



HAL
open science

Synthèse de nouveaux fluorophores organiques – Application à la conception de substrats fluorogéniques d'enzymes fondés sur le principe de la synthèse in situ

Garance Dejouy

► To cite this version:

Garance Dejouy. Synthèse de nouveaux fluorophores organiques – Application à la conception de substrats fluorogéniques d'enzymes fondés sur le principe de la synthèse in situ. Chimie organique. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCK027 . tel-03060479

HAL Id: tel-03060479

<https://theses.hal.science/tel-03060479>

Submitted on 14 Dec 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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

parrainée par la société bioMérieux



PRÉPARÉE À L'INSTITUT DE CHIMIE MOLÉCULAIRE DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

École Doctorale n°553

École Doctorale Carnot-Pasteur

Doctorat de Chimie Organique

présentée par

Garance DEJOUY

Ingénieure ECPM

Synthèse de nouveaux fluorophores organiques
Application à la conception de substrats fluorogéniques
d'enzymes fondés sur le principe de la synthèse *in situ*

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

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 9 Octobre 2020 devant la commission d'examen :

| | | |
|--------------------------|---|--------------------|
| BURGER Alain | Professeur, Université Nice Sophia Antipolis | Président de Jury |
| DURANDETTI Muriel | Maître de Conférences, Université de Rouen | Rapporteuse |
| MAHUTEAU-BETZER Florence | Directrice de Recherche CNRS, Institut Curie | Rapporteuse |
| DEVILLERS Charles | Maître de Conférences, Université de Bourgogne | Examineur |
| ORENGA Sylvain | Chercheur expert microbiologie, bioMérieux | Invité |
| ROMIEU Anthony | Professeur, Université de Bourgogne | Directeur de thèse |
| VALVERDE Ibai | Chargé de Recherche CNRS, Université de Bourgogne | Co-encadrant |

Financements - Remerciements Institutionnels

Ces travaux ont été financés par la région Bourgogne Franche-Comté, dans le cadre du dispositif "Jeunes Chercheurs Entrepreneurs" (bourse de thèse JCE), le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Université de Bourgogne, les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), la région Bourgogne (programme "FABER", PARI Action 6, SSTIC 6 "Imagerie, instrumentation, chimie et applications biomédicales") ainsi que l'Institut Universitaire de France (IUF) dont le Prof. Anthony Romieu a été membre junior de 2013 à 2018.

J'ai également bénéficié de fonds de l'École Doctorale Carnot-Pasteur (ED 553) et de l'ANR DetectOP_BChE (ANR-18-CE39-0014) pour financer mon séjour de 2 mois sur le site de bioMérieux à La-Balme-les-Grottes en Isère.

Ma participation à différents congrès nationaux et internationaux (SEC056, FICS 2020 et IC3EM 2020) a également été financée par l'ED 553 et l'ANR DetectOP_BChE (ANR-18-CE39-0014).



Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'équipe *Porphyrines, Polyamines, Développement et Applications (P2DA)*, à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), Unité Mixte de Recherche (UMR 6302) ayant pour organismes de tutelle la COMU Université Bourgogne Franche-Comté (UBFC), l'Université de Bourgogne et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Je remercie dans un premier temps, les professeurs Franck Denat et Claude Gros, respectivement directeur de l'ICMUB et responsable de P2DA, pour m'avoir accueillie pendant ces trois ans. Parmi les différents organismes qui m'ont permis d'accomplir ces travaux de recherche, je citerai également l'École Doctorale Carnot-Pasteur de l'Université de Bourgogne et son directeur Hans Jauslin, ainsi que l'IAE de Dijon et son ancien directeur Fabrice Hervé pour avoir accueillie la dernière promotion de doctorants JCE.

Dans un deuxième temps, je souhaite remercier Florence Mahuteau-Betzer, directeur de recherche CNRS à l'Institut Curie, ainsi que Muriel Durandetti, maître de conférences à l'Université de Rouen pour avoir accepté de juger ces travaux de thèse.

Je souhaite également remercier Alain Burger, professeur à l'Université de Nice et Charles Devillers, maître de conférences à l'Université de Bourgogne, pour avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse lors de ces trois ans et d'avoir été à mon écoute et plein de bons conseils lors des deux réunions annuelles.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Prof. Anthony Romieu, qui m'a accompagnée tout au long de ces trois ans. Merci pour ta disponibilité, ta confiance, tes conseils et le partage de tes connaissances. Merci aussi d'avoir pris le temps de me comprendre et de me connaître afin que nos caractères bien marqués s'accordent et s'associent pour réussir à avancer ensemble sur les projets. Je profite de ce moment pour te remercier également pour tout ce que tu gères au niveau du laboratoire et pour ta mémoire infailible sur la localisation des produits qui m'a souvent fait gagner un temps précieux.

Je tiens également à remercier chaleureusement Ibai Valverde, co-encadrant de ma thèse, pour les précieux conseils et le temps qu'il m'a accordé pour préparer chacune de mes présentations orales. Je retiens aussi les nombreuses discussions concernant la chimie et mon avenir professionnel, mais aussi la "gestion" plus personnelle de mon esprit enchevêtré.

Je souhaite aussi remercier Sylvain Oregã et Valérie Chalansonnet, travaillant tous deux au sein de l'entreprise parraine de ma thèse, bioMérieux, qui ont accepté d'en être les représentants, mais aussi pour leurs accueils chaleureux et leurs différents conseils et discussions lors de mon séjour de deux mois sur le site de La-Balme-les-Grottes.

Je remercie également les trois mousquetaires de l'équipe Information : Christine Stern, Anne Combet et Thierry Belloir, pour leurs aides lors de mes déboires informatiques et pour m'avoir mis une salle à disposition afin que je rédige mon manuscrit dans de bonnes conditions.

Merci aussi aux chercheurs et personnels de l'équipe P2DA que je ne pourrai pas tous citer : Victor Goncalves pour ta bonne humeur lors de tes venues au R-11, Richard Décreau, pour m'avoir prêté ton bonnet de piscine à deux reprises, Marcel Soustelle pour les analyses élémentaires et pour tes qualités de bricoleur, Stéphanie Robin pour la gestion administrative des participations aux congrès, mais aussi pour tes discussions, ta gentillesse et tes précieux conseils de vie, Marc Pirotta pour la gestion de la soute et pour ta sympathie communicative et enfin Magaly Gentilhomme, sans qui nos locaux seraient remplis de poussière et avec qui j'ai apprécié échanger.

Je remercie aussi les membres de la plateforme d'analyses PACSMUB qui ont consacré une partie de leur temps à l'analyse de mes composés. Je pense notamment à Marie-José Penouilh, Quentin Bonnin et Michel Picquet pour les analyses par spectrométrie de masse haute résolution, mais aussi leurs temps pour paramétrer la RMN de noyaux non conventionnels (Si, Se) et les instruments de spectroscopie. Je n'oublie pas Myriam Heydel, qui a réalisé les analyses par chromatographie ionique de mes fluorophores qui "sont super beau ! Ils changent de couleur en fonction de la lumière !". Je la remercie aussi pour les nombreux repas passés en sa compagnie.

J'aimerais maintenant remercier de tout mon cœur : Berrou et Renarde. Avec qui nous formions la dream team et sans qui ces trois années de thèse n'auraient certainement pas été les mêmes. Merci à vous deux pour le soutien moral et l'amitié que vous m'avez donné. Anne, merci pour ton écoute, ta "peur" du risque et ton "respect" des règles qui m'ont souvent menée à rire. Merci aussi pour toutes ces soirées et le soutien sans faille que tu m'as apporté. On sait maintenant que le travail de groupe ensemble n'est pas fait pour nous et que ta journée favorite est le 1^{er} Avril. Emma, merci d'avoir égayé mes journées de travail, j'ai toujours eu de magnifiques chansons en tête grâce à toi. Merci d'avoir accepté de te "battre" avec moi (on sait qui gagne hein), je n'oublierai pas notre joli punching-ball et le fou-rire que cet épisode nous a apporté, ainsi que tous les autres.

Je tiens aussi à remercier particulièrement Léa, notre petite princesse, qui a partagé de nombreux moments avec nous durant nos deux années communes. Merci pour les nombreux fou-rires aux cours de pilates, pour les sorties, les conseils et le défouloir pendant le train fantôme. Je n'oublie pas Johan, alias Jojo, qui a partagé une année et demi à nos côtés pour la bonne humeur qu'il dégage, ses blagues et les nombreuses soirées (#soirée burger) passées à cinq.

Ces trois années de thèse ont aussi été marquées par Sergei, mon moscovite adoré !! Je n'oublie pas les nombreuses soirées passées en ta compagnie qui t'ont permis de t'échapper de ta "cave", ton soutien quotidien, ta bonne humeur, ton sourire mais aussi tes manigances russes... Merci de m'avoir fait visiter Moscou :D

Je souhaite également remercier particulièrement quatre post-docts : Kevin, avec qui j'ai travaillé pendant 6 mois sur un super projet !! (Je maintiens cependant que la couleur des Si-pyronines est la plus belle :p). Merci pour tes discussions, ton temps, tes conseils et ta bonne humeur. Ce fût un plaisir de travailler avec toi. Merci Laurène, ma voisine de bureau, pour les nombreux moments passés ensemble, tes conseils, ta bienveillance et ton écoute. Merci à Sophia qui a pris ton relais et qui elle aussi continue d'être là pour moi. Enfin merci à Daiann, mon argentin préféré, pour les nombreuses discussions à réfléchir sur nos vies, pour ton écoute précieuse et ton aide pendant les moments difficiles mais aussi pour les moments de rire et de partage.

