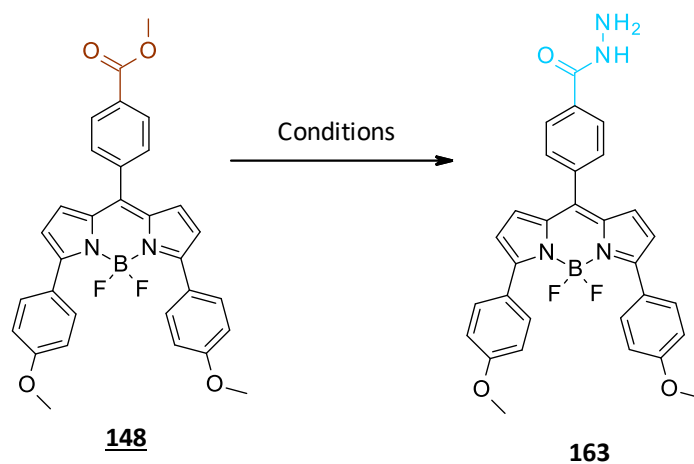
Pour résumer sur la partie synthèse des BODIPY esters : une bibliothèque de 10 BODIPY avec différents substituants a été synthétisée en 4 étapes à partir du pyrrole commercial selon une synthèse divergente et des rendements globaux compris entre 5% (**162**) et 20% (**148**) et un rendement global moyen de 11,5%.

D. Vers des BODIPY-hydrasides pour le marquage des protéines carbonylées

Il ne manque plus qu'une dernière étape pour obtenir de nouvelles sondes fluorescentes fonctionnelles : l'introduction de la fonction hydrazide.

La fonction hydrazine, très bon nucléophile, va attaquer directement le carbonyle de l'ester, par un mécanisme d'addition élimination, sans passer par une étape d'activation. Le BODIPY-

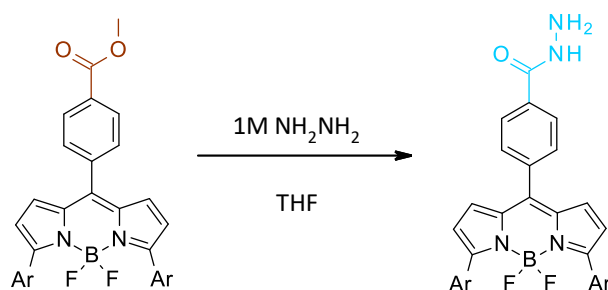
pMeO a tout d'abord été mis en présence d'un excès d'hydrazine monohydraté dans du méthanol ou de l'éthanol pour plus de solubilité.¹⁹⁰ Le milieu a été chauffé à reflux pendant 24h sans résultat, aucune conversion n'ayant été observée. Finalement, le BODIPY-pMeO a été mis à réagir directement dans de l'hydrazine 1M dans du THF (environ 57 équivalents) à température ambiante pendant une nuit ce qui a permis d'obtenir le composé final avec une conversion totale et un rendement quantitatif (schéma 3.34).



Entrée	Réactif	Solvant	Résultats
1	NH ₂ NH ₂ .H ₂ O (1,6 equiv.)	MeOH	Pas de conversion
2	NH ₂ NH ₂ .H ₂ O (1,6 equiv.)	EtOH	Pas de conversion
3	NH ₂ NH ₂ (1M dans THF)	THF	Rdt = 100%

Schéma 3.34 : Optimisation de synthèse pour l'obtention de la fonction hydrazide.

Les conditions expérimentales de l'entrée 3 (schéma 3.34) ont été utilisées pour convertir 7 des 10 BODIPY esters initiaux.



¹⁹⁰ Ashokkumar, P.; Weisshoff, H.; Kraus, W.; Rurack, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2225-2229.

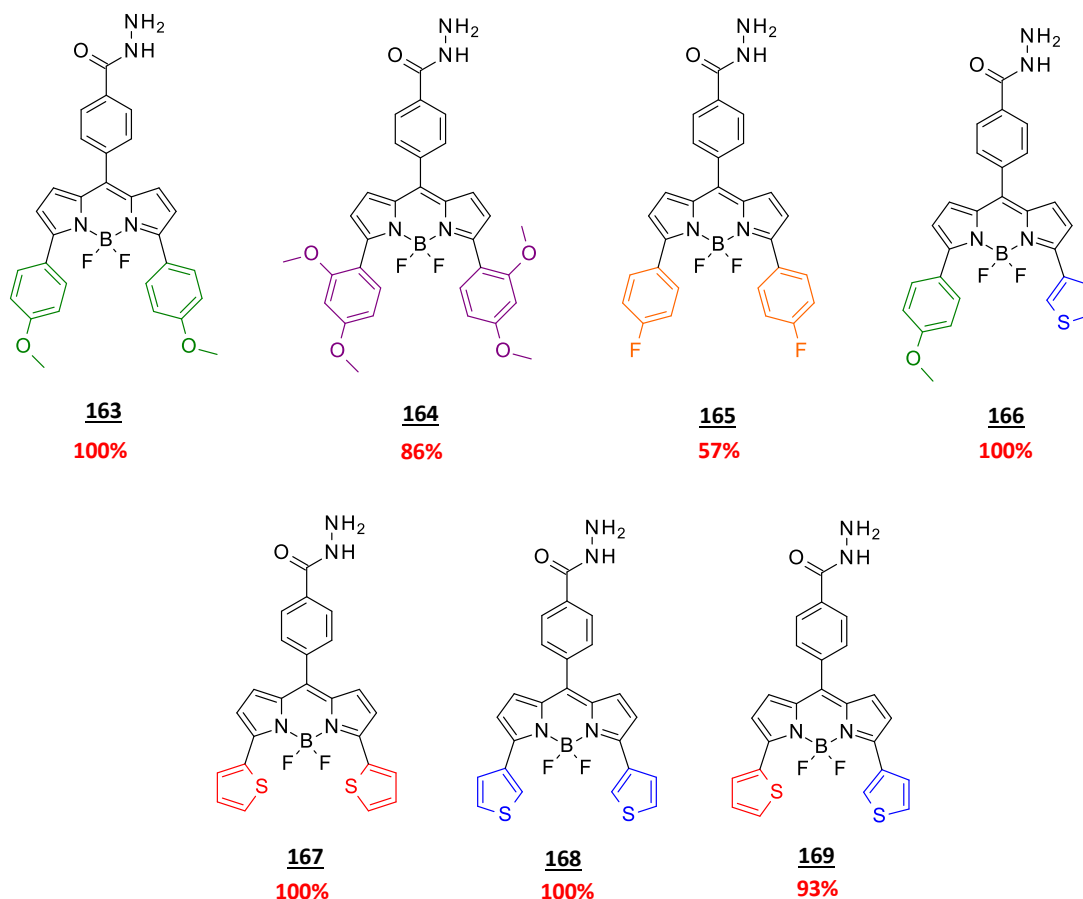


Schéma 3.35 : Structures et rendements des BODIPY-hydrazides synthétisés.

Une fois la synthèse achevée, les propriétés optiques de tous les BODIPY esters et hydrazides ont été mesurées. 4 BODIPY hydrazides seront utilisés pour des applications biologiques détaillées dans le chapitre IV.

4. Propriétés de fluorescence des BODIPY esters et hydrazides

A. Fluorescence des BODIPY esters dans le méthanol

Pour caractériser la fluorescence des molécules, nous nous sommes placés dans le méthanol, milieu de mesure identique à celui des mesures de fluorescence des CyDyes commerciales (voir chapitre I). Ceci peut s'expliquer par le fait que les gels de migration 2D

sont en polyacrylamide. Ce polymère forme un réseau avec des pores plus ou moins grand dans le gel, ce qui permet de séparer les protéines selon leur masse. Une fois la migration terminée, les gels sont placés dans un milieu éthanol-acide acétique (95/5). Cette solution permet la contraction des pores du réseau pour fixer les protéines sur le gel et empêcher toute migration ou diffusion supplémentaire au sein du gel. Ainsi, les mesures de fluorescence dans le méthanol permettent d'être dans des conditions proches de celle d'analyses des gels.

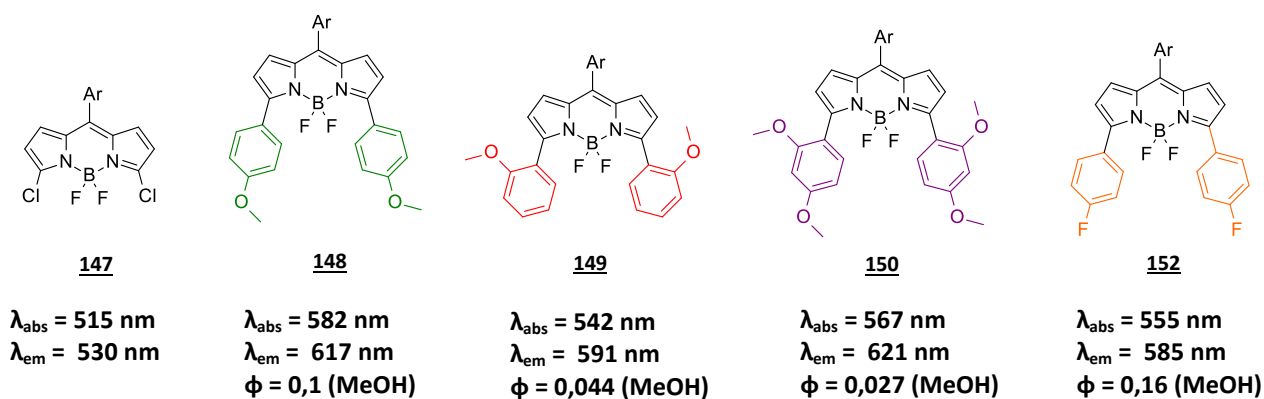
Il est à noter que les propriétés de fluorescence (intensité d'émission, rendement quantique) dépendent du solvant de mesure.

Les BODIPY décrits précédemment sont peu solubles dans les solvants comme le chloroforme ou le dichlorométhane et quasiment insolubles dans le méthanol. Par conséquent, les solutions mères des fluorophores ont été réalisées dans un mélange DMSO-méthanol avec des proportions variant entre 20% et 50% en DMSO. Mais, étant dilué entre 100 et 1000 fois (selon l'échantillon) dans du méthanol pour avoir des absorptions comprises entre 0,05 et 0,1, le milieu peut être assimilé à du méthanol pur.

Pour rappel, la fluorescence des BODIPY provient de la transition entre les orbitales HOMO-LUMO localisées sur le noyau BODIPY. La substitution des pyrroles influence le niveau d'énergie de ces orbitales ce qui permet d'observer des phénomènes hypso- ou bathochromiques sur la fluorescence.

a. Mesures de fluorescence des BODIPY esters 3,5-disubstitués par des groupements aryles

Nous allons, tout d'abord, comparer l'effet du méthoxy présent sur les groupements phényles sur la fluorescence. Les données des spectres ci-dessous sont des données normalisées arbitrairement en intensité de fluorescence et d'absorption.



avec Ar = PhCO₂Me

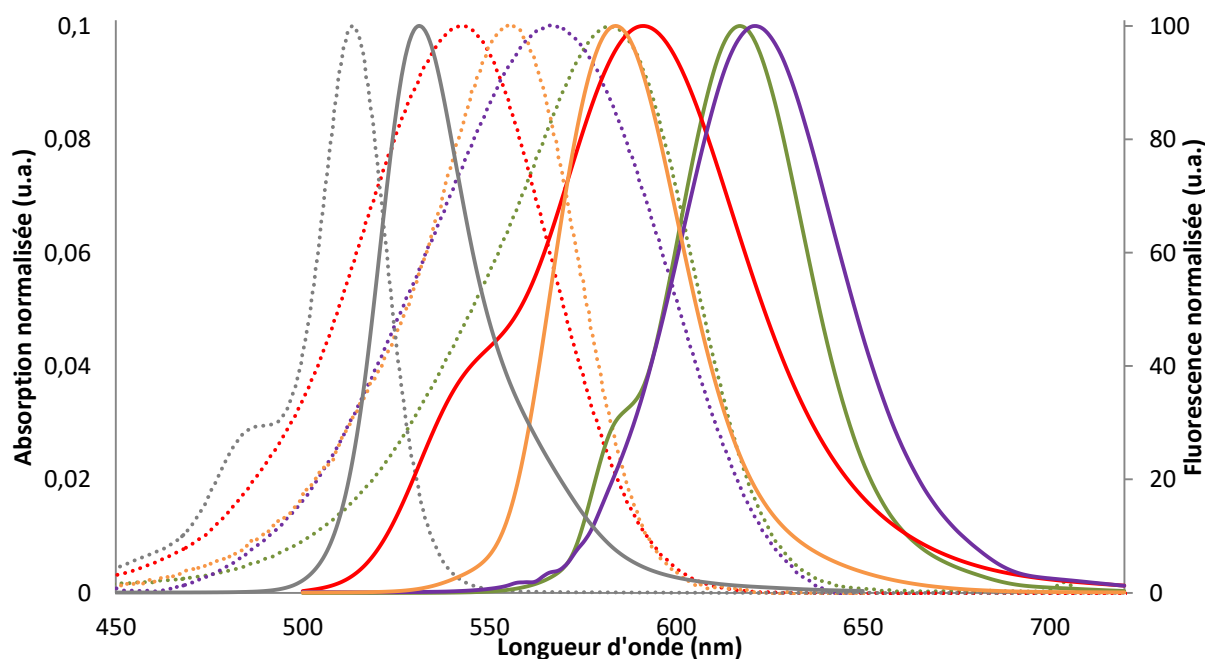


Figure 3.36 : Spectres d'absorption (en pointillé) et fluorescence (trait plein) des BODIPY ester **147**, **148**, **149**, **150** et **152** dans le méthanol.

Sur tous les composés possédant des motifs méthoxyphényl, le BODIPY **150** (en violet) présente l'émission en fluorescence la plus élevée avec des longueurs d'onde allant jusqu'à 621 nm pour une absorption de 567 nm et un déplacement de Stoke $\Delta\lambda$ de 54 nm. En comparaison, les analogues monosubstitué **148** et **149** ont des $\Delta\lambda$ de respectivement 35 nm et 49 nm. Il est intéressant de constater que le composé **150** a conservé une émission proche du BODIPY **148** mais avec une absorption à équidistance entre celle du BODIPY **148** (582 nm) et du BODIPY **149** (542 nm). On retrouve une absorption maximum sans superposition avec le maximum d'émission et inversement : une propriété qui est directement liée recherchée dans la création d'une nouvelle sonde fluorescente.

L'effet bathochromique observé pour le BODIPY **148** est plus important que pour le BODIPY **149**. Cet écart peut provenir de la délocalisation de la charge lors l'ICT, entre le groupement électro-donneur vers le groupement électro-attracteur en *meso*, qui est plus importante avec un substituant en para qu'en ortho. En effet le methoxy en ortho doit contraindre la molécule à adopter une conformation non coplanaire du système atropoisomérique - diaromatique réduisant ainsi la délocalisation (figure 3.37).

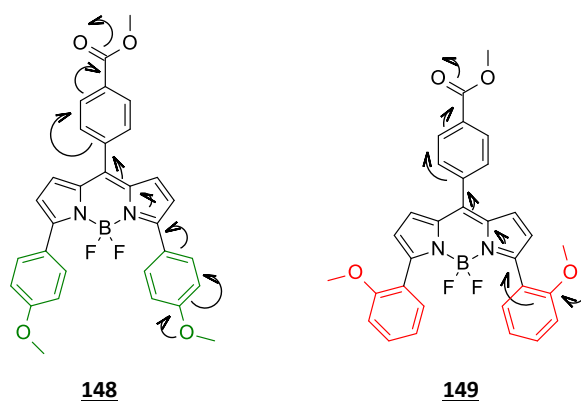


Figure 3.37 : Représentation schématique des délocalisations possibles sur les BODIPY-pMeO et BODIPY-oMeO.

Le BODIPY **152**, quant à lui, absorbe à 555 nm et émet à 585 nm pour un $\Delta\lambda$ de 30 nm. On retrouve ici aussi un effet bathochromique plus faible lié à l'introduction de la conjugaison avec le cycle aromatique et l'effet inductif attracteur du groupement fluorophényle qui diminue la délocalisation globale.

On remarque que les rendements quantiques sont de l'ordre de 10% avec un minimum de 2,7% pour le BODIPY **150** et un maximum de 16% pour le BODIPY **152**. Un faible rendement quantique peut s'expliquer, dans notre cas, par une mobilité conformationnelle de la structure ou du π -stacking. Pour rappel, la probabilité de dissiper l'énergie d'un état excité par des processus non-radiatif augmente lorsque les groupements présents sur le squelette BODIPY peuvent avoir différentes conformations par rotation.¹⁹¹ La présence d'un groupement méthoxy en *ortho* réduit l'intensité de fluorescence par rapport à la position en *para*. Compte tenu de la gêne stérique, ce résultat ne peut pas s'expliquer seulement avec les conformères possibles. D'autres phénomènes doivent être pris en compte comme la neutralisation de la fluorescence dans ce milieu pour le composé **149** ou encore la perte

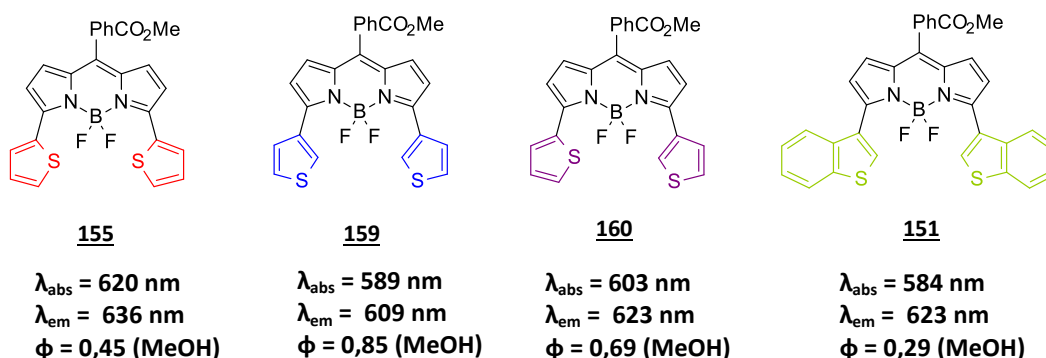
¹⁹¹ Kim, H.; Burghart, A.; Welch, M. B.; Reibenspies, J.; Burgess, K. *Chem. Comm.* **1999**, 1889-1890.

d'énergie par π -stacking. Lorsque la fonction est sur les deux positions, le rendement quantique chute encore plus à 2,7%.

b. Mesures de fluorescence des BODIPY esters 3,5-disubstitués par des groupements hétéroaryles

Concernant les BODIPY esters **155**, **159** et **160**, on remarque que le BODIPY **155** est celui qui émet à la plus grande longueur d'onde (636 nm) de tous les composés synthétisés dans notre laboratoire. Cependant c'est aussi celui qui possède le déplacement de Stokes $\Delta\lambda$ le plus faible avec 16 nm. Ainsi, les spectres d'absorption et d'émission se recouvrent davantage qu'avec les autres BODIPY.

La molécule **159** possède un maximum d'absorption à 589 nm pour 609 nm en émission. On constate que le composé **160** est une « moyenne » des composés **155** et **159** car ses maxima ($\lambda_{\text{abs}} = 603 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 623 \text{ nm}$) sont quasiment situés au milieu des maxima d'absorption et d'émission des deux autres. Il est à noter que le BODIPY **155** montre une délocalisation des électrons sur plus d'atome que les BODIPY **160** et **159** ce qui explique l'effet bathochromique plus important. En ajoutant un benzothiophène (**151**) à la place du 3-thiophène (**159**), le déplacement de Stokes est presque doublé de 20 à 39 nm, et on augmente la longueur d'onde d'émission (623 nm) tout en diminuant celle d'absorption (584 nm). Un exemple supplémentaire démontrant l'importance de la conjugaison sur la fluorescence.



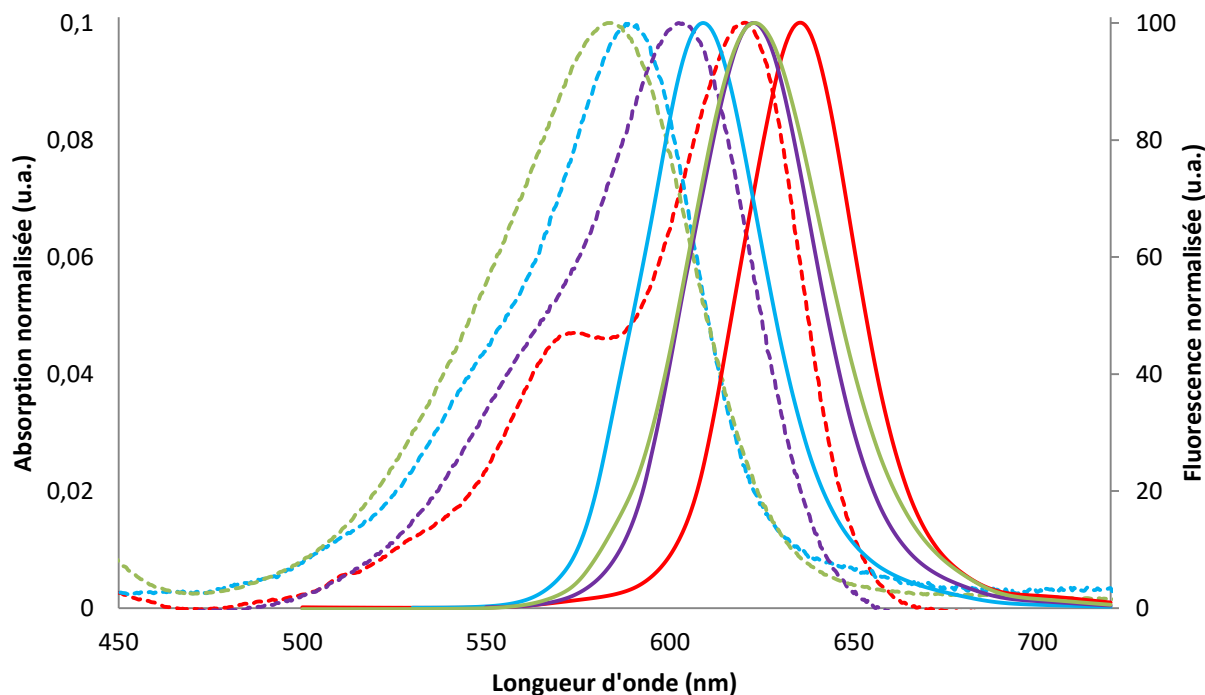


Figure 3.38 : Spectres d'absorption (en pointillé) et de fluorescence (trait plein) des BODIPY ester **155**, **159**, **160** et **151** dans le méthanol.

Les composés **155**, **159** et **160** sont les plus fluorescents de tous les BODIPY synthétisés. Un hétérocycle soufré induit une meilleure intensité d'émission allant jusqu'à de très bon rendement quantique comme 85% pour le BODIPY **159** ou 69% pour le BODIPY **160**. La position du soufre influence les longueurs d'onde d'absorption et d'émission mais aussi l'intensité de fluorescence. On peut aussi remarquer que le rendement quantique de 29% du BODIPY **151** est bien plus faible que pour les analogues thiényles ce qui est sans doute dû aux interactions de type π -stacking qui entraînent une perte de fluorescence.

c. Mesures de fluorescence des BODIPY esters dissymétriques issus des réactions de couplages séquentielles

Enfin, les spectres des composés **161** et **162** sont représentés ci-dessous avec les spectres des analogues symétriques. Pour la molécule **161**, on mesure un maximum d'absorption et d'émission à respectivement 601 nm et 628 nm qui sont aussi quasiment

centrés entre les maxima des analogues symétriques. De même que le rendement quantique de 36% qui est compris entre celui du composé **148** (10%) et celui du composé **155** (45%).

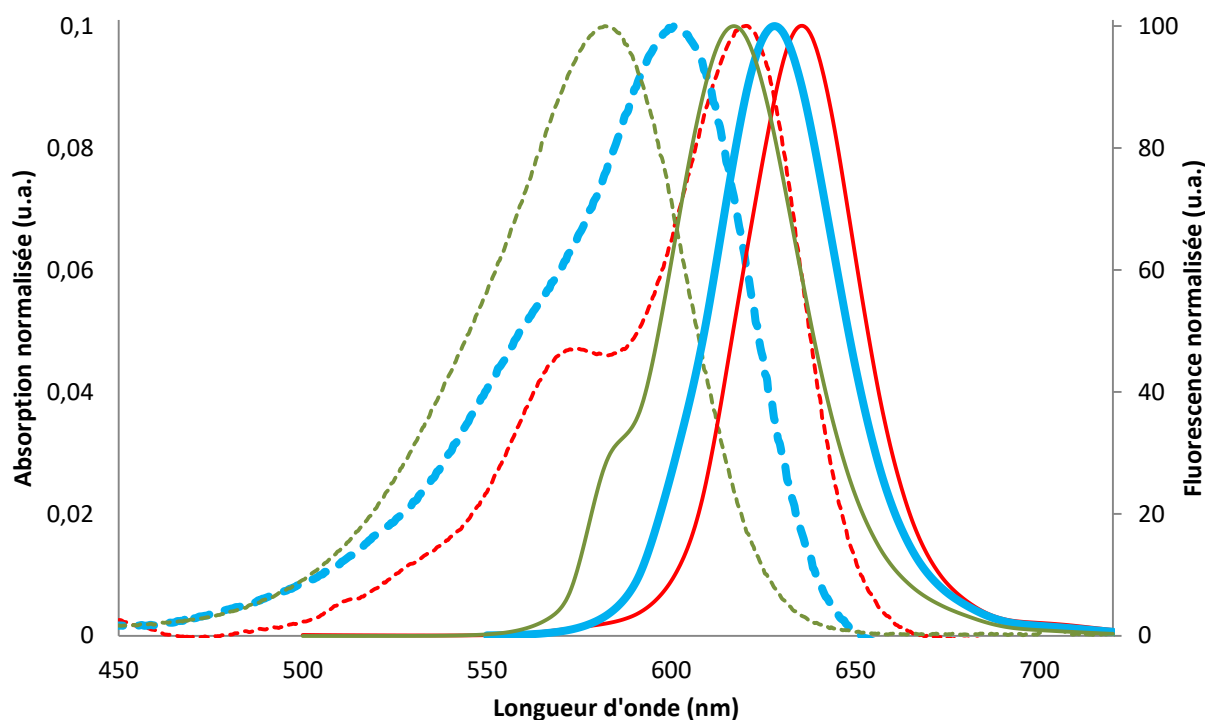
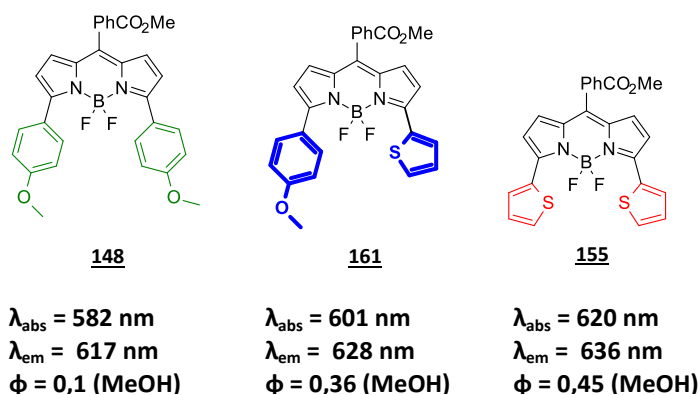


Figure 3.39 : Spectres d'absorption (en pointillé) et de fluorescence (trait plein) des BODIPY ester **148**, **161** et **155** dans le méthanol.

Enfin, le composé **162** suit le même comportement que les autres composés dissymétriques, ses maxima d'absorption et d'émission, respectivement 585 nm et 615 nm, se situent entre les maxima des analogues symétriques. Cependant, les différents spectres se superposent et ceux du composé **162** se retrouve confondus avec les molécules **148** et **159**. De plus, comme dans le cas du BODIPY **161**, on retrouve un rendement quantique de 39% pour le BODIPY **162** compris entre ceux des analogues symétriques correspondants.

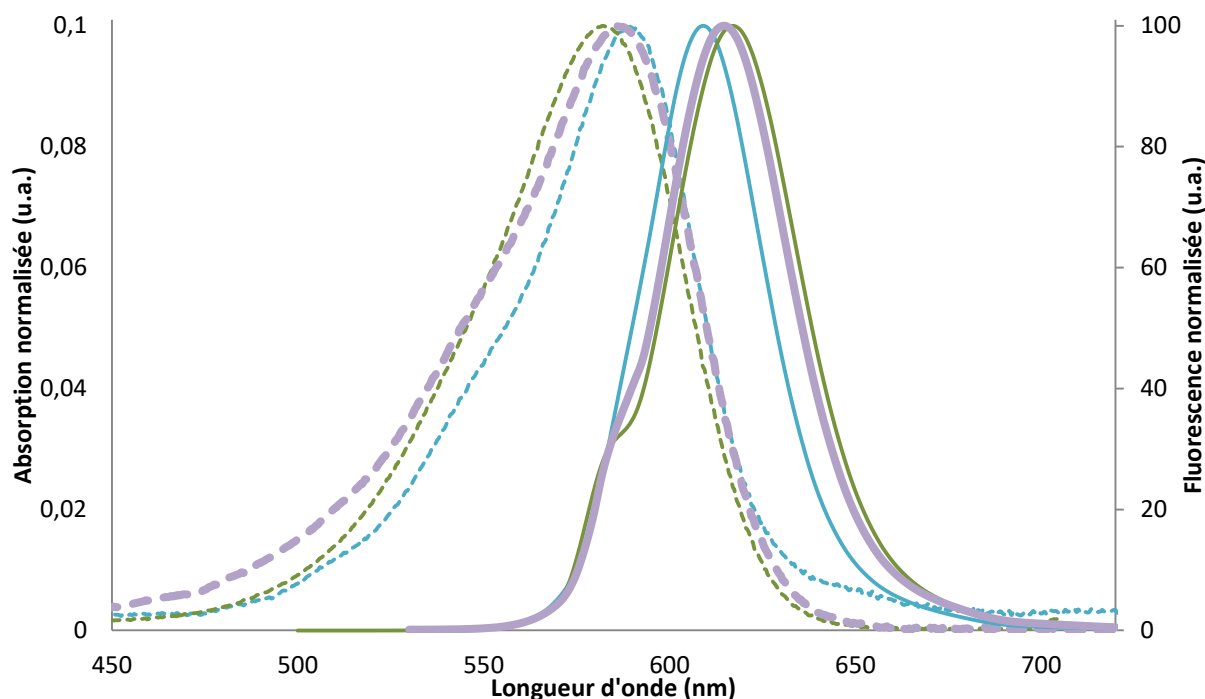
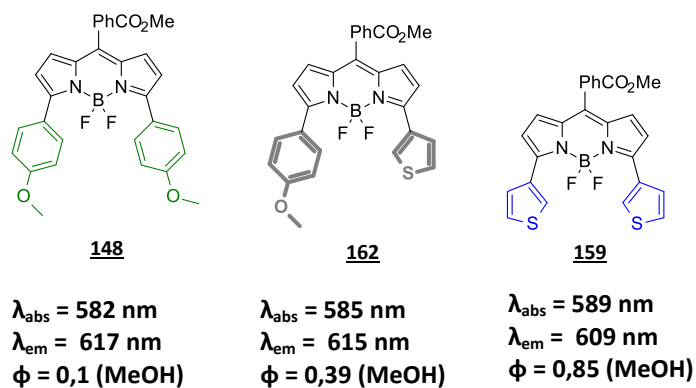


Figure 3.40 : Spectres d'absorption (en pointillé) et de fluorescence (trait plein) des BODIPY ester [148](#), [162](#) et [159](#).

Ces mesures démontrent que l'ICT induit par les groupements électro-donneurs, comme le méthoxy ou le thiophène, contribuent à exacerber la fluorescence. L'augmentation de la conjugaison et/ou du nombre de site de délocalisation de charge, par l'introduction d'un cycle aromatique en position 3 et 5 du BODIPY, permet d'obtenir soit un meilleur effet bathochromique soit un meilleur déplacement de Stokes. Cependant, le déplacement de Stokes décroît à mesure que la longueur d'onde d'émission augmente.

d. Tableau récapitulatif des propriétés optiques des BODIPY esters

D'autres paramètres optiques sont à prendre en compte : le coefficient d'absorption molaire et le rendement quantique. Les coefficients d'absorption molaire sont reportés dans le tableau ci-dessous, ainsi que les longueurs d'onde d'absorption et d'émission, le déplacement de Stokes et le rendement quantique. Le rendement quantique a été mesuré par comparaison avec du violet de Crésyl qui possède un domaine de fluorescence superposable à celui de nos BODIPY.

BODIPY Dans le MeOH	ϵ (M ⁻¹ /cm)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	ϕ	Brillance B ($\epsilon \cdot \phi$)
<u>148</u>	27754	582	617	35	0,1	2775
<u>149</u>	32903	542	591	49	0,044	1448
<u>150</u>	37912	567	621	54	0,027	1024
<u>151</u>	40319	584	623	39	0,29	11692
<u>152</u>	31352	555	585	30	0,16	5016
<u>155</u>	30377	620	636	16	0,45	13670
<u>159</u>	36278	589	609	20	0,85	30837
<u>160</u>	31578	603	623	20	0,69	21789
<u>161</u>	32026	601	628	27	0,36	11529
<u>162</u>	28372	585	615	30	0,39	11065

Figure 3.41 : Tableau résumé des propriétés optiques des BODIPY-ester dans le méthanol.

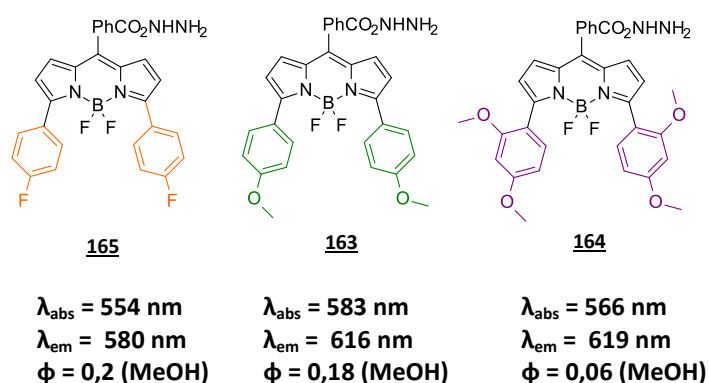
Les coefficients d'absorption molaire sont compris entre 27754 M⁻¹.cm⁻¹ et 40319 M⁻¹.cm⁻¹ ce qui est assez faibles pour des sondes fluorescentes (au moins 100000 M⁻¹.cm⁻¹ pour les sondes commerciales). Cependant, nous avons mesuré de hauts rendements quantiques pour les BODIPY possédant des motifs thiényles entre 45% et 85%. Les BODIPY dissymétriques (**160**, **161** et **162**) présentent des propriétés optiques intermédiaires à leurs analogues symétriques sauf dans le cas des coefficients d'extinction molaire. Le fluorophore

151 est celui qui présente le meilleur coefficient d'absorption molaire avec $40319 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour un rendement quantique de 29%. D'après la valeur de leur brillance, on peut noter que les 3 meilleures sondes seraient les BODIPY **155**, **159** et **160**. Mais les spectres d'absorption et d'émission se recouvrent entre eux donc nous ne pourrions conserver que le BODIPY **155** et le BODIPY **159**. Enfin le BODIPY **159** est le composé ayant la fluorescence la plus intense comme le montre sa brillance de 30837 et son rendement quantique de 85%.

B. Fluorescence des BODIPY hydrazides dans le méthanol

De manière identique, les mesures de fluorescence des BODIPY hydrazides ont été effectuées dans le méthanol. Les spectres d'absorption et de fluorescence des dérivés hydrazides sont semblables (voire identiques) à leurs analogues ester. Les maxima d'absorption et d'émission sont similaires à 1 ou 2 nm près. Les changements sur les propriétés optiques interviennent sur le coefficient d'absorption molaire et sur le rendement quantique.

Tout d'abord, seuls 7 BODIPY esters ont été convertis en BODIPY hydrazides comme expliqué précédemment. Les différents spectres sont présentés successivement ci-après (Figure 3.45 et 3.46). Dans un souci de clarté, ils ont été séparés sur 2 figures.



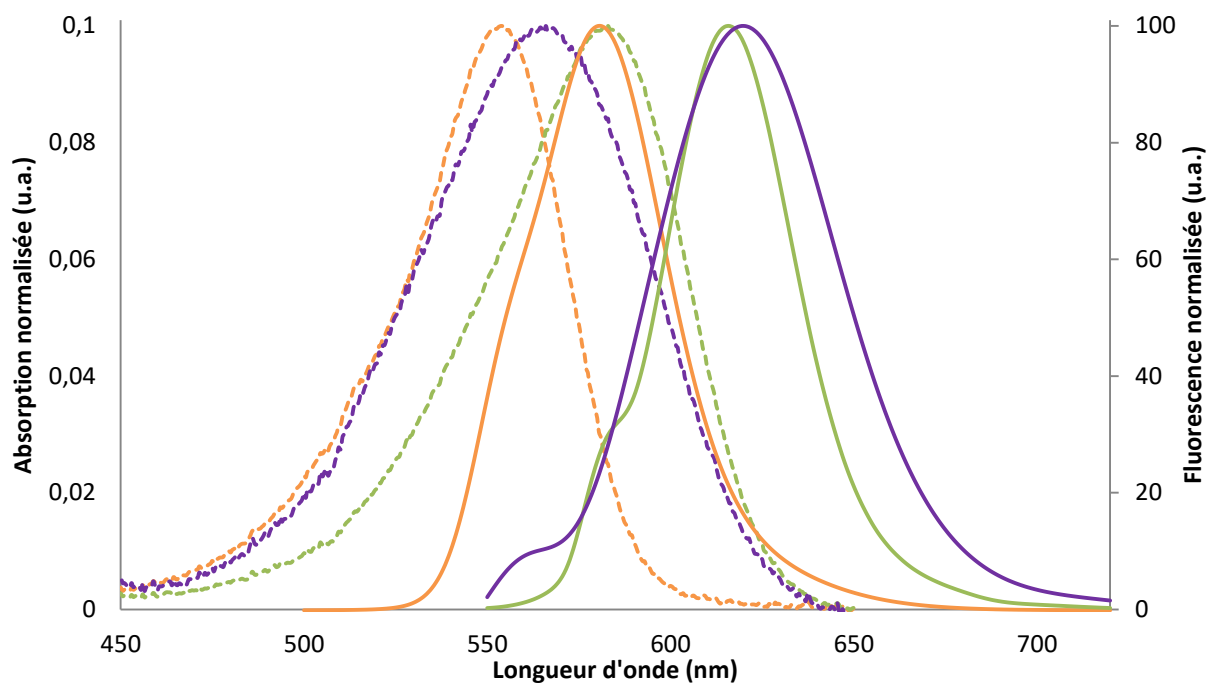
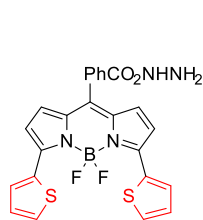
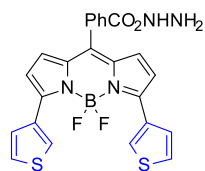


Figure 3.42 : Spectres d'absorption (en pointillé) et d'émission (trait plein) des BODIPY hydrazides **165**, **163**, **164** dans le méthanol.



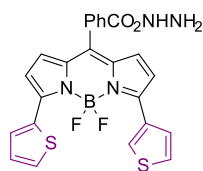
167

$\lambda_{\text{abs}} = 619 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$
 $\phi = 0,47 \text{ (MeOH)}$



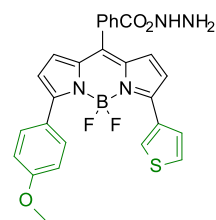
168

$\lambda_{\text{abs}} = 588 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 606 \text{ nm}$
 $\phi = 0,88 \text{ (MeOH)}$



169

$\lambda_{\text{abs}} = 602 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 619 \text{ nm}$
 $\phi = 0,66 \text{ (MeOH)}$



166

$\lambda_{\text{abs}} = 586 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$
 $\phi = 0,49 \text{ (MeOH)}$

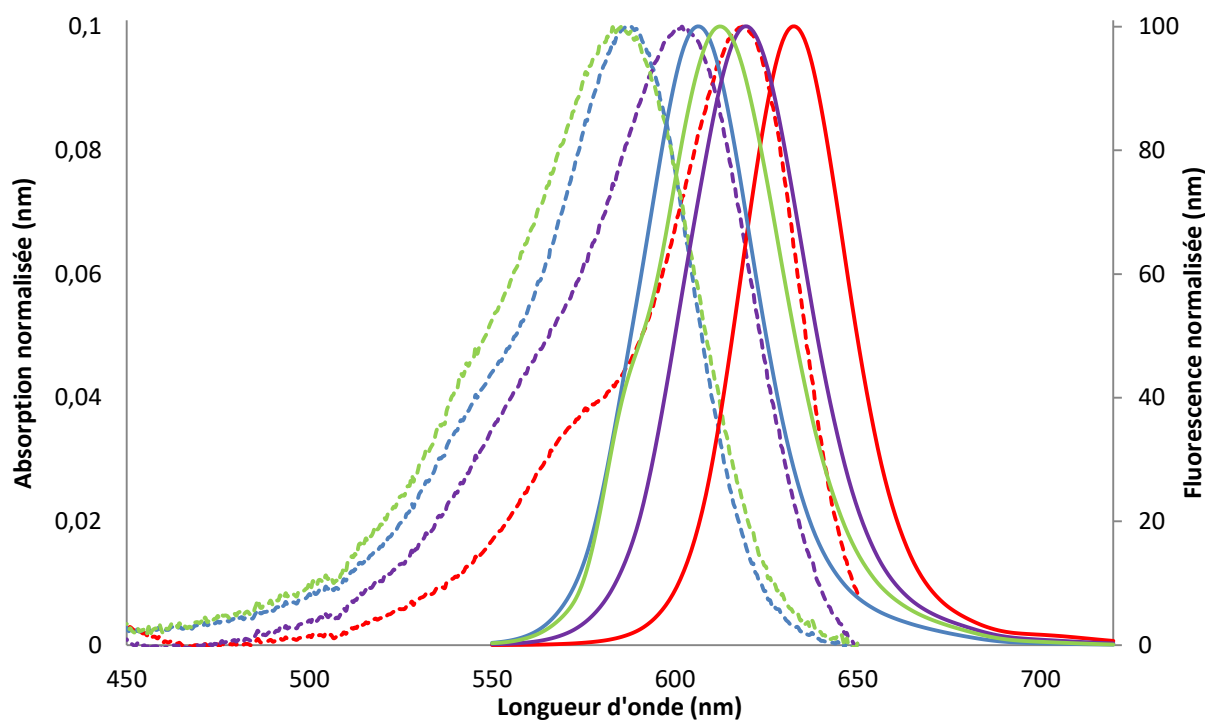


Figure 3.43 : Spectres d'absorption (en pointillé) et d'émission (trait plein) des BODIPY hydrazides **167**, **168**, **169** et **166** dans le méthanol.