Je n'oublie pas les doctorants et post-docts avec qui j'ai passé de supers moments (soirée, après-midi, jeu du midi, randonnée, repas) : Micka, Mathieu, Julie, Joachim, Robin, Jérémie, Francesco, Thibaud, Pauline, Valou, Vivian, Osian, Kevin, Flavien, Delphine et Pierre. Mais aussi les autres avec qui j'ai pu échanger au milieu d'un couloir, dans le R-06 ou en RMN : Amélie, Valentin, Cleve, Amelle, Asmae, Océane, Alex, Coline, Quentin, Benjamin et Wassima.

J'adresse un énorme merci à mes amis. Les anciens Strasbourgeois : Alexandre, Alicia, Camille, Émilie, Marine, Marion² qui m'ont permis d'aérer mon esprit le temps de week-ends et sont toujours présents quoiqu'il arrive. Ceux qui date mais qui sont toujours là : Marine, Claire, Guillaume et Antoine. Un merci particulier à Marine et Claire qui depuis 16 années continuent d'écouter mes déboires, de me soutenir et de partager de merveilleux moments avec moi. Un merci particulier à Fanny qui, malgré l'océan qui se trouve entre nous, a toujours été disponible pour prendre et donner des nouvelles et qui m'a permis le temps de nos appels d'entendre à nouveau le merveilleux accent québécois qu'elle a finalement adopté. Merci à Agathe et Chloé, pour le retour du trio lors de week-ends de folie. Enfin merci à Hermine, sans qui ma vie Dijonnaise n'aurait pas été la même. Une petite pensée pour mes deux amis québécois, Audrey et William, avec qui j'ai tant partagé autour de la chimie.

Pour finir, je tiens à remercier mes grands-parents qui m'ont poussée et me poussent toujours à être positive. Ma mamie, pour les nombreux repas imprévus à m'écouter et me reconforter. Mes "grandes" sœurs : Marie, Lison et Ema pour supporter mon stress, mes plaintes et partager mes crises de folie lorsque je rentrais à la maison. Je n'oublie pas les "petits" Robin, Ambre et Lyra, qui m'ont permis, même si cela était parfois compliqué, de penser à autre chose que mon travail. Enfin merci Maman et Papa, de m'avoir toujours soutenue dans ma vie professionnelle et personnelle, de me pousser à toujours aller plus haut sans oublier que la vie, ce n'est pas que le travail, c'est aussi du plaisir. Merci à tous pour votre patience et votre présence qui me montrent chaque jour la chance que j'ai de vous avoir.

Last but not least, merci à Jason, d'abord pour les premières corrections orthographiques et grammaticales, mais surtout pour le bonheur et le réconfort que tu m'apportes.

Abréviations, acronymes et anglicismes

| | |
|---------------------------|---|
| AAP | L-alanine aminopeptidase |
| Abs | Absorbance |
| AcOH | Acide acétique glacial |
| ACQ | " <i>Aggregation-caused quenching</i> " – Extinction de fluorescence induite par agrégation |
| AIBN | Azobisisobutyronitrile |
| AIE | " <i>Aggregation-induced emission</i> " – Émission induite par agrégation |
| Ala | L-Alanine |
| All | Allyle |
| 7-AMC | 7-Amino-4-méthylcoumarine |
| APTS | Acide <i>para</i> -toluène sulfonique |
| aq. | Aqueux |
| Ar | Argon |
| Aza-BODIPY | Aza-borondipyrrrométhène |
| β -Ala | β -alanine |
| BAP | β -alanine aminopeptidase |
| BBOF | " <i>Double resonance broadband observe</i> " |
| BHQ | <i>Black Hole Quencher</i> |
| BODIPY | Bore-dipyrrrométhane |
| BSA | Albumine de sérum bovin |
| CH ₃ CN ou ACN | Acétonitrile |
| compd | Composé |
| DAD | " <i>Diode Array Detector</i> " – Détecteur à barrette de diodes |
| DBU | 1,8- diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène |
| DCC | <i>N,N'</i> -Dicyclohexycarbodiimide |
| DCM | Dichlorométhane |
| DCP | Chlorophosphate de diéthyle |
| DDQ | 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone |
| DEAC | 7-Diéthylaminocoumarine |

| | |
|----------------|--|
| DIEA | <i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine |
| DMABN | 4- <i>N,N</i> -Diméthylamino-benzonitrile |
| DMAP | 4- <i>N,N</i> -Diméthylaminopyridine |
| DMAS | Diméthylaminostyryle |
| DMF | <i>N,N</i> -Diméthylformamide |
| DPP | Dicétopyrrolopyrrole |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EHC | 7-Hydroxycoumarine-3-carboxylate d'éthyle |
| Em | Émission |
| ESI | " <i>Electrospray Ionization</i> " – Ionisation électrospray |
| ESIPT | " <i>Excited-State Intramolecular Photon-Transfer</i> " – Transfert de proton intramoléculaire à l'état excité |
| EtOH | Ethanol |
| Ex | Excitation |
| EWG | " <i>Electron-withdrawing group</i> " – Groupement électroattracteur |
| FRET | " <i>Föster Resonance Energy Transfer</i> " – Transfert d'énergie par résonance de type Förster |
| GHT | Glutamyltransférase |
| GSH | Glutathion |
| HATU | Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3 <i>H</i> -[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridine-3-yloxy)méthaniminium |
| HClO | Acide hypochloreux |
| hNQO1 | " <i>Human quinone oxidoreductase-1</i> " – Quinone 1 H deshydrogenase |
| HOAt | 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazole |
| HOMO | " <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> " – Orbitale la plus basse en énergie, occupée |
| HPLC | " <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> " – Chromatographie liquide haute performance |
| HPQ | 2-(2'-hydroxyphényl)-4(3 <i>H</i>)-quinazolinone |
| HRMS | Spectrométrie de masse haute résolution |
| ICT | " <i>Internal (ou Intramolecular) Charge Transfer</i> " – Transfert de charge interne ou intramoléculaire |

| | |
|----------------------|---|
| IC | " <i>Internal conversion</i> " - Conversion interne |
| ISC | " <i>Intersystem crossing</i> " – Phénomène de croisement intersystème |
| (N)IR I ou II | (Proche) Infrarouge I : 650 – 900 nm ; II : 1000 – 1700 nm |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| LAP | Leucine Aminopeptidase |
| LUMO | " <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> " – Orbitale la plus haute en énergie, non-occupée |
| MAP | Méthionine aminopeptidase |
| <i>m</i> -CPBA | Acide <i>meta</i> -chloroperbenzoïque |
| Me | Méthyle |
| MeOH | Méthanol |
| LRMS | Spectrométrie de masse basse résolution |
| N ₂ | Diazote |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NBS | <i>N</i> -bromosuccinimide |
| NHS | <i>N</i> -hydroxysuccinimide |
| nm | Nanomètre |
| NO | Monoxyde d'azote |
| NTR | Nitroréductase |
| OA | " <i>Open Access</i> " – Libre accès |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PABA | Alcool <i>para</i> -aminobenzylique |
| PAL | Phosphatase alcaline |
| PB | " <i>Phosphate Buffer</i> "- Tampon phosphate |
| PBS | " <i>Phosphate Buffered Saline</i> " – Tampon phosphate salin |
| PDT | Thérapie photodynamique |
| Pd/C | Palladium sur charbon |
| PE | Éther de pétrole |
| PeT | Transfert d'électron photo-induit |
| PGA | Amidase de pénicilline G |

| | |
|-------------------------|--|
| pH | Potentiel hydrogène |
| PhAc(Cl) | (Chlorure de) phénylalcétyle |
| Phen | Phénanthroline |
| PHB | <i>para</i> -aminobenzyle |
| PHBA | Alcool <i>para</i> -hydroxybenzylique |
| PhMe | Toluène |
| PPD | <i>para</i> -phénylènediamine |
| <i>p</i> -TsOH | Acide <i>para</i> -toluènesulfonique |
| QY | " <i>Quantum Yield</i> " – Rendement quantique |
| RMN/NMR | Résonance Magnétique Nucléaire |
| ROS | " <i>Reactive Oxygen Species</i> " – Espèces réactives de l'oxygène |
| sat. | Saturé |
| SET | " <i>Single Electron Target</i> " – Transfert mono-électronique |
| S/N | Rapport signal sur bruit |
| S _N | Substitution Nucléophile |
| S _N Ar | Substitution Nucléophile Aromatique |
| SIM | " <i>Single ion monitoring</i> " – mode d'ions sélectionnés |
| STED | " <i>Simulated-emission-depletion</i> " – Déplétion par émission stimulée |
| T. A. / RT | Température ambiante |
| TBET | Transfert d'énergie à travers les liaisons |
| TBHP | Hydroperoxyde de <i>tert</i> -butyle |
| TBO | " <i>Triple Resonance Broad Band</i> " |
| TBN | Nitrite de <i>tert</i> -butyle (tBuONO) |
| TBS | " <i>Trypcase Soy Broth</i> "- Bouillon de soja tryptique |
| TEA ou Net ₃ | Triéthylamine |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| TMR | Tétraméthylrhodamine |
| TMS | Tétraméthylsilane |
| TICT | " <i>Twisted Internal Charge Transfer</i> " – Transfert de charge intramoléculaire avec changement conformationnel |
| TNT | 2,4,6-Trinitrotoluène |

| | |
|-------|---|
| THF | Tétrahydrofurane |
| TrCl | Chlorure de triphénylméthyle ou chlorure de trityle |
| u.m.a | Unité arbitraire de masse |
| UV | Ultraviolet |
| Vis | Visible |
| 4-MU | 4-Méthylombélliférone ou 4-Méthylumbelliférone |

Préambule

Ces travaux de thèse ont été effectués entre le 1^{er} Octobre 2017 et le 30 septembre 2020 au sein de l'équipe "Polyamine, Porphyrines, Développements et Applications (P2DA)" (ICMUB, UMR CNRS 6302, Université de Bourgogne Franche-Comté, bât. Mirande situé sur le campus de Dijon de l'Université de Bourgogne, www.icmub.com), sous la direction du Prof. Anthony Romieu, le co-encadrement du Dr. Ibai Valverde et sous le parrainage du département R&D Microbiologie de la société bioMérieux (site de La Balme-Les-Grottes, Isère) par l'intermédiaire de M. Sylvain Orega et du Dr. Valérie Chalansonnet. Par ailleurs, dans le cadre du dispositif JCE, j'ai suivi le Master Administration des Entreprises au sein de l'IAE de Dijon qui correspond à 270 heures de cours suivies auxquelles s'ajoutent des examens et des dossiers qui ont permis à l'évaluation des compétences acquises. J'ai aussi pu bénéficier d'une formation en entrepreneuriat dispensée par des professeurs de la Burgundy Business School de Dijon (20 h).

Tous les travaux expérimentaux rapportés dans ce manuscrit sont issus de mon travail personnel sauf mention explicite du contraire. J'ai en particulier collaboré avec un membre de mon équipe, le Dr. Kévin Renault sur le projet présenté dans le troisième chapitre de ce manuscrit. De plus, la validation biologique des molécules synthétisées et présentées dans le dernier chapitre de ce mémoire, notamment les expériences sur cultures bactériennes, ont été effectuées en collaboration avec le Dr. Valérie Chalansonnet au sein du département R&D Microbiologie de la société bioMérieux, au sein de l'équipe de M. Sylvain Orega, et ce lors d'un séjour de deux mois sur leur site (1^{er} juillet 2019 au 28 août 2019). Les caractérisations analytiques (analyse élémentaire, IR, RMN, UV-Vis/fluorescence, spectrométrie de masse ESI haute ou basse résolution et analyses HPLC en phase inverse ou par chromatographie ionique) des molécules synthétisées ont été effectuées par moi-même mais aussi par des personnels de PACSMUB ("Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne", www.wpcm.fr) qui sont explicitement remerciés ou associés comme co-auteurs dans les publications émanant de ces travaux. L'ensemble des résultats expérimentaux sont reportés dans les cahiers de laboratoire X031646 et X031669. Il est également important de souligner l'aide matérielle (dons de nombreux réactifs et de produits synthétisés "*in house*") apportée par l'ancien laboratoire du Prof. Anthony Romieu (équipe de Chimie Bio-Organique du laboratoire COBRA, UMR CNRS 6014, Université & INSA de Rouen, bât. IRCOF situé sur le campus de Mont-Saint-Aignan de l'Université de Rouen) dans la réalisation de ces travaux.

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

synthétisées et évoquées dans ce manuscrit, est disponible pour les chapitres 1 à 4 afin de faciliter la lecture du document. Il est important de noter que les références bibliographiques sont uniquement référencées en note de bas de page et la numérotation de celles-ci est propre à chaque chapitre.

Ce manuscrit rassemble l'ensemble des résultats obtenus lors de mes trois années de thèse dont la majorité a été dédiée au travail expérimental de synthèse, d'analyse et de validation (bio)analytique des outils chimiques envisagés. Ce travail s'est inscrit dans une thématique émergente qui concerne la synthèse *in-situ* de fluorophores organiques pour des applications en biodétection. Plus précisément, il a concerné le développement d'outils chimiques permettant de valider ce concept *via* une activation enzymatique modèle. Deux types de précurseurs "cagés" (sondes fluorogéniques fondées sur le principe du "covalent assembly") ont été envisagés dans le but de former, *via* des processus domino plus ou moins complexes et biocompatibles, divers fluorophores organiques couvrant des gammes spectrales complémentaires. Par ailleurs, nous espérons que ces travaux pourront fournir des pistes et des solutions pouvant servir aux actuels et futurs membres de notre équipe ainsi qu'aux nombreux chercheurs (des secteurs académique et privé) travaillant dans les domaines de la (bio)détection et de l'imagerie moléculaire mettant en jeu la modalité optique de fluorescence.

Sommaire

Introduction Générale

| | |
|--|----|
| I. Concepts généraux de la fluorescence | 23 |
| II. Le principe d'une détection fluorogénique | 28 |
| II.1. Les sondes pro-fluorescentes ou pro-fluorophores | 29 |
| II.1.1. Chemosenseurs et chemodosimètres fluorescents | 30 |
| II.1.2. Les différentes réponses fluorogéniques | 31 |
| II.2. Les processus permettant la modulation de la fluorescence | 32 |
| II.2.1. Transfert de charge interne | 33 |
| II.2.2. Transfert d'électron photo-induit | 34 |
| II.2.3. Transfert de proton intramoléculaire..... | 35 |
| II.2.4. Transfert d'énergie..... | 36 |
| II.2.5. AIE (" <i>Aggregation-induced emission</i> ") et ACQ (" <i>Aggregation-caused quenching</i> ") | 41 |
| II.2.6. L'effet d'atome lourd..... | 42 |
| II.3. Sondes pro-fluorescentes enzymo-activables <i>via</i> la modification structurale d'un fluorophore | 43 |
| III. Présentation des travaux de thèse | 46 |

Chapitre 1 : Synthèse de colorants fluorescents de type hétéro-xanthène

| | |
|---|----|
| I. État de l'Art | 51 |
| I.1. Xanthènes..... | 51 |
| I.1.1. Historique et généralités structurales | 51 |
| I.1.2. Propriétés spectrales..... | 54 |
| I.1.3. Stratégies de modifications du cœur xanthène pour approcher des longueurs d'ondes dans le NIR-I..... | 57 |
| I.2. Les Hétéro-xanthènes..... | 62 |
| I.2.1. Hétéro-xanthènes du groupe 13..... | 62 |
| I.2.2. Hétéro-xanthènes du groupe 14..... | 63 |
| I.2.3. Hétéro-xanthènes du groupe 15..... | 64 |

| | |
|---|-----|
| I.2.4. Hétéro-xanthènes du groupe 16..... | 68 |
| I.3. Vers la synthèse d'hétéro-pyronines..... | 71 |
| II. Résultats et discussions | 72 |
| II.1. Synthèse de dérivés sulfone-xanthènes..... | 72 |
| II.1.1. Article 1. "Synthesis, stability and spectral behavior of fluorogenic sulfone-pyronin and sulfone-rosamine dyes"..... | 73 |
| II.1.2. Conclusions et perspectives..... | 87 |
| II.2. Synthèse et étude physico-chimique d'une Si-pyronine | 88 |
| II.2.1. Les dérivés Si-rhodamines/rosamines..... | 89 |
| II.2.2. Article 2. "Quest for novel fluorogenic xanthene dyes: Synthesis, spectral properties and stability of 3-imino-3 <i>H</i> -xanthen-6-amine (pyronin) and its silicon analog"..... | 95 |
| II.2.3. Conclusions et perspectives..... | 104 |
| II.3. Synthèses et études physico-chimiques de Si-pyronines non-symétriques | 106 |
| II.3.1. Article 3. "Synthetic routes to novel fluorogenic pyronins and silicon analogs with far-red spectral properties and enhanced aqueous stability" | 106 |
| III. Conclusions et Perspectives | 118 |

Chapitre 2 : Sondes de type "*covalent assembly*" conduisant à la formation *in situ* d'hétéro-pyronines fluorescentes

| | |
|---|-----|
| I. État de l'Art..... | 123 |
| I.1. Sondes de types " <i>covalent assembly</i> "..... | 123 |
| I.1.1. Concept général..... | 123 |
| I.1.2. Historique et exemples..... | 124 |
| I.2. Sondes de types " <i>covalent assembly</i> " conduisant à la formation <i>in situ</i> de cœurs xanthène..... | 128 |
| I.2.1. Travaux du groupe de Y. Yang | 128 |
| I.2.2. Travaux de notre groupe..... | 131 |
| II. Résultats et discussions | 139 |
| II.1. Vers la synthèse de précurseurs "cagés" conduisant à la formation <i>in situ</i> d'une Si-pyronine fluorescente après activation enzymatique..... | 139 |

| | |
|---|-----|
| II.1.1. Structure générale du précurseur "cagé" | 139 |
| II.1.2. Stratégie de synthèse du précurseur "cagé" | 140 |
| II.2. Synthèse du précurseur "cagé" conduisant à la formation de GD99 après activation enzymatique | 141 |
| II.2.1. Première stratégie <i>via</i> une protection de l'aldéhyde | 141 |
| II.2.2. Deuxième stratégie <i>via</i> un alcool benzylique protégé | 147 |
| II.2.3. Troisième stratégie : introduction tardive du motif formyle..... | 149 |
| III. Conclusions et perspectives..... | 150 |