Voici un tableau récapitulatif des données optiques des composés hydrazides :

BODIPY-Hz <i>Dans le MeOH</i>	ϵ (M^{-1}/cm)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	ϕ	Brillance B ($\epsilon.\phi$)
163	34530	583	616	33	0,18	6215
164	14549	566	619	53	0,06	9311
165	19264	554	580	26	0,2	3853
166	10429	586	612	26	0,49	5110
167	26314	619	633	14	0,47	12368
168	24567	588	606	18	0,88	21619
169	20608	602	619	17	0,66	13601

Figure 3.44 : Tableau résumé des propriétés optiques des BODIPY-Hydrazides dans le méthanol.

Les coefficients d'absorption molaire ont tendance à diminuer par rapport aux BODIPY esters avec des écarts allant jusqu'à 50% tout en conservant une bonne intensité de fluorescence. Cela implique une hausse des rendements quantiques sauf dans le cas du BODIPY 169 dont l'intensité de fluorescence diminue aussi.

L'hypothèse de départ, supposant qu'une fonction ester a un pouvoir attracteur semblable à celui d'une fonction hydrazide, s'est donc révélée être juste car l'effet électro-attracteur de la fonction hydrazide en position *méso* est semblable voire meilleur que celui de l'ester ce qui a permis de conserver les longueurs d'onde d'absorption et d'émission mais aussi l'intensité de fluorescence.

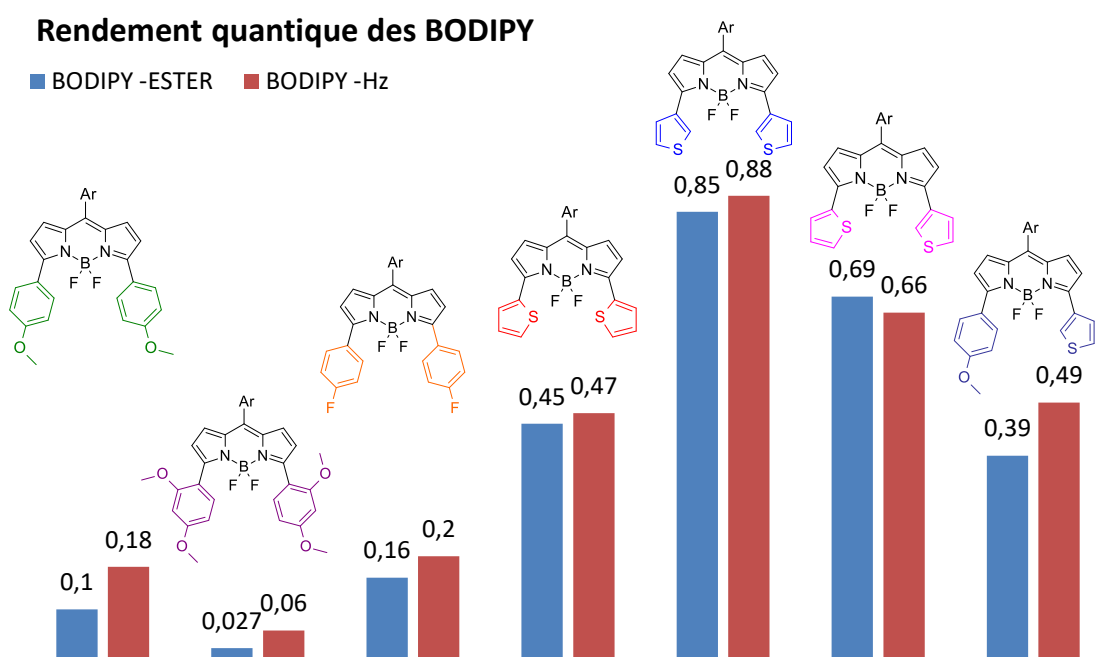


Figure 3.45 : Comparaison des rendements quantiques des formes esters et hydrazides dans le méthanol.

En conclusion, nous avons présenté la synthèse et la caractérisation de nouvelles sondes fluorescentes de type BODIPY avec des longueurs d'onde d'émission allant jusqu'à 636 nm vers l'IR. Obtenu par synthèse divergente originale avec un rendement global moyen de 11.5%, il est possible d'augmenter la bibliothèque de composés selon les objectifs d'utilisation. Nous apportons 7 nouvelles sondes possibles pour les études biologiques liées aux protéines carbonylées sur un domaine optique entre 500 nm et 650 nm.

Elles possèdent une charge neutre et un poids moléculaire de l'ordre de 610 g/mol ce qui est légèrement plus lourd que les cyanines utilisées (~565 g/mol chez Biotum). Bien qu'elles possèdent des déplacements de Stokes assez modestes (maximum 54 nm), n'évitant pas complètement les phénomènes de superposition, elles possèdent un rendement quantique élevé pour des fluorophores proche IR (jusqu'à 85%). Notons aussi qu'ils sont bien supérieurs aux rendements quantiques des cyanines hydrazides commerciales (inférieur à 35%)

Compte tenu des propriétés optiques présentées dans ce chapitre, nous avons sélectionné 2 BODIPY prometteurs pour remplacer les cyanines hydrazide Cy3 et Cy5, respectivement les BODIPY **168** et **167**. Ce dernier est celui présentant les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission les plus grandes et ses spectres ne sont que faiblement superposés avec ceux du BODIPY **168**.

Chapitre IV

*Applications biologiques : Utilisation
des nouvelles sondes fluorescentes
pour le marquage des protéines*

IV. Applications biologiques : Utilisation des nouvelles sondes fluorescentes pour le marquage des protéines

Dans ce chapitre, nous détaillerons les résultats des applications biologiques des nouveaux hétérocycles fluorescentes. Nous commencerons par les analyses sur le caractère inhibiteurs des 1,2,4-triazoles sur les kallibréines. Puis nous développerons les résultats des expériences de 2D-Oxy DIGE avec les BODIPY que nous avons synthétisés dans le chapitre III. Enfin, nous concluons avec la valorisation des nouvelles sondes BODIPY en microscopie à fluorescence et en cytométrie en flux.

1. Les 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués en tant qu'inhibiteurs potentiels des kallibréines

A. Introduction sur les kallibréines KLK6 et KLK8

Les kallibréines sont des protéases à sérine sécrétées sous la forme de monomères de 25 à 30 kDa. Elles sont classiquement séparées en deux grandes familles, celle des kallibréines plasmatiques et celle des kallibréines tissulaires. Les kallibréines plasmatiques jouent un rôle important dans de grands processus physiologiques tels que la coagulation sanguine, la fibrinolyse ou l'inflammation.¹⁹² Cependant, dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous focaliserons uniquement sur les kallibréines tissulaires.

¹⁹² Hedstrom, L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4524.

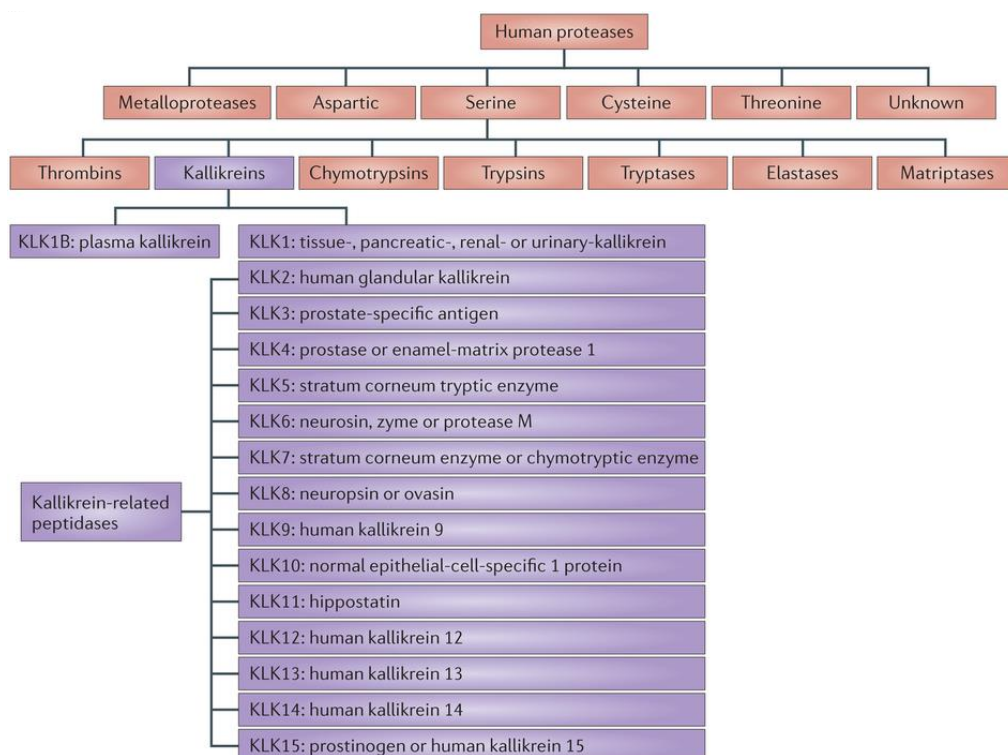


Figure 4.1 : Classification des 15 kallikréines tissulaires (hKs ou KLKs) parmi les protéases à sérine (avec leurs noms alternatifs).¹⁹³

Les kallikréines tissulaires possèdent une structure en deux tonneaux β composés de six brins chacun et reliés par trois segments transdomaines. Le site actif se trouve à l'interface entre les deux tonneaux β et est caractéristique des protéases à sérine, à savoir qu'il correspond à la triade catalytique His57, Asp102 et Ser195, la sérine amorçant l'hydrolyse des substrats peptidiques.^{190,194} Les kallikréines KLK6 et KLK8 sont des protéines impliquées dans la carcinogénèse¹⁹⁵ et peuvent être des nouveaux biomarqueurs du cancer. Ces enzymes sont régulées par des hormones et sont présentes dans le chromosome 19. Les KLK6 et KLK8 clivent spécifiquement les résidus basiques, elles sont donc analogues à la trypsine. Ces protéases à sérine sont des protéases prépondérantes du système nerveux central. La KLK6 ou neurosine est produite par les neurones et par les cellules gliales, et dispose d'une activité protéolytique analogue à celle de la trypsine. Elle est très fortement distribuée au niveau de la moelle épinière et du bulbe rachidien. Quant à la KLK8 ou la

¹⁹³ Prassas, I.; Eissa, A.; Poda, G.; Diamandis, E. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 183-202.

¹⁹⁴ Tan, X.; Furio, L.; Reboud-Ravaux, M.; Villoutreix, B. O.; Hovnanian, A.; El Amri, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4547-4551.

¹⁹⁵ Hedstrom, L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4524.

neuropsine, elle est exprimée dans l'hippocampe, le noyau latéral de l'amygdale ainsi que d'autres domaines du système limbique qui sont tous impliqués dans l'apprentissage et la mémoire.

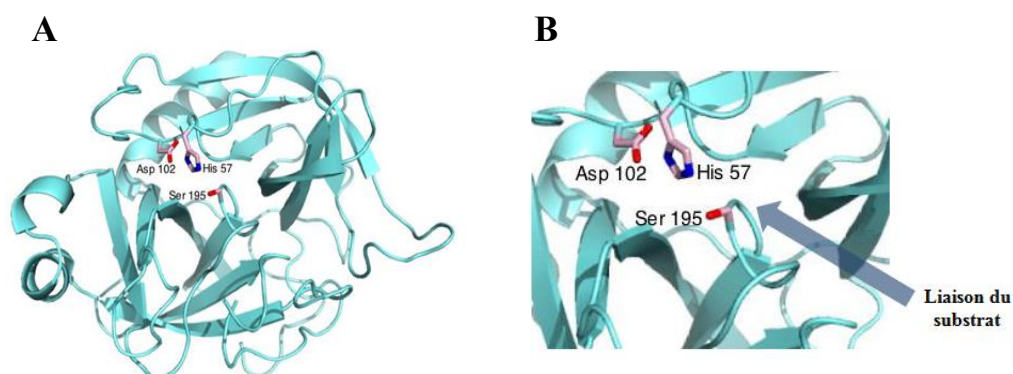
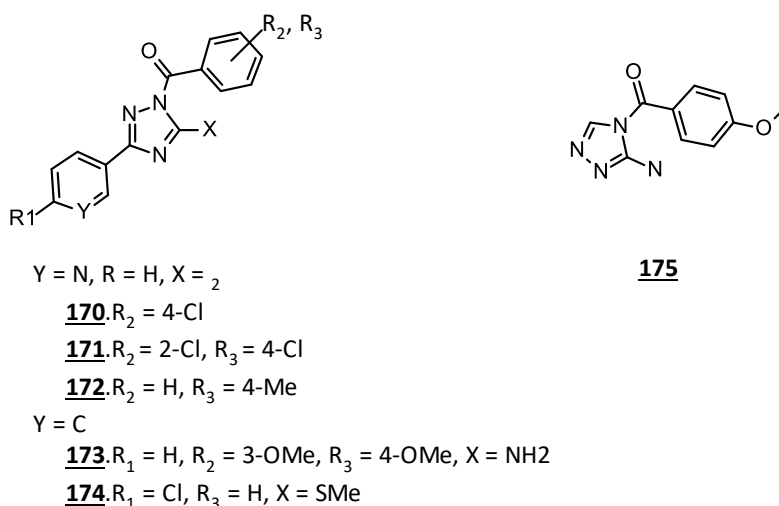


Figure 4.2 : Structure générique des protéases à sérine.

(A) Structure de la chymotrypsine, protéase à sérine modèle. **(B)** La triade catalytique (Ser195, His57, Asp102) au sein du site actif.¹⁹⁶

En 2013, l'équipe du Pr. Chahrazade El Amri a publié un article sur les 1,2,4-triazoles en tant qu'inhibiteur de kalicrénines.¹⁹³



Molécule	IC ₅₀ (μM)		
	KLK-5	KLK-7	KLK-14
170	1.14±0.08	0.22±0.01	>30
171	>30	3.5±0.1	-

¹⁹⁶ Kalinska, M.; Meyer-Hoffert, U.; Kantyka, T.; Potempa, J. *Biochimie* **2016**, *122*, 270-282.

<u>172</u>	0.27±0.01	0.04±0.001	1.29±0.05
<u>173</u>	1.30±0.07	0.23±0.01	>30
<u>174</u>	0.14±0.01	0.66±0.03	0.97±0.03
<u>175</u>	0.99±0.03	0.61±0.02	3.43±0.12

Figure 4.3 : Inhibiteurs des kallibréines humaines.

Les KLK5 et KLK7 interviennent dans les mécanismes de dégradation intracellulaire régulant ainsi le processus de desquamation (perte des couches superficielles de l'épiderme, couche cornée) tout comme les KLK14 et KLK8.^{197,198} Les triazoles **170**, **171**, **122**, **173** et **174** inhibent la KLK-5 avec des concentrations comprises entre 0,14 µM et 1,30 µM. KLK-7 est inhibée par tous les triazoles pour des concentrations de 0,04 µM à 0,66 µM. Enfin, Seuls les triazoles **171**, **173** et **174** montrent une activité sur KLK-14. Certains de nos triazoles ont donc été testés pour déterminer leur activité biologique potentielle sur les nouvelles KLK-6 et KLK-8. Sur la base de ces précédents résultats, nous avons donc décidé de cribler certains de nos composés triazoles sur les kallibréines KLK6 et KLK8 qui constituent des cibles d'intérêt dans les pathologies associées au vieillissement et notamment les maladies neurodégénératives. Un des objectifs était d'élargir le répertoire des inhibiteurs triazoles des kallibréines.

B. Criblage de la série de composés triazoles à motif 2-pyridone : mise en évidence d'une activité inhibitrice sur la KLK8

Les résultats présentés ci-après ont été mesurés par la doctorante en biologie Sabrina Aït Amiri. Les premières étapes du travail ont consisté à cribler les composés d'intérêt sur les kallibréines 6 et 8 (KLK6 et KLK8) à deux concentrations fixes (10 et 50 µM) et de déterminer le pourcentage d'inhibition. Lorsque le pourcentage d'inhibition est satisfaisant, c'est-à-dire lorsque celui-ci s'approche de 50%, le pouvoir inhibiteur est quantifié à travers la mesure de l'IC₅₀. L'IC₅₀ est un paramètre désignant la concentration en inhibiteur permettant d'inhiber 50% de l'activité enzymatique de la cible.

¹⁹⁷ Fortugno, P.; Furio, L.; Teson, M.; Berretti, M.; El Hachem, M.; Zambruno, G.; Hovnanian, A.; D'Alessio, M. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 4187.

¹⁹⁸ Furio, L.; Hovnanian, A. J. *Invest. Dermatol.* **2012**, *131*, 2169.

Les mesures d'IC₅₀ ont été réalisées sur une gamme en concentration d'inhibiteurs (typiquement 1-200 µM) après incubation avec les kallicréines (KLK6 et KLK8) à 37°C pendant 15 min. Les mesures de concentration en protéine inhibée se font par spectrométrie de fluorescence. La kallicréine est incubée dans un milieu tampon type TRIS pH 8.0 avec le triazole. Le substrat utilisé pour déterminer le taux d'inhibition est du Boc-QAR-AMC (AMC, 7-amino-4-methylcoumarin), un peptide qui libère le groupement fluorescent AMC lorsqu'il est clivé. Les résultats présentés dans la figure 4.4 ne montrent aucune molécule candidate intéressante en tant qu'inhibiteur de la KLK6 car seul le triazole **T05** présente une inhibition cependant pour une concentration trop élevée de 50 µM.

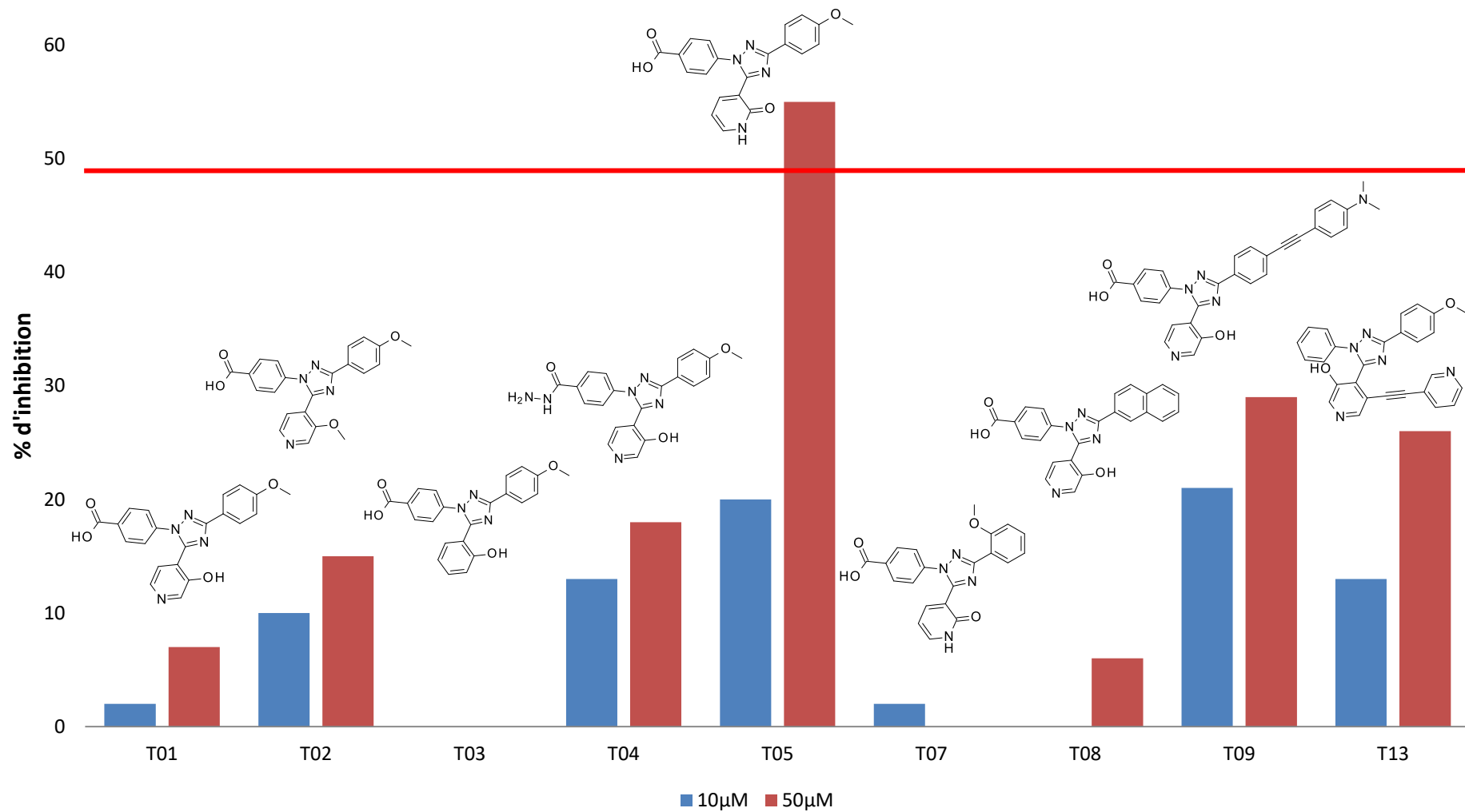


Figure 4.4 : Mesures d'inhibition de la KLK6 dans le tampon TRIS pH 8.0 à 10 et 50 μM de composé, incubé pendant 15min avec la protéase.

Dans les mêmes conditions, les mêmes triazoles ont été testés pour l'inhibition de la KLK8. Nous pouvons constater que plusieurs triazoles (**T01**, **T03**, **T05**, **T08**, **T09**) présentent une activité pour une concentration de 50 μM jugée trop haute pour considérer les molécules comme des inhibiteurs d'intérêt. Le composé triazole **T05** inhibe à 72% la KLK8 à une concentration de 10 μM (Figure 4.6). L'étude suivante a démontré que l' IC_{50} du **T05** est de $10,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$. Des analyses mécanistiques ont permis de conclure que le triazole **T05** est un inhibiteur compétitif de la KLK8 par un mécanisme réversible avec une constante de réversibilité $K_i = 7,05 \mu\text{M}$. Enfin, l'augmentation du temps d'incubation jusqu'à 1 h accroît le taux d'inhibition de la KLK8. Ceci suggère que la fixation du composé T05 au sein du site actif de la KLK8 comprend vraisemblablement plusieurs étapes.

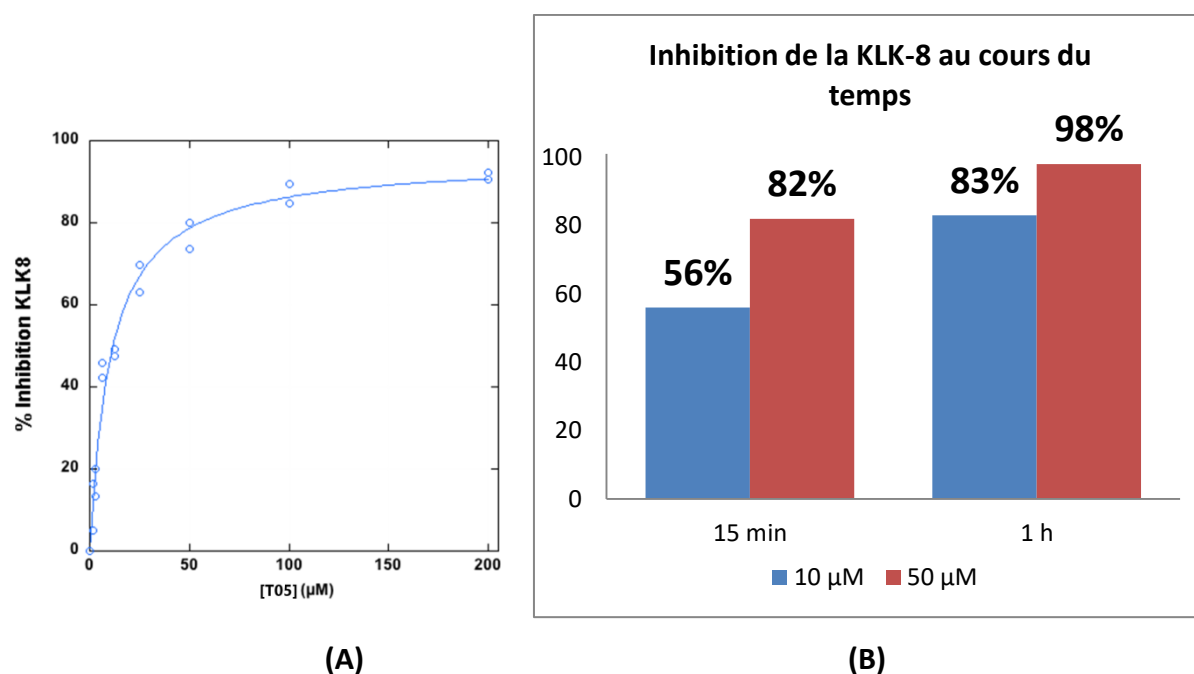


Figure 4.5 : Inhibition de la KLK-8.

(A) inhibition en fonction de la concentration, (B) évolution de l'inhibition au cours du temps.

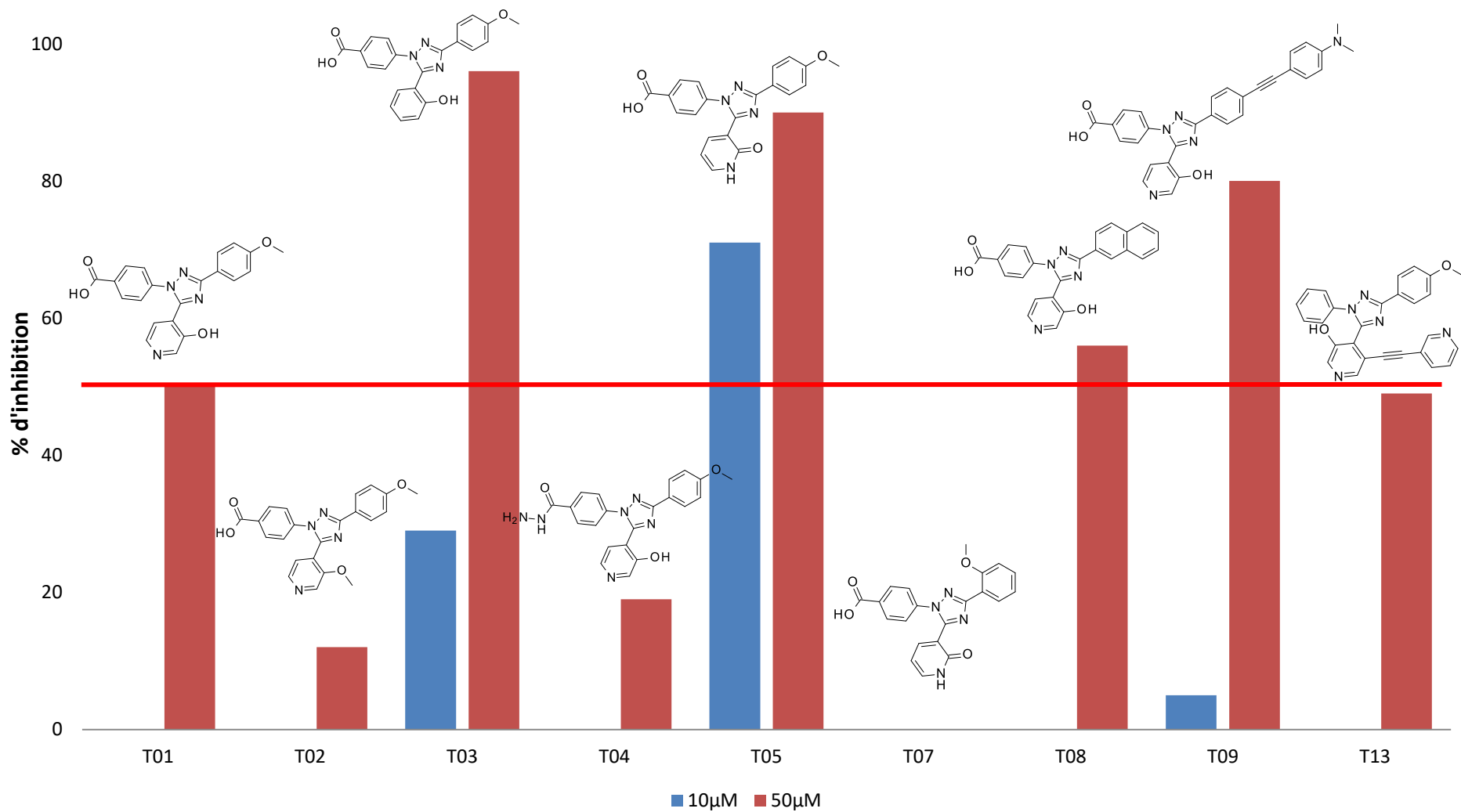


Figure 4.6 : Mesures d'inhibition de la KLK8 dans le tampon TRIS pH 8.0 à 10 et 50 μM de composé, incubé pendant 15min avec la protéase.

Compte tenu de la structure des triazoles, on peut postuler que la présence de plusieurs cycles aromatiques, notamment le triazole central, permet une interaction de type π -stacking avec l'His57 (figure 4.2). D'autre part, tous les acides aminés de ce site actif (Asp102, His57, Ser195) possèdent des atomes d'azotes ou d'oxygènes permettant la création de liaison hydrogène les substituants présents sur les triazoles. Avec les résultats des tests d'inhibition, il est possible que la 2-pyridone du triazole **T05** possède une meilleure affinité avec le site actif grâce, peut-être, à une interaction optimale avec l'Asp102 favorisant l'insertion dans le site actif.

2. Marquage des protéines carbonylées par les nouveaux hétérocycles fluorescents fonctionnalisés avec un groupement hydrazide

A. Introduction sur la carbonylation des protéines comme biomarqueur du vieillissement et du stress oxydant

Dans le chapitre d'introduction générale, nous avons décrit les différents impacts du stress oxydant sur les cellules ainsi que leurs origines et les conséquences sur les protéines. La carbonylation des protéines résulte de l'oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène (EROs). Ces entités chimiques radicalaires et/ou chargées comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ ou le radical hydroxyle HO^{\cdot} attaquent les acides aminés des protéines entraînant leurs modifications. On peut citer notamment la transformation des lysines et des arginines en carbonyles mais aussi l'oxydation des lipides insaturés en aldéhydes accepteurs de Michael. Les mécanismes intracellulaires éliminant ces protéines modifiées deviennent de moins en moins performants avec le vieillissement ou dans des pathologies comme l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et d'autres pathologies neurodégénératives (voir chapitre I). Ce phénomène de surproduction et d'accumulation de ces protéines carbonylées dans les cellules est un marqueur caractéristique du stress oxydant. La technique 2D-Oxi DIGE permet de détecter et de quantifier ces protéines carbonylées.

Nous allons maintenant aborder les résultats obtenus avec les expériences de marquages de protéines carbonylées avec nos nouveaux fluorophores hydrazides.

B. Résultats relatifs à la préparation de sérum albumine bovine (BSA) carbonylée

Les différents fluorophores (triazoles et BODIPY) hydrazide ont été utilisés pour marquer la BSA carbonylée. Cette expérience a été réalisée pour valider le marquage des fonctions carbonyles des protéines par ces différents fluorophores.

Nous avons utilisé de l'albumine de sérum bovin (Bovin Serum Albumin en anglais), une protéine extraite du sérum bovin qui est régulièrement utilisée en biologie comme protéine de test. La BSA (fraction V) que nous avons utilisée possède environ 35 lysines en surface. Ces lysines ont été modifiées pour obtenir des fonctions carbonyles. Deux voies de synthèse ont été essayées pour introduire les fonctions carbonyles en surface de la BSA : en une étape avec du glutaraldéhyde¹⁹⁹ ou en deux étapes à partir du glycidol.²⁰⁰

L'introduction de fonctions carbonyles à partir du glutaraldéhyde **176** se fait en milieu tampon phosphate de sodium (NaP) pH 8,0. Le mélange est incubé pendant 3 h à 5°C puis le milieu est élué sur une colonne HiTrap desalting qui permet de séparer l'excès de glutaraldéhyde de la protéine modifiée. Pour déterminer la quantité de protéine récupérée, l'absorbance (A) de la solution de protéine est mesurée à 280 nm (maximum d'absorption de la BSA). Cependant, le rendement de cette réaction n'est pas fiable car en fin d'expérience, la quantité de protéine récupérée, BSA-CHO, est trop importante par rapport à la quantité de BSA initiale. Cette constatation a été faite à la suite de nombreux essais par différents chercheurs dans le laboratoire.

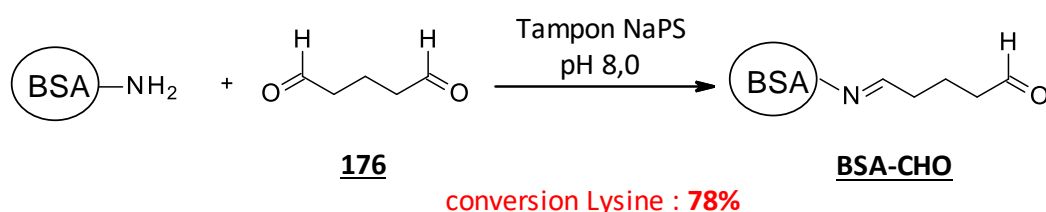


Figure 4.7 : Réaction entre la BSA et le glutaraldéhyde.

¹⁹⁹ Hermanson, Greg T. *Bioconjugate Techniques 2nd Edition*. Rockford, Illinois, USA **2008**, p134.

²⁰⁰ Heldt, J.; Fischer-Durand, N.; Salmay, M.; Vessières, A.; Jaouen G. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5429-5433.

Le taux de conversion des lysines a pu être déterminé grâce à un test au TNBS (acide picrylsulfonique) qui sert à marquer les amines primaires.²⁰¹ On enregistre l'absorbance à 420 nm pour deux gammes : une gamme de BSA et une gamme de BSA-CHO. Le rapport des droites d'absorption en fonction de la concentration à 420 nm nous permet d'obtenir le taux de lysine convertis en aldéhyde. De plus, un test complémentaire au Purpald²⁰² (4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, 4-Amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole-3-thiol), un triazole avec une hydrazine en 5, a été réalisé. Ce réactif permet de vérifier que les fonctions présentes en surface sont bien des fonctions aldéhydes.

Cette expérience a des inconvénients : le rendement de réaction n'est pas accessible de façon conventionnelle (i.e. par absorbance) et on peut avoir un phénomène de réticulation des protéines entre elles. En effet, le glutaraldéhyde possédant deux fonctions aldéhydes, il est possible qu'il réagisse avec une autre lysine proche sur la même protéine ou encore avec une lysine d'une autre protéine. Ces réactions parasites étant difficiles à éviter, nous sommes passés sur un autre protocole de modification développé par des chercheurs de notre équipe il y a quelques années.¹⁹⁸ Cette autre méthode se fait en deux étapes : une étape de réaction entre la lysine et le glycidol, puis une étape de clivage de 1,2-diols en présence de NaIO₄.²⁰³

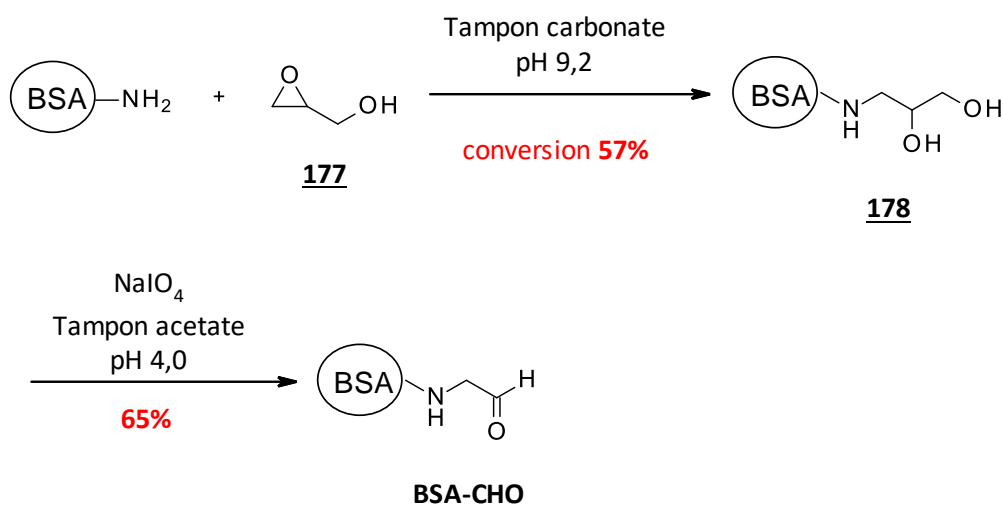


Figure 4.8 : Synthèse de la BSA-CHO en deux étapes à partir du glycidol.

²⁰¹ Morçöl, T.; Subramanian, A.; Velander, W. H. *J. Immunol. methods* **1997**, *203*, 45–53.

²⁰² Quesenberry, M.S. ; Lee, Y.C. *Anal. Biochem.* **1996**, *234*, 50-55.

²⁰³ Shainoff, J. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 690–695.

Le mécanisme de l'étape de clivage de diols vicinaux est décrit ci-dessous sur la figure 4.9.

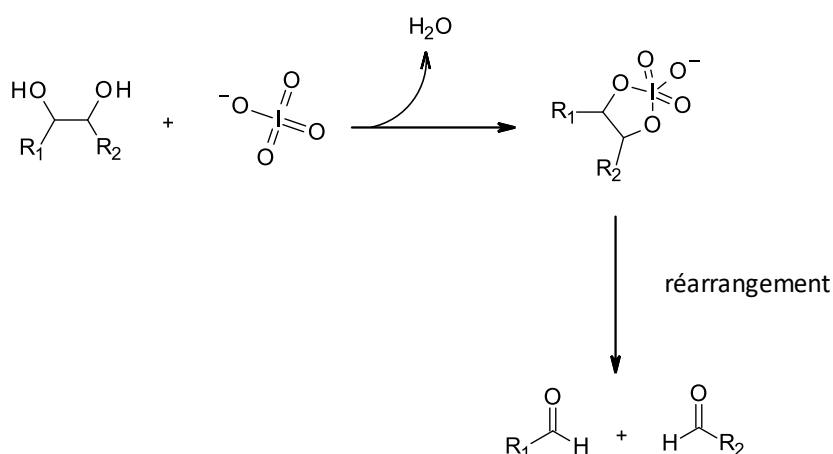


Figure 4.9 : Clivage de diols vicinaux en présence de periodate de sodium.

Le periodate se fixe sur le diol par cycloaddition puis une étape de réarrangement permet d'obtenir la BSA-CHO et du formaldéhyde qui sera éliminé lors de la purification sur colonne HiTrap desalting tout comme l'excès de periodate de sodium. On observe un rendement total de 65%, mesuré via l'absorbance à 280 nm et le test au TNBS.

La modification des lysines de la BSA n'a converti que 57% des 35 lysines en surface de la BSA soit 20 lysines modifiées en diols. De plus, les conditions d'oxydation de la BSA-diol sont optimisées pour des anticorps qui sont des entités biologiques sensibles à ces conditions à cause de la présence de sucres. Nous allons donc considérer une conversion de diol en aldéhyde de 100%.

C. Marquage de la BSA-CHO avec les nouveaux fluorophores

a. Marquage de la BSA-CHO avec le triazole hydrazide T04

Le triazole **T04** avec une fonction hydrazide a pu être obtenu pour effectuer le marquage de la BSA-CHO. En utilisant un protocole de marquage initialement prévu pour marquer des anticorps,²⁰⁴ la BSA-CHO a été mise à incuber avec le triazole **T04** (30

²⁰⁴ Hermanson, Greg T. *Bioconjugate Techniques 2nd Edition*. Rockford, Illinois, USA 2008, p805.

équivalents) à 20 °C pendant 24 h dans un tampon AcONa+NaCl pH 5,0 car le marquage avec des fonctions hydrazides est favorisée en milieu légèrement acide. Le triazole a été solubilisé dans le DMF au début de l'expérience.