Chapitre 3 : Sondes de type "*covalent assembly*" conduisant à la formation *in situ* de quinoxalin-2(1*H*)-ones

| | |
|--|-----|
| I. Les quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones | 155 |
| I.1. Synthèses et modifications structurales | 155 |
| I.2. Propriétés photophysiques..... | 159 |
| I.3. Utilisations en tant que réactifs fluorescents de dérivatisation et sondes fluorogéniques..... | 163 |
| II. Résultats et discussions | 166 |
| II.1. Méthode de validation d'une sonde fluorescente de type " <i>covalent assembly</i> " | 168 |
| II.2. Article 4. "Fluorogenic Enzyme-Triggered Domino Reactions Producing Quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-one-based Heterocycles | 170 |
| II.3. Travaux complémentaires – Détection d'une activité de type nitroréductase | 180 |
| III. Conclusions et perspectives | 182 |

Chapitre 4 : Substrats fluorogéniques conventionnels dérivés d'une nouvelle bis-sulfonyl-*para*-phénylènediamine fluorescente. Application en microbiologie

| | |
|--|-----|
| I. État de l'Art..... | 189 |
| I.1. Identification des bactéries | 191 |
| I.2. Substrats enzymatiques fluorogéniques en microbiologie..... | 192 |
| I.3. Substrats fluorogéniques pour la détection de protéases | 195 |

| | |
|---|-----|
| I.3.1. Les substrats ciblant la L-alanine aminopeptidase | 195 |
| I.3.2. Les substrats ciblant la β -alanine aminopeptidase..... | 197 |
| I.3.3. Les substrats ciblant la pénicilline G amidase | 200 |
| II. Résultats et discussions | 203 |
| II.1. Synthèse du fluorophore et des sondes fluorogéniques..... | 204 |
| II.1.1. Synthèse du fluorophore BMeS- <i>p</i> -A..... | 204 |
| II.1.2. Synthèse d'un substrat fluorogénique sensible à une activité de type NTR | 205 |
| II.1.3. Synthèse d'un substrat fluorogénique sensible à la β -alanine aminopeptidase..... | 206 |
| II.2. Étude spectrale du fluorophore GD148 et du substrat fluorogénique GD155 | 207 |
| II.3. Évaluation <i>in vivo</i> de la sonde GD155 | 209 |
| II.3.1. Évaluation de l'hydrolyse de la sonde GD155 dans des souches bactériennes..... | 209 |
| II.3.2. Évaluation de l'hydrolyse de la sonde GD155 par des lysats bactériens..... | 211 |
| III. Conclusions et perspectives | 212 |
| Conclusions et perspectives | |
| I. Conclusions..... | 217 |
| II. Perspectives..... | 220 |

Introduction Générale

I. Concepts généraux de la fluorescence

Parmi les phénomènes de luminescence (Tableau 1) caractérisés par l'émission de lumière d'une espèce chimique excitée retournant à son état électronique fondamental, celui qui focalisera toute notre attention est la fluorescence. Elle fait partie, avec la phosphorescence, des phénomènes de photoluminescence qui correspondent à une excitation de l'atome ou de la molécule *via* l'absorption de photons provenant d'une source lumineuse¹.

Tableau 1. Les différents types de luminescence².

| Modes d'excitations | Types de luminescence |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Lumière | Photoluminescence |
| Réaction chimique | Chémiluminescence |
| Réaction biochimique | Bioluminescence |
| Rayonnements ionisants | Radioluminescence |
| Électrons accélérés | Electroluminescence |
| Champ électrique | Cathodoluminescence |
| Élévation de température | Thermoluminescence |
| Ultrasons | Sonoluminescence |
| Frottements, rupture, déformation | Triboluminescence |

Ainsi, lorsqu'un composé absorbe de l'énergie lumineuse (photons), ses électrons peuvent passer d'un état fondamental singulet (S_0) à un état excité singulet instable de plus haute énergie ($\geq S_1$). Le retour à l'état fondamental peut alors prendre différents chemins de désexcitation (Figure 1).

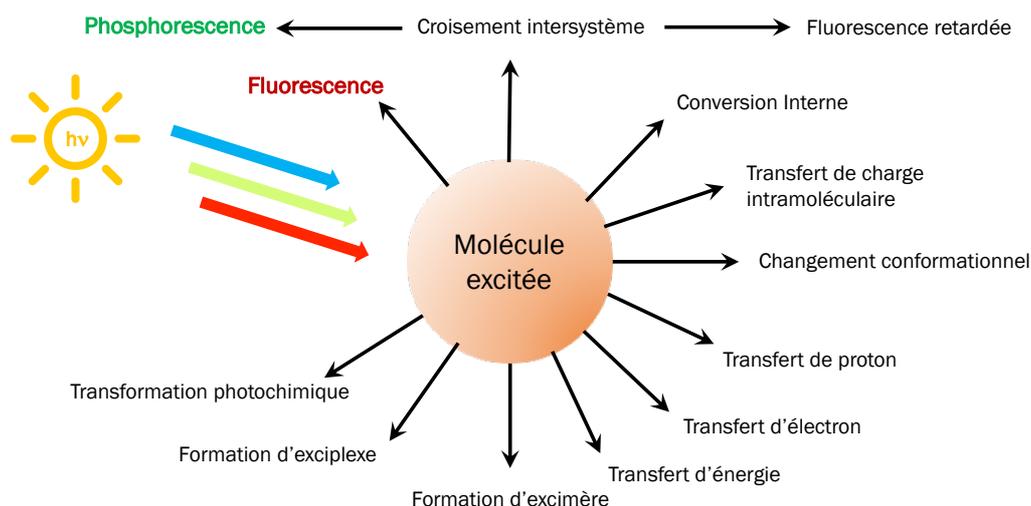


Figure 1. Les différents chemins de désexcitation envisageables après une excitation photonique (Illustration inspirée du livre de B. Valeur²).

¹ P. S. Francis, C. F. Hogan, Luminescence. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, S. D. Kolev, I. D. McKelvie, Eds. **2008**, Chapitre 13.

² B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.

La fluorescence se caractérise par une transition radiative de type $S_1 \rightarrow S_0$, sans changement d'état de spin de l'électron excité, et s'accompagne d'une émission de lumière ; on parle alors de processus radiatif. La phosphorescence est, quant à elle, issue d'une transition radiative d'un état excité triplet T_1 vers l'état fondamental S_0 ; l'état triplet T_1 résulte de la transition électronique de $S_1 \rightarrow T_1$ par croisement inter-système (ISC, pour "*intersystem crossing*") non radiatif. Ces deux phénomènes se différencient également par la durée de vie de leur état excité, compris entre 10^{-9} et 10^{-6} s pour l'état excité S_1 et entre 10^{-3} et 10^3 s (voire parfois plusieurs minutes) pour l'état excité T_1 . Il est important de préciser que lorsque le composé absorbe des photons, l'état excité S_n atteint est souvent à un niveau supérieur à l'état excité S_1 . Ainsi, une première transition électronique non-radiative, nommée conversion interne (IC, pour "*Internal Conversion*"), a lieu et permet le passage des spins de même multiplicité d'un état électronique vers un autre état d'énergie plus faible ($S_n \rightarrow S_1$ ou $T_n \rightarrow T_1$). Enfin, il est possible que la fluorescence soit inhibée (ou "quenchée") par différents processus : collision de l'espèce excitée avec d'autres espèces environnantes (e.g., molécules de solvant), formations d'agrégats, ou de complexes. L'ensemble de ces transitions électroniques sont résumées sur le diagramme de Perrin-Jablonski simplifié (Figure 2). Enfin, le spectre d'émission de fluorescence est généralement situé à des longueurs d'ondes supérieures (i.e., plus basse en énergie) à celles du spectre d'absorption en raison des pertes d'énergie accompagnant les transitions non-radiatives dans l'état excité³. La différence entre les maxima d'absorption et d'émission est nommée déplacement de Stokes et apparaît comme l'une des grandeurs photophysiques importantes caractérisant une molécule fluorescente ; son unité est le cm^{-1} mais dans un souci de facilité, il est souvent exprimé en nm (Figure 3A). Une autre grandeur importante, le rendement quantique de fluorescence (ϕ_F ou QY) permet d'évaluer l'efficacité de fluorescence. Il correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés, et il est compris, par définition, entre 0 et 1. Il peut aussi être calculé à l'aide des constantes de vitesse des transitions radiatives et non-radiatives (respectivement k_r et k_{nr}) (Figure 3B). Ces deux constantes permettent aussi de calculer la durée de vie (τ_s) de l'état excité S_1 d'un fluorophore qui est généralement comprise entre 0.1 et 4 ns pour les fluorophores organiques⁴ (Figure 3C). Le dernier paramètre important pour caractériser un fluorophore est la brillance (B_s), qui qualifie l'intensité de fluorescence et qui est définie comme le produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire (ϵ , exprimé en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), qui caractérise quant à lui la capacité d'une molécule à absorber les photons (Figure 3D).