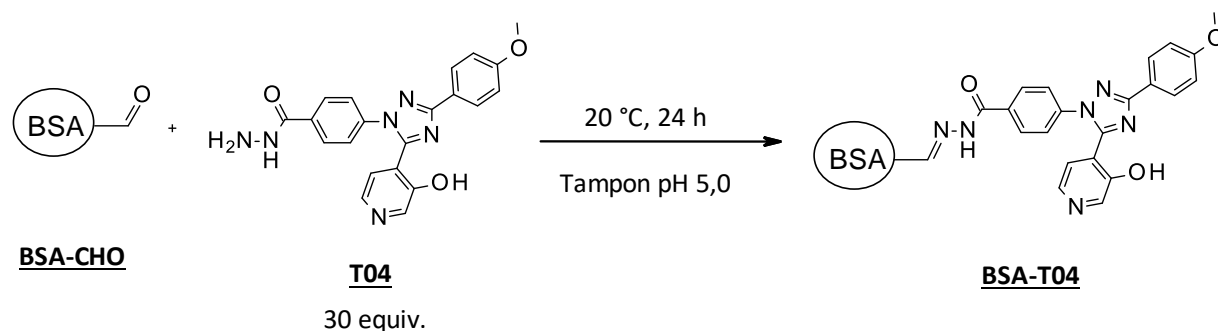


Figure 4.10 : Marquage de la **BSA-CHO** avec le triazole **T04**.

Comme nous l'avons évoqué dans la partie sur les BODIPY, la fonction hydrazone nouvellement formée est hydrolysable. Bien qu'il soit possible de la conserver sous cette forme pour les expériences que nous souhaitons réaliser, il est d'usage de réduire la double liaison pour empêcher toute hydrolyse. Pour réduire cette double liaison C=N de l'hydrazone, on se place en milieu tampon éthanolamine/HCl pH 10,3 à TA pendant 2 h puis on ajoute l'agent réducteur du cyanoborohydrure de sodium NaBH₃CN. La réduction se fait à température ambiante pendant 2 h. La protéine marquée est ensuite dialysée en milieu PBS pH 7,4 en 48 h. La dialyse est une méthode de purification de solutions utilisant une membrane perméable aux petites molécules. Le boudin de dialyse contenant la protéine et les autres composés (fluorophores, NaBH₃CN, tampon), est plongé dans une solution tampon PBS agitée pendant 48h de façon à évacuer les réactifs et solvant d'expérience. La solution tampon PBS est renouvelée 3 fois pour optimiser l'échange entre le contenu du boudin et le tampon. La BSA marquée est ensuite récupérée et lavée 3 fois avec du tampon PBS. L'absorbance mesurée à 280 nm prouve la présence de la protéine mais le triazole absorbe aussi à cette longueur d'onde. Nous avons effectué un test de fluorescence car la BSA n'est pas fluorescente entre 400 nm et 500 nm (zone d'émission du triazole). Cependant, aucune réponse significative n'a été enregistrée en fluorescence.

Le triazole **T04** possède un rendement quantique très faible (>1%) qui n'a pu être mesuré car l'intensité de fluorescence de la quinine sulfate de référence était trop importante pour

effectuer une mesure fiable par comparaison. Ceci expliquerait la réponse nulle en fluorescence car l'intensité du triazole est trop faible pour être détectable à cette concentration en milieu PBS (10^{-4} M).

Nous ne pouvons qu'émettre l'hypothèse selon laquelle la BSA-CHO a bien été marquée par le triazole hydrazide car cette fonction est connue pour marquer les carbonyles. Une analyse par spectrométrie de masse pourrait peut-être apporter une réponse plus précise en supposant que l'on puisse déterminer de façon certaine la présence du pic du fluorophore.

b. Marquage de la BSA-CHO avec le BODIPY hydrazide 163

Etant le premier BODIPY hydrazide obtenu au laboratoire, le composé *p*MeO a été utilisé dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment avec la BSA-CHO. L'avantage que présente le BODIPY hydrazide *p*MeO est son pic d'absorption à 615 nm dans le PBS comme le montre le spectre d'absorption ci-dessous.

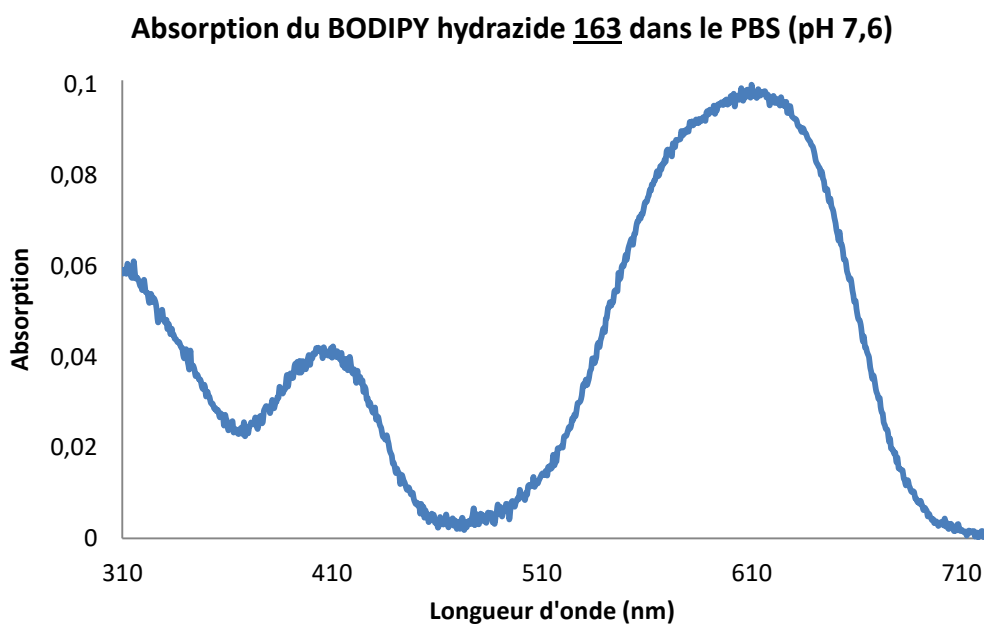


Figure 4.11 : Spectre d'absorption du BODIPY hydrazide 163 dans un tampon PBS pH 7,4.

La BSA-CHO a été mise à incuber avec 20 équivalents de 163 dans le tampon AcONa/NaCl pH 5,0. Le fluorophore a été solubilisé dans du DMSO au préalable car il n'est pas directement soluble dans le tampon. L'ajout de la solution de fluorophore à la solution de protéine se fait

goutte à goutte pour éviter la précipitation du BODIPY. Après réduction et dialyse, on obtient une solution de protéine bleue, ce qui confirme visuellement le marquage. On observe aussi une fluorescence lorsque l'on place la solution sous une lampe UV de laboratoire (365 nm) (Figure 4.12).

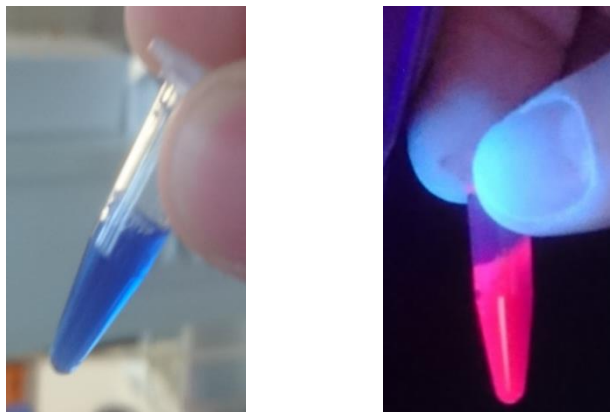
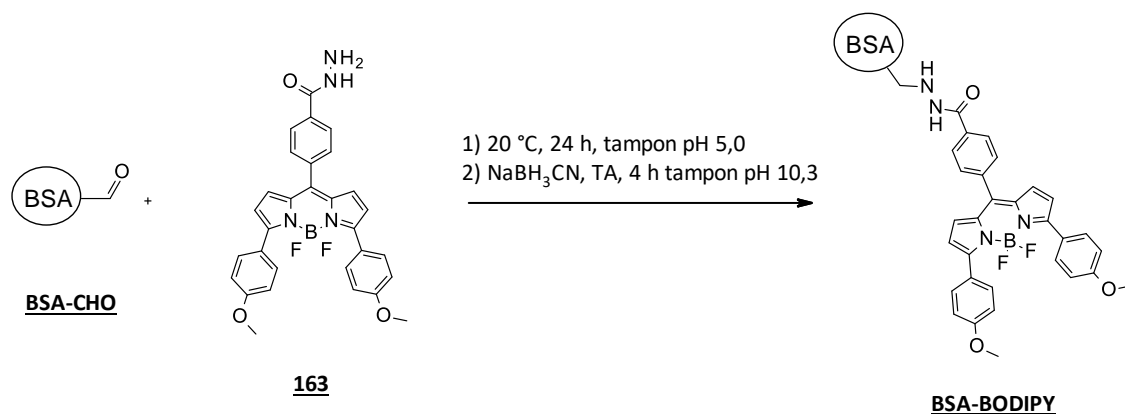


Figure 4.12 : BSA-CHO marquée avec le BODIPY hydrazide 163.

La mesure de l'absorbance à 615 nm permet de déterminer que la solution possède une concentration en BODIPY de $4,6 \cdot 10^{-4}$ M pour $7,66 \cdot 10^{-5}$ M de protéine. On observe donc un rapport de 6 BODIPY pour une BSA soit un taux de marquage de 30%. C'est un taux de marquage minimum car on considère 20 aldéhydes en surface qui est un nombre surestimé et l'expérience se passe en conditions de marquage à minima. Seuls 20 équivalents de BODIPY ont été introduits pour le marquage soit 1 BODIPY pour 1 aldéhyde.



Taux de marquage minimum : 30%

Figure 4.13 : Marquage de la BSA-CHO avec le BODIPY.

Ces expériences de marquage de la BSA sont destinées à vérifier la capacité de marquage des BODIPY hydrazides. L'expérience avec le BODIPY 163 prouve que la fonction hydrazide se

fixe sur les carbonyles et peut marquer les protéines carbonylées sans la dénaturer au préalable. La première étape de marquage étant validée, les BODIPY hydrazides ont pu être testés pour leur utilisation dans le cadre de la technologie 2D-Oxi DIGE.

3. Utilisation des sondes fluorescentes pour la technique 2D-Oxi DIGE : validation et marquage différentiel des échantillons

A. Présentation du protocole d'électrophorèse bidimensionnelle avec les cyanines hydrazides

Nous avons utilisé une version simplifiée de la technologie 2D -Oxi DIGE pour analyser la carbonylation des protéines d'un muscle de fessier de souris. Cette partie ayant pour but de valider les fluorophores fonctionnalisés pour leur utilisation en électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée avec Janek Hyzewicz, post-doctorant.

Un échantillon de muscle a été broyé manuellement puis dilué dans une solution tampon UTC (8M Urée, 2M Thiourée, 2% CHAPS, 0.057M DTT). Le CHAPS (pour 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) est un détergent qui va permettre de solubiliser les protéines du muscle. Le DTT (threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol) est un agent réducteur permettant de conserver les cystéines dans leur état réduit et d'empêcher la formation de pont disulfure.

Le mélange est ensuite incubé pendant 1 h dans la glace puis passé au vortex et enfin au sonicateur pour extraire une quantité maximale de protéines. Après centrifugation (20000 g, 4 °C, 30 min) le surnageant est récupéré, puis analysé avec la technique de Bradford pour déterminer sa concentration en protéine.

Pour chaque échantillon, on utilise une quantité de protéines comprise entre 50 µg et 100 µg. Pour le marquage, on utilise 1 µl de solution à 10 mM (dans le DMSO) de fluorophore pour 100 µg de protéines de façon à faire un marquage à maxima (marquage de la totalité des fonctions carbonyles) grâce à un large excès de fluorophore. Le mélange est incubé une

nuit à 4 °C. Les protéines sont récupérées par précipitation en utilisant un kit 2D Clean-up. L'excès de fluorophores est éliminé par lavage des protéines avec une solution tampon (inclue dans le kit) contenant de l'acétone. Cette étape provoque généralement une perte de matériel biologique, environ 50% des protéines initialement marquées.

Les échantillons sont ensuite placés sur des strips (pH 3 – pH 10) préalablement équilibrés, c'est-à-dire, qu'ils ont été mis dans une solution tampon UTC contenant des pharmalytes (DeStreak) qui vont permettre une meilleure focalisation des protéines dans les strips hydratés. Les strips sont placés sur l'IPGphor pour effectuer la migration des protéines selon le point isoélectrique en appliquant une différence de potentiel aux bornes des strips.

Après migration, les strips sont introduits dans des gels en polyacrylamide pour l'électrophorèse en deuxième dimension et recouverts de gel d'agarose pour les fixer à l'intérieur. Les gels sont ensuite mis à migrer pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

Toutes ces étapes sont résumées sur la figure ci-dessous.

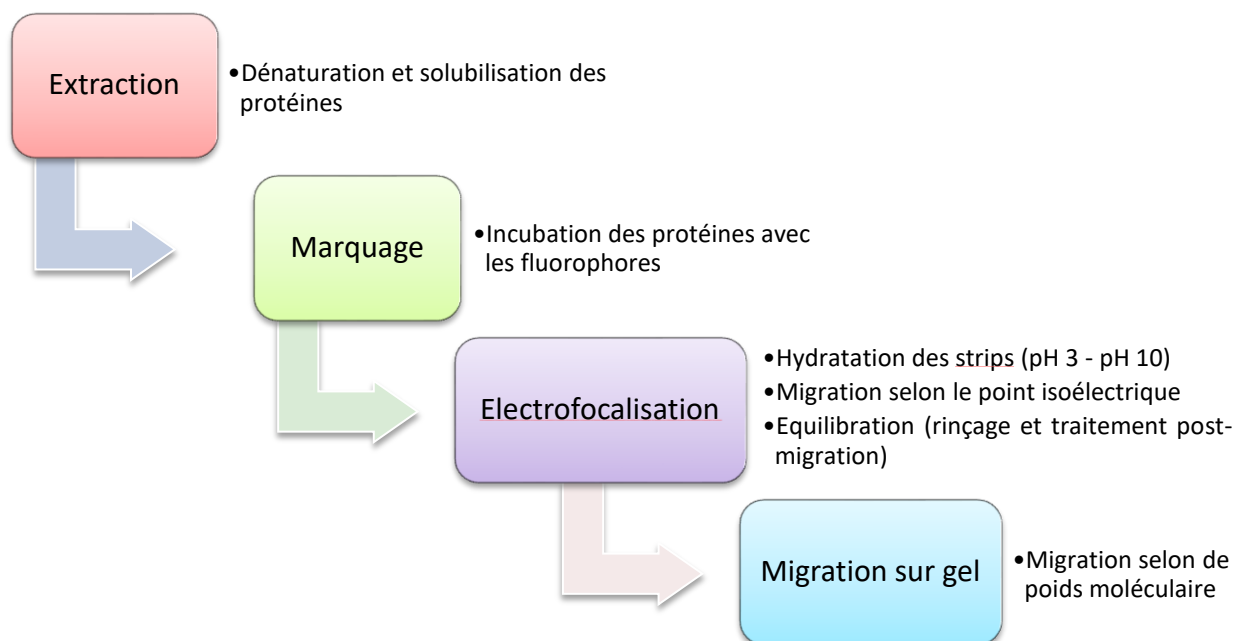


Figure 4.14 : Protocole électrophorèse 2D.

Les gels sont ensuite mis à incuber dans un mélange éthanol avec 1% à 2% d'acide acétique pour resserrer les pores du gel et fixer les protéines sur le gel (pour éviter toute variation ou diffusion au sein du gel). La lecture des gels s'effectue grâce à un appareil appelé Ettan DIGE, dans lequel les gels sont placés sur une plaque permettant l'irradiation aux longueurs d'onde

d'excitation des fluorophores. Les paramètres optiques des sondes sont pré-enregistrés dans l'appareil pour l'excitation et la mesure de la fluorescence.

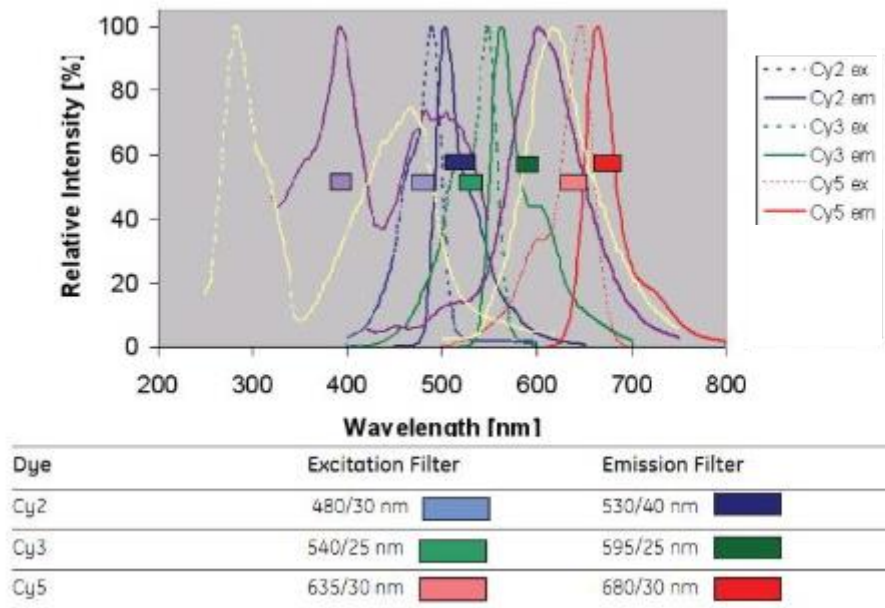
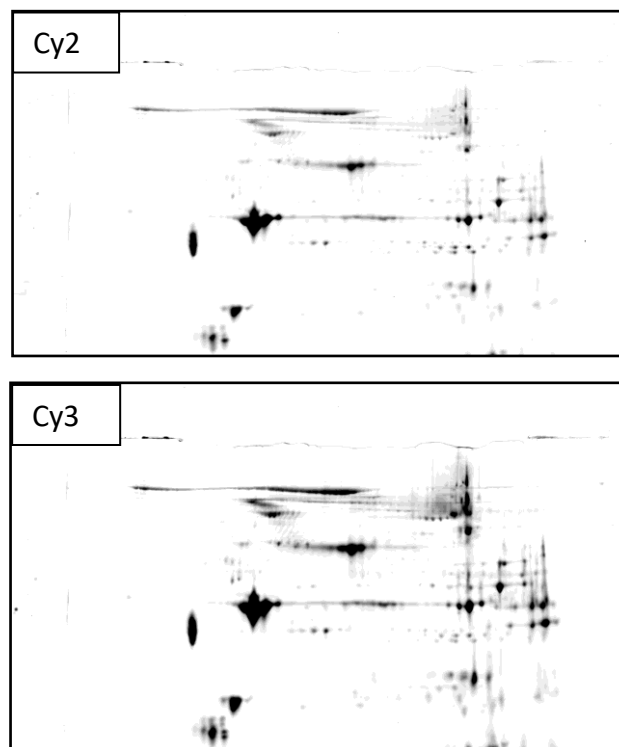


Figure 4.15 : Paramètres enregistrés dans l'Ettan DIGE.

Nous avons utilisés les trois cyanines hydrazides Cy2, Cy3 et Cy5 sur les gels d'essais ce qui nous a permis d'obtenir les images suivantes après traitement.



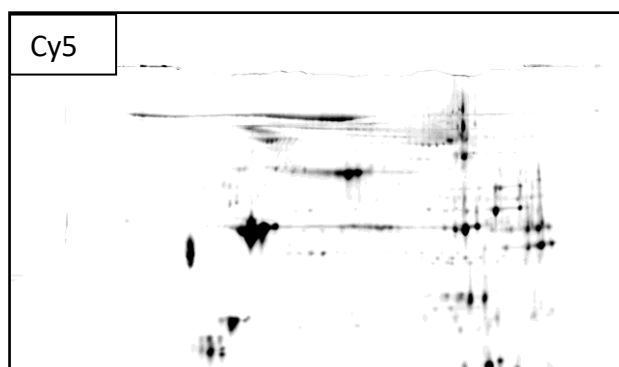


Figure 4.16 : Révélation des gels 2D des protéines marquées avec les cyanines hydrazides Cy2, Cy3 et Cy5. *Gel polyacrylamide BIORAD 4-20%*

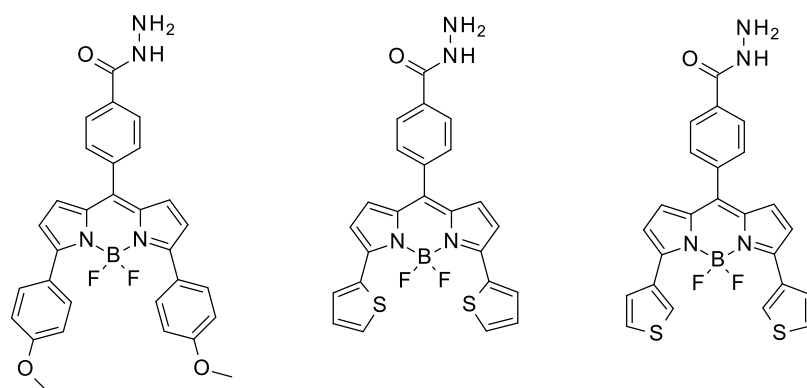
La révélation des trois gels donne bien des protéomes identiques (même échantillon pour chaque marqueur). Il est difficile d'identifier de visu et avec certitude chaque protéine présente sur les gels cependant les amas les plus visibles sur la gauche des gels correspondent aux actines. Les actines sont des protéines présentes dans toutes les cellules mais encore plus abondamment dans les cellules musculaires.²⁰⁵

B. Les nouvelles sondes BODIPY: premiers essais en électrophorèse bidimensionnelle

a. Validation de la compatibilité des nouvelles sondes BODIPY 2S et 3S hydrazide avec l'électrophorèse bidimensionnelle

Trois BODIPY hydrazides ont été sélectionnés pour faire les essais préliminaires : les BODIPY *p*MeO (**163**), 2S (**167**) et 3S (**168**) donc la structure et les propriétés optiques sont rappelées sur la figure 4.17. Pour toutes les prochaines discussions sur les expériences et les résultats, les BODIPY **163**, **167** et **168** seront respectivement appelés BODIPY ***p*MeO**, **2S** et **3S**.

²⁰⁵ Ghoshdastider, U.; Jiang, S.; Popp, D.; Robinson, RC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2015**, *112*, 9150-9151.



Paramètres	<i>p</i> MeO (163)	2S (167)	3S (168)
λ_{abs} (nm)	583	619	588
λ_{em} (nm)	616	633	606
Φ	0,18	0,47	0,88
ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	34530	26314	24567

Figure 4.17 : Propriétés optiques des BODIPY *p*MeO (**163**), 2S (**167**) et 3S (**168**).

En suivant le protocole décrit dans la partie précédente sur un muscle du dos de souris, les protéines extraites ont été marquées avec les BODIPY hydrazides constituant ainsi un lot de 3 échantillons. Pour comparer les résultats, deux autres échantillons du même muscle ont été préparés et marqués avec les cyanines hydrazides Cy2 et Cy3.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une expérience de gel 1D, avant l'étape de précipitation, en effectuant une migration sur gel pour avoir un aperçu de la fluorescence des BODIPY hydrazides dans les gels.

On remarque que la fluorescence du BODIPY hydrazide **pMeO** est trop diffuse (figure 4.18) et que les bandes ne sont pas correctement résolues par rapport aux autres échantillons. De plus, on remarque que le BODIPY hydrazide **2S** révèle en même temps que la cyanine Cy5 et que le BODIPY hydrazide **3S** révèle avec Cy3. Il est donc possible de mettre des échantillons marqués avec Cy3 et **3S** (à 555 nm) sur le même gel et faire de même avec Cy5 et **2S** (à 647 nm).

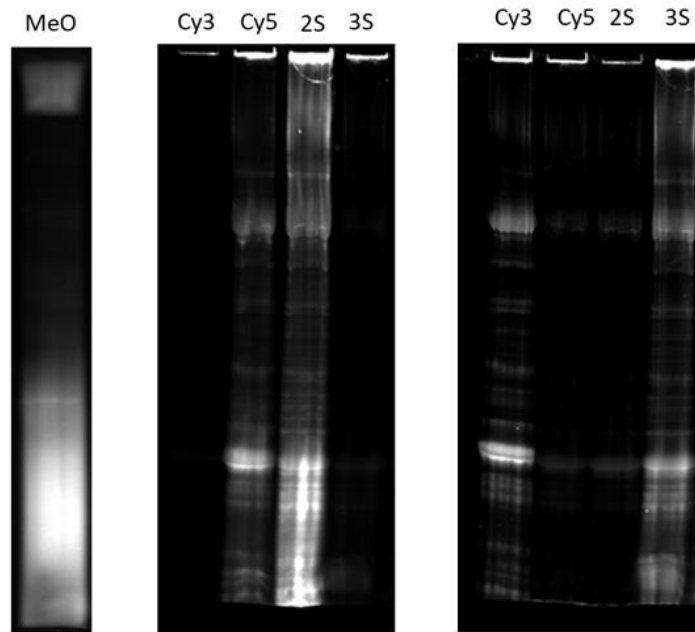


Figure 4.18 : Gel 1D – Essais préliminaires. *Gel polyacrylamide BIORAD 4-20% 15 puits*

La révélation des protéines totales avec le bleu de Coomassie (figure 4.19) permet de vérifier la position réelle de toutes les protéines ce qui permet de conclure sur le BODIPY hydrazide *p*MeO. Ce fluorophore ne pourra pas être utilisé en 2D-Oxi DIGE car sur la figure 4.19 on remarque que les protéines de l'échantillon marqué avec ***p*MeO** ont bien été séparées mais ceci n'est pas le cas pour la fluorescence.

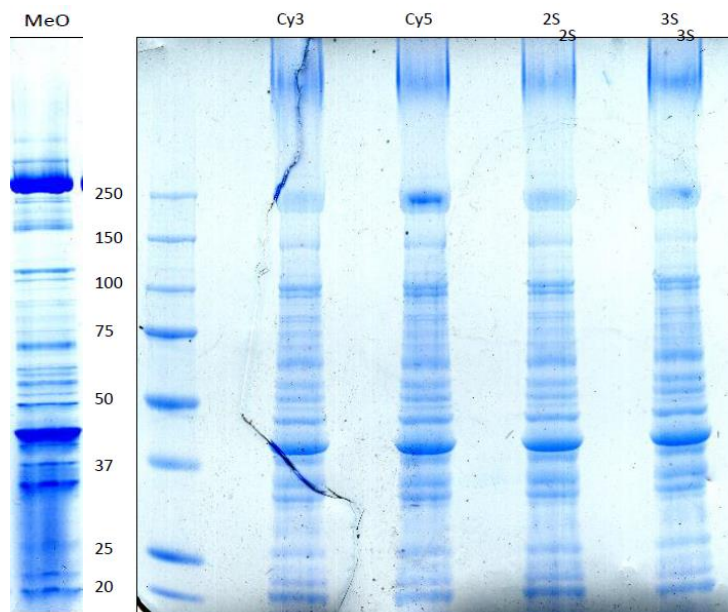


Figure 4.19 : Révélation protéines totales 1D. *Gel polyacrylamide BIORAD 4-20% 15 puits, révélation 1 h dans le bleu de Coomassie, 4 lavages à l'eau de 15 min.*

Ce sont donc les BODIPY hydrazides **2S** et **3S** qui ont été utilisés pour les étapes suivantes. Une autre migration sur gel a été réalisée en parallèle de l'expérience en 2D avec les BODIPY hydrazides sélectionnés après l'étape de précipitation.

Lors de la révélation du gel 1D (figure 4.20), on remarque que les bandes de protéines ne sont pas nettes, avec une trainée et certaines différences pour la migration. La révélation au bleu de Coomassie montre que ce ne serait pas due à un mauvais marquage mais bien à une variation induite par la précipitation. Le marquage a été réalisé sur le même échantillon de muscle initial.

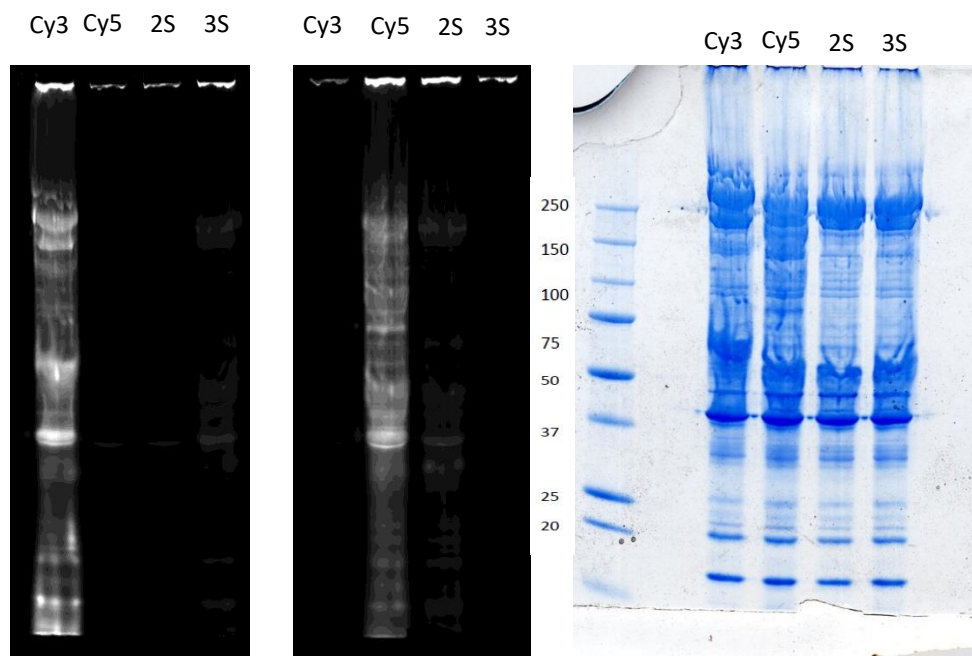


Figure 4.20 : Migration 1D post-précipitation. Gel polyacrylamide BIORAD 4-20% 15 puits, révélation 1 h dans le bleu de Coomassie, 4 lavages à l'eau de 15 min.

Expérimentalement, ce n'est pas un phénomène inconnu car l'étape de précipitation est celle qui introduit le plus de variations durant l'expérience d'un chercheur à un autre. Comme la technique 2D-DIGE / Oxi-DIGE permet de comparer plusieurs échantillons sur le même gel à conditions que les propriétés optiques des fluorophores ne se superposent pas, deux gels 2D ont été utilisés pour l'expérience : le gel 1 : Cy3 et BODIPY hydrazide **2S** et le gel 2 : Cy5 et BODIPY hydrazide **3S**.

L'appareil prend une photo du gel en fluorescence. Bien que les cyanines soient photosensibles, ce n'est pas le cas des BODIPY que nous utilisons.

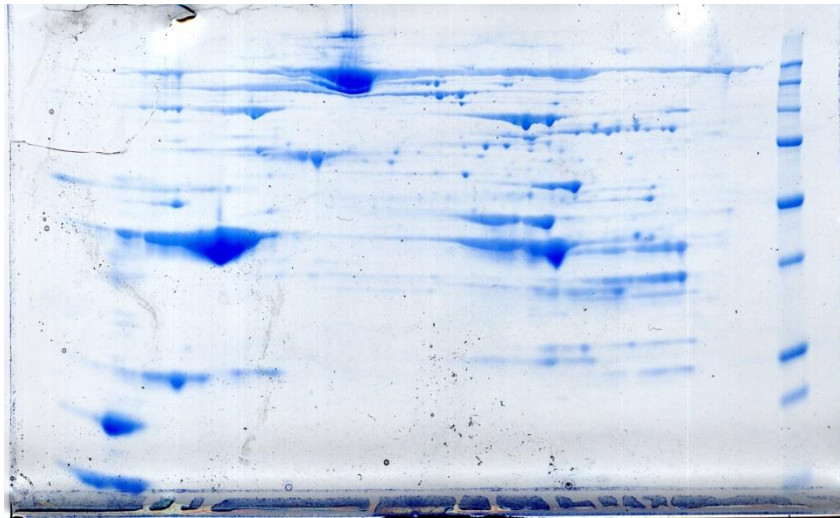


Figure 4.22 : Révélation Gel 1 au bleu de Coomassie. *Gel polyacrylamide BIORAD 4-20%, révélation 1 h dans le bleu de Coomassie, 4 lavages à l'eau de 15 min.*

Concernant le second gel avec Cy5 et le BODIPY hydrazide **3S**, nous avons observé quelques disparités. Il est normalement possible de comparer les deux gels car l'échantillon de muscle est le même pour tous les fluorophores. Sur la figure 4.23, les protéomes ont des différences qui ne devraient pas être présentes. Lorsque l'on compare les résultats en fluorescence avec les révélations en protéines totales, les deux protéomes sont présents donc il n'y a pas « d'erreur » de marquage ou de migration. Cependant, on retrouve tout de même une majorité de spots en commun pour les deux longueurs d'onde de lecture. Ces différences peuvent être attribuées à la variation technique sur l'étape de précipitation. Cependant, on peut comparer aussi le Gel 1 et le Gel 2. Les profils Cy3, **2S** et **3S** sont très proches par rapport au profil de Cy5. Le BODIPY **3S** est donc, lui aussi, compatible avec la 2D-Oxi DIGE. Avec les résultats de cette expérience, on peut en conclure que les fluorophores hydrazides **2S** et **3S** peuvent remplacer les cyanines Cy3 et Cy5.

Les mêmes tâches de protéines sont présentes pour Cy3, **2S** et **3S** mais les différences avec Cy5 montrent que l'étape de précipitation est un facteur limitant. Nous avons donc essayé de refaire l'expérience, sans l'étape de précipitation.

b. Modification du protocole expérimental

L'étape de précipitation est présente dans le protocole pour récupérer un maximum de matériel biologique à déposer sur les gels, mais aussi pour retirer l'excédent de fluorophores nécessaire au marquage. Cependant, expérimentalement il y a en moyenne la moitié du matériel qui est perdu au cours des étapes de précipitation et lavage.

Cette expérience a été réalisée sur le même échantillon de protéines extraites du muscle de dos de souris. Les tests de Bradford, pour déterminer les concentrations en protéines totales, montrent une diminution comprise entre 50% et 60% vis-à-vis d'une expérience classique avec précipitation.

La première étape de l'électrophorèse 2D consiste en une électrofocalisation pour séparer les protéines selon leur charge. Lors de l'étape de précipitation, l'excès de fluorophores est retiré mais l'électrofocalisation peut aussi le permettre. Dans le cas de fluorophores chargés, il est plus difficile d'ôter l'excédent. Expérimentalement, on observe une coloration des strips sur la zone à haut pH ce qui démontre une migration incomplète des cyanines hydrazide. En revanche, ce phénomène ne se rencontre pas lors de l'utilisation des BODIPY ce que l'on peut attribuer à leurs charges neutres. La lecture des gels 2D montre une intensité de fluorescence très faible par rapport à la première expérience pour les mêmes quantités de protéines dans les échantillons. De plus, il y a environ 5%-10% d'écart d'intensité entre les tâches des actines (en vert sur la figure 4.25) et les autres tâches principales de protéines (en rouge). Les images des figures 4.25 et 4.26 montrent la présence des protéines marquées et situées dans les zones similaires à celle de l'expérience précédente. Mais le manque d'intensité et de protéines sur le gel montre que l'étape de précipitation est tout de même nécessaire pour la 2D-Oxi DIGE. Les résultats obtenus avec le Gel BODIPY montrent la même conclusion. On remarque cependant la présence de nombreux artefacts sur ce gel. La faible intensité de fluorescence est un facteur trop important pour s'affranchir de l'étape de précipitation.

Gel BODIPY
(sans précipitation) :

C. Comparaison entre des cellules myoblastes murins C2C12 contrôlé et soumis à un stress oxydant

La dernière expérience avec cette technique a été réalisée à partir de deux échantillons de cellules dont l'un a été soumis à un stress oxydant avant analyse. Les myoblastes de souris C2C12 proviennent d'une lignée cellulaire clonée connue pour proliférer rapidement.²⁰⁶ Ces cellules musculaires sont régulièrement utilisées comme modèle cellulaire.

Pour cette expérience, les cellules ont été séparées en deux lots C et H. Le lot H est celui qui a subi un traitement avec une solution de H₂O₂ à 0,5 mM pendant 30 min pour oxyder les protéines. Après centrifugation (20000 g, 5 min) les cellules ont été rincées avec du tampon PBS pour retirer le peroxyde d'hydrogène. Après une seconde centrifugation à 20000 g pendant 10 min, le surnageant a été récupéré. Les deux lots C et H ont été séparés en 6 échantillons C1, C2, C3 et H1, H2, H3 provenant respectivement des lots C et H. Après un test de Bradford, les échantillons H3 et C3 ont été conservés. Les échantillons ont été marqués avec plusieurs fluorophores différents dont un nouveau BODIPY : le BODIPY hydrazide **165** qui sera maintenant nommé **pF** (structure rappelé sur le figure 4.27 ci-dessous).

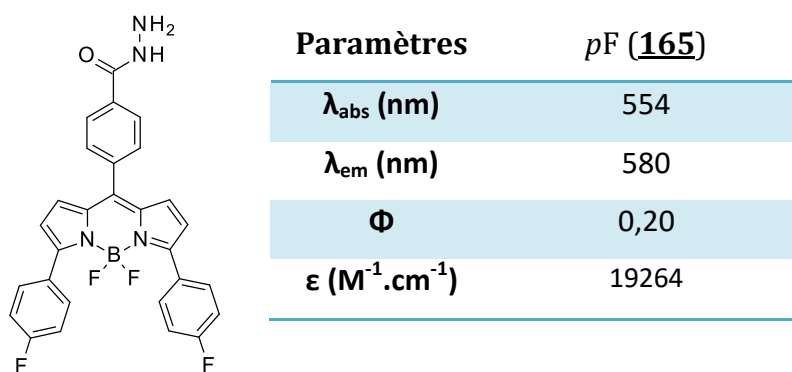


Figure 4.27 : Structure du BODIPY hydrazide **pF** (**165**).

Ce BODIPY a été testé pour remplacer la cyanine Cy2 car **pF** est le composé qui est le moins bathochrome des BODIPY hydrazide et il absorbe à 554 nm et émet à 580 nm. Bien que les

²⁰⁶ Yaffe, D.; Saxel, O. *Nature* **1977**, *270*, 725-727.

spectres entre pF et 3S se recouvrent (de façon similaire au recouvrement entre 3S et 2S), nous avons cependant essayé ce nouveau fluorophore.

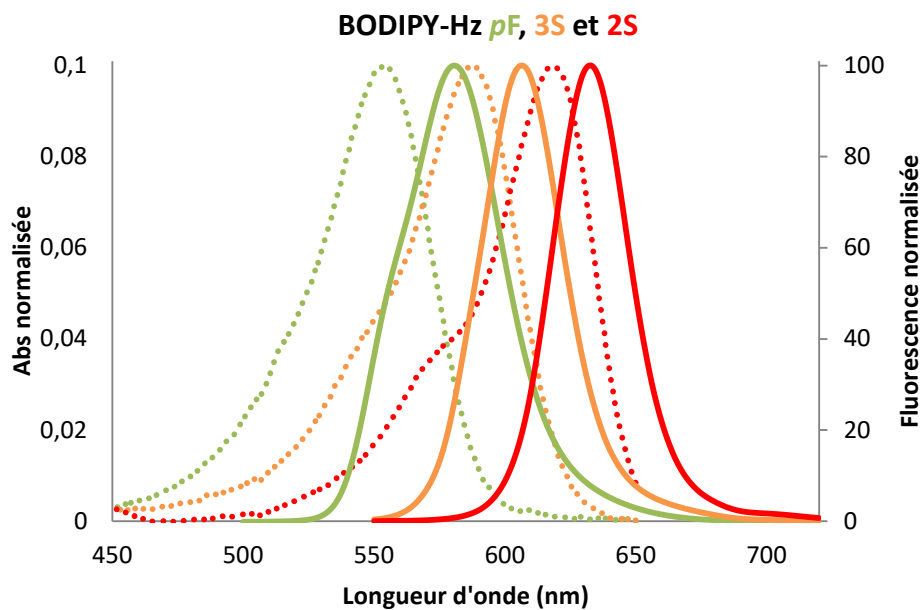


Figure 4.28 : Spectres d'absorption (en pointillé) et de fluorescence (trait plein) des BODIPY hydrazide pF, 3S et 2S.

Nous avons constaté que le nouveau BODIPY hydrazide pF émet avec les mêmes propriétés optiques que 3S. De plus, les échantillons marqués avec pF sont plus intenses que ceux avec 3S et le profil pF-H3 est plus intense que le profil pF-Std. Les profils 2S-C3 et 2S-H3 montrent que la fluorescence est 60% plus intense sur l'échantillon H3 pour les protéines à 50 kDa et 3 fois plus intense pour les protéines à 80 kDa. D'autre part, le profil 3S-H3 à 50 kDa est 10% plus intense que le profil 3S-C3. La fluorescence à 80 kDa est 50% plus intense. En considérant le taux de marquage identique pour 2S et 3S, le traitement oxydant a augmenté le taux de carbonylation d'au moins 50%.

L'échantillon étalon (Std) est un mélange équi-massique des échantillons C3 et H3 marqué avec le fluorophore pF. Chaque mélange introduit dans les puits du gel contient 50 µg de protéines et chaque marquage s'est fait avec 2 µl de solution à 10 mM de fluorophores.

Gel 1D (comparaison des échantillons H3 et C3) :

A : Révélation 647 nm :

B : Révélation 555 nm :

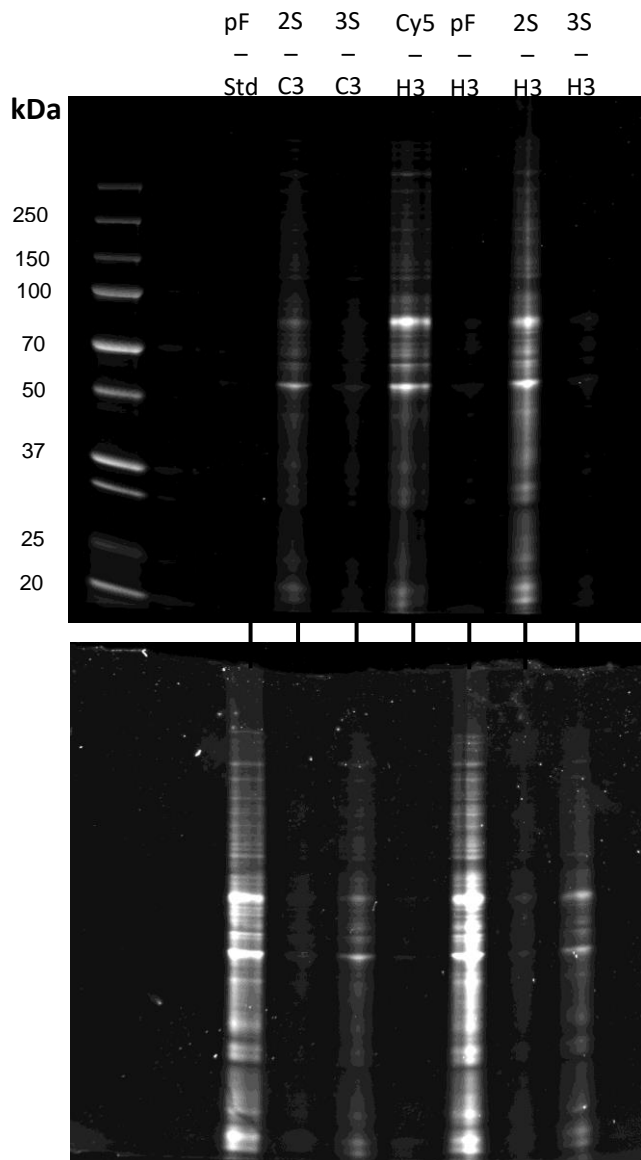


Figure 4.29 : Gel 1D avec les protéines des échantillons C3 et H3. *Gel polyacrylamide BIORAD 4-20% 15 puits*

En parallèle de l'expérience 1D, les échantillons ont été ajoutés sur les 2 strips pH 3 – pH 10 pour l'électrofocalisation. Ainsi, nous avons pu analyser les 2 gels suivant : le gel 1 : pF-H3 et Cy5-H3, le gel 2 : pF-Std, 2S-H3 et 3S-C3. Les profils (figure 4.30) sont similaires cependant on observe une différence sur la migration (au niveau des protéines entre 15 kDa et 37 kDa) qui peut être expliquée par le temps d'acquisition. Lors de l'analyse, le temps d'acquisition était d'environ 10 min pour 2-3 min habituellement. Le gel s'est asséché et s'est racorni ce qui a

physiquement modifié la position des protéines marquées pendant l'acquisition en fluorescence de Cy5. En réhydratant le gel, nous n'avons pas pu lui rendre son aspect initial.

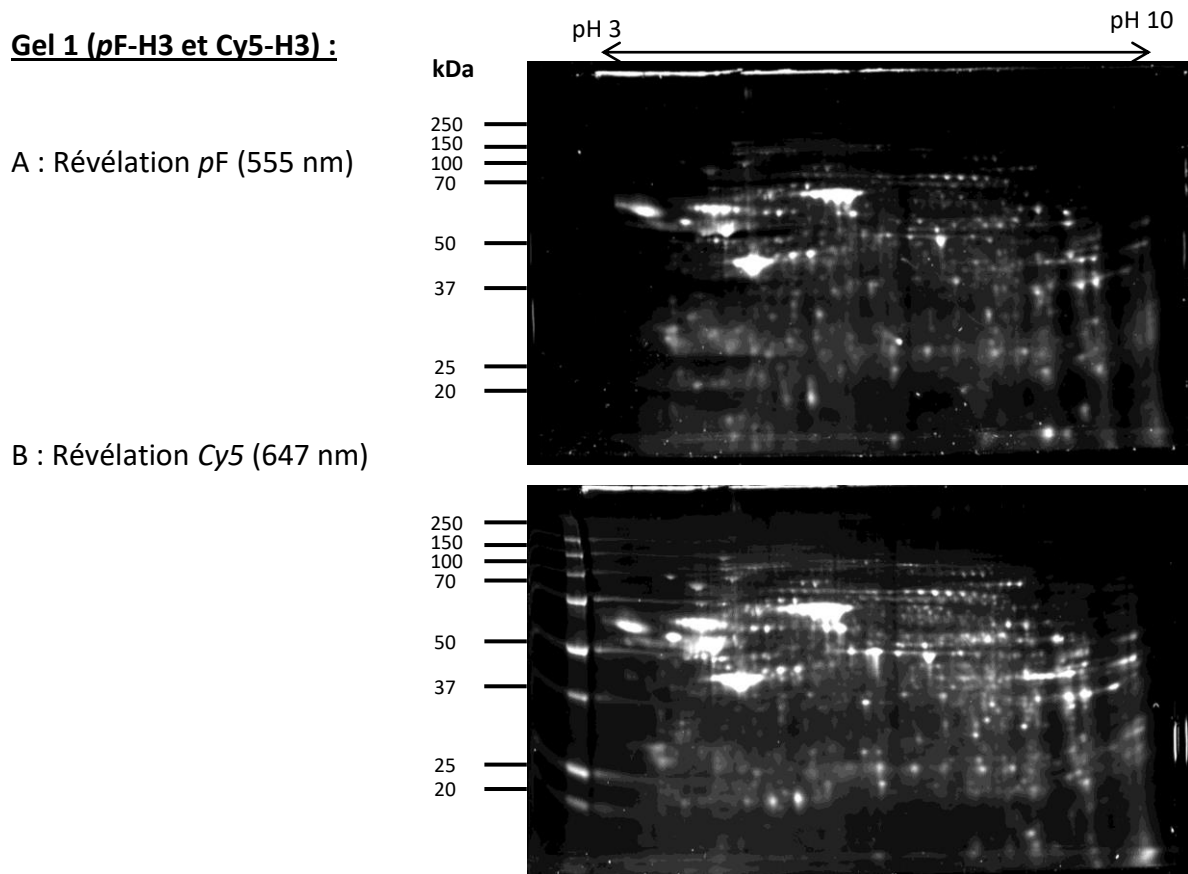


Figure 4.30 : Gel 1 (pF-H3 et Cy5-H3). Gel polyacrylamide BIORAD 4-20%.

Le second gel (figure 4.31), avec pF-Std, 3S-C3 et 2S-H3 ne permet de faire qu'une légère différence entre les lots C3 et H3. Les deux BODIPY 3S et pF révélant sur la même plage de fluorescence, les lots C3 et H3 ne sont pas totalement comparable. En effet, l'échantillon étalon (Std) contenant aussi H3, il y a 25% des protéines révélées à 555 nm qui proviennent du lot H3. Cependant, il y a des différences notables sur le gel 2 comme le montre la figure 4.32. Sur les zones entre 15 kDa et 37 kDa, il y a une suroxydation des protéines par rapport au reste du gel où la superposition des acquisitions est colorée en jaune. L'échantillon 2S-H3 émet une fluorescence 35% plus intense que les échantillons pF-Std et 3S-C3.

Les informations sur le gel 1D de la figure 4.29 sur la différence de marquage entre les cellules contrôles et oxydées est plus marquée que sur le gel en 2D. L'utilisation du BODIPY hydrazide pF est validée avec le gel 2D mais ne peut pas être utilisé avec le BODIPY hydrazide

3S. En conclusion, les nouvelles sondes BODIPY hydrazides pF, 2S et 3S sont utilisables pour le marquage des protéines carbonylées et pour la réalisation du 2D-Oxi DIGE. Les gels 1D montrent que la migration des protéines est identique entre celles marquées avec les BODIPY hydrazides et celles avec les cyanines hydrazides Cy2, Cy3 et Cy5.

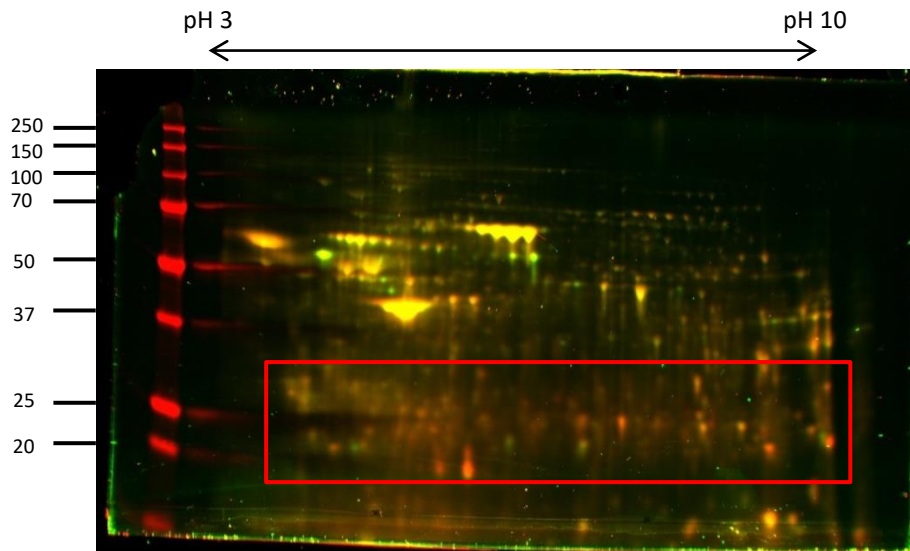


Figure 4.31 : Superposition des échantillons marqués par pF-Std et 3S-C3 (en vert) et 2S-H3 (en rouge). Gel polyacrylamide BIORAD 4-20%.

L'étape de précipitation est nécessaire pour réaliser la technique mais entraîne une perte de protéines de l'ordre de 50%. L'étape d'électrofocalisation est plus nette avec les BODIPY hydrazides qu'avec les cyanines hydrazides mais les résultats sont les mêmes pour les deux familles de fluorophores. Les sondes 2S et 3S peuvent donc remplacer respectivement les cyanines Cy5 et Cy3. Il reste à trouver une dernière sonde pour remplacer Cy2.

4. Utilisation des BODIPY hydrazides en microscopie à fluorescence et cytométrie en flux avec des cellules C2C12

A. Détection des protéines carbonylées en microscopie à fluorescence après marquage des myoblastes murins C2C12 par les BODIPY hydrazides

Nous avons expliqué dans le chapitre III que les BODIPY hydrazides peuvent être utilisés pour des expériences sur cellules après extraction des protéines. Nous avons essayé de marquer les protéines carbonylées directement dans les cellules. Ces expériences ont été réalisées avec Janek Hyzewicz, post-doctorant et Marie-Paule Hamon, doctorante, avec un microscope à fluorescence. Environ 500 000 cellules C2C12 (par échantillon) ont été fixées à l'éthanol dans des boîtes de culture, puis placées dans un milieu tampon PBS. Pour cette expérience, 6 échantillons ont été préparés : 3 contrôles dont 2 marqués avec **2S** et **3S**, et 3 soumis à un stress oxydant (30 min en présence de 0,5mM de H₂O₂) dont 2 marqués avec **2S** et **3S**. Après le traitement par le peroxyde d'hydrogène, les cellules ont été mises en présence de saponine, un détergent de la famille des terpénoides cycliques qui permet d'« ouvrir » des pores dans la membrane plasmique des cellules. Ces « ouvertures » facilitent l'incorporation des fluorophores dans le cytoplasme et donc la mise en contact des BODIPY hydrazides (5µL à 10mM) avec les protéines. Après 2 heures de marquage, les cellules ont été rincées 3 fois avec du tampon PBS pour retirer l'excès de marqueurs. Enfin, les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) pour leur détection au microscope. Le DAPI est une molécule capable de créer des interactions électrostatiques avec les bases adénines (A) et thymine (T) de l'ADN. Cette molécule fluorescente absorbe à 350 nm et émet entre 450 nm et 490 nm.

Les images prises par le microscope à fluorescence sont représentées sur la figure 4.32 ci-dessous. Les images contrôles (A) montrent les cellules contrôles et stressées sans marquage. Les images B montrent les deux lots de cellules marquées avec le BODIPY 3S et enfin les images C montrent les lots de cellules contrôles et stressées marquées par le BODIPY hydrazides **2S**. Les cellules des lots A ne présentent aucune émission en fluorescence au-delà de 500 nm. De plus, il n'y a aucune différence notable sur les noyaux des cellules contrôles A. Toutes les images ont été traitées dans les mêmes conditions pour permettre la comparaison des résultats. L'excès de fluorophore a bien été éliminé car on remarque qu'il y

a des zones sans aucune fluorescence ce qui ne serait pas le cas s'il restait du marqueur non fixé. Les cellules stressées, marquées avec **3S**, émettent une fluorescence plus intense que les cellules contrôles ce qui démontre une augmentation des protéines carbonylées. Cette augmentation est beaucoup plus marquée entre les échantillons du panel C (cellules stressées versus contrôles).

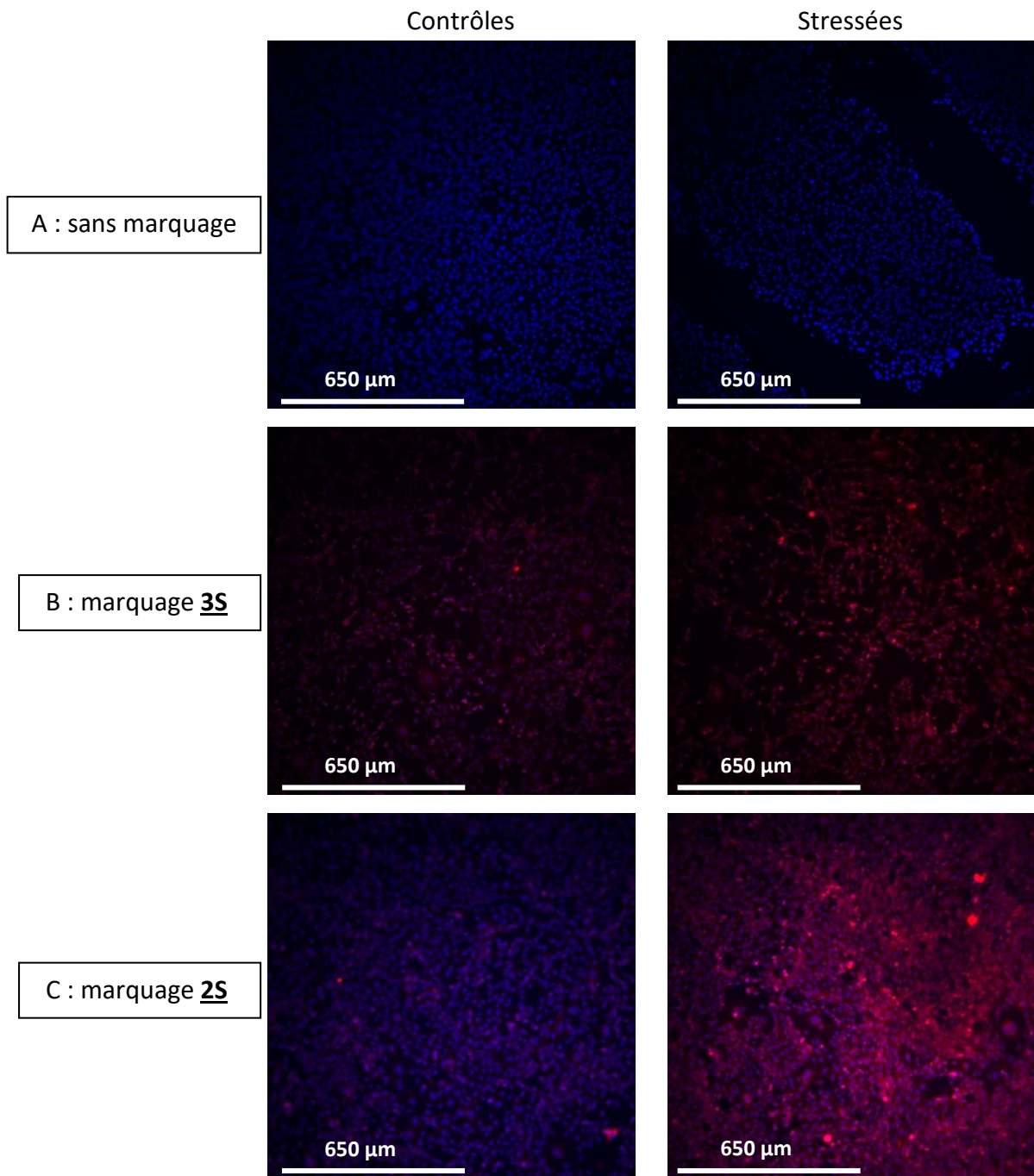


Figure 4.32 : Images microscopie à fluorescence. DAPI (en bleu) et BODIPY **3S** et **2S** (en rouge).

L'importante fluorescence du marqueur 2S montre un taux de carbonylation bien plus important en accord avec le traitement par un stress oxydant. Si on compare les échantillons stressés B et C (figure 4.33), il y a plus de cellules présentes sur le C que sur le B, ce qui ne permet pas de conclure avec certitude que 2S a un meilleur taux de marquage que 3S.

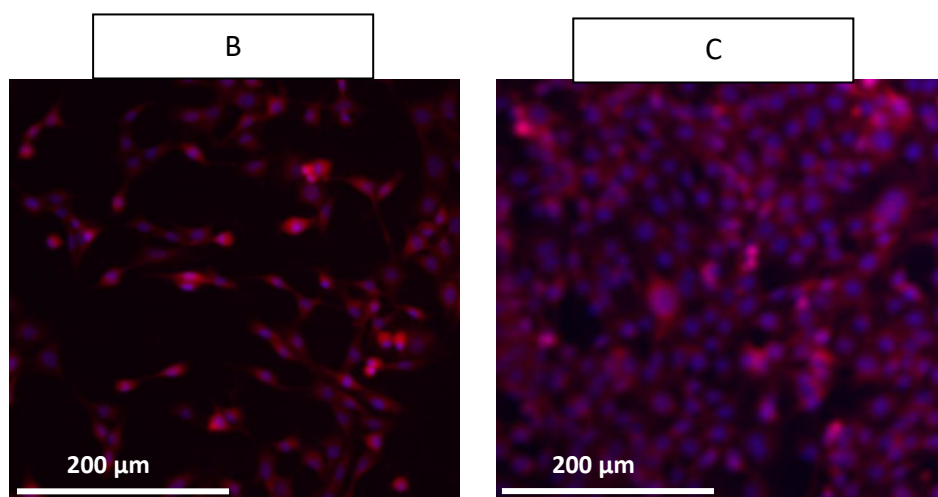


Figure 4.33 : Agrandissement des images de microscopie à fluorescence. B : cellules stressées 3S, C : cellules stressées 2S.

Cette expérience d'immunofluorescence pourrait être réalisée une seconde fois sur des cellules fixées sur des lames permettant un meilleur grossissement. Les résultats concluraient alors sur les zones exactes de marquage (cytosol, membrane plasmique, noyau). Cependant, on peut conclure, avec les informations actuelles, que les BODIPY hydrazides peuvent être utilisés directement *in vitro* sur des cellules C2C12. Des études de toxicité sont nécessaires avant de pouvoir faire des essais *in vivo* même si, de façon générale, les BODIPY ne sont pas connus pour leur toxicité.

B. Détection des protéines carbonylées en cytométrie en flux après marquage des myoblastes murins C2C12 par les BODIPY hydrazides

a. Introduction à la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique analyse cellulaire biologique permettant de caractériser les populations d'un échantillon. Elle fut inventée en 1934 par A. Moldovan.²⁰⁷ Les entités biochimiques (cellules, molécules, particules) sont envoyées à travers le faisceau d'un laser à grande vitesse puis elles sont comptées et caractérisées grâce à la lumière qu'elles réémettent par diffusion ou fluorescence. C'est la différence de lumière réémise qui permet de trier, de quantifier et de caractériser les entités d'un échantillon. La cytométrie en flux peut être, par exemple, utilisée pour déterminer le type de population présente dans le sang²⁰⁸ dans le cas de diverses pathologies (dysfonction endothéliale,²⁰⁹ allergies²¹⁰ leucémie²¹¹...). Les cellules marquées avec un agent fluorescent sont envoyées une par une à devant un rayon laser et un détecteur enregistre le signal résultant de ce passage permettant de classer les entités selon différents critères comme la nature des cellules (vivantes, mortes, type de cellule...). On peut aussi avoir accès à d'autres informations comme la morphologie, la taille ou la structure des cellules. Il existe des appareillages FACS (fluorescence-activated cell sorting) capables de trier et de récupérer les populations après séparation. Les résultats de l'expérience de cytométrie que nous avons réalisée sur des cellules myoblastes murins C2C12 soumis à un stress oxydant sont présentés sur la figure 4.34 ci-dessous. Le graphique A montre l'existence d'une population très majoritaire qui représente 95,4% de toutes les cellules injectées dans l'appareillage. Nous avons considéré qu'il s'agissait des cellules C2C12 intactes après le traitement oxydant. A partir de cette population sélectionnée, le graphique B représente les 99,7% de cellules C2C12 marquées par le BODIPY **2S** hydrazide. Cette expérience démontre que le BODIPY **2S** hydrazide est détectable en cytométrie en flux et qu'il marque de façon uniforme la population.

²⁰⁷ Moldovan, A. *Science* **1934**, 188-189.

²⁰⁸ Smith, P. J.; Wiltshire, M.; Davies, S.; Patterson, L. H.; Hoy, T. J. *Immuno. Methods* **1999**, 229, 131–139.

²⁰⁹ Agouni, A.; Lagrue-Lak-Hal, A. H.; Ducluzeau, P. H.; Mostefai, H. A.; Draunet-Busson, C.; Leftheriotis, G.; Heymes, C.; Martinez, M. C.; Andriantsitohaina, R. *Am. J. Pathol.* **2008**, 173, 1210–1219.

²¹⁰ Sainte-Laudy, J.; Sabbah, A.; Vallon, C.; Guerin, J. C. *Inflammation Research* **1998**, 47, 401–408.

²¹¹ Panoskaltzis, N.; Reid, C. D. L.; Knight, S. C. *Leukemia* **2003**, 17, 716–730.

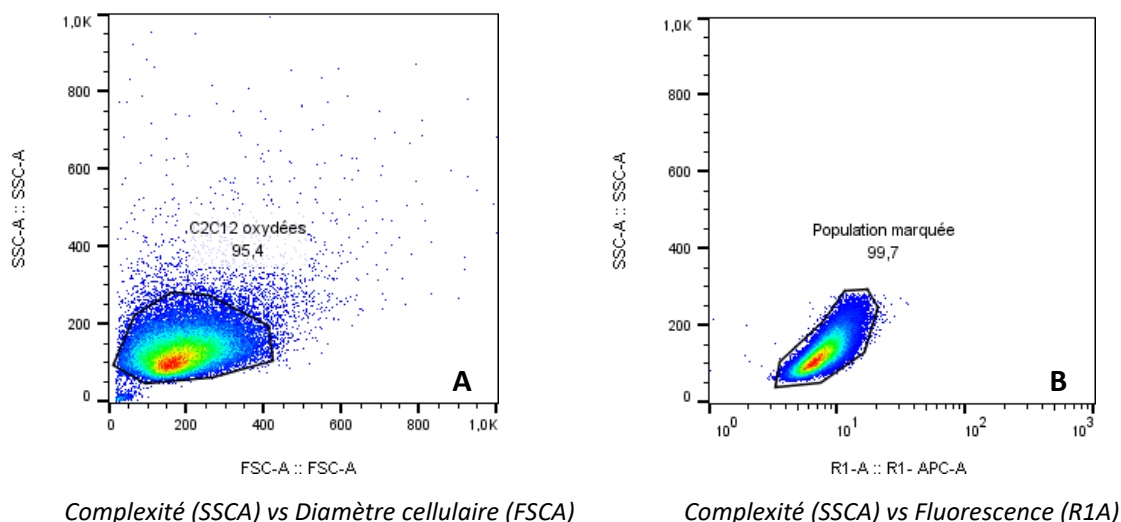


Figure 4.34 : Exemples de résultats en cytométrie en flux.

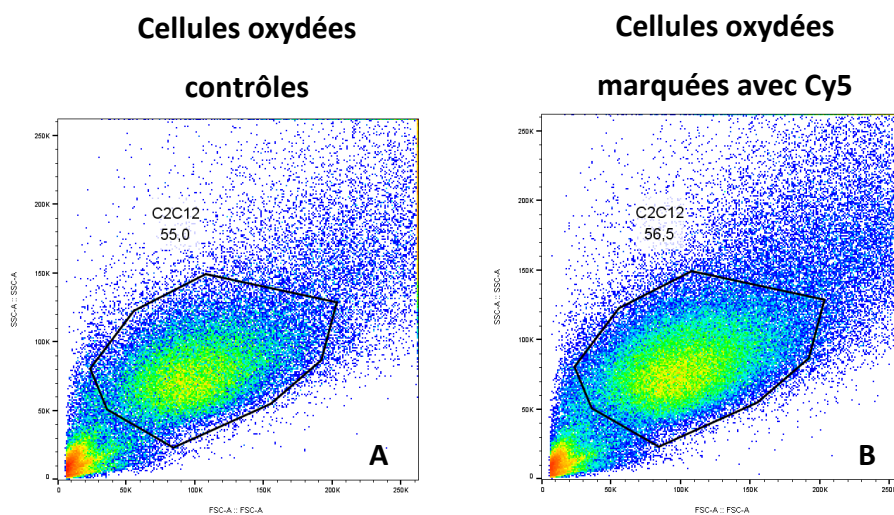
Dans les deux prochaines sous-parties, nous allons décrire les expériences de cytométrie en flux réalisées avec les BODIPY hydrazides et les cyanines hydrazides sur deux populations cellulaires de C2C12 contrôles et soumises à un stress oxydant.

b. Comparaison des populations de cellules C2C12 oxydées marquées par la cyanine Cy5 et le BODIPY 2S

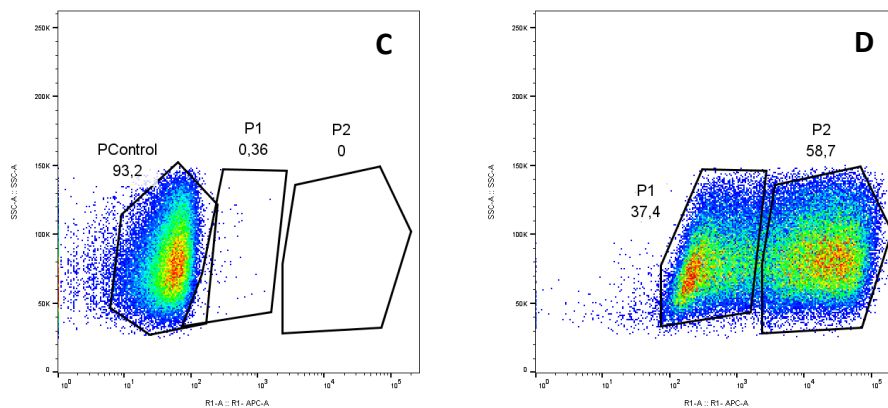
Nous allons utiliser deux fluorophores pour ces expériences : la cyanine Cy5 hydrazide et la nouvelle sonde BODIPY **2S** hydrazide. La sonde Cy5 a déjà été utilisée en cytométrie en flux.²¹² Les mesures de fluorescence ont été enregistrées pour une détection de 647 nm pour les deux sondes. Pour un volume de 500 µl de cellules traitées par le peroxyde d'hydrogène en milieu PBS, 10 µl d'une solution de fluorophores à 10 mM dans le DMSO sont ajoutés. Le marquage est réalisé à 4 °C pendant 3 h. Après le marquage, les échantillons subissent trois lavages (centrifugation, récupération du surnageant, dispersion dans 200µl de PBS) pour retirer l'excès de marqueur fluorescent. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie. L'échantillon contrôle (figure 4.35) est un lot de cellules C2C12 traitées par le peroxyde d'hydrogène non marquées. On peut remarquer que pour la population majoritaire de cellules C2C12 on retrouve une population unique non

²¹² Cy5 dye, ThermoFischer scientific, www.thermofischer.com, 2018.

fluorescente (Contrôles, graphique C). On peut remarquer une population proche de l'origine des graphiques A et B, ce sont les débris cellulaires résultant du traitement oxydant. Les résultats montrent que lors du marquage avec Cy5 hydrazide, on observe deux populations fluorescentes avec un marquage distinct. Sur la population majoritaire de cellules C2C12, soit 56,5% (68503 cellules) de la population totale (graphique B), on découvre deux populations majeures en fluorescence appelées P1 et P2 (graphique D). La population P1 (28657 cellules) montre une intensité de fluorescence 100 fois plus faible que la population P2 (37367 cellules). L'existence de ces deux populations s'explique par une différence de marquage. Dans le cas des cellules P1, nous pensons que les cellules ont été marquées en surface, sur leur membrane plasmique. Dans le cas des cellules P2, il y a eu le fluorophore Cy5 hydrazide a été internalisé ce qui a permis le marquage des protéines carbonylées dans le cytosol.



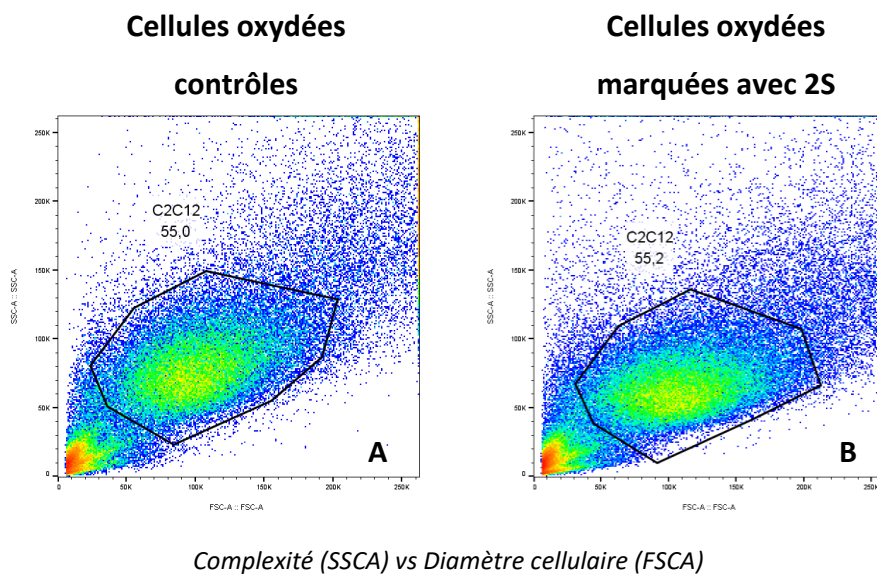
Complexité (SSCA) vs Diamètre cellulaire (FSCA)

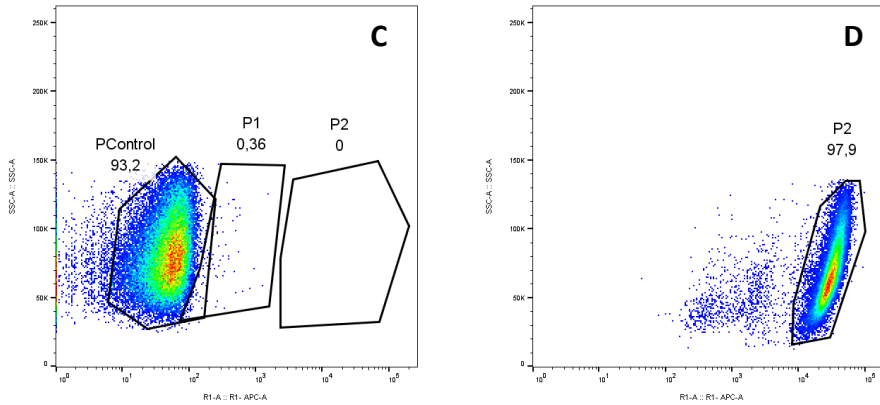


Complexité (SSCA) vs Fluorescence (R1A)

Figure 4.35 : Comparaison des populations de cellules C2C12 contrôles (graphique A et C) et marquées avec **Cy5** (graphique B et D)

Il est à noter que l'abondance des deux populations P1 et P2 peut varier au cours du temps et que pour un temps de marquage plus long, le système tendrait vers une seule population P2. Nous avons aussi comparé ces analyses avec celles de l'échantillon marqué avec le BODIPY **2S**. Sur la figure 4.36, les analyses comparatives entre l'échantillon contrôle et celui marqué avec **2S** sont présentés. Sur le graphique B, la population de cellule C2C12 majoritaire est composée de 52332 entités. A partir de ces cellules, nous retrouvons une seule population P2 composée de 51323 entités soit 97,9% de la population C2C12 marquée uniformément contrairement à l'échantillon marqué avec Cy5 hydrazide. Compte tenu de l'intensité de fluorescence et du fait que les BODIPY sont connus pour s'insérer dans les cellules (voir Chapitre III), on peut en déduire que nous sommes en présence d'un marquage des cellules C2C12 à la fois sur la membrane plasmique mais aussi sur les protéines carbonylées du cytosol.





Complexité (SSCA) vs Fluorescence (R1A)

Figure 4.36 : Comparaison des populations de cellules C2C12 contrôles (graphique A et C) et marquées avec **2S** (graphique B et D).

L'expérience de cytométrie en flux, qui va être détaillée dans la dernière sous-partie a permis d'établir si la différence d'internalisation des sondes fluorescences était bien le facteur expliquant ces résultats des figures 4.35 et 4.36.

c. Comparaison des populations de cellules C2C12 soumises à un stress oxydant puis perméabilisées et marquées par la cyanine Cy5 et le BODIPY 2S

Les membranes des cellules ont été perméabilisées avant l'étape de marquage. Les cellules C2C12 traitées par le peroxyde d'hydrogène ont été incubées dans l'acétone pendant 5 min puis lavées avec du PBS. Il s'agit d'un traitement plutôt drastique pour perméabiliser rapidement les membranes cellulaires et nos résultats montrent ainsi un fort taux de mort cellulaire après ce traitement. Deux échantillons de cellules ont été marquées 30 min à température ambiante avec Cy5 hydrazide ou BODIPY **2S**.

Comme expliqué précédemment, on observe un fort taux de mort cellulaire, environ 90% des cellules ont été détruites. On sélectionne donc une population de cellules C2C12 viables qui représente 20% des échantillons, soit 3296 entités pour Cy5 (graphique A) et 5064 entités pour **2S** (graphique B). Il est important de remarquer que nous obtenons une seule population P2 pour chaque échantillon. Cette population représente 96,4% (3159 cellules)

de la population C2C12 marquée avec Cy5 hydrazide (graphique C) et 97,3% (4959 cellules) pour celle marquée avec **2S** (graphique D). Les deux populations P2 ont la même complexité et la même intensité de fluorescence.

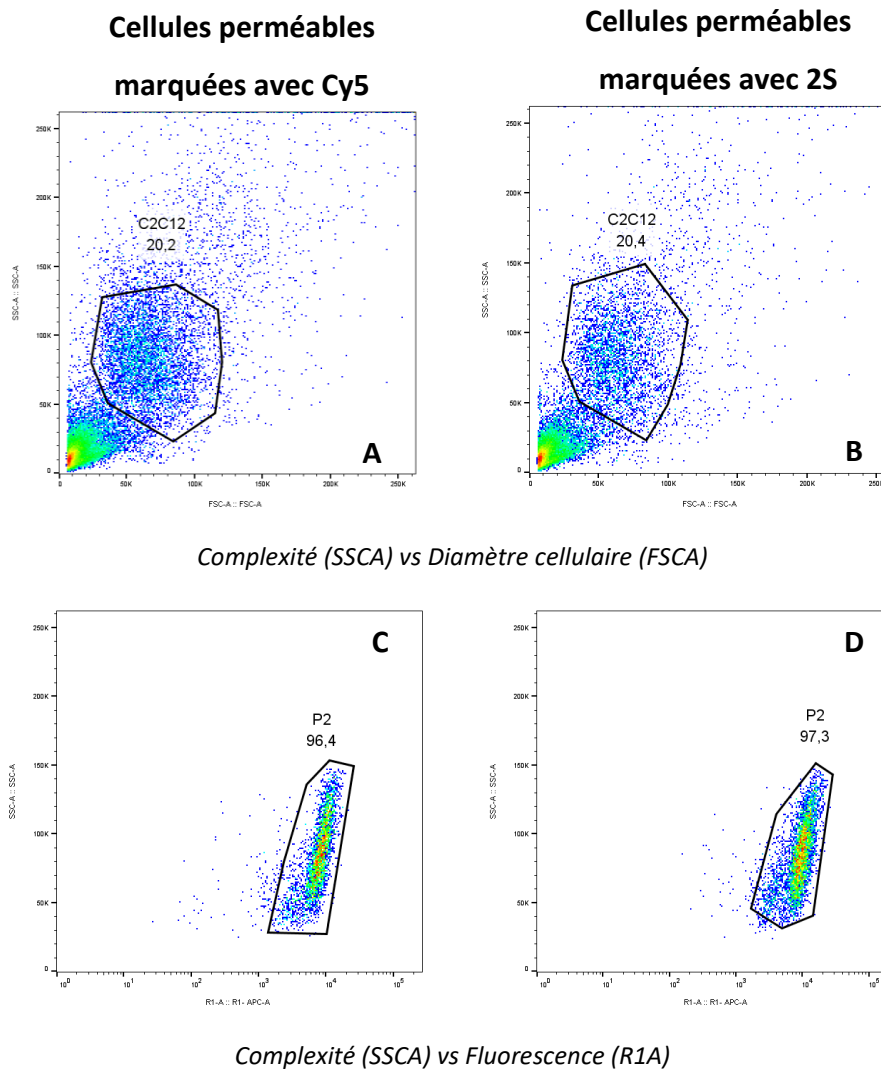


Figure 4.37 : Comparaison des populations de cellules C2C12 perméabilisées, marquées avec Cy5 (graphique A et C) et **2S** (graphique B et D).

En résumé, les expériences de cytométrie en flux démontrent que le marquage des cellules non préalablement perméabilisées, par le BODIPY **2S** est bien meilleur que celui obtenu par la cyanine Cy5 hydrazide commerciale. Ainsi du fait d'une meilleure internalisation par les cellules, le marquage avec le BODIPY **2S** pourrait se faire en moins de temps. Nous pensons

que c'est le caractère lipophile du BODIPY qui lui confère cette meilleure internalisation par rapport à la cyanine Cy5 qui est globalement chargée et donc moins lipophile.

d. Conclusion du chapitre sur les applications biologiques

Dans une première partie, nous avons présenté les résultats préliminaires de l'inhibition des kallitréines KLK6 et KLK8 par les 1,2,4-triazoles trisubstitués qui ont permis de déterminer un candidat prometteur pour de futures applications biologiques. Une étude structure-affinité doit être réalisée pour déterminer la ou les structures présentant les meilleures IC₅₀. Ces molécules hétérocycliques présentent aussi des propriétés de fluorescence qui pourraient être potentiellement utiles pour des études mécanistiques et/ou de suivi biologique.

Nous avons ensuite présenté les résultats sur le marquage de la BSA que nous avons oxydée en tant que preuve de concept pour nos triazoles et nos BODIPY hydrazides. Cependant, seuls les résultats avec les BODIPY hydrazides ont été concluants et ont permis de passer à l'étape suivante de validation de leur utilisation pour la technologie 2D-Oxy DIGE.

Nous avons détaillé les informations prouvant la validité des nouveaux BODIPY en tant que sondes fluorescentes utilisables pour la 2D-Oxy DIGE. Elles présentent un marquage optimale et similaire aux cyanines, y compris pour la différenciation entre des échantillons de cellules contrôles et oxydés. Cependant, nous n'avons sélectionné que 2 candidats pour remplacer Cy3 et Cy5 avec respectivement les BODIPY **2S** et **3S**.

Grâce aux études sur des cellules myoblastes murins C2C12, les BODIPY **2S** et **3S** hydrazides ont révélés être utilisables pour d'autres analyses biologiques comme la microscopie à fluorescence ou la cytométrie en flux. Les BODIPY hydrazides ont démontré une meilleure insertion à travers les membranes cellulaires.

Conclusion Générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse décrivent la conception et la synthèse de nouveaux hétérocycles fluorescents pour l'amélioration et le perfectionnement des techniques d'analyses biologiques. Entre 2010 et 2014, l'équipe ChemBio et ses collaborateurs de chez Sanofi ont décrit la synthèse de plus de 40 structures de type pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one. A partir de ces bicycles aromatiques, ils ont aussi décrit leur conversion en 1,2,4-triazoles-1,3,5-trisubstitués ou en 1,3,5-triazines-2,4,6-trisubstitués. Les premières analyses optiques ont démontré que ces hétérocycles azotés possédaient des propriétés de fluorescences. L'équipe de B. Friguet a montré un intérêt particulier pour ces nouvelles sondes fluorescentes potentielles pour la biologie, en particulier pour le marquage des protéines carbonylées associées au vieillissement et à l'inflammation. En 2012, B. Friguet et ses collaborateurs ont développé une technique de détection et de quantification des protéines carbonylées appelée 2D-Oxi DIGE. Celle-ci permet l'analyse de la carbonylation des protéines de plusieurs échantillons cellulaires différents en une seule expérience grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes commerciales, les CyDyes hydrazides. Cependant, pour perfectionner la technique 2D-Oxi DIGE, une collaboration entre l'équipe ChemBio et celle de B. Friguet a débuté pour synthétiser de nouvelles sondes fluorescentes « maison » avec une absorption dans le visible (400 nm – 650 nm) et n'émettent pas dans le proche IR ou l'IR (>650 nm), spécifiquement développées pour le marquage des protéines carbonylées.