³ Il est important de noter que dans certains cas, comme le peuplement d'un état excité par absorption multi-photonique, aussi appelé phénomène d'*upconversion*, la fluorescence sera de type anti-Stokes (i.e., longueur d'onde d'émission inférieure à la longueur d'onde d'absorption). Pour une revue sur l'exploitation de ce phénomène dans la construction de matériaux appliquée au domaine de la biologie, voir : X. Zhu, Q. Su, W. Feng, F. Li, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 1025-1039.

⁴ P. Sarder, D. Maji, S. Achilefu, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 963-974.

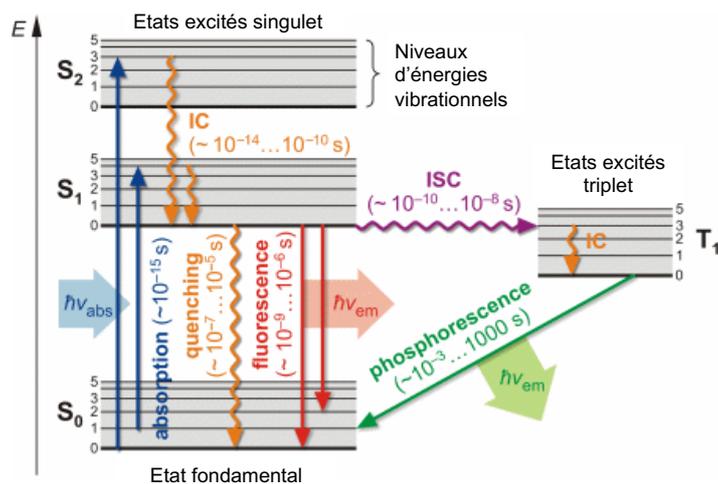


Figure 2. Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié. Les transitions radiatives sont représentées par des flèches droites et celles non-radiatives par des flèches ondulées⁵.

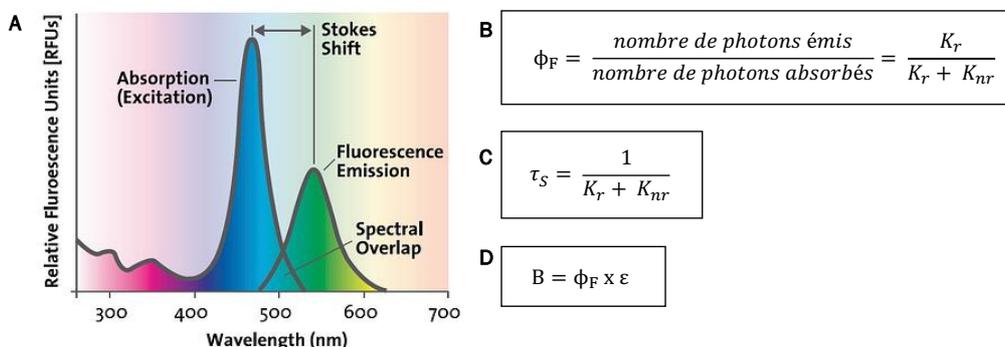


Figure 3. Représentation des spectres d'absorption et d'émission d'un fluorophore et formules mathématiques permettant d'accéder au rendement quantique de fluorescence (B), au temps de vie de fluorescence (C) et à la brillance (D). Illustration disponible sur le site de la société Tecan⁶.

Toutes ces caractéristiques peuvent être profondément influencées par de nombreux paramètres extérieurs. La température peut faire varier la position des maxima d'absorption et d'émission, mais aussi la nature du milieu utilisé pour les mesures des caractéristiques photophysiques (*i.e.*, polarité, viscosité, pH, l'ajout d'additifs, ...), on parle alors de solvatochromisme. L'apparition d'agrégats due aux interactions entre molécules d'un même fluorophore peut également modifier ses propriétés spectrales. Si une modification de l'allure du spectre ou un déplacement du maximum d'émission est observé, on parlera d'agrégats de type J ou H⁷ (Figure 4). L'agrégation peut aussi entraîner une apparition de l'émission, on parle alors d'émission induite par agrégation (AIE pour "Aggregation-Induced Emission") ou provoquer une diminution de l'intensité de fluorescence, on parle dans ce cas d'extinction causée par agrégation

⁵ Illustration adaptée de <https://home.uni-leipzig.de/pwm/web/?section=introduction&page=fluorescence> (visité le 02/07/2020).

⁶ <https://www.tecan.com/blog/how-to-develop-an-optimal-fluorescence-assay> (le 4/07/2020).

⁷ a) A. Einfeld, J. S. Briggs, *Chem. Phys.*, **2006**, 324, 376-384; b) M. Kasha, *Radiat. Res.*, **2012**, 178, AV27-AV34; c) D. Zhai, W. Xu, L. Zhang, Y.-T. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 2402-2411.

(ACQ pour "Aggregation-Caused Quenching"). Ces deux phénomènes seront développés plus loin dans cette introduction.

La formation d'excimères⁸ ou d'exciplexes⁹ peut aussi intervenir. Dans les deux cas, elle est caractérisée par un déplacement bathochrome et un élargissement de la bande d'émission. Toutefois la formation d'exciplexe peut quant à elle, diminuer la fluorescence par la désactivation de son état excité pour donner des paires d'ions puis des ions libres solvatés. Ce processus de désactivation est favorisé dans les solvants polaires². Enfin, un dernier facteur ayant un impact important sur la fluorescence est le photoblanchiment. Il se définit par l'extinction irréversible du fluorophore suite à une excitation continue et prolongée, qui trouve son origine dans les réactions chimiques pouvant avoir lieu à l'état excité entre le fluorophore et certaines molécules du milieu environnant (principalement l'oxygène, notamment dans son état singulet 1O_2) pour conduire généralement à des dérivés dont le système d'électrons π conjugués a été altéré¹⁰.

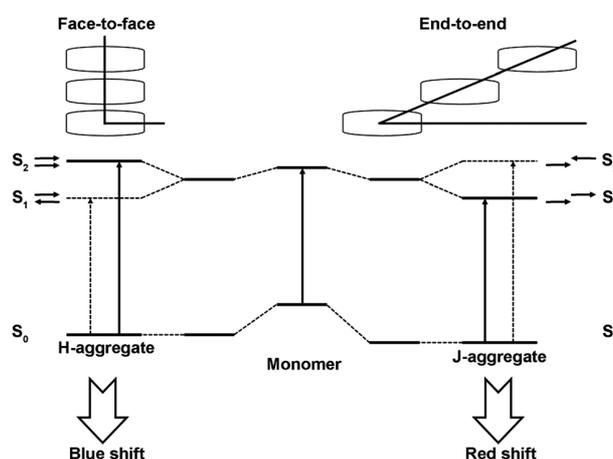


Figure 4. Les deux types d'agrégats et leurs effets sur le spectre d'émission. Illustration issue de la référence 7c. © 2014 Royal Society of Chemistry.

Les architectures moléculaires présentant des propriétés de fluorescence sont très diverses. Il existe les biomolécules endogènes de petite taille (e.g., les acides aminés à chaîne latérale aromatique, le co-facteur NAD(P)H ou les dérivés porphyriniques, comme l'hème ferrique de l'hémoglobine) qui possèdent une fluorescence intrinsèque, les complexes métalliques (e.g., dérivés des cations lanthanide (III)), les nanocristaux et les molécules organiques (*i.e.*, également désignés par les termes fluorophores organiques ou synthétiques)¹¹. Généralement, la structure de ces dernières se caractérise par la présence d'un système π -conjugué étendu, connu sous le

⁸ Excimère : Dimère MM^* à l'état excité formé suite à la collision d'une molécule excitée M^* et d'une molécule identique non excitée M .

⁹ Exciplexe : Complexe E^* à l'état excité formé suite à la collision d'une molécule excitée (donneur ou accepteur d'électron) avec une molécule différente non excitée (donneur ou accepteur d'électrons).

¹⁰ a) T. Ha, P. Tinnefeld, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2012**, 63, 595-617; b) E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba, M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 1057-1075. Pour le cas, plus particuliers des cyanines, voir : A. P. Gorka, R. R. Nani, M. J. Schnermann, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 7584-7598.

¹¹ Pour des revues sur les fluorophores autres qu'organiques, voir : a) M. Ni, S. Zhuo, M. Ni, H. Yu, S. Zhuo, P. T. C. So, H. Yu, P. T. C. So, H. Yu, H. Yu, *J. Biophotonics*, **2017**, 10, 11-23; b) I. Martinic, S. V. Eliseeva, S. Petoud, *J. Lumin.*, **2017**, 189, 19-43.

nom de chromophore, fréquemment associé à un ou plusieurs groupes auxochromes. Les principales familles de fluorophores organiques, qui se distinguent de par la structure de leur chromophore principal, sont présentées dans la Figure 5. Soulignons toutefois que la revue dont est issue cette illustration date de 2008¹² et que depuis de nouvelles classes de colorants fluorescents ont émergé et rencontré un vif succès¹³ (e.g., aza-BODIPYs¹⁴, dicétopyrrolopyrroles (DPP)¹⁵, hybrides dihydroxanthène-hémicyanine¹⁶, ...). Dans les prochains paragraphes, seule l'utilisation de fluorophores organiques dans la conception de sondes fluorogéniques va être présentée. En outre, les fluorophores organiques sur lesquels notre intérêt s'est porté sont ceux de la famille (hétéro)xanthène et des quinoxalin-2(1*H*)-ones qui seront respectivement décrites plus en détails dans un état de l'art aux chapitres 1 et 3.