Dans la première partie de ce projet, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes à base 1,2,4-triazoles possédant une fonction de marquage hydrazide, un fragment 2-pyridone ou 3-pyridol. Pour cela, nous avons tout d'abord effectué des fonctionnalisations de diverses pyrido-oxazinones via des réactions de couplage pallado-catalysées de Sonogashira ou de Stille puis effectué la synthèse de près de 20 triazoles 1,3,5-trisubstitués possédant des substituants aryles différents en position 3 du noyau triazole. Sur un ensemble restreint de triazoles judicieusement sélectionnés, nous avons détaillé leurs propriétés photophysiques dans 4 solvants : l'acétonitrile, l'éthanol, le dichlorométhane et l'eau. Ces mesures ont mis en évidence un large déplacement de Stokes attribué à un mécanisme de fluorescence de type ESIPT (Excited State Intramolecular Proton Transfer) traduisant la présence de deux formes tautomères (énol et céto). Grâce aux spectres de fluorescence et à une étude de chimie théorique *in silico* menée par nos collaborateurs du LCT, nous avons pu rationaliser nos résultats et prouver que nos triazoles présentent une

bande d'émission simple dans l'acétonitrile et l'éthanol dû à la forme énol et une émission duale dans le dichlorométhane dû aux deux formes énol (minoritaire) et céto (majoritaire). Cependant, ces hétérocycles azotés n'absorbent pas dans le visible et n'émettent pas au-delà de 530 nm. Nous nous sommes tournés vers d'autres hétérocycles fluorescents connus, les BODIPY.

Dans la deuxième partie, nous avons présenté la conception et la synthèse de nouvelles sondes à base BODIPY avec une fonction hydrazide pour le marquage des protéines carbonylées. A travers une synthèse divergente, nous avons décrit un ensemble de 16 nouveaux BODIPY substitués en position 3 et 5 par des aryles et des hétéroaryles, dont 7 possédant une fonction hydrazide. Les fragments aryles substitués par des groupements méthoxy ou fluor, et les 2-thiényles et 3-thiényles ont été introduits sur un BODIPY plateforme par réactions de couplage de Sonogashira ou de Stille. Nous avons ainsi obtenu de nouvelles sondes fluorescentes avec des absorptions comprises entre 554 nm et 619 nm, des émissions allant jusqu'à 636 nm, et des rendements quantiques compris entre 10% et 88%.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons démontré la validation de ces nouveaux BODIPY en tant que sondes fluorescentes pour le marquage des protéines carbonylées à travers les résultats en 2D-Oxi DIGE et les expériences *in vitro* de microscopie à fluorescence et de cytométrie en flux. Nous avons montré que les BODIPY sont compatibles avec la technique 2D-Oxi DIGE, et qu'ils peuvent être utilisés directement pour le marquage des protéines des cellules sans dénaturation préalable. Les résultats en cytométrie en flux traduisent aussi une endocytose des BODIPY pour un marquage dans le cytosol et pas seulement au niveau de la membrane plasmique contrairement aux CyDyes hydrazides. En perspective, il serait intéressant d'introduire d'autres fonctions de marquage et ainsi étendre leur potentiel d'utilisation en biologie. En parallèle, il faudrait déterminer si ces molécules sont utilisables *in vivo* en vérifiant leur cytotoxicité et si elles sont suffisamment intenses pour être détectées à travers les tissus biologiques.

Partie Expérimentale

General materials and methods

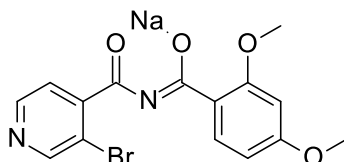
Unless otherwise indicated, all starting materials, reagents and catalysts were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Anhydrous tetrahydrofuran (THF), toluene, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), isopropyl alcohol (*i*-PrOH), dichloromethane (CH₂Cl₂), chloroform (CHCl₃), ethylacetate (AcOEt), hexanes, cyclohexane (Cy), petroleum ether 40-70°C (EP), diethyl ether (Et₂O), 1,4-dioxane, N,N-dimethylformamide (DMF) and methyl ethyl ketone (MEK) were purchased with quality standards for analysis from Carlo-Erba. Acetonitrile (MeCN) was purchased with quality standards for HPLC from Carlo-Erba. Prior to use, THF, toluene were subsequently dried over activated molecular sieves (4 Å). Tert-Butyl alcohol (*t*-BuOH) 99+% was purchased from Alfa Aesar. Dimethyl sulfoxide (DMSO) anhydrous >99.9% were purchased from Sigma-Aldrich. Reactions involving air or moisture sensitive reagents or intermediates were carried out under an inert atmosphere of nitrogen or argon in glassware that had been oven dried followed by nitrogen purge. Reaction temperatures are reported as the temperature of the bath surrounding the vessel, unless otherwise indicated. Merck 60F254 silica gel was used for thin-layer chromatography (TLC) and Merck Geduran SI 60 Å silica gel (40-63 um) was used for flash chromatography. ¹H and ¹³C (or J-MOD) NMR spectra were recorded on Brüker AVANCE 400 spectrometer or a 600 MHz Brüker AVANCE 200. All NMR spectra were taken in deuterated chloroform (CDCl₃) or deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d₆) unless otherwise noted. Chemical shifts (δ) are expressed as ppm referenced to the residual solvent (i.e. chloroform, ¹H δ 7.24 ppm, ¹³C δ 77.1 ppm and dimethylsulfoxide, ¹H δ 2.50 ppm, ¹³C δ 39.5 ppm). Splitting patterns are expressed, as seen on spectra, as s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; p, pentet; m, multiplet; comp, overlapping multiplets of magnetically nonequivalent protons; br, broad; app, apparent. IR spectra were recorded on ThermoNicolet Avatar 330 FT IR on film or in solution with the indicated solvent. High resolution mass spectral (HRMS) analyses were taken on a Bruker micrOTOF mass spectrometer using electron spray ionization. The melting point were performed on electrothermal IA 91000. Reactions with microwave assistance were performed using a Biotage InitiatorTM 2.0 apparatus in a Biotage 2-5 mL or 10-20 mL microwave vial, at the indicated temperature (detected by IR-sensor), on very high absorption mode, for an

indicated period of time. Absorption spectra were performed on JASCO V670 at 20°C using DMSO solutions in a quartz optical cell 10X10 mm from Hellma Analytics. The emission and excitation spectra were performed on JASCO J-815 CD spectrometer in a quartz optical cell 10x10 mm from Hellma analytics.

For Biology experiments : 1D gel for electrophoresis are Invitrogen Novex WedgeWell 4-20% polyacrylamide Tris-Glycine gel 1.0mm * 15 wells. 2D gel for bidimensional electrophoresis and 2D-Oxi DIGE are BIO-RAD Criterion TGX precast gel 4-20% polyacrylamide IGP+1 well 11 cm. Electrofocalisation of strips was done on an Ettan IPGphor 3 devices from GE Healthcare. Picture of the fluorescence of gels were captured with a BIO-RAD ChemiDoc MP imaging system. Microscopy pictures were recorded on a Leica DMI8 microscope. Cytometry measurements were recorded on MACSQuant X from MACS Miltenyi Biotech.

Experimental section : Chapter II

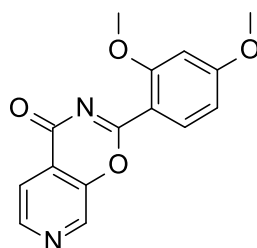
The synthesis of pyrido-oxazinones **38**, **42**, **43** and **44**, used for coupling reactions and coupling products **55** and **58** has been described both in the PhD thesis of L. Le Falher.



General procedure A :[(Z)-N-(3-bromopyridine-4-carbonyl)-C-(2,4-dimethoxyphenyl) carbonimidoyl]oxysodium

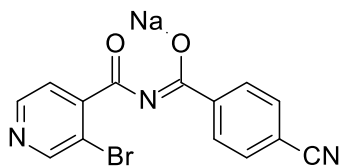
(39a) :

At 0 °C, under argon atmosphere, to a solution of 3-bromoisonicotinamide (1 g, 4.98 mmol) in THF (100 mL) was added sodium hydride 60% suspension in oil (418 mg, 10.5 mmol). The resulting mixture was then stirred for one hour at 0 °C. Then at -78 °C, pure 2,4-dimethoxybenzoyl chloride (1.04 g, 4.98 mmol) was added and the resulting mixture was slowly warmed up to room temperature and stirred for 12 h. Then, the mixture was concentrated to dryness in vacuo. The resulting solid was then triturated in diethyl ether, filtered, to provide the title product as a white powder in 99 % yield (1.89 g). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.56 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 6.48 – 6.39 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 176.07, 172.40, 161.25, 159.22, 151.43, 150.94, 147.96, 132.31, 123.37, 123.01, 117.33, 104.10, 98.78, 55.67, 55.24; IR (film, cm⁻¹) 1604, 1567, 1502, 1308; mass spectrum ESI+ *m/z* 386.9963 [C₁₅H₁₂BrN₂NaO₄(M+H) requires 386.9883]; mp 196-197 °C.



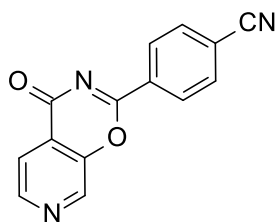
2-(2,4-dimethoxyphenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (39) :

In a 10-20 mL microwave vial were placed 440 mg of [(Z)-N-(3-bromopyridine-4-carbonyl)-C-(2,4-dimethoxyphenyl)carbonimidoyl]oxysodium **39a** (1.13 mmol). Then, 20 mL of anhydrous DMSO were added and the microwave vial was sealed. The resulting mixture was then submitted to microwave irradiation under stirring for 30 minutes at 180 °C. The microwave vial was opened, and the reaction mixture was poured in a separating funnel containing 120 mL of water, extracted three times with EtOAc (3x100 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with ethyl acetate to recover 162 mg a pale yellow solid in 51 % yield. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.91 (s, 1H), 8.71 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 5.0, 0.8 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.57 – 6.49 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.90 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.81, 165.12, 164.98, 161.82, 150.22, 146.76, 140.62, 135.02, 123.00, 119.04, 110.60, 105.43, 98.85, 55.80, 55.45; IR (film, cm⁻¹) 1690, 1592, 1532, 1339, 1290; mass spectrum ESI+ *m/z* 307.0699 [C₁₅H₁₂N₂O₄(M+H) requires 307.0791]; mp 232-233 °C.



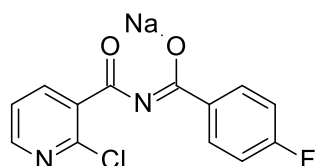
[(Z)-N-(3-bromopyridine-4-carbonyl)-C-(4-cyanophenyl)carbonimidoyl]oxysodium (40a**) :**

The title product has been synthesized according to general procedure A as a white powder in 87 % yield (378 mg) from 3-bromoisonicotinamide (0.250 g, 1.24 mmol) and 4-cyanobenzoyl chloride (0.210 g, 1.24 mmol). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.65 (s, 1H), 8.48 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 174.32, 172.37, 151.42, 150.94, 148.01, 144.10, 131.74 (2C), 129.42 (2C), 123.32, 118.95, 117.15, 112.37; IR (film, cm⁻¹) 1506, 1365, 795; mass spectrum ESI+ *m/z* 351.9692 [C₁₄H₇BrN₃NaO₂(M+H) requires 351.9619]; mp 272-273 °C.



2-(4-cyanophenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (40) :

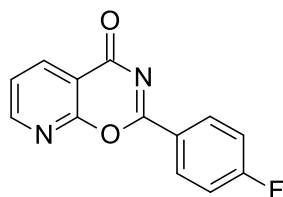
In a 10-20 mL microwave vial were placed 280 mg of [(Z)-N-(3-bromopyridine-4-carbonyl)-C-(4-cyanophenyl)carbonimidoyl]oxysodium 40a (0.80 mmol). Then, 16 mL of anhydrous DMSO were added and the microwave vial was sealed. The resulting mixture was then submitted to microwave irradiation under stirring for 30 minutes at 180 °C. The microwave vial was opened, and the reaction mixture was poured in a separating funnel containing 100 mL of water, extracted three times with EtOAc (3x80 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with diethyl ether to recover 82 mg a yellow solid with 41 % yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.17 (s, 1H), 8.78 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.13, 164.84, 162.65, 147.86, 141.63, 134.28, 133.36 (2C), 130.20 (2C), 123.61, 119.22, 118.25, 116.84; IR (film, cm⁻¹) 3372, 2235, 1692, 1611, 1546, 1344; mass spectrum ESI+ *m/z* 250.0610 [C₁₄H₇N₃O₂(M+H) requires 249.0538]; mp 238-239°C.



[(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-C-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl] oxysodium (46a) :

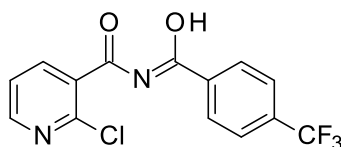
The title compound was synthesized according to general procedure A as a pale yellow solid with 85% yield (441 mg) from 2-chloronicotinamide (0.250 g, 1.59 mmol) and 4-fluorobenzoyl chloride (189 μL, 1.59 mmol). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.31 (dd, *J* = 4.8, 2.0 Hz, 1H), 8.19 – 8.08 (m, 2H), 7.95 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 7.5, 4.7 Hz, 1H), 7.22 – 7.09 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 173.74, 173.26, 165.30, 162.04, 148.18, 146.74, 138.15, 138.09, 136.21, 131.34, 131.22, 122.65, 114.43, 114.15; IR (film, cm⁻¹) 1619,

1579, 1505, 1382, 795; mass spectrum ESI+ m/z 301.0144 [$C_{13}H_7FCINa_2O_2(M+H)$ requires 301.0072]; mp 255-256 °C.



General procedure B : 2-(4-fluorophenyl)pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one (46) :

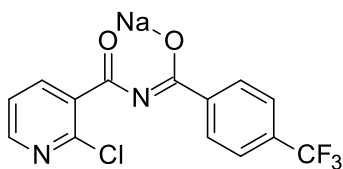
In a 10-20 mL microwave vial were placed 300 mg of sodium [(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-C-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl] oxysodium 46a (1 mmol). Then, 20 mL of anhydrous acetonitrile were added and the microwave vial was sealed. The resulting mixture was then submitted to microwave irradiations under stirring for 20 minutes at 150 °C. The reaction mixture was filtered to remove sodium salts and the filtrate was concentrated to dryness in vacuo. The resulting residue was triturated in Et_2O , filtered and dried under vacuum for 2 h at 80 °C, to yield to 183 mg (80 %) of the corresponding final compound as a pale yellow solid. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.81 (dd, $J = 4.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.49 (dd, $J = 7.6, 2.0$ Hz, 1H), 8.42 – 8.29 (m, 2H), 7.69 (dd, $J = 7.7, 4.7$ Hz, 1H), 7.55 – 7.41 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO$) δ 167.63, 166.82, 165.11, 163.41, 159.90, 154.84, 138.01, 132.55, 132.55, 124.76, 116.97, 116.74, 113.82. IR (film, cm^{-1}) 1687, 1614, 1555, 1335, 782; mass spectrum ESI+ m/z 265.0386 [$C_{13}H_7FN_2O_2Na(M+Na)$ requires 265.0486]; mp 223-224 °C.



(1Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-4-(trifluoromethyl)benzimidic acid (49b) :

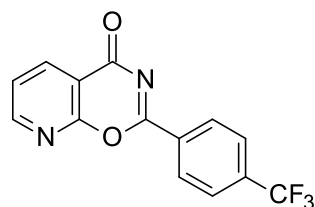
The title product has been synthesized according to general procedure A from 2-chloronicotinamide (0.5g, 3.19 mmol) and 4-trifluoromethylbenzoyl chloride (474 μ l, 3.19 mmol). The crude was purified over silica gel ($EtOAc$ /Cyclohexane 1:1) to afford the title compound as a white powder with 90 % yield (942 mg). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 12.09 (bs, 1H), 8.53 (dd, $J = 4.8, 1.9$ Hz, 1H), 8.18 – 8.04 (m, 3H), 7.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.56 (dd, $J = 7.6, 4.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO$) δ 166.70, 165.49, 150.50, 145.57, 137.83

(2C), 136.22, 132.63, 129.46 (3C), 125.54, 123.09 (2C); IR (film, cm^{-1}) 3233, 1723, 1680, 1314, 1117, 747; mass spectrum ESI+ m/z 351.0120 [$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H) requires 351.0226]; mp 159-160 °C.



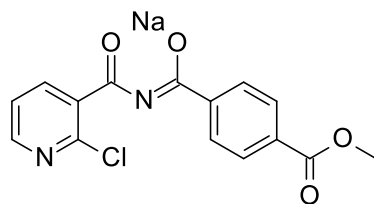
[(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-C-[4-(trifluoromethyl)phenyl]carbonimidoyl]oxy sodium (49a**) :**

In a MW vial under argon, 200mg (0.61mmol) of [(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-4-(trifluoromethyl)benzimidic acid **49b**] were solubilized in 16 ml of dry DMSO then 24mg (0.61 mmol, 1eq) of NaH (60%) were added and stirred at rt for 1h. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.32 (dd, $J = 4.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.94 (dd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.39 (dd, $J = 7.5, 4.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 174.36, 172.71, 148.29, 146.77, 143.77, 138.22 (2C), 137.95, 129.68, 129.44 (2C), 124.57, 122.67.



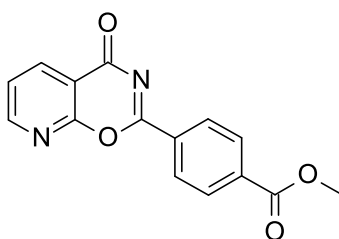
2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one (49**) :**

The title product has been synthesized according to general procedure B as a pale yellow powder with 58 % yield (270 mg) from [(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-C-[4-(trifluoromethyl)phenyl] carbonimidoyl]oxysodium (350 mg, 1.6 mmol) in 40 mL of anhydrous acetonitrile. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.83 (dd, $J = 4.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.51 (dd, $J = 7.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 7.7, 4.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.60, 162.49, 159.33, 154.58 (2C), 137.67 (2C), 133.53, 129.85 (3C), 126.11, 124.53, 113.51 ; IR (film, cm^{-1}) 1692, 1615, 1323, 1123, 783 ; mass spectrum ESI+ m/z 293.0248 [$\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H) requires 293.0459]; mp 182-183 °C.



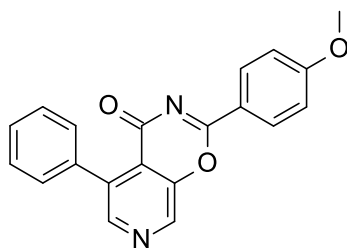
[(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-C-(4-methoxycarbonylphenyl)carbonimidoyl]oxy sodium (50a) :

The title product has been synthesized according to general procedure A as a white powder with 67 % yield (364 mg) from 2-chloronicotinamide (250 mg, 1.60 mmol) and methyl 4-(chlorocarbonyl)benzoate (318 mg, 1.60 mmol). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.30 (dd, $J = 4.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.90 (dd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 7.5, 4.7$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 174.08, 172.85, 166.18, 147.97, 146.62, 144.38, 138.31, 137.94, 130.67, 128.93 (2C), 128.53 (2C), 122.59, 52.14, 39.97; IR (film, cm^{-1}) 1722, 1615, 1410, 1282, 741; mass spectrum ESI+ m/z 341.0308 [$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{NaO}_4(\text{M}+\text{H})$ requires 341.0226]; mp 241-242 °C.



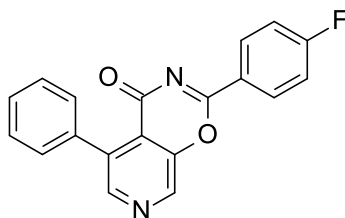
methyl 4-(4-oxopyrido[3,2-e][1,3]oxazin-2-yl)benzoate (50) :

The title product has been synthesized according to general procedure B as a pale yellow powder with 94 % yield (264 mg) from [(Z)-N-(2-chloropyridine-3-carbonyl)-C-(4-methoxycarbonylphenyl) carbonimidoyl]oxysodium 50a (340 mg, 1 mmol). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.84 (dd, $J = 4.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.52 (dd, $J = 7.8, 2.0$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.72 (dd, $J = 7.7, 4.7$ Hz, 1H), 3.92 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.71, 165.43, 162.86, 159.42, 154.57, 137.66, 134.17, 133.72, 129.79, 129.42, 124.50, 113.54, 52.62; IR (film, cm^{-1}) 1726, 1695, 1613, 1278, 1112 ; mass spectrum ESI+ m/z 282.2791 [$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}(\text{M}+\text{Na})$ requires 282.0640]; mp 234-235 °C.



General procedure C : 2-(4-methoxyphenyl)-5-phenyl-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (51) :

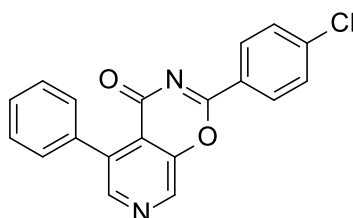
In a sealed tube, a mixture of 5-Bromo-2-(4-methoxyphenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 42 (100 mg, 0.3 mmol), phenyltributyltin (166 mg, 0.45 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (9 mg, 0.012 mmol) in toluene (3 ml) were degassed for 10 minutes and refluxed for 21h at 110 °C. Upon completion the reaction mixture was transferred in a separating funnel containing 10 ml of a saturated aqueous solution of NH₄Cl and 10 ml of ethylacetate. The two phases were decanted and separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2x10 ml). The combined organic layers were washed 3 times with 1M KF aqueous solution, followed by water (10 ml), dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified on silica gel (petroleum ether/ EtOAc : 4/6) and triturated with ether, filtered and dried under vacuum to provide the desired compound in 71 % yield (71 mg). ¹HNMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.86 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 9.2, 2H), 7.36 (m, 5H), 6.96 (d, *J* = 9.2, 2H) 3.85 (s, 3H); JMOD NMR (100MHz, CDCl₃) δ 165.1, 164.4, 162.8, 150.9, 149.0, 139.7, 135.4, 135.5, 132.0 (2C), 129.5 (2C), 128.7, 128.2 (2C), 121.1, 120.8, 114.6 (2C), 55.8; IR (film, cm⁻¹) 1691, 1602, 1568, 1546, 1510, 1469, 1431, 1330, 1305, 1257, 1234, 1199, 1199, 1225, 1122, 1080, 1031, 1010, 972, 933, 850, 767, 745, 705; mass spectrum ESI+ *m/z* 337.1147 [C₂₀H₁₄LiN₂O₃ (M+Li) require 337.1159]; mp 190-192°C.



2-(4-Fluorophenyl)-5-phenyl-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (52) :

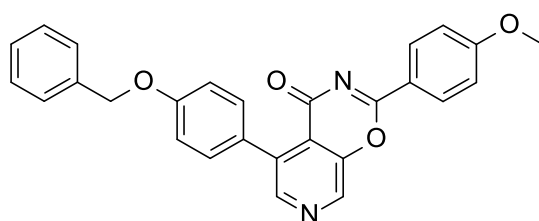
The title compound was obtained following general procedure C in 21 % yield (20 mg) as a white powder from 5-Bromo-2-(4-fluorophenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 43 (96 mg, 0.30 mmol) and tributylphenylstannane (147 μl, 0.45 mmol). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-

d_6) δ 9.15 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.44 – 8.36 (m, 2H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 7.45 (s, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.51, 164.15, 163.81, 161.28, 150.57, 147.97, 140.23, 135.67, 134.82, 132.10, 131.97, 129.35, 128.00, 127.78, 125.74, 120.37, 116.61, 116.31. mass spectrum ESI+ m/z 373.0949 [$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NaN}_2\text{FO}_3$ (M+MeOH+Na) require 373.0805] mp 183-184°C.



2-(4-Chlorophenyl)-5-phenylpyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (53) :

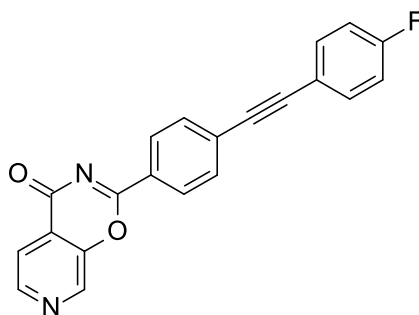
The title compound was obtained following general procedure C in 54 % yield (54 mg) as a white powder from 5-bromo-2-(4-chlorophenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **44** (100 mg, 0.30 mmol) and tributylphenylstannane (147 μL , 0.45 mmol). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.0 (bs, 1H), 8.65 (bs, 1H), 8.36 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.49 (m, 3H), 7.44 (m, 2H); JMOD ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 164.0, 162.1, 151.0, 149.3, 141.4, 139.8, 136.5, 135.3, 131.0 (2C), 129.6 (2C), 129.5 (2C), 128.8, 128.3 (2C), 127.6, 120.7; IR (film, cm^{-1}) 1687, 1587, 1545, 1487, 1466, 1403, 1330, 1244, 1129, 1008, 900, 846, 765, 739, 701, 679, 637, 523; mass spectrum ESI+ m/z 389.0650 [$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{NaO}_3$ (M+ CH_3OH +Na) require 389.0663], mp 160-162°C.



5-(4-Benzyloxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (54) :

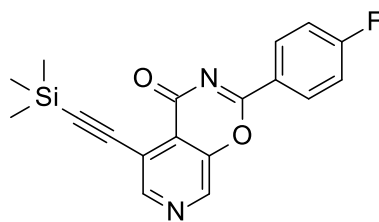
The title compound was obtained following general procedure C in 66 % yield (86 mg) as a pale yellow powder from 5-bromo-2-(4-methoxyphenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **42** (100 mg, 0.3 mmol) and (benzyloxy)phenyltributylstannane (189 μL , 0.45 mmol). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.08 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.30 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.42 (m, 5H), 7.20 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.91 (s, 3H); JMOD ^{13}C NMR

(100MHz, CDCl₃) δ 164.3, 163.9, 161.8, 158.4, 150.6, 147.8, 139.5, 137.0, 134.5, 131.3, 130.8, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 120.9, 120.2, 114.6, 114.0, 69.2, 55.7; IR (film, cm⁻¹) 2954, 2847, 1699, 1601, 1509, 1461, 1256, 1238, 1170, 1015, 854; mass spectrum ESI+ m/z 459.1328 [C₂₇H₂₀NaN₂O₄ (M+Na) require 459.1321] mp 192-193°C.



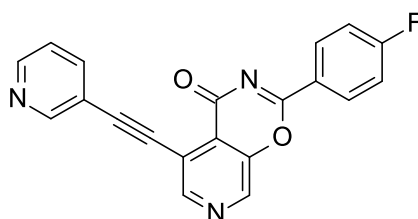
General procedure D : 2-{4-[(4-fluorophenyl)ethynyl]phenyl}-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (59**) :**

In a microwave tube, under argon, were added CuI (1.7 mg, 3 mol%), PdCl₂PPh₃ (9 mg, 4 mol%), 2-(4-bromophenyl)-4H-pyrido [4,3-e][1,3]oxazin-4-one **38** (91 mg, 0.3 mmol), toluene (1.2 mL) and NEt₃ (0.6 mL) previously degassed. The reaction mixture was degassed for 10 min and 1-ethynyl-4-fluorobenzene (54 mL, 0.45 mmol) was added. The vial was sealed and heated at 80 °C until completion of the reaction followed by ¹H NMR. The resulting mixture was filtered on celite and washed with EtOAc (3x2 mL) and CH₂Cl₂ (2 mL). The organic filtrate was washed with water (3x6 ml), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was solubilized in CH₂Cl₂, precipitated in pentane and filtered. The title compound was more specifically purified on silica gel eluting with EtOAc / PE : 60/40 to yield to 70 mg (68 %) of the corresponding final compound as a yellow powder. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.20 (s, 1H), 8.77 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.71 (m, 2H), 7.32 (m, 2H); JMOD ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 164.8 (d, J = 200 Hz, 1C), 163.6, 162.8, 161.1, 147.1, 141.1, 134.0 (d, J = 9 Hz, 2C), 131.9, 129.4, 129.2, 128.0, 123.1, 118.0, 116.1 (d, J = 23 Hz, 2C), 92.3, 88.2; IR (film, cm⁻¹) 3061, 3041, 2214, 1682, 1594, 1542, 1514, 1424, 1343, 1221, 837, 701; mass spectrum ESI+ m/z 365,0702 [C₂₁H₁₁FN₂NaO₂ (M+Na) requires 365.0683]; mp 264-265 °C.



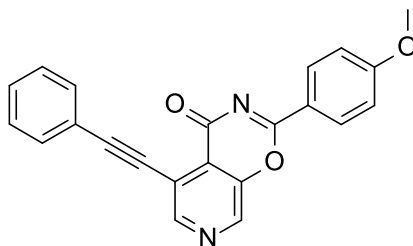
2-(4-Fluorophenyl)-5-(2-trimethylsilylethynyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (60) :

By heating the reaction mixture at 80°C for 30 min, the title compound was obtained following general procedure D in 41 % yield (43 mg) as a yellow powder from 5-bromo-2-(4-fluoro-phenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **43** (96 mg, 0.3 mmol) and trimethylsilylacetylene (63 μ L, 0.45 mmol). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.09 (bs, 1H), 8.74 (bs, 1H), 8.37 (m, 2H), 7.51(m, 2H), 0.30 (s, 9H); JMOD ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 167.5 (d, $J = 252$ Hz, 1C), 165.0, 163.3, 161.9, 151.3, 150.6, 140.8, 132.4 (d, $J = 6$ Hz, 2C), 126.1, 123.6, 116.8 (d, $J = 22$ Hz, 2C), 116.0, 104.9, 100.2; IR 3079, 3050, 2962, 2160, 1707, 1617, 1597, 1556, 1413, 1322, 1297, 1222, 1152, 844; mass spectrum ESI+ m/z 361.0770 [$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{NaO}_2\text{Si}$. $[\text{M}+\text{Na}]$ require 361.0784] mp 190-191 °C.



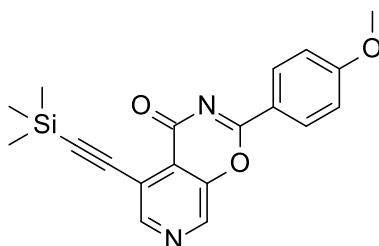
2-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-3-ylethynyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (61) :

By heating the reaction mixture at 80 °C for 30 min, the title compound was obtained following general procedure D in 70 % yield (72 mg) as a yellow powder from 5-bromo-2-(4-fluoro-phenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **43** (96 mg, 0.3 mmol) and 3-ethynylpyridine (46 mL, 0.45 mmol). ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.16 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.71 (bs, 2H), 8.42 (m, 2H), 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.53 (m, 3H); JMOD ^{13}C NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ 167.6 (d, $J = 252.3$ Hz, 1C), 164.2, 163.2, 161.7, 150.5, 140.6, 132.1 (d, $J = 9$ Hz, 2C), 125.7 (d, $J = 3$ Hz, 2C), 122.9, 116.5 (d, $J = 22$ Hz, 2C), 94.3, 87.9; IR 3053, 3018, 3003, 2953, 2845, 2609, 1614, 1573, 1548, 1479, 1433, 1413, 1365, 1332, 1292, 122, 118, 1156, 1128, 118, 1155, 1128, 1097, 1070, 999, 916, 80, 833, 742; mass spectrum ESI+ m/z 366.0661[$\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) require 366.0649]; mp 185-187 °C.



2-(4-Methoxyphenyl)-5-(phenylethynyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (62) :

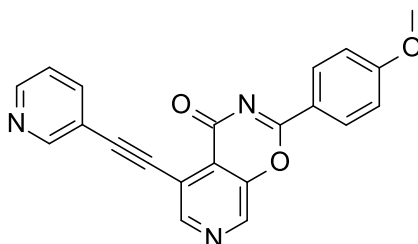
By heating the reaction mixture at 80 °C for 30 min, the title compound was obtained following general procedure D in 91% yield (100 mg) as a yellow powder from 5-Bromo-2-(4-methoxyphenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 42 (100 mg, 0.3 mmol) and phenylacetylene (49 μ l, 0.45 mmol). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.80 (s, 2H), 8.33 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.70 (m, 2H), 7.38 (m, 3H), 7.00 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H); JMOD ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 165.2, 163.8, 163.1, 151.2, 138.8, 132.5 (2C), 132.1 (2C), 129.6, 128.6 (2C), 123.2, 122.6, 121.1, 114.7 (2C), 99.9, 84.8, 77.4, 55.9; IR (film, cm^{-1}) 3371, 3099., 3007, 2972, 2897, 1693, 1598, 1568, 1548, 1510, 1492, 1469, 1440, 1427, 1338, 1301, 1246, 1188, 1174, 1145, 1120, 1101, 1068, 1053, 1018, 991, 960, 914, 852, 891, 852, 810; mass spectrum ESI+ m/z 377.0884[$\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (M+Na) require 377.0897]; mp 195-197 °C.



2-(4-methoxyphenyl)-5-((trimethylsilyl)ethynyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (63) :

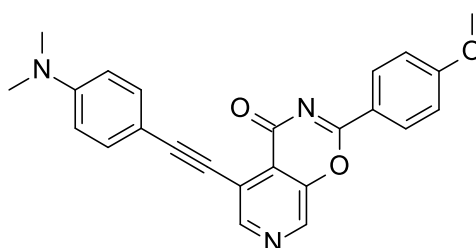
By heating the reaction mixture at 80 °C for 30 min, the title compound was obtained following general procedure D in 53% yield (56 mg) as a yellow powder from 5-bromo-2-(4-methoxyphenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one 42 (100 mg, 0.3 mmol) and trimethylsilylacetylene (63 μ l, 0.45 mmol). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.76 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.29 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 0.30 (s, 9H); JMOD ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 165.2, 163.5, 162.9, 151.7, 139.2, 132.2, 131.0 (2C), 123.7, 121.0, 114.6

(2C), 106.9, 99.0, 55.8, 0.1 (3C); IR 1697, 104, 1570, 1510, 1469, 1323, 1301, 1267, 1238, 1174, 1111, 106, 1014, 995, 866, 810, 767, 700; mass spectrum ESI+ m/z 405.1253 [$C_{19}H_{18}N_2O_3Si$ (M+Na) require 405.1241] mp 189-191 °C.



2-(4-Methoxy-phenyl)-5-pyridin-3-ylethynyl-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (64) :

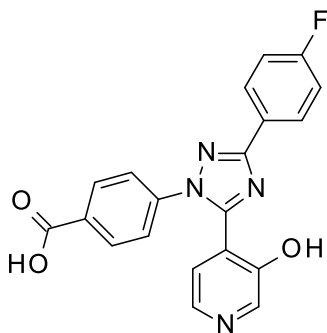
By heating the reaction mixture at 80 °C for 30 min, the title compound was obtained following general procedure D in 56% yield (50 mg) as a yellow powder from 5-bromo-2-(4-methoxyphenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **42** (83 mg, 0.25 mmol) and 3-ethynylpyridine (39 mg, 0.37 mmol). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, T = 320 K) δ 8.91 (bs, 1 H), 8.81 (bs, 2 H), 8.61 (bs, 1 H), 8.30 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 7.97 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.31 (bs, 1 H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 3.90 (s, 3 H); JMOD ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, T = 320 K) δ 165.3, 163.4, 163.1, 152.8, 151.1, 150.6, 149.6, 139.4, 139.2, 132.0 (2 C), 123.3, 123.2, 121.1 (2 C), 117.4, 114.7 (2 C), 96.0, 87.7, 55.8; IR (film, cm^{-1}) 3066 (bs), 2214, 1690, 1599, 1568, 1545, 1512, 1480, 1460, 1340, 1310, 1260, 1245, 1182, 1015, 860, 812, 750, 700; mass spectrum ESI+ m/z 378.0835 [$C_{21}H_{13}N_3O_3Na$ (M+Na) requires 378.0849]; mp 214-216 °C.



5-[2-[4-(Dimethylamino)phenyl]ethynyl]-2-(4-methoxyphenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (65) :

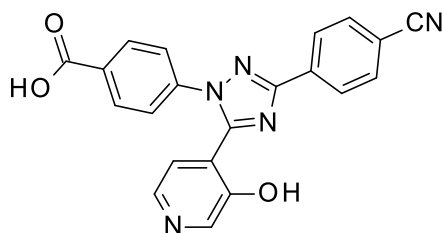
By heating the reaction mixture at 80 °C for 30 min, the title compound was obtained following general procedure D in 75 % yield (148 mg) as an orange-brown powder from 5-bromo-2-(4-methoxy-phenyl)-4H-pyrido [4,3-e][1,3]oxazin-4-one (167 mg, 0.5 mmol) and 4-ethynyl-N,N-dimethylaniline (80 mg, 0.55 mmol). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.94 (s,

1H), 8.74 (s, 1H), 8.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.00 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.26, 163.08, 162.13, 150.63, 150.27, 149.55, 138.16, 132.85 (2C), 131.21 (2C), 121.92, 120.92, 117.19, 114.53 (2C), 111.70 (2C), 107.72, 100.40, 83.80, 55.62, 39.78. IR (film, cm⁻¹) 2191, 1687, 1597, 1565, 1207; mass spectrum ESI+ *m/z* 420.1305 [C₂₄H₁₉N₃O₃ (M+Na) require 420.1420]; mp 230-231°C.



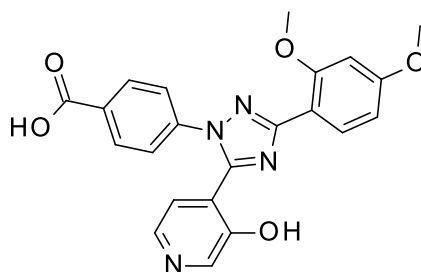
General procedure E : 4-[3-(4-Fluorophenyl)-5-(3-hydroxy-4-pyridyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (70) also named T15 :

In a vial under argon atmosphere, to a solution of 2-(4-fluorophenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (150 mg, 0.62 mmol) in EtOH (10.3 mL) were added 4-hydrazinobenzoic acid (76 mg, 0.5 mmol). The vial was sealed and the resulting mixture was stirred for 30 min at 110 °C. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was then triturated in diethyl ether and filtered to furnish 182 mg (78 %) of the desired compound as a white powder. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17 (bs, 2 H), 8.10 (m, 2 H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.48 (m, 3 H), 7.29 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H) ; J-MOD ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 166.5, 164.7, 161.5, 160.6, 151.2, 150.9, 141.2, 140.5, 139.3, 130.7, 130.4 (2C), 128.4, 128.3, 126.6, 124.6, 123.3 (2C), 122.1, 116.1, 115.8 ; IR (film, cm⁻¹) 2901, 1714, 1608, 1415, 1229, 839; mass spectrum ESI+ *m/z* 375.0906 [C₂₀H₁₃FN₄O₃ (M+H) requires 375.3406]; mp >300 °C.



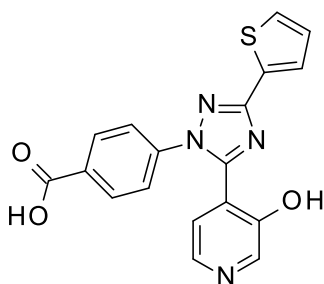
4-[3-(4-Cyanophenyl)-5-(3-hydroxy-4-pyridyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (71) also named **T17** :

The title product **71** has been synthesized according to general procedure E as a white powder in 66 % yield (50 mg) from 2-(4-cyanophenyl)-4H-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **40** (50 mg, 0.20 mmol). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.10 (bs, 1H), 10.58 (bs, 1H), 8.33 – 8.17 (m, 4H), 8.08 – 7.91 (m, 4H), 7.62 – 7.50 (m, 3H) ; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.43, 159.98, 151.62, 150.92, 141.01, 140.55, 139.07, 134.21, 133.06 (2C), 130.89, 130.45 (2C), 126.75 (2C), 124.64, 123.37 (2C), 121.85, 118.61, 112.18 ; IR (film, cm^{-1}) 2477, 2234, 1693, 1477, 1282 ; mass spectrum ESI+ m/z 384.1100 [$\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$ (M-H) requires 384.1018]; mp >300 °C.



4-[3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-5-(3-hydroxy-4-pyridyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (72) :

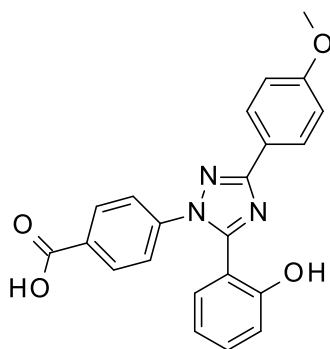
The title product **72** has been synthesized according to general procedure E as a white powder in 71 % yield (103 mg) from 2-(2,4-dimethoxyphenyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **39** (100 mg, 0.35 mmol). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.24 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.53, 161.69, 159.95, 158.60, 150.98, 149.76, 141.35, 140.45, 139.07, 131.41, 130.58, 130.38, 124.30, 123.32, 122.06, 111.89, 105.33, 99.12, 55.80, 55.38; IR (film, cm^{-1}) 1689, 1608, 1572, 1291, 1160; mass spectrum ESI+ m/z 419.1340 [$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$ (M+H) requires 419,1277]; mp >300 °C.