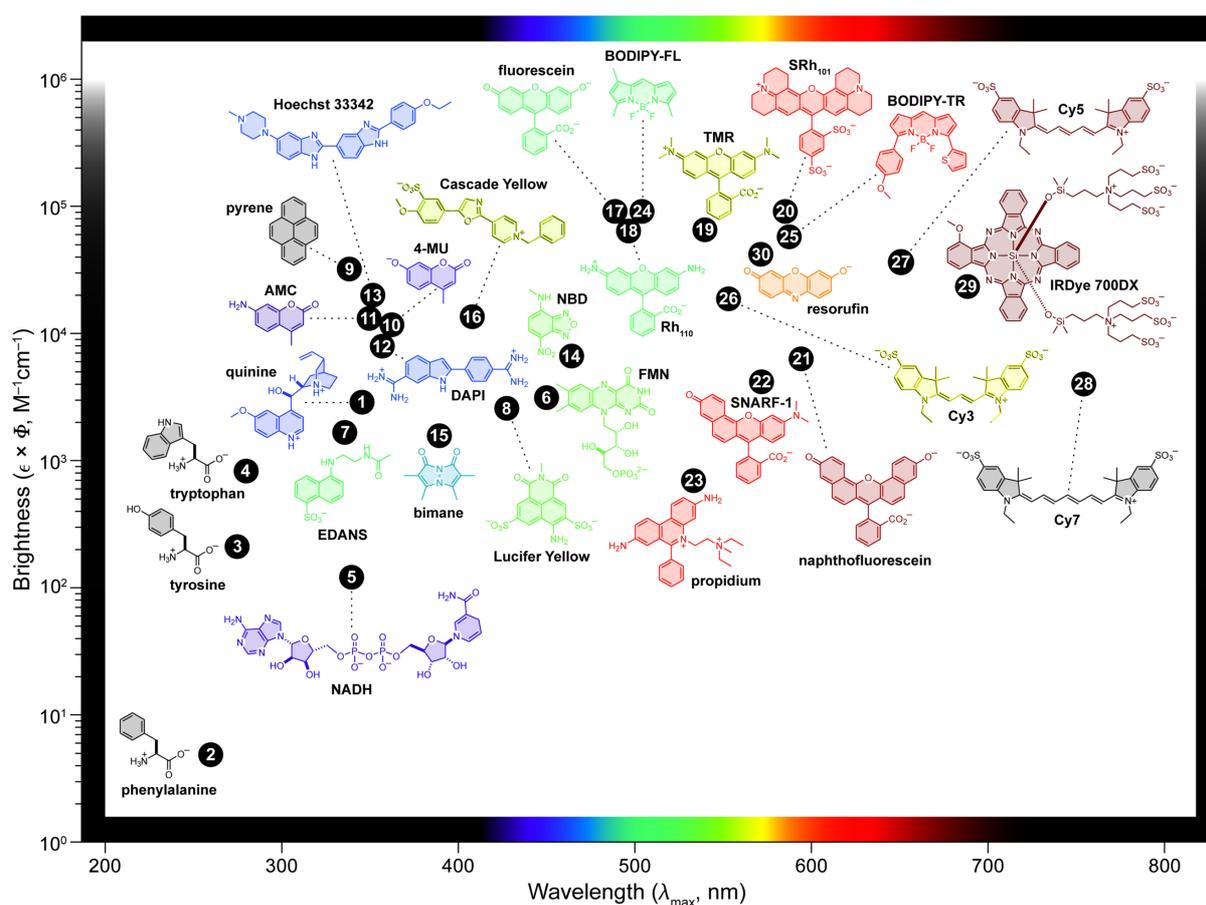


Figure 5. Représentation des principales familles de fluorophores organiques classées en fonction de leur brillance et de leur maximum d'émission. Illustration issue de la revue de L. D. Lavis et R. T. Raines¹². © 2008 American Chemical Society.

¹² L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, 142-155.

¹³ L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 855-866.

¹⁴ Y. Ge, D. F. O'Shea, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 3846-3864.

¹⁵ M. Grzybowski, D. T. Gryko, *Adv. Opt. Mater.*, **2015**, 3, 280-320.

¹⁶ H. Chen, B. Dong, Y. Tang, W. Lin, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50, 1410-1422.

II. Le principe d'une détection fluorogénique

L'un des principaux avantages lié à l'utilisation de fluorophores organiques pour imager, détecter des processus ou analytes biologiques, est le lien entre leurs structures chimiques et leurs propriétés photophysiques. Il est ainsi possible d'utiliser certaines molécules directement pour le marquage fluorescent des cellules ou de certains de leurs organites (souvent appelé "staining", Figure 6D) en jouant sur les caractéristiques du milieu (pH, polarité, ...) qui vont influencer la structure du fluorophore et donc sa fluorescence¹⁷. Une seconde possibilité est de vectoriser le fluorophore à une autre molécule (généralement une biomolécule ou un biopolymère) pour suivre (en temps réel) l'interaction de cette dernière avec une cible biologique et/ou l'environnement de la cible. Dans cette méthode, le conjugué fluorophore-biomolécule ne doit pas interférer avec d'autres processus biochimiques natifs du système biologique étudié¹⁸ (Figure 6A). La dernière stratégie est de modifier chimiquement le fluorophore afin d'obtenir des sondes fluorescentes dites "intelligentes", souvent nommées sondes fluorogéniques¹⁹. Parmi les différentes stratégies possibles, celles basées sur la modulation des propriétés spectrales du fluorophore *via* l'introduction d'un ou de plusieurs groupements jouant un rôle d'extincteur de la fluorescence ou *via* l'interaction et/ou la réaction avec l'espèce à détecter, sont fréquemment utilisées (Figure 6B-C). Dans ce manuscrit, seuls les composés basés sur cette dernière approche vont être étudiés. On parle alors de pro-fluorophore ou de sonde pro-fluorescente, de plus, la réaction entre la sonde et l'analyte ciblé sera toujours non réversible (*vide infra*).

¹⁷ W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang, L. Yuan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 13658-13699.

¹⁸ Pour des revues présentant les différentes stratégies mises en œuvre pour la marquage fluorescent de biomolécules, voir : a) M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 190-212; b) K. M. Dean, A. E. Palmer, *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, 10, 512-523; c) G. Zhang, S. Zheng, H. Liu, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 3405-3417; d) Y. Ha, H.-K. Choi, *Chem. Biol. Interac.*, **2016**, 248, 36-51.

¹⁹ a) P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 9307-9320; b) B. M. Luby, D. M. Charron, C. M. MacLaughlin, G. Zheng, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2017**, 113, 97-121.

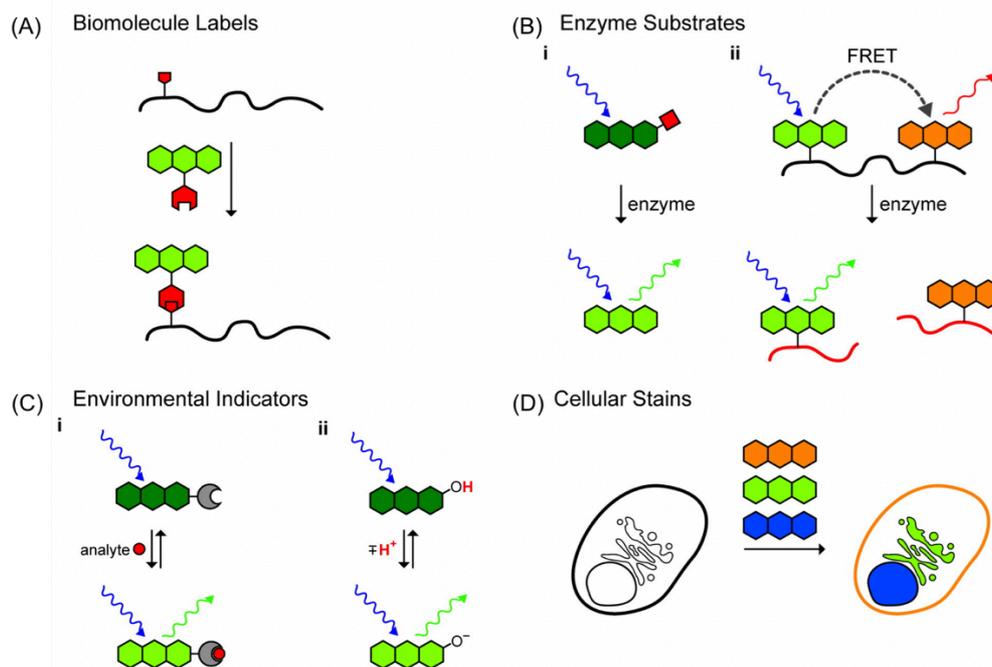


Figure 6. Représentation schématique de l'utilisation de fluorophores organiques dans les différentes stratégies couramment mises en œuvre pour l'étude des systèmes biologiques. (A) Marquage d'une biomolécule en utilisant par exemple une réaction bioorthogonale. (B) Sondes fluorogéniques basées sur les mécanismes de pro-fluorescence (gauche) et FRET (droite) pour détecter une activité enzymatique. (C) Sondes fluorogéniques permettant la détection d'espèces biologiques ou la mesure de certains paramètres cellulaires. (D) Marquage des organites cellulaires à l'aide d'un fluorophore non fonctionnalisé. Illustration issue de la revue de L. D. Lavis et R. T. Raines¹². © 2008 American Chemical Society.