4-[5-(3-Hydroxy-4-pyridyl)-3-(2-thienyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (73) also named T10

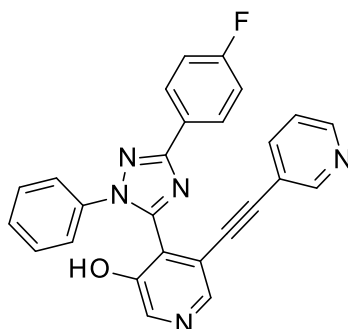
:

The title product 73 has been synthesized according to general procedure E, then triturated with DCM, as a brown powder in 95 % yield (113 mg) from 2-(2-thienyl)pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one (78 mg, 0.34 mmol). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.10 (bs, 1H), 10.47 (bs, 1H), 8.22 (bs, 2H), 8.00 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.53 (m, 3H), 7.22 (dd, J = 5.0, 3.6 Hz, 1H); J-MOD ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.40, 157.77, 150.96, 140.93, 140.53, 138.97, 132.52, 130.60, 130.40 (2C), 129.25, 128.23, 128.07, 126.88, 124.61, 123.27 (2C), 121.88; IR (film, cm⁻¹) 3075, 1696, 1233, 775; mass spectrum ESI+ *m/z* 363.0554 [C₁₈H₁₂N₄O₃S (M+H) requires 363.0624]; mp 281-282 °C.



4-[5-(2-Hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (74) also named T03 :

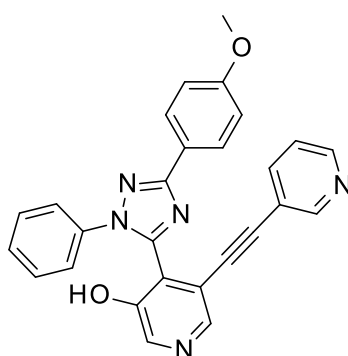
The title product 74 has been synthesized according to general procedure E as a light brown powder in 77 % yield (106 mg) from 2-(4-methoxyphenyl)-1,3-benzoxazin-4-one (90 mg, 0.36 mmol). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.06 (m, 2H), 7.97 (m, 2H), 7.46 (m, 3H), 7.35 (ddd, J = 8.3, 7.4, 1.8 Hz, 1H), 7.08 (m, 2H), 6.91 (m, 2H), 4.37 (bs, 2H), 3.82 (s, 3H); J-MOD ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.52, 160.75, 160.39, 155.38, 153.04, 141.14, 132.02, 130.82, 130.18 (2C), 127.59 (2C), 122.95, 122.83 (2C), 119.24, 116.15, 115.56, 114.30 (2C), 55.26; IR (film, cm⁻¹) 2934, 1692, 1609, 1488, 1252; ESI+ *m/z* 386.1158 [C₂₃H₁₇N₃O₄ (M-H) requires 386.1213]; mp 292-293 °C.



4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-phenyl-1,2,4-triazol-3-yl]-5-[2-(3-pyridyl)ethynyl]pyridin-3-ol (75)

also named **T12** :

In a MW vial under argon atmosphere, to a solution of 2-(4-fluoro-phenyl)-5-pyridin-3-ylethynyl-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **61** (200 mg, 0.58 mmol) in EtOH (14.5 mL) were added phenylhydrazine (63 μ l, 0.40 mmol) and acetic acid (5 μ l, 0.087 mmol). The vial was sealed and the resulting mixture was stirred for 30 min at 110 °C. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was purified over column chromatography to furnish 75 mg (58 %) of the desired compound as a brown powder. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.09 (bs, 1H), 8.32 (bs, 4H), 8.18 (m, 2H), 7.69 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (m, 8H); J-MOD ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 164.6, 161.36, 160.7, 151.05, 149.3, 148.9, 142.5, 139.1, 138.5, 136.9, 129.5 (2C), 128.9, 128.3, 128.2, 126.7, 126.6, 124.5, 123 (2C), 116.1, 115.8, 92.3, 86.8; IR (film, cm^{-1}) 1604, 1525, 1207, 1107, 1062; mass spectrum ESI+ m/z 432.1254 [$\text{C}_{26}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{O}_1$ (M+H) requires 432.1333]; mp 108-110 °C.

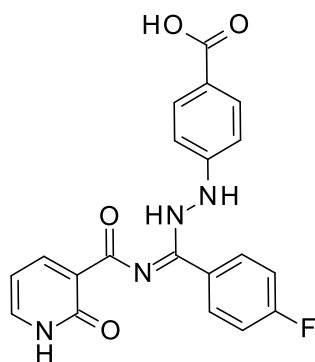


4-[5-(4-Methoxyphenyl)-2-phenyl-1,2,4-triazol-3-yl]-5-[2-(3-pyridyl)ethynyl]pyridin-3-ol

(76) also named **T13** :

In a MW vial under argon atmosphere, to a solution of 2-(4-methoxy-phenyl)-5-pyridin-3-ylethynyl-pyrido[4,3-e][1,3]oxazin-4-one **64** (130 mg, 0.37 mmol) in EtOH (9.25 mL) were

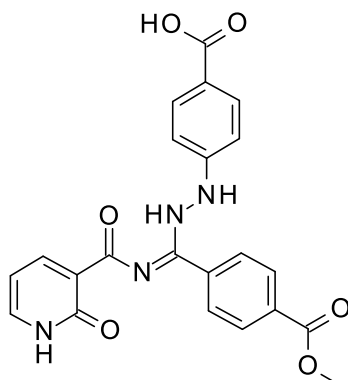
added phenylhydrazine (40 μ L, 0.40 mmol). The vial was sealed and the resulting mixture was stirred for 30 min at 110 $^{\circ}$ C. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was purified over column chromatography to furnish 75 mg (60 %) of the desired compound as a brown powder. 1 H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.01 (bs, 1H), 8.53 (bs, 1H), 8.36 (bs, 3H), 8.07 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (m, 6 H), 7.08 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H); J-MOD 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 161.4, 160.4, 151.3, 149.6, 148.6, 142.5, 139.1, 138.2, 137.1, 129.4 (2 C), 128.7, 127.5 (2 C), 124.8, 122.9 (2 C), 122.7, 114.3 (2 C), 92.3, 86.7, 55.2; IR (film, cm^{-1}) 3029, 2926, 2836, 2603, 2360, 2049, 1613, 1498, 1414, 1248, 760; mass spectrum ESI+ m/z 446.1596 [$\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2$ (M+1) requires 446.1539]; mp 105-107 $^{\circ}$ C.



4-[2-[(Z)-C-(4-fluorophenyl)-N-(2-oxo-1H-pyridine-3-carbonyl)carbonimidoyl]hydrazino]benzoic acid (77**) :**

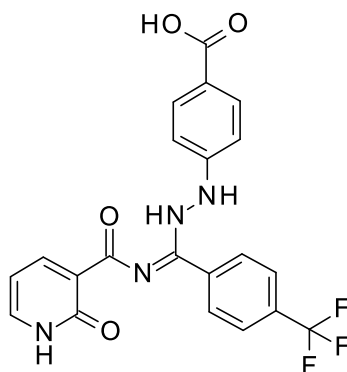
In a vial under argon atmosphere, to a solution of 2-(4-fluorophenyl)pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one **46** (27 mg, 0.11 mmol) in EtOH (2.2 mL) were added 4-hydrazinobenzoic acid (19 mg, 0.12 mmol). The vial was sealed and the resulting mixture was stirred for 30 min at 110 $^{\circ}$ C. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was then triturated in diethyl ether and filtered to furnish 19 mg (50%) of the desired compound as a yellow powder. 1 H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.70 (bs, 1H), 11.80 (bs, 1H), 9.97 (bs, 1H), 8.42 (dd, J = 7.2, 2.1 Hz, 1H), 7.88 (dd, J = 6.3, 2.2 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.77 (dd, J = 8.7, 5.6 Hz, 2H), 7.33 – 7.18 (m, 4H), 6.60 (t, J = 6.7 Hz, 1H); 13 C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.29, 164.08, 162.82, 162.25, 160.82, 148.76, 144.77, 140.54, 132.81, 131.21, 131.17, 130.96, 127.77, 127.66, 120.97, 119.92, 115.58, 115.30, 112.19, 106.84; IR (film, cm^{-1}) 2832,

1678, 1660, 1599, 1157, 739; mass spectrum ESI+ m/z 417.0970 [$C_{20}H_{15}FN_4O_4Na(M+Na)$ 417.0966]; mp >300 °C.



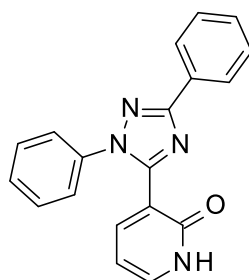
4-[2-[(Z)-C-(4-methoxycarbonylphenyl)-N-(2-oxo-1H-pyridine-3-carbonyl)carbonimidoyl]hydrazino]benzoic acid (78**) :**

In a vial under argon atmosphere, to a solution of methyl 4-(4-oxopyrido[3,2-e][1,3]oxazin-2-yl)benzoate **50** (140 mg, 0.50 mmol) in EtOH (10 mL) were added 4-hydrazinobenzoic acid (77 mg, 0.55 mmol). The vial was sealed and the resulting mixture was stirred for 30 min at 110 °C. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was then triturated in diethyl ether and filtered to furnish 138 mg (66%) of the desired compound as a yellow powder. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.84 (bs, 1H), 11.77 (bs, 1H), 10.20 (bs, 1H), 8.40 (dd, $J = 7.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.87 (dd, $J = 10.6, 8.6$ Hz, 6H), 7.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.60 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.24, 165.96, 162.74, 162.38, 148.39, 144.75, 140.56, 139.20, 132.46, 130.98, 129.42, 129.09, 125.58, 121.50, 119.97, 112.54, 106.80, 52.17; IR (film, cm^{-1}) 2980, 1737, 1678, 1511, 1268, 1167; mass spectrum ESI+ m/z 435.1298 [$C_{22}H_{18}N_4O_6(M+H)$ requires 435.1226]; mp >300 °C.



4-[2-[(Z)-N-(2-oxo-1H-pyridine-3-carbonyl)-C-[4-(trifluoromethyl)phenyl]carbonimidoyl]hydrazino]benzoic acid (79**) :**

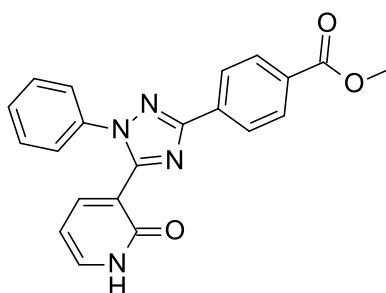
In a vial under argon atmosphere, to a solution of 2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one **49** (46 mg, 0.16 mmol) in EtOH (3.2 mL) were added 4-hydrazinobenzoic acid (27 mg, 0.17 mmol). The vial was sealed and the resulting mixture was stirred for 30 min at 110 °C. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was then triturated in diethyl ether and filtered to furnish 51 mg (75 %) of the desired compound as a yellow powder. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.69 (bs, 1H), 11.79 (bs, 1H), 10.21 (bs, 1H), 8.40 (dd, *J* = 7.2, 2.2 Hz, 1H), 7.96 – 7.80 (m, 5H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.37 – 7.25 (m, 2H), 6.60 (dd, *J* = 7.2, 6.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.21, 162.77, 162.35, 148.41, 144.79 (2C), 140.51, 138.68, 132.30, 130.97 (2C), 128.54, 128.22, 126.08 (2C), 125.38, 121.47, 119.96, 112.50 (2C), 106.80; IR (film, cm⁻¹) 3084, 2832, 1677, 1255, 1163, 789; mass spectrum ESI+ *m/z* 467.0930 [C₂₁H₁₅F₃N₄O₄Na(M+Na) requires 467.0940]; mp >300 °C.



General procedure F : 3-(2,5-diphenyl-1,2,4-triazol-3-yl)-1H-pyridin-2-one (80**) :**

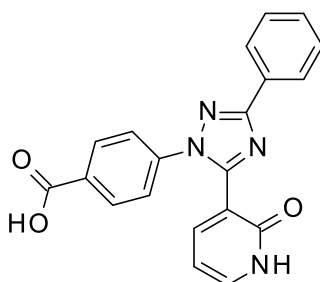
In a vial under argon atmosphere, to a solution of 2-phenylpyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one **45** (176 mg, 0.79 mmol) in EtOH (13.3 ml) were added of phenylhydrazine (87 μl, 0.86 mmol) and acetic acid (1.3 ml, 15.8 mmol). The reaction was heated at 110 °C for 40 min then

concentrated and the resulting solid was triturated with diethyl ether then filtered to recover 191 mg of a white powder in 77 % yield. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.96 (bs, 1H), 8.15 – 8.03 (m, 2H), 7.91 (dd, $J = 6.9, 2.2$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 6.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.56 – 7.37 (m, 8H), 6.35 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.67, 159.46, 151.80, 143.67, 138.42, 138.23, 130.50, 129.40, 129.02 (2C), 128.80 (2C), 128.20, 125.88 (2C), 123.30 (2C), 119.89, 104.82; IR (film, cm^{-1}) 3002, 1646, 1492 ; mass spectrum ESI+ m/z 337.1067 [$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{ONa}(\text{M}+\text{Na})$ 337.1167]; mp 282 °C-283 °C.



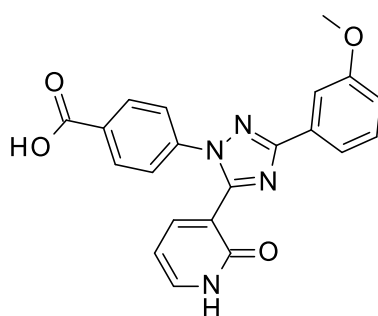
Methyl 4-[5-(2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-1-phenyl-1,2,4-triazol-3-yl]benzoate (81**) :**

The title product **81** has been synthesized according to general procedure F as a white powder in 59 % yield (61 mg) from methyl 4-(4-oxopyrido[3,2-e][1,3]oxazin-2-yl)benzoate **50** (79 mg, 0.28 mmol) and phenylhydrazine (31 μl , 0.30 mmol). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.82 (bs, 1H), 8.26 – 8.21 (m, 2H), 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.86 (dd, $J = 6.9, 2.1$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 6.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.54 – 7.39 (m, 5H), 6.33 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.09, 165.54, 159.54, 159.06, 152.00, 143.13, 138.11, 137.86, 134.55, 129.99, 129.26 (2C), 128.55 (2C), 127.95, 125.72 (2C), 123.12 (2C), 119.46, 104.28, 51.60; IR (film, cm^{-1}) 2925, 1705, 1649, 1277; mass spectrum ESI+ m/z 373.1222 [$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ requires 373.1222; mp >300 °C.



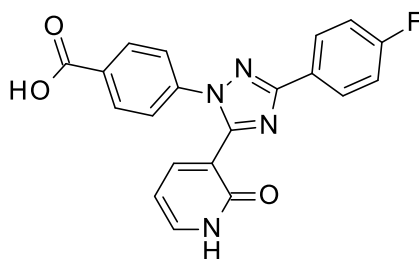
4-[5-(2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-3-phenyl-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (82**):**

The title product **82** has been synthesized according to general procedure F as a white powder in 48 % yield (50 mg) from 2-phenylpyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one **45** (64 mg, 0.29 mmol). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.04 (bs, 1H), 12.10 (bs, 1H), 8.11 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 8.08 – 7.96 (m, 3H), 7.62 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 7.57 – 7.43 (m, 3H), 6.40 (t, J = 6.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.52, 161.04, 159.27, 152.08, 143.93, 141.74, 138.77, 130.27 (2C), 130.15, 129.63, 128.88 (2C), 126.02 (2C), 122.81 (2C), 119.53, 105.07; IR (film, cm^{-1}) 2870, 1705, 1647, 1215, 771; mass spectrum ESI+ m/z 381.1078 [$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ (M+Na) requires 381.1065]; mp >300 °C.



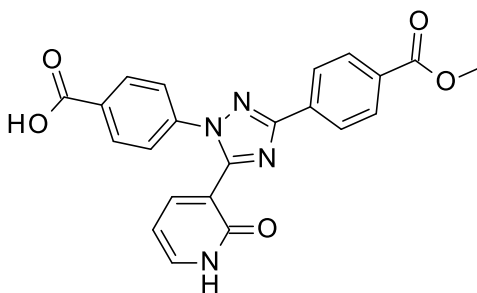
4-[3-(3-Methoxyphenyl)-5-(2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (83**) :**

The title product **83** has been synthesized according to general procedure F as a white powder in 57 % yield (86 mg) from 2-(3-methoxyphenyl)pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one (100 mg, 0.39 mmol). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.12 (bs, 1H), 12.20 (bs, 1H), 8.07 – 7.94 (m, 3H), 7.75 – 7.56 (m, 5H), 7.43 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.05 (dd, J = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 6.40 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.55, 160.92, 159.59, 159.29, 152.12, 144.00, 141.65, 138.87, 131.64, 130.38, 130.30 (2C), 130.13, 122.87, 122.87 (2C), 119.47, 118.42, 115.64, 110.88, 105.06, 55.23; IR (film, cm^{-1}) 2980, 1680, 1318, 770; mass spectrum ESI+ m/z 411.1070 [$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$ (M-H) requires 411,1171]; mp >300 °C.



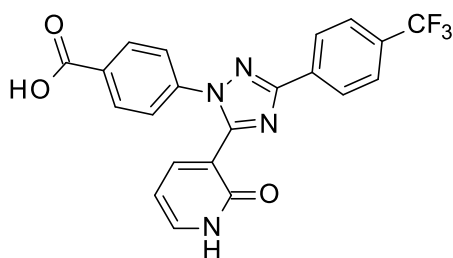
4-[3-(4-Fluorophenyl)-5-(2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (84**) :**

In a sealed tube, to a solution of 4-[2-[(Z)-C-(4-fluorophenyl)-N-(2-oxo-1H-pyridine-3-carbonyl)carbonimidoyl]hydrazino]benzoic acid **77** (20 mg, 0.048 mmol) in EtOH (2 ml) were added acetic acid (0.2 ml) and heated for 30 min at 110 °C. The resulting residue was concentrated, washed in diethyl ether and filtered to furnish 19 mg (100 %) of the desired compound as a yellow powder. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.10 (bs, 1H), 12.05 (bs, 1H), 8.19 – 8.08 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H), 7.67 – 7.55 (m, 3H), 7.35 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.95, 165.05, 161.78, 160.70, 159.69, 152.63, 144.41, 142.11, 139.29, 130.71, 128.77, 128.66, 127.30, 123.28, 119.86, 116.52, 116.23, 105.50. IR (film, cm⁻¹) 2925, 1705, 1649, 1609, 1219, 772; mass spectrum ESI+ *m/z* 377.1044 [C₂₀H₁₃FN₄O₃(M+H) requires 377.0971]; mp >300 °C.



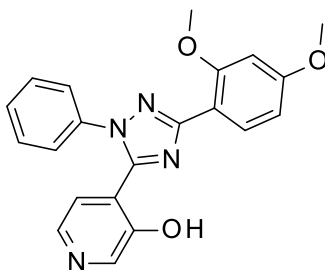
4-[3-(4-Methoxycarbonylphenyl)-5-(2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (85**) :**

In a sealed tube, to a solution of 4-[2-[(Z)-C-(4-methoxycarbonylphenyl)-N-(2-oxo-1H-pyridine-3-carbonyl)carbonimidoyl]hydrazino] benzoic acid **78** (138 mg, 0.33 mmol) in EtOH (6.6 ml) were added acetic acid (0.6 ml) and heated for 30 min at 110 °C. The resulting residue was concentrated, washed in diethyl ether and filtered to furnish 135 mg (100 %) of the desired compound as a yellow powder. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.02 (bs, 1H), 12.18 (bs, 1H), 8.24 (m, 2H), 8.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.01 (dd, *J* = 7.7, 2.5 Hz, 3H), 7.63 (t, *J* = 8.1 Hz, 3H), 6.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.47, 165.87, 160.11, 159.19, 152.49, 144.06, 141.61, 138.98, 134.49, 130.37, 130.29 (3C), 126.21 (2C), 122.88 (3C), 119.23, 105.06, 52.26; IR (film, cm⁻¹) 2819, 1735, 1665, 1253; mass spectrum ESI+ *m/z* 417.1193 [C₂₂H₁₆N₄O₅(M+H) requires 417.1121]; mp >300 °C.



4-[5-(2-Oxo-1H-pyridin-3-yl)-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-triazol-1-yl]benzoic acid (86**) :**

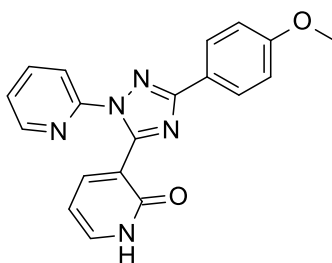
In a sealed tube, to a solution of 4-[2-[(Z)-N-(2-oxo-1H-pyridine-3-carbonyl)-C-[4-(trifluoromethyl)phenyl]carbonimidoyl]hydrazino] benzoic acid **79** (51 mg, 0.14 mmol) in EtOH (3 ml) were added acetic acid (0.3 ml) and heated for 30 min at 110 °C. The resulting residue was concentrated, washed in diethyl ether and filtered to furnish 49 mg (100 %) of the desired compound as a yellow powder. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.14 (bs, 1H), 12.03 (bs, 1H), 8.31 (m, 2H), 8.10 – 7.98 (m, 3H), 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H), 6.41 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.49, 159.80, 159.21, 152.54, 144.11, 141.59, 138.98, 134.06, 130.41, 130.29 (3C), 126.67 (2C), 125.91, 122.93 (3C), 119.19, 105.08; IR (film, cm⁻¹) 3010, 1703, 1649, 1324, 1118; mass spectrum ESI+ *m/z* 427.1012 [C₂₁H₁₃F₃N₄O₃(M+H) requires 427.0939]; mp >300 °C.



4-[5-(2,4-Dimethoxyphenyl)-2-phenyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl]-pyridin-3-ol (111**) :**

In a sealed tube, 2-(2,4-dimethoxyphenyl)-4H-pyrido[4,3-*e*][1,3]oxazin-4-one **39** (137 mg, 0.48 mmol) was dissolved in dry ethanol (10 mL). After addition of phenylhydrazine (47 μL, 52 mg, 0.48 mmol) and triethylamine (71 μL, 53 mg, 0.53 mmol), the reaction was heated at 110 °C for 1 h. After the reaction mixture has cooled down to room temperature, 10 mL of water have been added and the ethanol has been evaporated. The product has been extracted three times with DCM (15 mL). The organic phases were combined and dried over

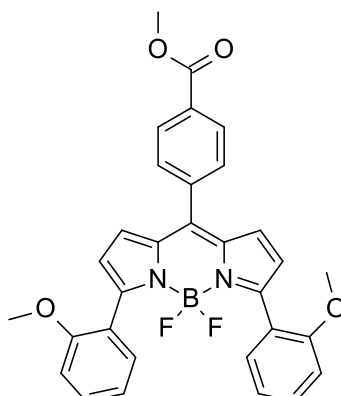
MgSO₄. After evaporation of the DCM, the resulting orange powder has been triturated with a mixture EtOAc /cyclohexane (1/10) to afford the pure product as an orange powder (130 mg, 0.35 mmol, 72 % yield). Crystals suitable for X-Ray diffraction were grown by slow evaporation of a saturated solution in dichloromethane. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 12.55 (bs s, 1 H, OH), 8.56 (bs, 1 H), 7.95 (m, 2 H, 2H), 7.50-7.64 (m, 5 H), 6.73 (bs, 1 H), 6.59-6.63 (m, 2 H), 3.95 (s, 3 H), 3.88 (s, 3H); ¹³C Jmod NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.6, 159.3, 158.4, 149.8, 141.7, 139.1, 138.2, 131.4, 130.7, 130.2, 126.8, 119.1, 116.9, 105.2, 99.4, 56.1, 55.6; IR (film, cm⁻¹) 2937. mass spectrum ESI+ *m/z* 397.1262 [C₂₁H₁₈N₄O₃Na] (M+Na) requires 397,1271]. mp >300 °C.



3-(3-(4-Methoxyphenyl)-1-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)pyridin-2(1H)-one (**112**) :

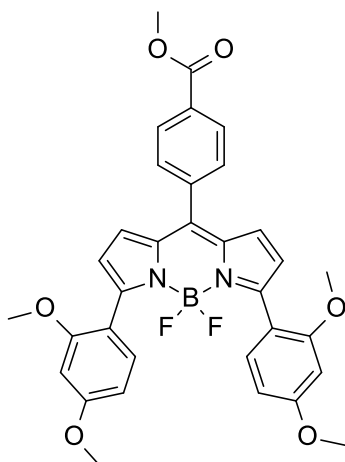
In a sealed tube, 2-(4-methoxyphenyl)-4H-pyrido[3,2-e][1,3]oxazin-4-one **39** (80 mg, 0.31 mmol) was dissolved in dry ethanol (8 mL). After addition of 2-hydrzinopyridine (34 mg, 0.31 mmol) and triethylamine (48 μL, 35 mg, 0.35 mmol), the reaction was heated at 110 °C for 1 h. After the reaction mixture has cooled down to room temperature, the ethanol has been evaporated and 10 mL of water have been added. The product has been extracted three times with DCM (15 mL). The organic phases were combined and dried over MgSO₄. After evaporation of the DCM and trituration with cyclohexane, the pure product was obtained as a white powder (83 mg, 0.24 mmol, 77 % yield). Crystals suitable for X-Ray diffraction were grown by slow evaporation of a saturated solution of DCM/cyclohexane. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.17-8.23 (m, 3 H), 8.08 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.85-7.94 (m, 2H), 7.23 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 6.41 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H); ¹³C Jmod NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.5, 161.4, 160.3, 151.4, 150.4, 147.9, 138.7, 139.8 (2C), 137.2, 128.7 (2C), 123.4, 121.6, 120.5, 116.9 (2C), 114.3(2C), 107.1, 55.5. mass spectrum ESI+ *m/z* 368.1120 [C₁₉H₁₅N₅O₂Na](M+Na) requires 368.1118].

Experimental section : Chapter III



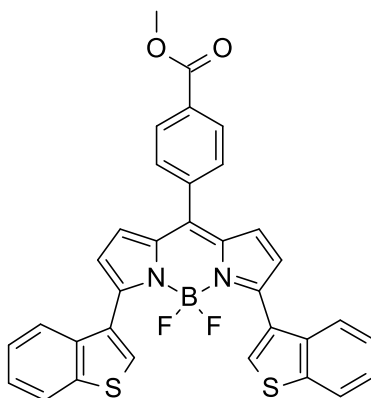
General procedure G : BODIPY 149 :

In a sealed tube under argon, 50 mg (0.127 mmol, 1 eq) of 147, 4.7 mg (3% mol) of Pd(PPh₃)₄ and 12.7 ml of dry toluene were charged, followed by 2.54 ml of an aqueous solution of Na₂CO₃ 1M. Then 199 mg (1.27 mmol, 10 eq) of 2-methoxybenzeneboronic acid were added by small amount and the reaction was heated at reflux for 30 min. The organic layer was recovered and the aqueous layer was extracted by DCM (3*30 ml). The combine organic layers were washed with water then brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product has been recrystallized in MeOH to afford 28 mg of a dark blue solid in 41 % yield. ¹H NMR 357 K (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.79 – 7.65 (m, 4H), 7.40 – 7.28 (m, 2H), 7.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.78 (s, 6H); ¹³C NMR 353 K (101 MHz, DMSO) δ 165.36, 157.14 (2C), 155.31, 141.48, 137.57 (2C), 134.09 (2C), 130.94 (2C), 130.65 (2C), 130.40 (2C), 130.29 (2C), 129.27 (2C), 128.69 (2C), 122.29, 121.15, 119.37 (2C), 111.39 (2C), 55.45 (2C), 51.82; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -132.56 (dd, *J* = 61.8, 31.3 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 2926, 1722, 1548, 1272, 1121, 1071; mass spectrum ESI+ *m/z* 561.1870 [C₃₁H₂₅BF₂N₂O₄Na(M+Na) requires 561.1870]; mp 121-123 °C.



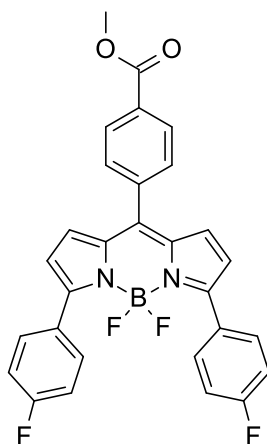
BODIPY 150 :

The title product **150** was synthesized according to general procedure G, then purified over silica gel (eluent DCM/Cyclohexane 7/3) to afford a dark blue solid (43 mg) in 58 % yield from 2,4-dimethoxybenzeneboronic acid (120 mg, 0.64 mmol). ^1H NMR (300 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ 8.18 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 6.62 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 6.59 – 6.51 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 3.78 (s, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 166.64, 162.05 (2C), 159.04 (2C), 155.70, 140.41, 139.37 (2C), 135.16 (2C), 133.01 (2C), 131.38 (2C), 130.66 (2C), 129.45 (2C), 129.01 (2C), 122.85, 114.82 (2C), 104.54 (2C), 98.86 (2C), 55.88 (2C), 55.48 (2C), 52.53; ^{19}F NMR (282 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ -134.14 (dd, J = 62.8, 31.7 Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 2930, 1722, 1572, 1466, 1253, 1129; mass spectrum ESI+ m/z 621.2005 [$\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}(\text{M}+\text{Na})$ requires 621.2087]; mp 212-213 °C.



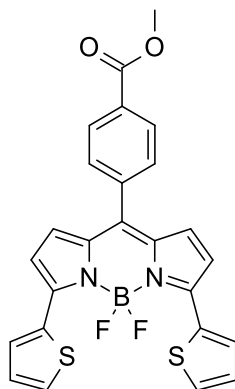
BODIPY 151 :

The title product **151** was synthesized according to general procedure G, then purified over silica gel (eluent DCM/Cyclohexane 7/3) to afford a dark blue solid (33 mg) in 44 % yield from 1-benzothien-3-ylboronic acid (113 mg, 0.63 mmol). ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.34 (s, 2H), 8.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.94 – 7.84 (m, 4H), 7.73 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.47 – 7.30 (m, 4H), 6.95 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 4.02 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 166.50, 152.51, 141.59, 140.10 (2C), 138.82 (2C), 138.33 (2C), 135.84, 131.87 (2C), 131.42, 131.30, 131.19, 130.71 (2C), 130.47 (2C), 129.69 (2C), 127.41 (2C), 124.82 (2C), 124.76 (2C), 123.13 (2C), 123.05 (2C), 121.40, 52.65; ^{19}F NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) δ -133.36 (dd, $J = 62.8, 31.4$ Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 2922, 1720, 1569, 1531, 1148; mass spectrum ESI+ m/z 613.0385 [$\text{C}_{33}\text{H}_{21}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}(\text{M}+\text{Na})$ requires 613,1105]; mp 272-273 °C.



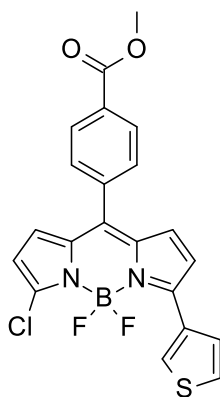
BODIPY 152 :

The title product **152** was synthesized according to general procedure G, then purified over silica gel (eluent DCM/Cyclohexane 7/3) to afford a purple solid (33 mg) in 51 % yield from 4-fluorobenzeneboronic acid (76 mg, 0.54 mmol). ^1H NMR (300 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ 8.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.92 – 7.80 (m, 4H), 7.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.22 – 7.09 (m, 4H), 6.90 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2) δ 166.78, 165.85, 162.54, 158.70 (2C), 143.56, 138.91 (2C), 136.70 (2C), 132.52 (2C), 132.17 (2C), 131.49 (2C), 131.26 (2C), 129.95 (2C), 129.30, 129.26, 121.75, 121.72, 115.98 (2C), 115.69 (2C), 52.91; ^{19}F NMR (282 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ -108.67 – -113.66 (m, 2F), -132.42 (dd, $J = 64.2, 32.1$ Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 1706, 1601, 1545, 1164, 1070; mass spectrum ESI+ m/z 537.1369 [$\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{BF}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}(\text{M}+\text{Na})$ requires 537.1475]; mp 211-212 °C.



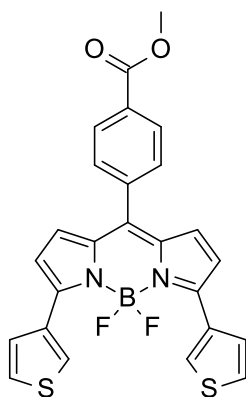
BODIPY 155 :

In a sealed tube under argon, 90 mg (0.23 mmol, 1 eq) of **147**, 8.1 mg (0.0069 mmol, 3 mol%) of Pd(PPh₃)₄ and 23 ml of dry toluene were charged. Then 753 μl (2.3 mmol, 10 eq) of 2-(tributyltin)thiophene were added and the reaction was heated at reflux for 5 h. The reaction was cooled to rt and 10 ml of H₂O (10 % KF) were added. The organic layer was recovered and the aqueous layer was extracted with DCM (3*30 ml). The combine organic layers were washed with water then brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product has been recrystallized in MeOH to afford 35 mg of a dark blue solid. Yield 66 %. ¹H NMR 353 K (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.09 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 2H), 7.88 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H); ¹³C NMR 353 K (151 MHz, DMSO) δ 165.39, 149.72 (2 C), 138.82 (2 C), 137.56 (2 C), 135.47 (2 C), 132.97 (2 C), 131.17 (2 C), 131.03 (2 C), 130.39 (2 C), 129.88, 128.77 (2 C), 128.46 (2 C), 120.87, 51.90; ¹⁹F NMR (282 MHz, Methylene Chloride-*d*₂) δ -139.56 (dd, *J* = 65.8, 32.8 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 1709, 1544, 1269, 1131, 1033; mass spectrum ESI+ *m/z* 513.0686 [C₂₅H₁₇BF₂N₂O₂S₂Na(M+Na) requires 513.0787]; mp >300 °C.



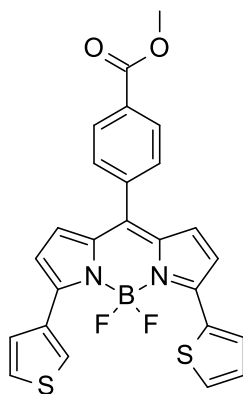
BODIPY 158 :

In a sealed tube under argon, 50 mg (0.127 mmol, 1 eq) of **147**, 4.4 mg (0.0038 mmol, 3 mol%) of Pd(PPh₃)₄ and 10 ml of dry toluene were charged. Then 2.54 ml (1.27 mmol, 10 eq) of 3-(tributyltin)thiophene (0.5 M in toluene) were added and the reaction was heated at reflux for 15 h. The reaction was cooled to rt and 10 ml of H₂O (10 % KF) were added. The organic layer was recovered and the aqueous layer was extracted with DCM (3*30 ml). The combine organic layers were washed with water then brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product has been purified over silica gel (eluent: DCM/Cylohexane 9/1) to afford 10 mg of a dark blue solid. Yield 18 %. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.44 (dd, *J* = 3.0, 1.3 Hz, 1H), 8.22 – 8.09 (m, 2H), 7.70 (dd, *J* = 5.1, 1.3 Hz, 1H), 7.65 – 7.54 (m, 2H), 7.41 (dd, *J* = 5.1, 2.9 Hz, 1H), 6.90 – 6.79 (m, 2H), 6.74 – 6.64 (m, 1H), 6.40 (dd, *J* = 4.3, 1.2 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.39, 155.59, 137.93, 132.56 (2C), 132.00, 130.60 (2C), 128.94 (2C), 128.65 (2C), 126.04, 122.03, 117.98, 77.58, 77.16, 76.74, 52.66. ¹⁹F NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) δ -143.15 (dd, *J* = 61.2, 30.5 Hz). IR (film, cm⁻¹) 2922, 1722, 1572, 1546, 1084 ; mass spectrum ESI+ *m/z* 465.0432 [C₂₁H₁₄BClF₂N₂O₂SNa (M+Na) requires 465.0526].



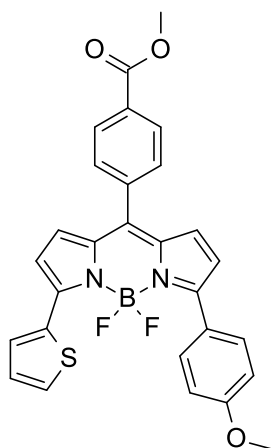
BODIPY 159 :

In a sealed tube under argon, 50 mg (0.127 mmol, 1 eq) of **147**, 4.4 mg (0.0038 mmol, 3 mol%) of Pd(PPh₃)₄, 53.8 mg (1.27 mmol, 10 eq) of LiCl and 10 ml of dry toluene were charged. Then 1.27ml (0.633 mmol, 5 eq) of 3-(tributyltin)thiophene (0.5 M in toluene) were added and the reaction was heated at reflux for 1 h. The reaction was cooled to rt and 10 ml of H₂O (10 % KF) were added. The organic layer was recovered and the aqueous layer was extracted with DCM (3*30 ml). The combine organic layers were washed with water then brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product has been purified over silica gel (eluent: DCM/Cylohexane 9/1) to afford 32 mg of a dark blue solid. Yield 59 %. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.48 (dd, *J* = 2.9, 1.3 Hz, 2H), 8.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.85 (dd, *J* = 5.2, 1.3 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.72 (dd, *J* = 5.1, 2.9 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H); ¹³C NMR 353 K (101 MHz, DMSO) δ 165.75, 151.92 (2 C), 139.98 (2 C), 138.01 (2 C), 135.30 (2 C), 132.07 (2 C), 130.97 (2 C), 130.90 (2 C), 130.51 (2 C), 129.45, 129.17, 128.87 (2 C), 126.70 (2 C), 121.50, 52.46; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -136.31 (dd, *J* = 67.2, 33.4 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 1713, 1525, 1273, 1138, 1058; mass spectrum ESI+ *m/z* 513.0687 [C₂₅H₁₇BF₂N₂O₂S₂Na(M+Na) requires 513.0792]; m.p. > 300 °C.



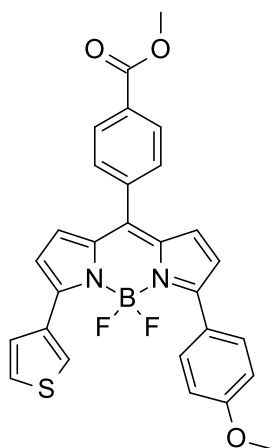
BODIPY 160 :

In a sealed tube under argon, 75 mg (0.19 mmol) of **147**, 6.6 mg (0.0057 mmol, 3 mol%) of Pd(PPh₃)₄, and 10 ml of dry toluene. Then 380 μl (0.19 mmol, 1 eq) of 3-(tributyltin)thiophene (0.5 M in toluene) and 80 mg (1.9 mmol, 10 eq) of LiCl were added to the mixture. The reaction was degassed for 10 min with argon. The reaction was heated at reflux, monitored by TLC (eluent DCM). After disappearance of SM, 73 mg (0.19 mmol, 1 eq) of 2-(tributyltin)thiophene was added to the mixture and the reaction was heated at reflux overnight. The mixture was treated with 15 ml of KF (10 % in water) then extracted with 3*35 ml of DCM, washed with brine, dried over MgSO₄ then concentrate to recover a dark blue solid as crude. After purification over silica gel (eluent DCM/Cyclohexane 7/3), the recovered product was triturated in cyclohexane to afford 47 mg as a dark blue solid. Yield 51 %. ¹H NMR (300 MHz, Methylene Chloride-*d*₂) δ 8.40 – 8.29 (m, 1H), 8.23 – 8.11 (m, 3H), 7.75 – 7.62 (m, 3H), 7.60 – 7.55 (m, 1H), 7.49 – 7.39 (m, 1H), 7.28 – 7.17 (m, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 3.96 (s, 3H); ¹³C NMR 353 K (101 MHz, DMSO) δ 166.24, 152.88, 150.61, 150.43, 140.24, 138.48, 136.36, 136.16, 133.86 (2C), 132.76 (2C), 132.00 (2C), 131.94 (2C), 131.81, 131.59, 131.22 (2C), 130.92, 130.70, 130.58, 129.78, 129.59 (2C), 129.28, 129.24, 126.91, 122.04, 121.69, 121.54, 52.71; ¹⁹F NMR (282 MHz, Methylene Chloride-*d*₂) δ -138.65 (dd, *J* = 66.1, 33.0 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 1711, 1571, 1536, 1526, 1469, 1270, 1043; mass spectrum ESI+ *m/z* 537.0691 [C₂₅H₁₇BF₂N₂O₂S₂Na(M+Na) requires 513.0793]; mp 293-294 °C.