II.1. Les sondes pro-fluorescentes ou pro-fluorophores

La terminologie pro-fluorescence a été introduite en 2005 par le groupe de R. T. Raines²⁰ au travers de la détection d'une activité de type estérase mettant en jeu un dérivé "cagé" de la rhodamine 110 dont les deux anilines primaires sont amidifiées par un bras espaceur enzymolabile de type "trimethyl lock" (Figure 7). En anglais, on rencontre également le terme "*latent fluorophore*" pour désigner ce type de sondes fluorogéniques. Elle se définit comme la fonctionnalisation du squelette d'un fluorophore par un motif capable d'éteindre ou de diminuer la fluorescence et réactif vis-à-vis de l'analyte cible. Cette modulation de la fluorescence est généralement due à un ou plusieurs processus photophysiques qui vont être décrits plus en détails ci-dessous. On peut aussi noter que la modification chimique du fluorophore, induite par un motif souvent nommé "quencheur" (ou parfois en anglais "*quenching reactive unit*" ou "*triggering unit*"), peut également être réalisée via l'emploi d'un bras espaceur auto-immolable²¹. Ce dernier permet d'espacer le "quencheur" du centre fluorogénique afin de diminuer l'encombrement stérique pouvant parfois nuire à la réaction avec le (bio)analyte ciblé. L'approche la plus simple, et souvent

²⁰ S. S. Chandran, K. A. Dickson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 1652-1653.

²¹ Pour des revues sur les bras espaceurs auto-immolables, voir : a) F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 20-53; b) S. Gnaïm, D. Shabat, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 2970-2984; c) A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 7492-7509; d) J. Yan, S. Lee, A. Zhang, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 6900-6916.

utilisée, pour masquer la fluorescence d'un composé, est la fonctionnalisation de ses fonctions phénols ou anilines primaires²², que l'on nommera alors centre fluorogénique ou interrupteur de fluorescence. Les différentes réactions fluorogéniques possibles entre la sonde pro-fluorescente et l'analyte ciblé sont décrites dans la Figure 8 et appartiennent aux grandes classes de réactions de la chimie organique (*i.e.*, réaction d'addition, d'élimination, processus domino mettant en jeu des réactions de cyclisation/élimination, ...) ²³.

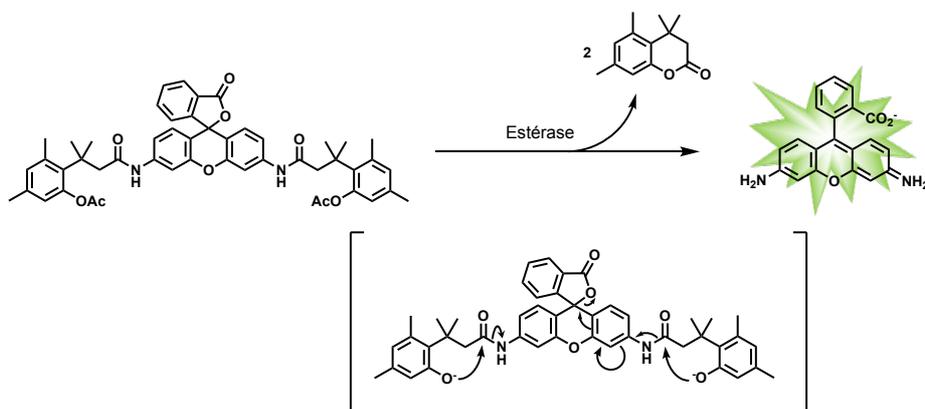


Figure 7. Sonde pro-fluorescente développée par le groupe de R. T. Raines permettant la détection d'une activité de type estérase²⁰.

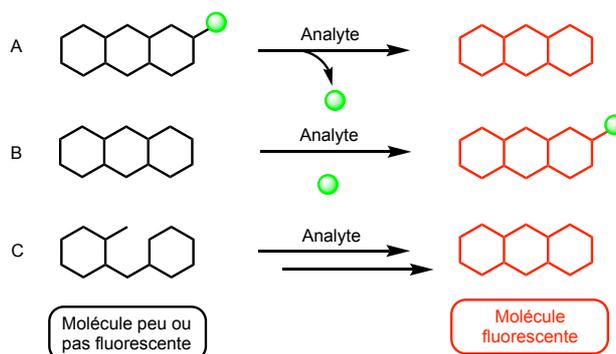


Figure 8. Principe des sondes pro-fluorescentes dont le mécanisme d'activation est fondé sur une réaction chimique fluorogénique. (A) Élimination avec rupture d'une ou de plusieurs liaisons (covalentes ou datives). (B) Addition ou complexation avec formation d'une ou plusieurs liaisons (covalentes ou dative). (C) Réaction domino.

II.1.1. Chemosenseurs et chemodosimètres fluorescents

La bio-imagerie en fluorescence offre une approche unique permettant l'étude du vivant à l'échelle moléculaire et en temps réel²⁴. Il est nécessaire que les sondes développées soient les plus spécifiques possibles et que la réaction avec l'analyte conduise à un changement significatif de leurs propriétés spectrales. Si le processus de détection fluorogénique résulte d'une réaction non-covalente et réversible avec cet analyte (*e.g.*, formation de liaisons hydrogènes, interactions

²² Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 5003-5015.

^{23a)} J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.*, **2012**, 4, 973-984; *b)* K. J. Bruemmer, S. W. M. Crossley, C. J. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 13734-13762.

²⁴ H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2620-2640.

électrostatiques et complexation de cation métallique²⁵), on parlera de chemosenseur fluorescent²⁶. A l'inverse, si la réaction fluorogénique est un processus irréversible, on parle alors de chemodosimètre fluorescent ; la sensibilité de détection est généralement améliorée dans ce dernier cas. Toutefois, il est intéressant de noter que les chemodosimètres ne sont pas utilisables pour observer le changement de concentration d'un analyte en temps réel²⁷.

II.1.2. Les différentes réponses fluorogéniques

Que la sonde fluorogénique soit un chemosenseur ou un chemodosimètre, deux types de réponses sont possibles : la réponse de type intensiométrique et la réponse de type ratiométrique. Dans le premier cas, on distingue les sondes dont l'activation par l'analyte conduit à une exaltation ou une extinction de l'émission de fluorescence, on parle alors respectivement de réponse de type "Off-On" ou "On-Off". Dans le second cas, un déplacement hypso- ou bathochrome des profils d'excitation et d'émission du fluorophore par rapport à la sonde est observable (Figure 9).

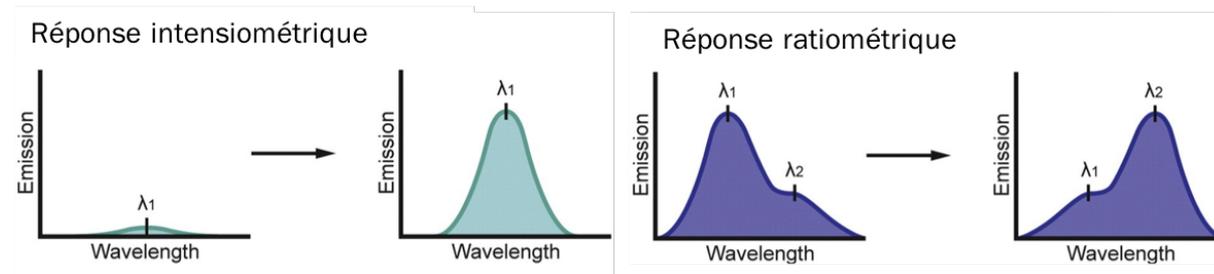


Figure 9. Représentation graphique des différentes réponses fluorogéniques. A gauche, réponse intensiométrique de type "Off-On". A droite, réponse ratiométrique avec déplacement bathochrome du maximum d'émission. Illustration issue de la revue de B. M. Luby *et al.*^{19b}. © 2017 Elsevier.

Afin que l'imagerie en fluorescence de processus biologiques et/ou le suivi d'un (bio)analyte d'intérêt puisse donner un rendu de qualité et produire des résultats fiables et exploitables, il est préférable que les fluorophores utilisés dans la conception des sondes, possèdent des propriétés spectrales dans la zone du NIR-I (650-900 nm, communément appelée "fenêtre thérapeutique") ou du NIR-II²⁸ (1000-1700 nm, notamment NIR-IIa 1300-1400 nm et NIR-IIb 1500-1700 nm) qui a été récemment identifiée comme une seconde fenêtre thérapeutique très prometteuse²⁹. En effet, la gamme spectrale de fluorescence intrinsèque de certaines biomolécules peut s'étendre

²⁵ A. T. Aron, K. M. Ramos-Torres, J. A. Cotruvo, C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.*, **2015**, *48*, 2434-2442.