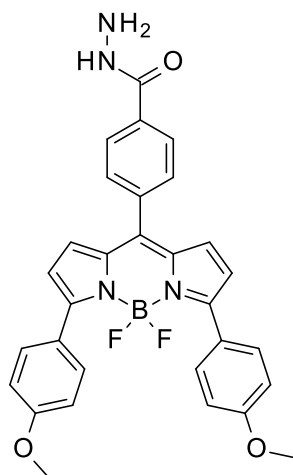
BODIPY 161 :

In a sealed tube under argon, 50 mg (0.127 mmol) of **147**, 8.8 mg (0.0076 mmol, 6 mol%) of Pd(PPh₃)₄ and 11 ml of dry toluene. Then 1.27 ml of an aqueous solution of Na₂CO₃ (1M) and 22 mg (0.145 mmol, 1.1 eq) of 4-methoxybenzeneboronic acid has been added. The reaction was degassed for 10 min with argon. The reaction was heated at reflux, monitored by TLC (eluent DCM) until appearance of double coupling product. The mixture was cooled to rt, then 150 μL of 2-(tributyltin)thiophene (0.472 mmol, 3.7 eq) and were added to the mixture. The reaction was warmed at reflux for 30 min. The mixture was extracted with 3*20 ml of DCM, washed with brine, dried over MgSO₄ then concentrate to recover a dark blue solid as crude. After purification over silica gel (eluent DCM/Cyclohexane 8/2), 21 mg of product was obtained. Yield 32 %. ¹H NMR (300 MHz, Methylene Chloride-*d*₂) δ 8.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.05 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.52 (dd, *J* = 5.1, 1.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 5.1, 3.8 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.88 – 6.75 (m, 3H), 6.71 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.36, 160.58, 158.14, 149.28, 139.54, 137.63, 135.49, 135.10, 133.03, 130.85, 130.76, 130.72, 130.40, 130.33 (2C), 130.23, 129.52, 128.69 (2C), 128.23, 123.95, 121.19, 120.52, 113.70 (2C), 55.04, 51.82; ¹⁹F NMR (282 MHz, Methylene Chloride-*d*₂) δ -139.57 (dd, *J* = 65.8, 32.8 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 2922, 1703, 1572, 1542, 1467, 1039; mass spectrum ESI+ *m/z* 515.1403 [C₂₈H₂₁BF₂N₂O₃S(M+H) requires 515.1334]; mp 232-233 °C.



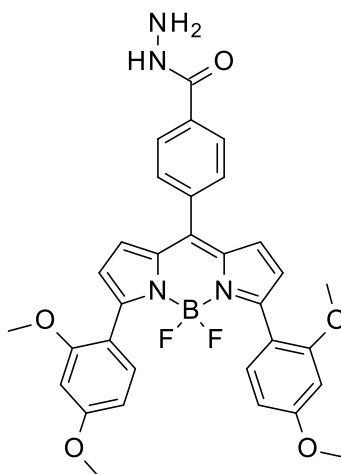
BODIPY 162 :

In a sealed tube under argon, 50 mg (0.127 mmol) of **147**, 8.8 mg (0.0076 mmol, 6 mol%) of Pd(PPh₃)₄ and 11 ml of dry toluene. Then 1.27 ml (0.635 mmol, 5 eq) of 3-(tributyltin)thiophene (0.5 M in toluene) were added to the mixture. The reaction was degassed for 10 min with argon. The reaction was heated at reflux, monitored by TLC (eluent DCM) until appearance of double coupling product. The mixture was cooled to rt, then 1.27 ml of Na₂CO₃(aq) (1M) and 100 mg (0.635 mmol, 5 eq) of 4-methoxybenzeneboronic acid has been added. The reaction was warmed at reflux for 30 min. The mixture was extracted with 3*20 ml of DCM, washed with brine, dried over MgSO₄ then concentrate to recover a dark blue solid as crude. After purification over silica gel (eluent DCM/Cyclohexane 8/2), 15 mg of product was obtained. Yield 23 %. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.26 (dd, *J* = 2.9, 1.3 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.69 – 7.59 (m, 3H), 7.34 (dd, *J* = 5.1, 3.0 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.82 – 6.71 (m, 3H), 6.65 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.88 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.87, 161.46, 159.61, 153.00, 140.98, 139.42, 136.67, 136.27, 132.98, 131.94, 131.76, 131.72, 131.67, 131.00 (2 C), 130.68, 130.31, 129.89 (2 C), 129.30, 129.14, 125.79, 125.44, 121.51, 120.97, 114.39 (2 C), 55.79, 52.90; ¹⁹F NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) δ -135.24 (dd, *J* = 65.4, 32.7 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 2925, 1716, 1543, 1469, 1274, 1057; mass spectrum ESI+ *m/z* 537.1251 [C₂₈H₂₁BF₂N₂O₃SNa(M+Na) requires 537.1329]; mp 189-190 °C.



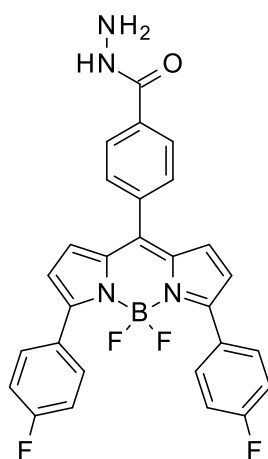
General procedure H : BODIPY 163 also named pMeO in Chapter IV :

In a round bottom flask under argon, 5.7 ml of hydrazine (1M in THF) were charged 53 mg of BODIPY 148 were added and the reaction was stirred at rt overnight. The mixture was concentrated and the dark red solid was triturated with Et₂O to afford 53 mg of the desired compound. Yield 100 %. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.00 (bs, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 6.94 – 6.82 (m, 4H), 4.63 (bs, 2H), 3.83 (s, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.03, 160.58 (2C), 157.73 (2C), 141.14, 136.05 (2C), 135.39 (2C), 134.76 (2C), 131.00 (2C), 130.55 (2C), 127.04 (2C), 124.34 (2C), 121.25, 113.90 (4C), 55.34 (2C); IR (film, cm⁻¹) 3327, 1566, 1466, 1140, 1056; mass spectrum ESI+ *m/z* 577.1982 [C₃₀H₂₅BF₂N₄O₃K(M+K) requires 577.1982]; mp 160-161 °C.



BODIPY 164 :

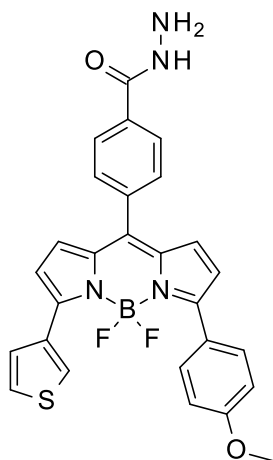
The crude product was synthesized according to general procedure H then triturated with cyclohexane to obtain the pure product **164** in 86 % yield as a dark blue solid (38 mg) from BODIPY **150** (44 mg, 0.74 mmol). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.99 (bs, 1H), 8.03 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 6.64 (d, J = 3.4 Hz, 4H), 6.59 (bs, 1H), 6.56 (bs, 1H), 4.64 (bs, 2H), 3.81 (s, 6H), 3.75 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.35, 159.43, 155.74, 141.56, 136.66, 135.42, 134.98 (2C), 132.65, 132.59 (2C), 132.54, 131.16 (2C), 130.76, 130.67, 129.64, 128.29, 127.49 (2C), 125.29, 123.14 (2C), 114.77 (2C), 105.64 (2C), 99.37 (2C), 56.40 (2C), 55.88 (2C). ^{19}F NMR (282 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ -134.15 (dd, J = 62.8, 31.5 Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 2941, 1719, 1609, 1253, 1070, 1029; mass spectrum ESI+ m/z 599.2270 [$\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_5(\text{M}+\text{H})$ requires 599.2199]; mp 204-205 °C.



BODIPY 165 also named pF in Chapter IV :

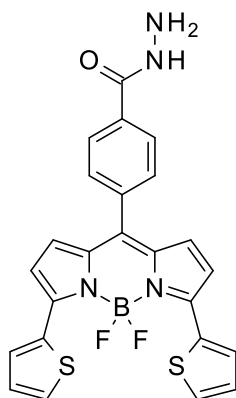
The title product **165** was synthesized according to general procedure H from BODIPY **152** (30 mg, 0.058 mmol). The crude had been purified over silica gel with DCM/MeOH 98/2 as eluent. The product was isolated in 57 % yield as a purple solid (17 mg). ^1H NMR (300 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ 7.92 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.89 – 7.81 (m, 4H), 7.70 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.58 (bs, 1H), 7.20 – 7.09 (m, 4H), 6.90 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 4.3 Hz, 2H); ^{13}C NMR 353 K (151 MHz, DMSO) δ 164.66, 163.44, 161.79, 156.96 (2C), 142.97, 135.31 (2C), 134.87, 134.14, 131.16 (2C), 130.79 (2C), 130.04 (2C), 128.16 (2C), 126.68 (2C), 121.14 (2C), 115.95, 115.80, 114.91 (2C), 114.76 (2C); ^{19}F NMR (282 MHz, Methylene Chloride- d_2) δ -111.31 – -111.51 (m, 2F), -132.43 (dd, J = 64.3, 32.2 Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 3325, 1602, 1567, 1433,

1137, 1058; mass spectrum ESI+ m/z 537.1499 [$C_{28}H_{19}BF_4N_4ONa(M+Na)$ requires 537.1588]; mp 188-189 °C.



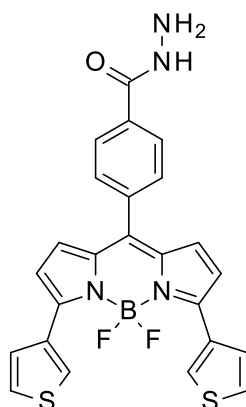
BODIPY 166 :

The title product **166** was synthesized according to general procedure H in quantitative yield as a dark blue solid (30 mg) from BODIPY **162** (30 mg, 0.06 mmol). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.77 (bs, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.81 – 7.67 (m, 3H), 7.63 (s, 1H), 7.15 – 6.99 (m, 3H), 6.99 – 6.76 (m, 3H), 4.79 (bs, 2H), 3.87 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.99, 160.65, 160.01, 134.77, 132.24 (2C), 130.87 (2C), 130.84 (2C), 130.21, 130.17, 130.14, 128.59, 126.83 (2C), 126.18, 126.00 (2C), 125.36, 113.87 (2C), 113.22 (2C), 55.23; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -133.36 (dd, $J = 66.3, 33.3$ Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 3346, 1657, 1605, 1544, 1074, 1059; mass spectrum ESI+ m/z 515.1519 [$C_{27}H_{21}BF_2N_4O_2S$ (M+H) requires 514.1446]; mp 272-273 °C.



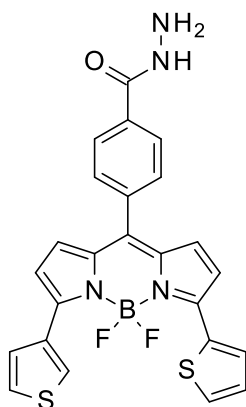
BODIPY 168 also named 2S in Chapter IV :

In a round bottom flask under argon, 3.49 ml of hydrazine (1M in THF) were charged 30 mg of BODIPY **155** were added and the reaction was stirred at rt overnight. The mixture was concentrated and the dark red solid was triturated with Et₂O to afford 33 mg of desire compound. Yield 100 %. ¹H NMR 357 K (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 (bs, 1H), 8.11 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.92 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 5.1, 3.8 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 4.75 (bs, 2H); ¹³C NMR 353 K (151 MHz, DMSO) δ 164.99, 149.67 (2 C), 139.58 (2 C), 135.84 (2 C), 135.76 (2 C), 134.74, 133.24, 131.57 (2 C), 131.52 (2 C), 130.51 (2 C), 130.44 (2 C), 129.01 (2 C), 127.05 (2 C), 121.14; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -137.40 (dd, *J* = 66.8, 33.3 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 3348, 1569, 1469, 1134, 710; mass spectrum ESI+ *m/z* 513.0899 [C₂₄H₁₇BF₂N₄O₁S₂Na(M+Na) requires 513.0899]; mp 229-230 °C.



BODIPY **168 also named **3S** in Chapter IV :**

The title product **168** was synthesized according to general procedure H in quantitative yield as a dark blue solid (30 mg) from BODIPY **159** (30 mg, 0.06 mmol). ¹H NMR 357 K (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.00 (bs, 1H), 8.47 (dd, *J* = 2.9, 1.3 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.85 (dd, *J* = 5.1, 1.3 Hz, 2H), 7.76 – 7.69 (m, 4H), 7.14 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 4.66 (bs, 2H); ¹³C NMR 353 K(101 MHz, DMSO) δ 165.00, 151.75 (2 C), 140.58 (2 C), 135.97 (2 C), 135.38 (2 C), 134.72 (2 C), 132.12 (2 C), 130.51 (3 C), 129.31, 128.87 (2 C), 127.03 (2 C), 126.67 (2 C), 121.35; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -136.26 (dd, *J* = 67.1, 33.4 Hz, 2F); IR (film, cm⁻¹) 2921, 1610, 1567, 1140, 1058; mass spectrum ESI+ *m/z* 513.0809 [C₂₄H₁₇BF₂N₄O₁S₂Na(M+Na) requires 513.0905]; mp 220-221 °C.



BODIPY 169 :

The title product **169** was synthesized according to general procedure H in 93 % yield as a dark blue solid (28 mg) from BODIPY **160** (30 mg, 0.06 mmol). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.77 (bs, 1H), 8.49 – 8.33 (m, 1H), 8.04 (dd, J = 11.8, 5.8 Hz, 3H), 7.84 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 7.74 – 7.62 (m, 3H), 7.31 – 7.25 (m, 1H), 7.12 – 7.04 (m, 1H), 7.04 – 6.97 (m, 1H), 6.97 – 6.80 (m, 2H), 4.62 (bs, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.70, 151.82, 151.63, 149.33, 139.94, 135.54, 135.35, 134.66, 133.04, 131.90, 130.86, 130.53, 130.03, 129.92 (2C), 128.73, 128.39, 128.35, 128.30, 126.63 (2C), 125.97, 121.01, 120.51; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -136.73 (dd, J = 66.5, 33.2 Hz, 2F); IR (film, cm^{-1}) 3310, 1658, 1566, 1470, 1134, 1042; mass spectrum ESI+ m/z 513.0800 [$\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_4\text{OS}_2\text{Na}(\text{M}+\text{Na})$ requires 513.0904]; mp 220-221 °C.

Quantum yield measurement :²¹³

We used standard 10 mm path length fluorescence or absorbance cuves for the experiment. Absorbance measurement must not exceed 0.1. We prepared 5 solutions for each compound and measured all absorbance and fluorescence spectra. Measurement was recorded in acetonitrile.

Then, we plotted a graph of integrated fluorescence against absorbance for each compound. The linear regression must intercept 0 and the gradient is used in the following equation to obtain the quantum yield of the compound.

The same procedure must be done with a standard fluorescent compound such as quinine sulfate in our case (0.54 in aqueous 0.1M H₂SO₄).

$$\phi_{compound} = \phi_{standard} \left(\frac{Gradient_{compound}}{Gradient_{standard}} \right)^2 \left(\frac{\eta_{compound}}{\eta_{standard}} \right)^2$$

With ϕ the quantum yield and η the refractive index of the solvent.

²¹³ A guide to recording fluorescence quantum yield, HORIBA Scientific,
<http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Fluorescence/quantumyieldstrad.pdf>

Experimental section : Biology protocol

2D OxiDIGE protocol :

I. Protein extraction

Work on ice. From cells,

1. Resuspend the pellet on 50 μ L buffer UTC (8M Urea, 2M Thiourea, 2% CHAPS): in 1 mL, add 480 mg Urea, 150 mg Thiourea. Then add 0,01 g of Amberlite and mix for 10 minutes. Filter on 0,45 μ m and add 2 mg CHAPS and 8,88 mg DTT.
2. Incubate 1 hour on ice, with pipetting (avoid bubbles) vortexing every 15 minutes and sonication after 30 minutes (avoid warming the sample or foaming)
3. Centrifugation 30 minutes, 20.000 g, 4°C, keep supernatant
4. Measure protein concentration with Bradford technique

II. Protein labelling

1. Select the desired amount of proteins for each sample and for the internal standard. Ex: Sample 1 100 μ g, Sample 2 100 μ g, Standard 80 μ g.
2. Take dyes from -20°C and centrifuge 10 min at 20.000 g to remove precipitate. To prepare stock solution, add 100 μ L of DMSO to 1 mg of dye to get a 10 mM solution.
3. Use 1 μ L of stock solution to stain 100 μ g of proteins.
4. Complete at 100 μ L for 100 μ g of proteins. Incubate overnight at 4°C

III. Strip rehydration (13cm, ph 3-10nl)

1. Prepare rehydration buffer: add to 1 mL of UTC buffer 12 μ L of DeStreak and 5 μ L de IGP of pharmalytes.
2. Pipette 400 μ l of buffer into each channel chosen for rehydration
3. Defrost the strip (it is conserved at -20 °C)
4. Remove the cover foil from the strip (start from the anode (+end))
5. Place the strip in the re-swelling tray channel gel side down. Avoid are bubbles.
6. Leave the strips rehydrating over night at room temperature

IV. Protein precipitation (remove salts)

Following the instruction of the 2D Clean-up kit,

1. For each vol of sample, add 3 volumes of precipitant. Mix and incubate on ice for 15 min.
2. For each vol of sample, add 3 volumes of co-precipitant. Mix by vortexing briefly.
3. Centrifuge the tubes at $8\ 000 \times g$ for 10 min. A small pellet should be visible. Proceed rapidly to the next step to avoid resuspension or diffusion of the pellet.
4. Remove as much of the supernatant. Do not disturb the pellet.
5. Carefully reposition the tubes in the centrifuge as before. Centrifuge again for at least 1 min to bring remaining liquid to the bottom of the tubes. Remove the remaining supernatant.
6. Add co-precipitant 3–4× times the size of the pellet.
7. Centrifuge the tube again for 5 min. use a pipette tip, remove and discard the wash.
8. Pipette enough distilled or de-ionized water on top of each pellet to cover the pellet. Vortex each tube for several seconds. The pellets should disperse in the water.
9. Add 1 ml of wash buffer, pre-chilled for at least 1 h at -20°C . Add 5 μL wash additive. Vortex until the pellet is fully dispersed. Incubate the tubes at -20°C for at least 30 min. Vortex every 10 minutes. The tubes can be left at this stage at -20°C for up to 1 week.
10. Centrifuge the tubes at $8\ 000 \times g$ for 10 min.
11. Discard the supernatant. Allow the pellet to air dry briefly (no more than 5 min).
14. Resuspend each pellet in 20 μL of UTC buffer (keep in mind cupule maximum volume, 50 μL).
15. Centrifuge the tubes at $8000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove any insoluble material and to reduce any foam. The supernatant may be stored at -80°C for later analysis.
16. Dose samples with Bradford. Prepare samples and standard mix, up to 50 μL (cupule limit).

V. Preparation of IPGphor

1. Open IPGphor
2. Degas 150 mL of mineral oil DryStrip Cover Fluid, place 108 mL in Manifold
3. Place strips from hydration cassette on IPGphor, gels up.

4. Take two electrode papers per strip, add 150 μ L milliQ water on each and place them on the extremity of the strips

5. Place electrodes. Place a cupule on top of the strip, without crushing it. Remove oil, charge the samples and cover with mineral oil again

1. Program IPGphor at 20°C, 50 μ A/strip (75 μ A maximum)

2. Click on “Advanced”, precise the number of strips, enter the focalization program:

Step	500V	1 hour (8 hours overnight)
Grad	1000V	1 hour
Grad	8000V	2,5 hours
Step	8000V	3 hours

3. You can keep focalized strips on plastic at -20°C or -80°C.

VI. Strips equilibration

1. Prepare equilibration buffer (6M Urea, 2% SDS, 30% glycerol, 50mM of 1.5 M Tris-HCl pH 8,6): for 50 mL, add 18 g Urea, 1 g SDS, 15 mL Glycerol, 1,67 mL of 1.5 M Tris-HCl pH 8,6 and complete with milliQ water (you can keep it at room temperature in a brown bottle for around 2 weeks)

2. Share in two solutions of 10 mL. Add 0,1 g DTT in the first one to create B1. Add 0,47 g of iodoacetamide in the second one to create B2.

3. Equilibrate the strips for 10 minutes in B1, then then minutes in B2

VII. Migration on gel

1. Open an IPG 11 cm gel and rinse the gel with migration buffer (classical Tris-SDS buffer).

2. Place the strips on the gel. Cut the extremity to fit it in.

3. Pour melted agarose solution on top of the gel to keep it in position (0.6% agarose in Tris-SDS buffer): 0,6 g agarose in 100 mL migration buffer

4. Complete with migration buffer and launch the migration (begin with 60 V and increase to 160)

5. Wash gels in buffer with 10% ethanol, 7% acetic acid

6. Expose the gels at an intensity variable (check by 1D gel on the same sample which intensity is the best). Recent configuration: Cy2 1.250, Cy3 0.300 Cy5 0.800

C2C12 murine myoblasts culture protocol :

Cell proliferation occurred in a mixture of 42,5% of Ham's F12 medium (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 42,5% of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and 15% of FBS (Fetal Bovine Serum in presence of 2g/L glucose or 2 g/L galactose) during 3 days in petri dish.

Protocol for cellular stress mimic with H₂O₂ :

C2C12 murine myoblasts were stressed with 5 ml of a mixture containing 2 ml of DMEM, 2.25 ml of DPBS, 1.25 ml of FBS and 7 µl of a H₂O₂ solution at 0.09M. C2C12 cells were incubated for 30 min at 37°C, then washed with 2*5 ml of DPBS (2% FBS). Cells were recovered in a eppendorf by utilising 2 ml of trypsin. After centrifugation (5 min at 2333 rpm), the supernatant was taken and 500 µl of DPBS were added.

Protein labelling for flux cytometry :

To a solution of 500 µl of C2C12 cells in DPBS, 10 µl of dyes (10mM in DMSO) were added. The mixture remained 2h in ice then washed with 3*500 µl of DPBS (centrifugation 5 min at 2333 rpm) to recover a solution of 500 µl of C2C12 cells labelled with dyes.

Protocol to increase C2C12 murine myoblasts membrane permeability (before protein labelling protocol) :

To a solution of 250 µl of C2C12 cells in DPBS, 1 ml of acetone were added and the mixture remained 5 min at 20°C. The mixture was centrifuged (5 min at 2333 rpm), the supernatant was taken then 1 ml of DPBS was added. C2C12 cells were washed with 3*500 µl of DPBS (centrifugation 5 min at 2333 rpm).

Annexes

Spectres d'absorption et d'excitation des triazoles

T01 :

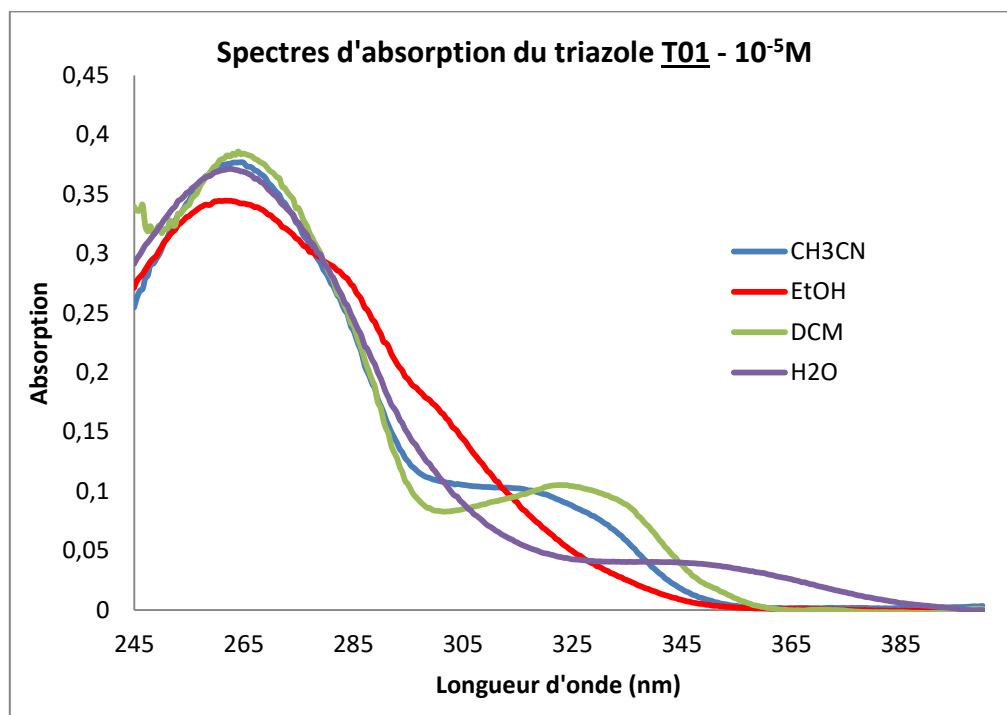


Figure A.1 : Spectres d'absorption du triazole **T01** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

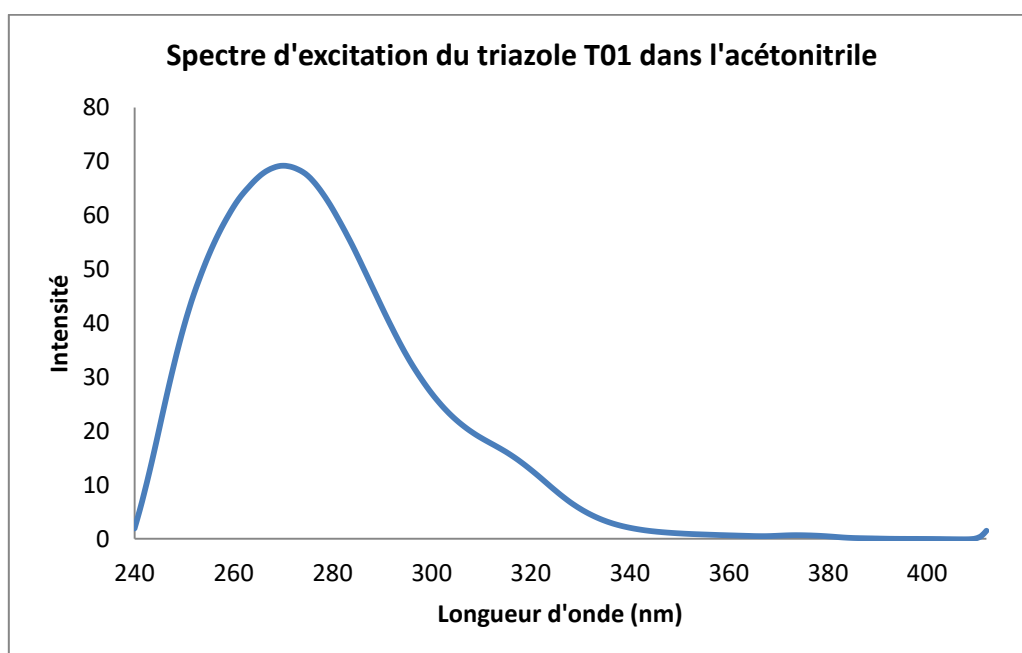


Figure A.2 : Spectre d'excitation du triazole **T01** à $10^{-5}M$ dans l'acétonitrile.

T02 :

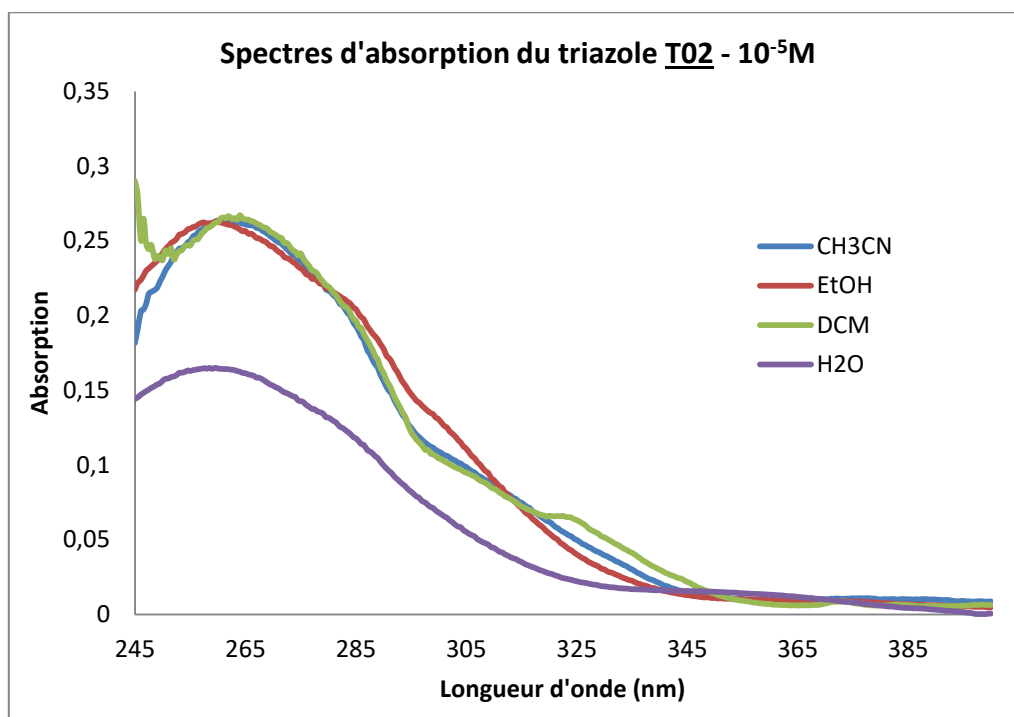


Figure A.3 : Spectres d'absorption du triazole **T02** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

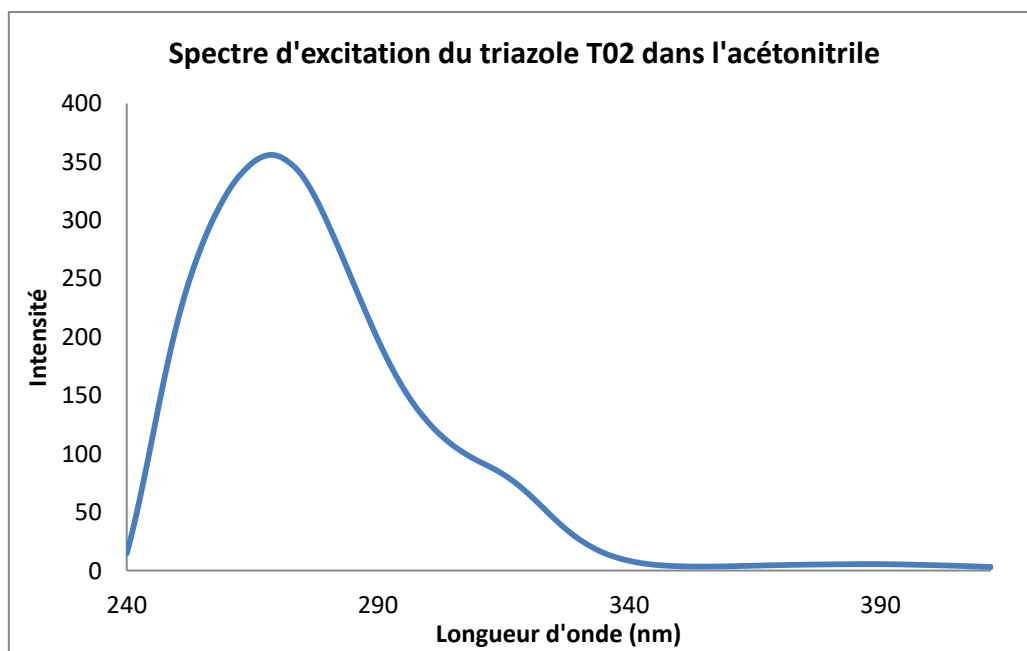


Figure A.4 : Spectre d'excitation du triazole **T02** à $10^{-5}M$ dans l'acétonitrile.

T03 :

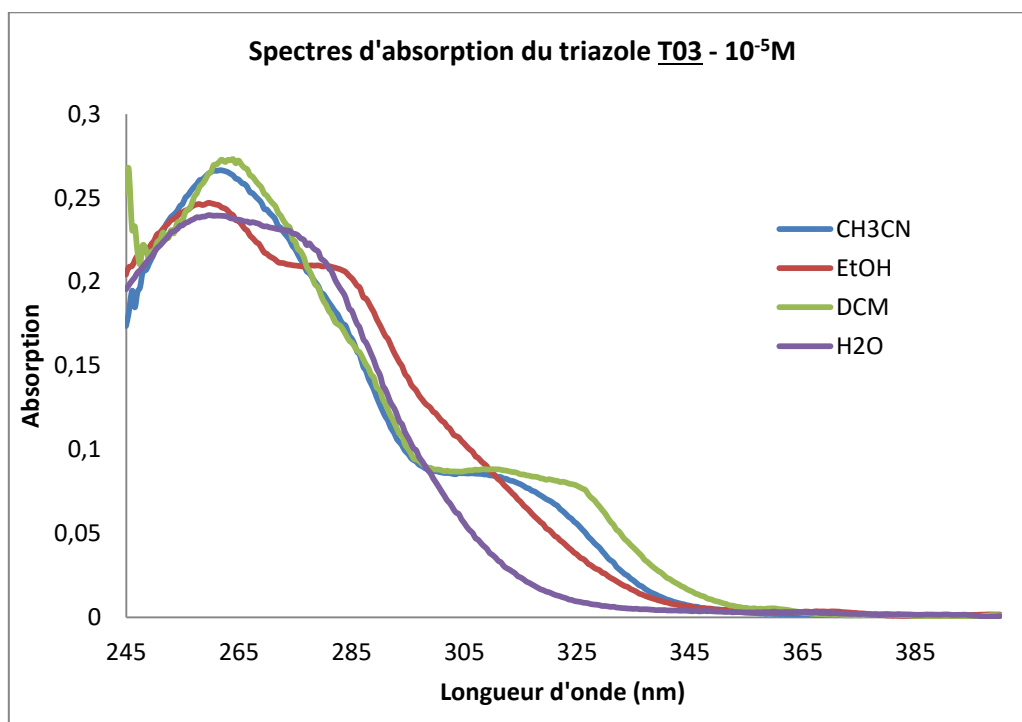


Figure A.5 : Spectres d'absorption du triazole **T03** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

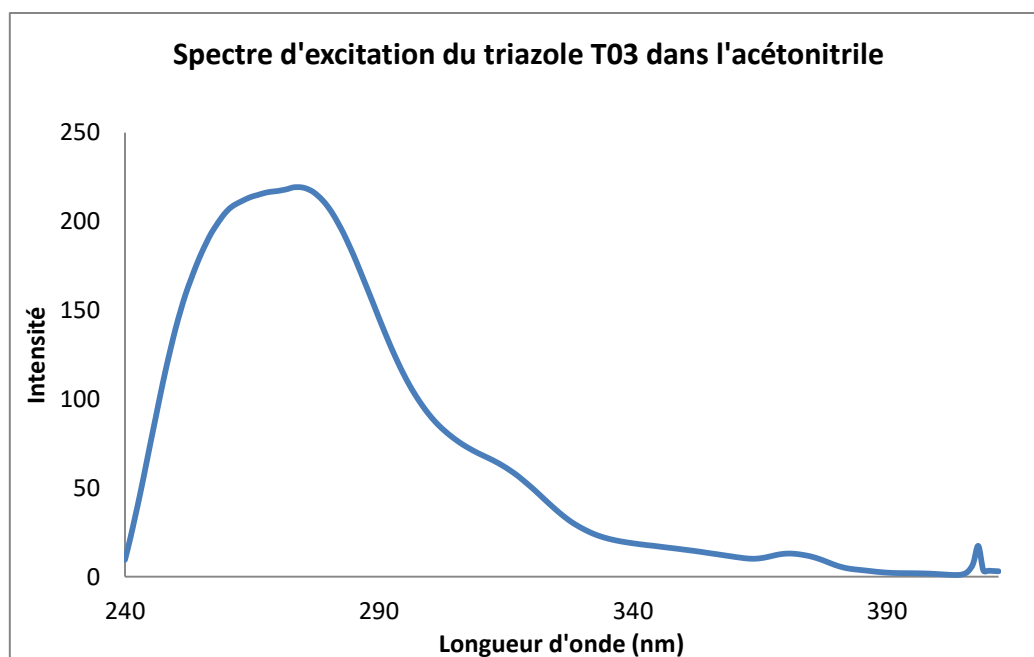


Figure A.6 : Spectre d'excitation du triazole **T03** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T05 :

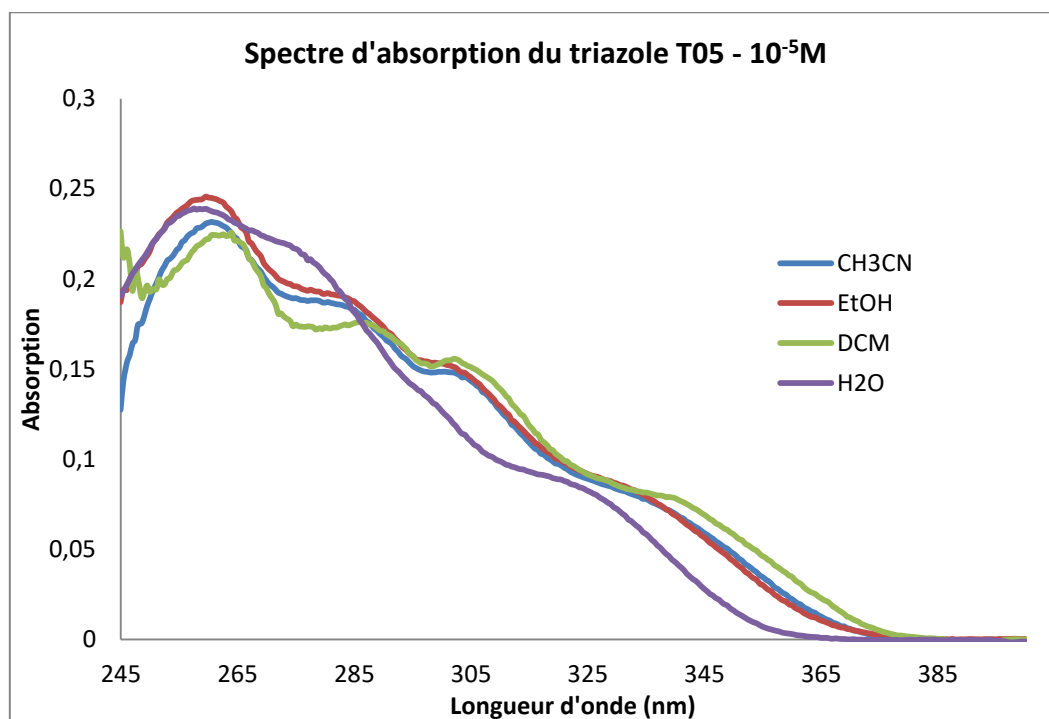


Figure A.7 : Spectres d'absorption du triazole **T05** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

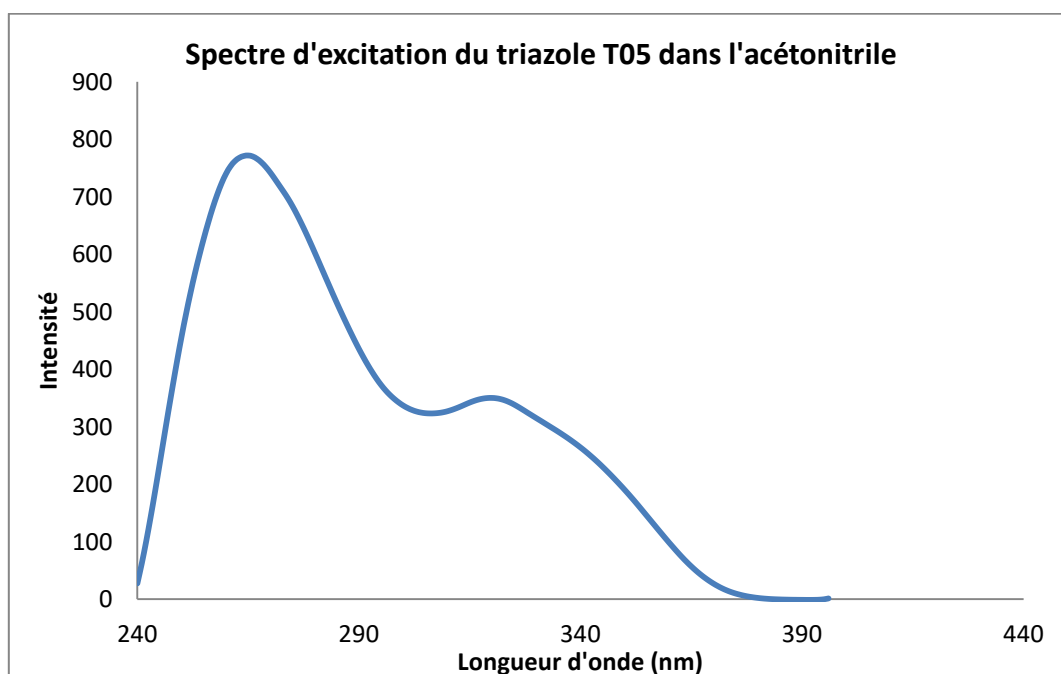


Figure A.8 : Spectre d'excitation du triazole **T05** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T09 :

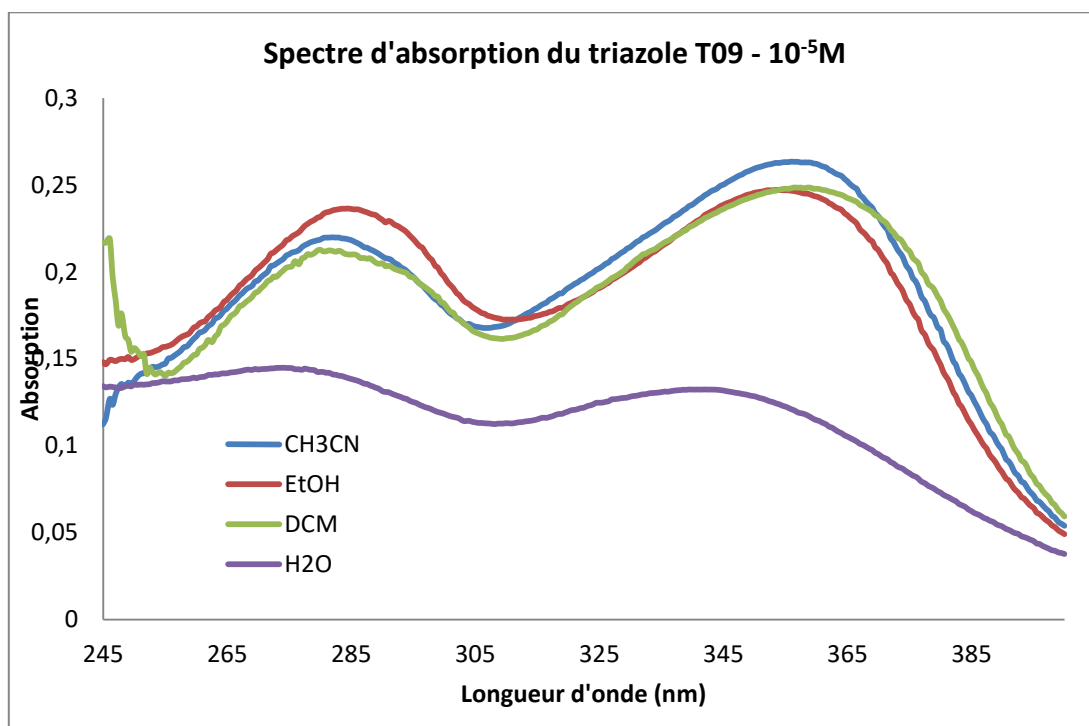


Figure A.9 : Spectres d'absorption du triazole **T09** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

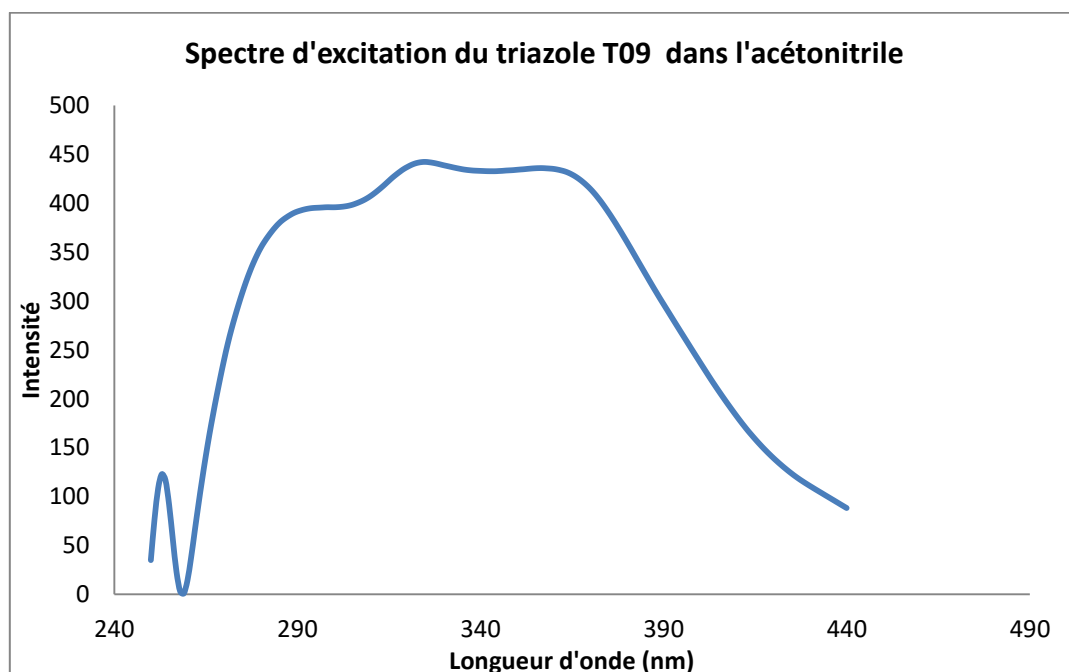


Figure A.10 : Spectre d'excitation du triazole **T09** à 10^{-5} M dans l'acétonitrile.

T10 :

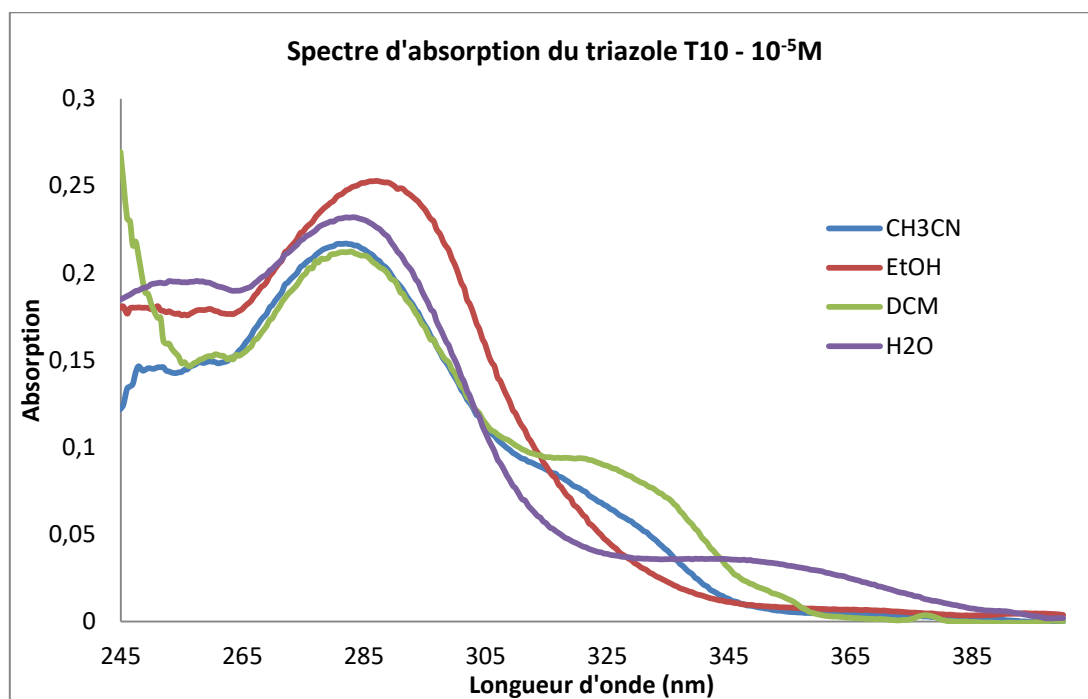


Figure A.11 : Spectres d'absorption du triazole **T10** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

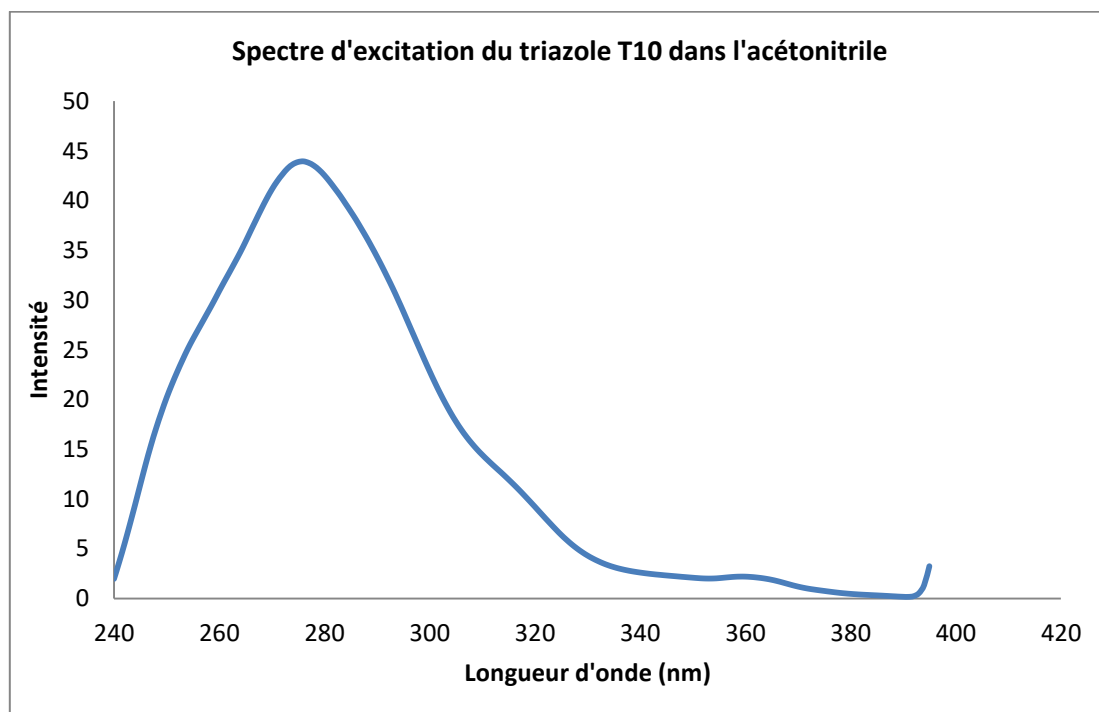


Figure A.12 : Spectre d'excitation du triazole **T10** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T12 :

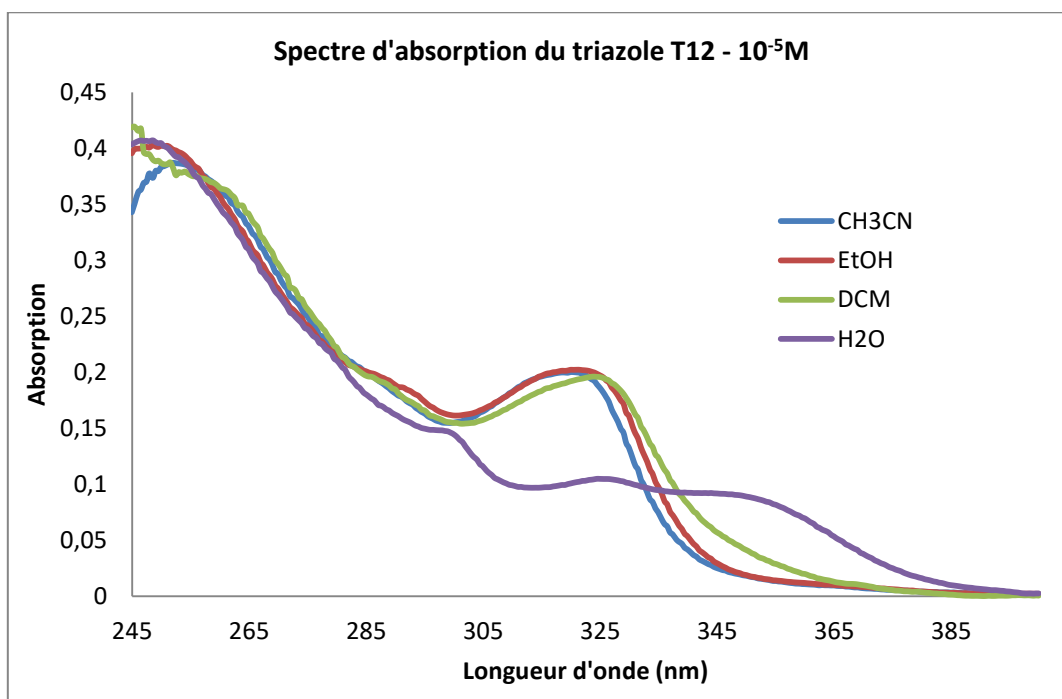


Figure A.13 : Spectres d'absorption du triazole **T12** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

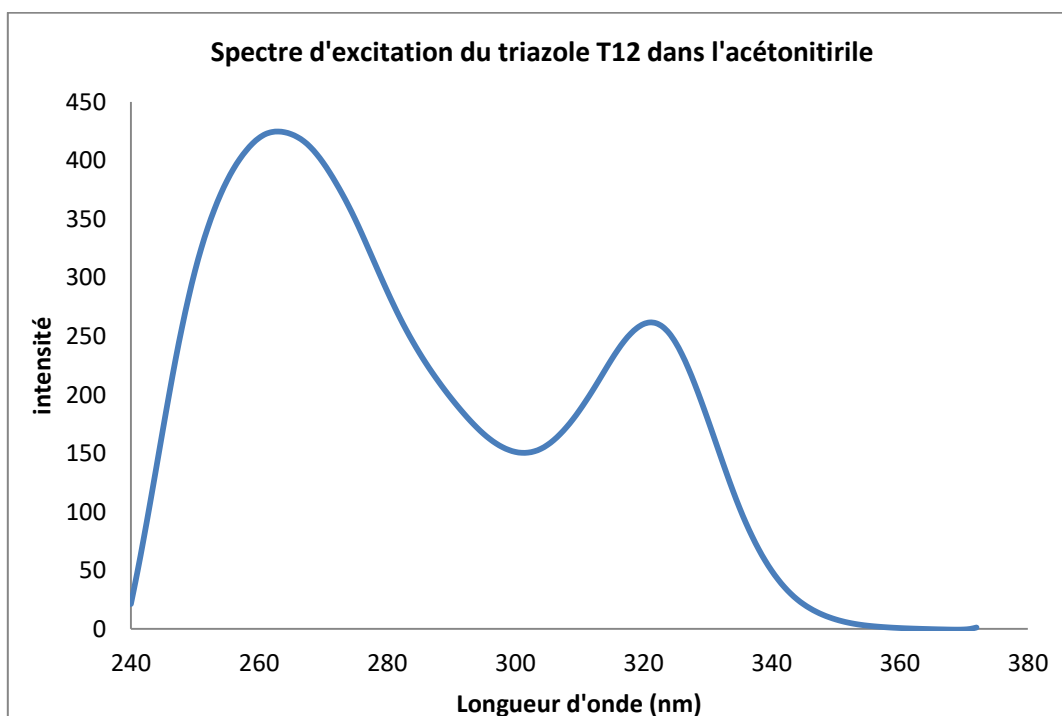


Figure A.14 : Spectre d'excitation du triazole **T12** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T13 :

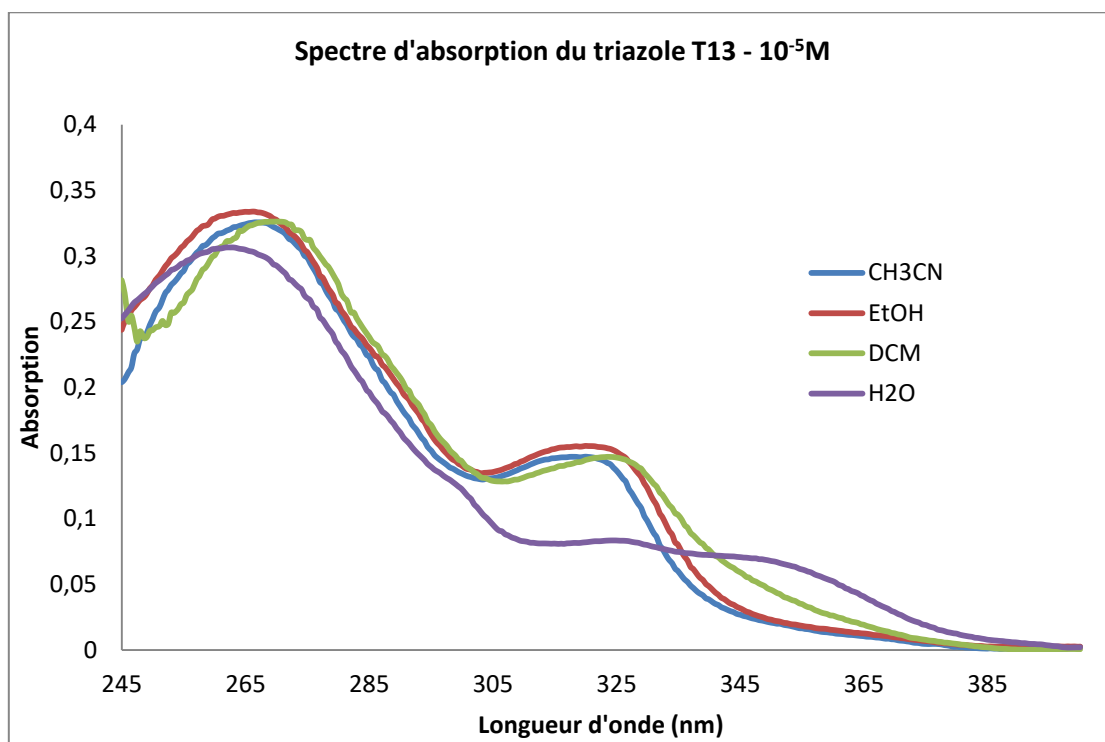


Figure A.15 : Spectres d'absorption du triazole **T13** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

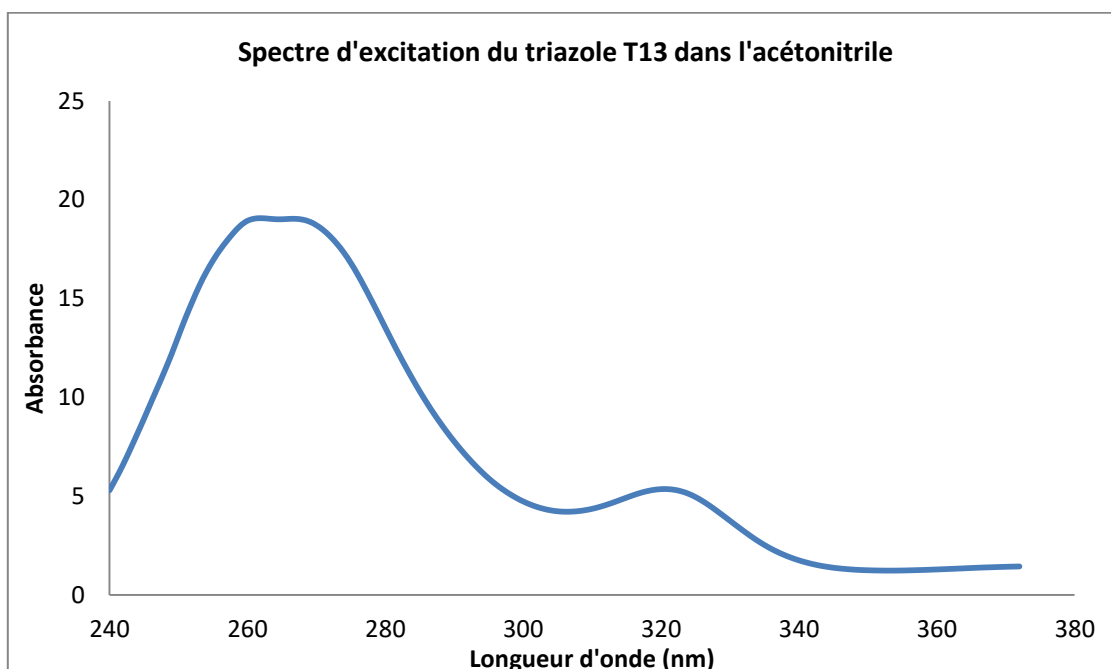


Figure A.16 : Spectre d'excitation du triazole **T13** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T15 :

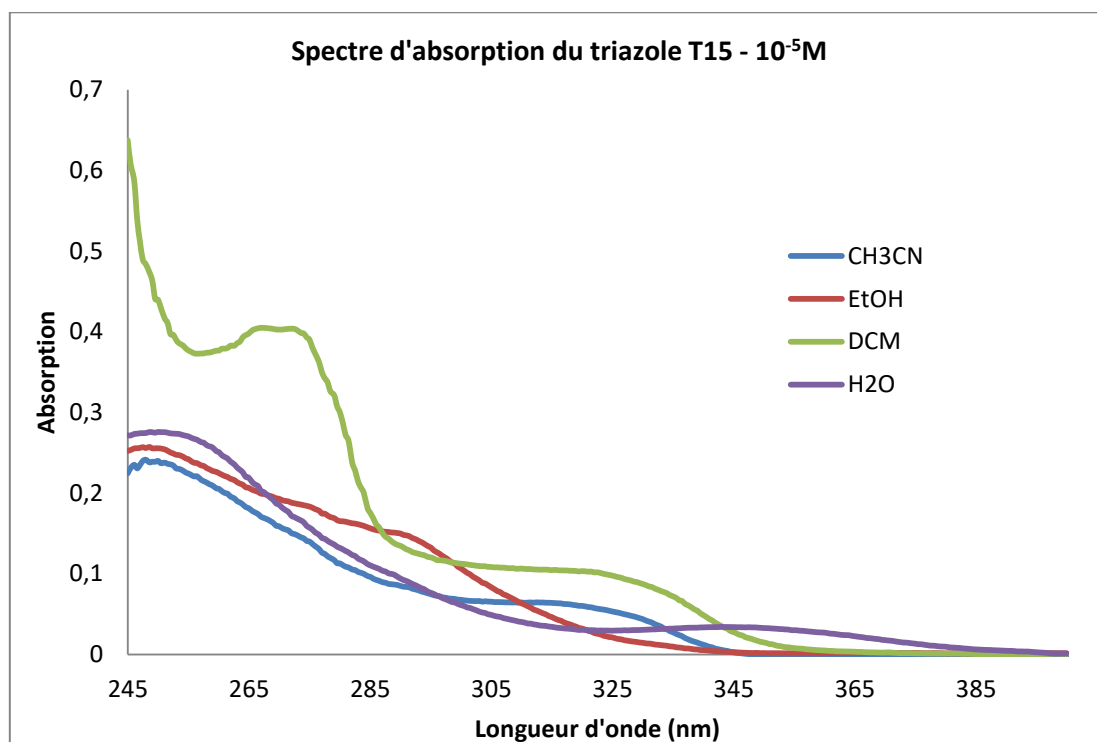


Figure A.17 : Spectres d'absorption du triazole **T15** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

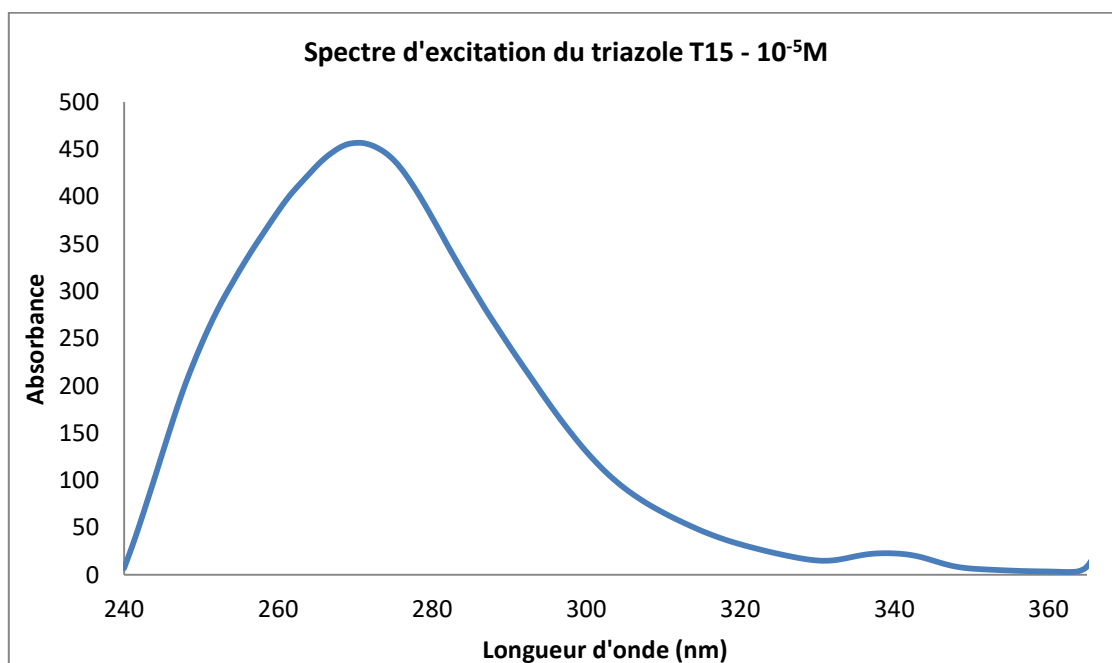


Figure A.18 : Spectre d'excitation du triazole **T15** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T16 :

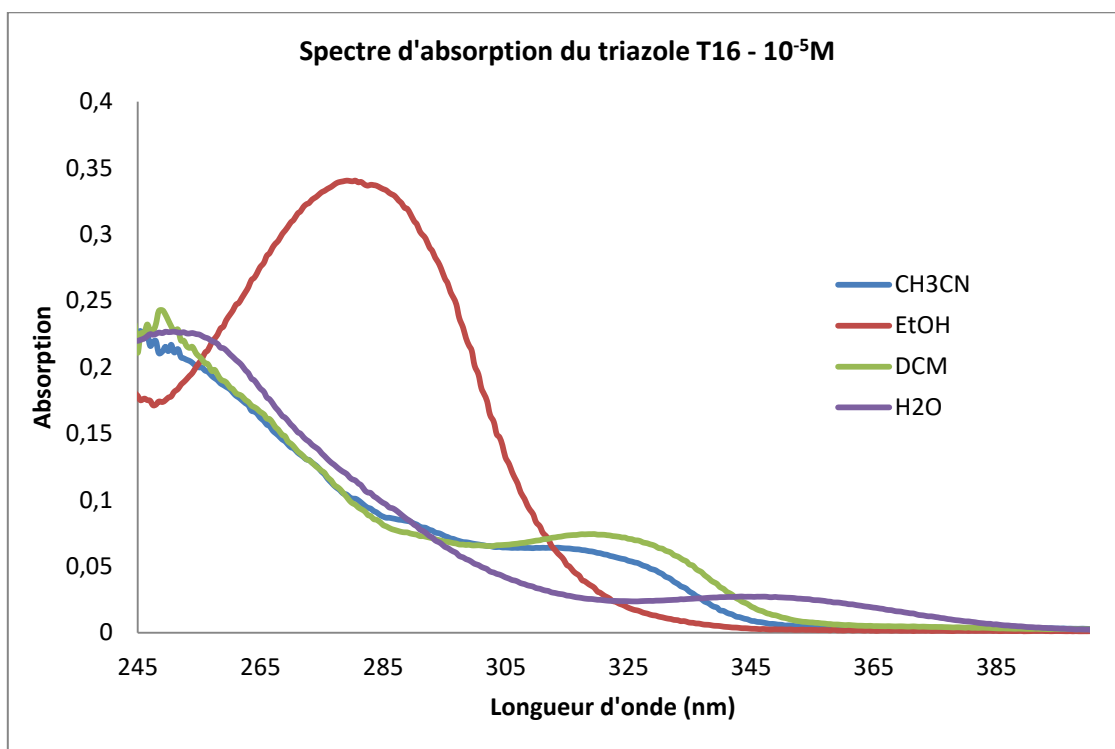


Figure A.19 : Spectres d'absorption du triazole **T16** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

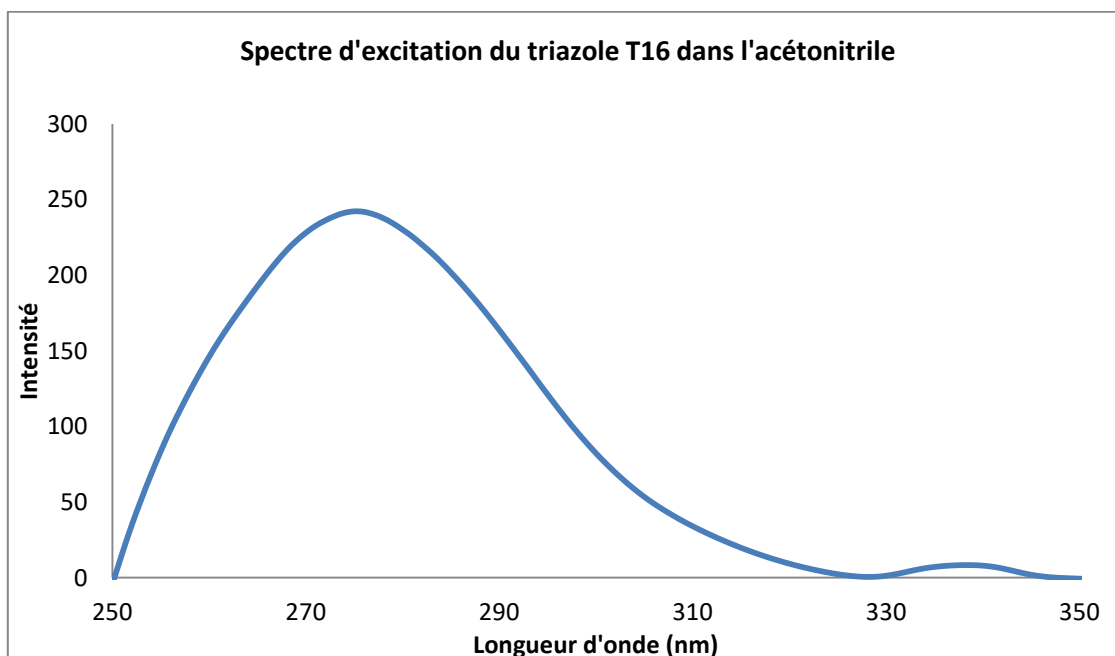


Figure A.20 : Spectre d'excitation du triazole **T16** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

T17 :

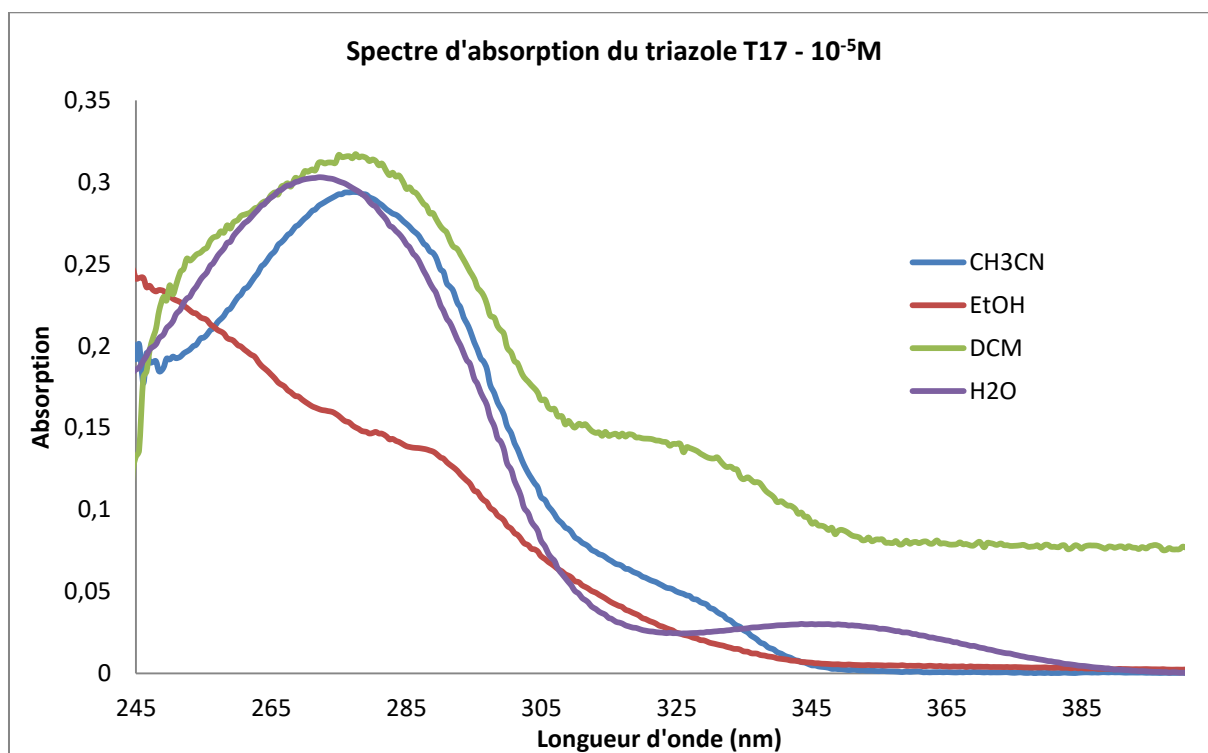


Figure A.21 : Spectres d'absorption du triazole **T17** dans l'acétonitrile (en bleu), dans le DCM (en vert), dans l'éthanol (en rouge) et dans l'eau (en violet).

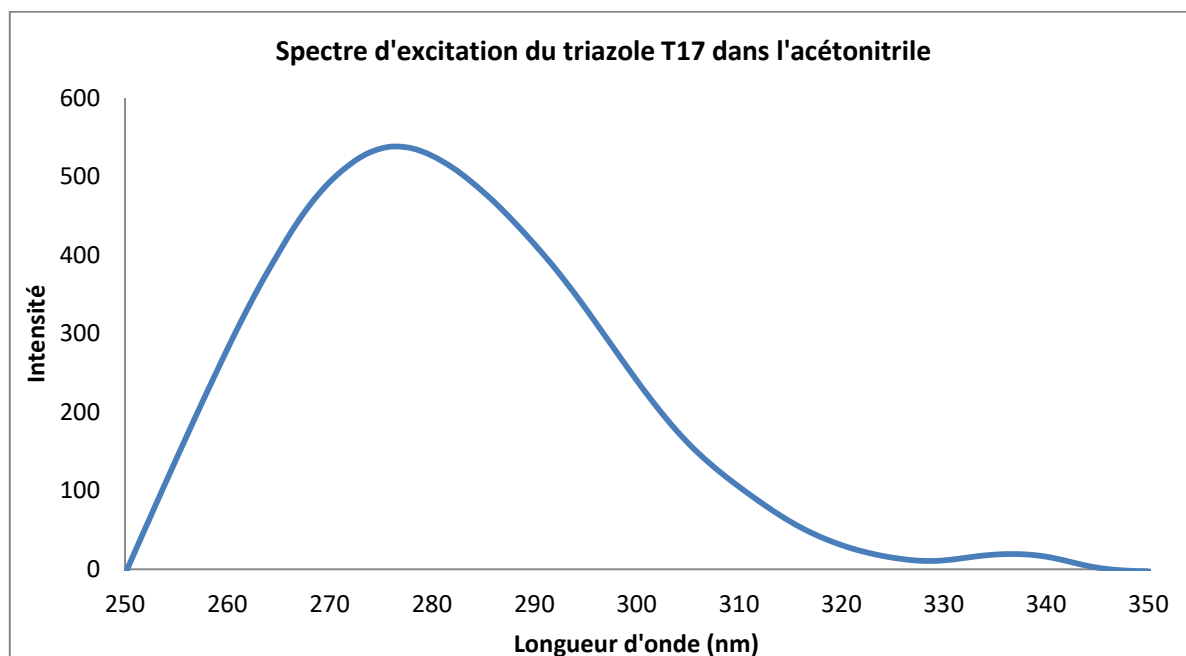


Figure A.22 : Spectre d'excitation du triazole **T17** à 10⁻⁵M dans l'acétonitrile.

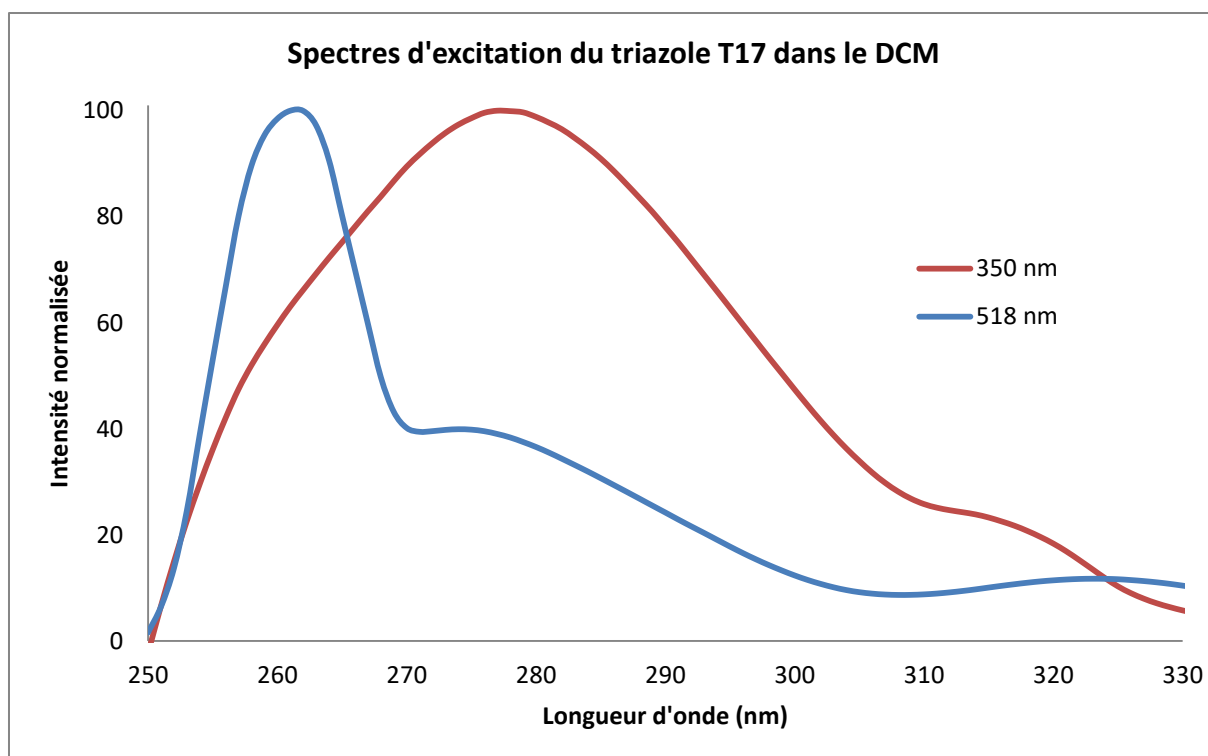


Figure A.23 : Spectres d'excitation du triazole **T17** à 10^{-5} M dans le DCM. Excitation enregistrée à 350 nm (en rouge) et à 518 nm (en bleu).

Publication :

« *Chemoselective Access to π -Conjugated Heterocycles by Stille and Sonogashira Reactions on 2-Substituted 4H-Pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones* »

Le Falher, L. ; Mumtaz, A. ; Nina Diogo, A. ; Thorimbert, S. ; Botuha, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 4, 827-832.

Posters & Communications :

Posters

« *Nouveaux hétérocycles fluorescents pour la détection de protéines carbonylées associées aux vieillissement et à l'inflammation* »

A. Nina Diogo, C. Botuha, M. Salmain, B. Friguet, S. Thorimbert, Journée IPV, Paris, 07 avril 2016

« *Détection des protéines carbonylées par l'utilisation de nouvelles sondes fluorescentes thienyl-BODIPY hydrazides* »

A. Nina Diogo, J. Hyzewicz, C. Botuha, S. Thorimbert, B. Friguet, symposium "Aspect systémiques du stress oxydant", Paris, 06 juin 2018

Communications

« *Utilisation des carbènes N-hétérocycliques (NHCs) en organocatalyse* »

A. Nina Diogo, C. Botuha, S. Thorimbert, JBED, Paris, Février 2016

« *Hétérocycles fluorescents pour la détection de protéines carbonylées associées aux vieillissement et à l'inflammation* »

A. Nina Diogo, C. Botuha, B. Friguet, S. Thorimbert, Journée IPV, Paris, 28 avril 2017

« *New fluorescent heterocycles for detection of carbonylated proteins associated to ageing and inflammation* »

A. Nina Diogo, C. Botuha, B. Friguet, S. Thorimbert, IPV day, Paris, 05 avril 2018

« *New fluorescent heterocycles for detection of carbonylated proteins associated to ageing and inflammation* »

A. Nina Diogo, C. Botuha, B. Friguet, S. Thorimbert, 25th Young researcher fellow meeting, Orléans, 5-7 mars 2018.

Hétérocycles fluorescents pour la détection des protéines carbonylées associées au vieillissement et à l'inflammation

Résumé :

Les travaux présentés dans ce manuscrit décrivent la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes pour le marquage des protéines carbonylées. Dans une première partie, la synthèse de nouvelles molécules fluorescentes à base 1,2,4-triazoles 1,3,5-trisubstitués est décrite à partir des 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones. L'étude photophysique des 1,2,4-triazoles dans plusieurs solvants a permis de mettre en évidence un mécanisme de fluorescence de type ESIPT induisant un large déplacement de Stokes (jusqu'à 250 nm). La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée à la synthèse de nouveaux BODIPY avec une fonction hydrazide. Enfin, la dernière partie décrit les applications de ces nouveaux BODIPY en tant que marqueurs des protéines carbonylées, utilisable avec la 2D-Oxi DIGE, la microscopie à fluorescence et la cytométrie en flux.

Mots-clés : 1,2,4-triazoles – ESIPT – BODIPY – sondes fluorescentes hydrazides – marquage – protéines carbonylées

Fluorescent heterocycles for detection of carbonylated proteins associated to ageing and inflammation

Abstract :

The works presented in this manuscript describe the synthesis of new fluorescent probes for protein labelling. In a first part, the synthesis of new fluorescent molecules 1,2,4-triazoles based 1,3,5-trisubstituted is described from 4H-pyrido[e][1,3]oxazin-4-ones. The photophysical study of 1,2,4-triazoles in several solvents allowed to highlight a fluorescence ESIPT type mechanism leading to a wide Stokes' shift (close to 250 nm). The second part of this manuscript is dedicated to the synthesis of new BODIPY with a hydrazide function. Finally, the last part describes the applications of these new BODIPY as fluorescent probes for carbonylated proteins labelling, used in 2D - Oxi DIGE, fluorescence microscopy and flow cytometry.

Keywords : 1,2,4-triazoles – ESIPT – BODIPY – fluorescent probes hydrazides – labelling – carbonylated proteins