²⁶ Pour des revues sur des chemosenseurs utilisés pour la détection fluorogénique d'analytes, voir : a) R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 4419-4476; b) H. N. Kim, Z. Guo, W. Zhu, J. Yoon, H. Tian, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 79-93.

²⁷ Pour des revues sur les chemodosimètres utilisés pour la détection fluorogénique d'analytes, voir : a) D.-G. Cho, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1647-1662; b) D. T. Quang, J. S. Kim, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 6280-6301; c) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng, F. Li, *Chem. Rev.*, **2013**, *113*, 192-270; d) S. Singha, Y. W. Jun, S. Sarkar, K. H. Ahn, *Acc. Chem. Res.*, **2019**, *52*, 2571-2581.

²⁸ Pour des revues sur les fluorophores/sondes NIR-II, voir : a) F. Ding, Y. Zhan, X. Lu, Y. Sun, *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, 4370-4380; b) S. He, J. Song, J. Qu, Z. Cheng, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 4258-4278; c) C. Chen, R. Tian, Y. Zeng, C. Chu, G. Liu, *Bioconjugate Chem.*, **2020**, *31*, 276-292; d) J. Huang, K. Pu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 11717-11731.

²⁹ Pour une revue récente sur les progrès des sondes NIR appliquées en bioimagerie, voir : J.-B. Li, H.-W. Liu, T. Fu, R. Wang, X.-B. Zhang, W. Tan, *Trends Chem.*, **2019**, *1*, 224-234.

de 250 nm, pour les acides aminés tel que la L-tyrosine, à 600 nm, pour les hèmes de type porphyrinique métallé par du fer(II). Ainsi, si le milieu biologique contient de tels molécules, l'auto-fluorescence résultante peut conduire à une mauvaise détection due à un bruit de fond trop élevé. De plus, pour les applications *in vivo*, la profondeur du tissu à analyser peut également s'avérer problématique en raison de l'absorption des photons (nécessaires à l'excitation ou émis par le fluorophore) par les tissus ou l'hémoglobine. Ainsi, obtenir des fluorophores absorbants et émettant dans le rouge lointain et/ou le NIR-I/II permet d'obtenir une meilleure pénétrabilité des photons et un rapport signal sur bruit (S/N) optimal³⁰ (Figure 10).

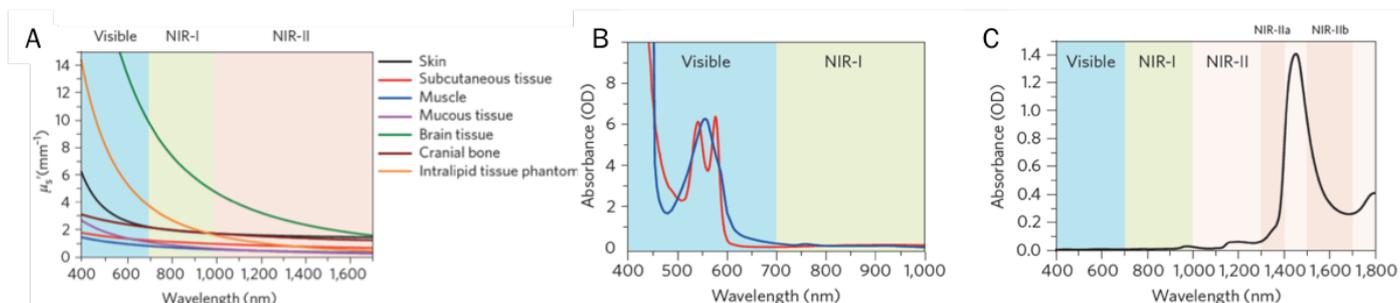


Figure 10. (A) Coefficient de diffusion de différents tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde. (B) Spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine (en rouge) et de la désoxyhémoglobine (en bleu). (C) Spectre d'absorption de l'eau. Illustration issue de la revue de G. Hong et al.³⁰. © Springer Nature.

La modification drastique des propriétés spectrales d'une sonde suite à sa réaction avec l'analyte ciblé, trouve son origine dans la modulation d'un ou de plusieurs processus photophysiques que nous allons maintenant détailler.

II.2. Les processus permettant la modulation de la fluorescence

De nombreux processus photophysiques peuvent conduire à la désactivation des états excités d'un fluorophore et ainsi moduler ses propriétés de fluorescence. Ils sont, de ce fait, souvent exploités dans la conception rationnelle des sondes fluorogéniques. De plus, il est parfois possible que plusieurs mécanismes photophysiques interviennent en même temps, dans la modulation des propriétés spectrales d'une même sonde, toutefois nous n'aborderons pas ce cas dans la partie suivante mais une revue est consultable pour plus d'information³¹. Dans cette partie, une description concise de chaque processus sera présentée et certains seront illustrés par un exemple de sonde issue de la littérature, dont l'application est la détection d'une activité enzymatique, et ce afin de correspondre à la thématique de mes travaux de thèse.

³⁰ G. Hong, A. L. Antaris, H. Dai, *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, *1*, 0010.

³¹ L. He, B. Dong, Y. Liu, W. Lin, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, *45*, 6449-6461.

II.2.1. Transfert de charge interne³²

Lors de l'excitation d'un fluorophore, ses électrons passent de l'orbitale la plus haute occupée (HOMO, pour "*Highest Occupied Molecular Orbital*") à l'orbitale la plus basse vacante (LUMO, pour "*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*") induisant un changement quasi-instantané de son moment dipolaire. Si le composé possède un groupement donneur d'électrons conjugué à un groupement attracteur d'électrons, nommé système "push-pull", le phénomène de transfert de charge intramoléculaire est exalté ainsi que le moment dipolaire. Cette variation va induire un déséquilibre entre les molécules excités et les molécules de solvant environnantes si celles-ci sont polaires. Afin de stabiliser au maximum l'état excité, ces dernières vont se réorganiser de façon plus ou moins lente suivant leur polarité, induisant un déplacement bathochrome du maximum d'émission du fluorophore. Ce phénomène est appelé transfert de charge intramoléculaire (ICT, pour "*Internal Charge Transfer*") et est souvent mis à profit pour la détection de cations³³.

En fonction de la nature du fluorophore et du milieu, l'ICT peut s'accompagner d'une rotation intramoléculaire, on parle alors de transfert de charge interne twisté (TICT, pour "*Twisted Internal Charge Transfer*")³⁴. Le retour à l'état fondamental se fait soit par un processus non-radiatif (un exemple sera présenté dans le chapitre 1), soit de façon radiative et une seconde bande d'émission est observée à des longueurs d'ondes plus élevées. Ce phénomène a été mis en évidence en 1987³⁵, par l'observation du spectre d'émission de fluorescence du 4-*N,N*-diméthylamino-benzonitrile (DMABN) (Figure 11).

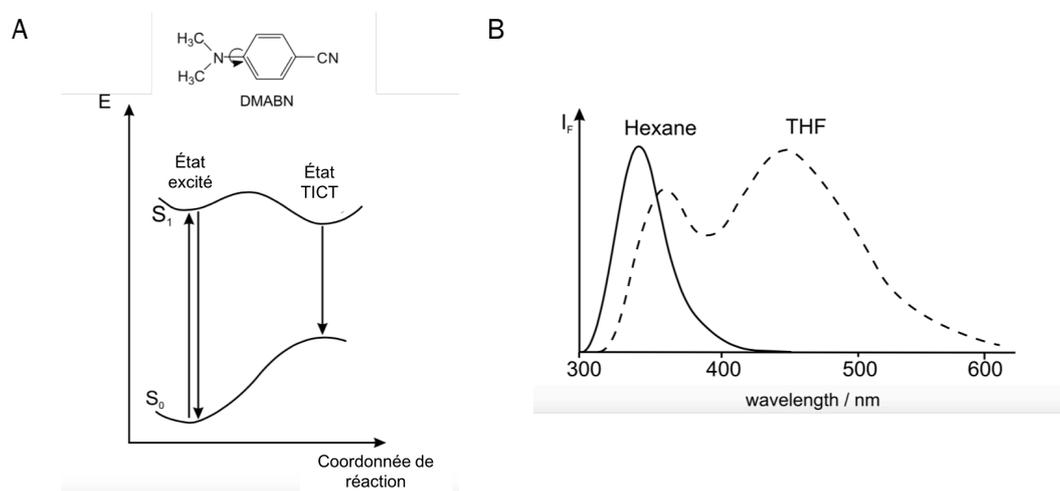


Figure 11. (A) Diagramme d'énergie potentielle de la DMABN mettant en évidence l'énergie de l'état excité et l'énergie de l'état excité twisté dues à la rotation du groupement diéthylamino. (B) Spectres d'émission de fluorescence du DMABN enregistrés respectivement dans l'hexane et le THF. Illustration issue du livre de B. Valeur³². © 2001 Wiley-VCH.

³² B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. In Wiley-CH: Weinheim, **2001**, pp. 62-67.

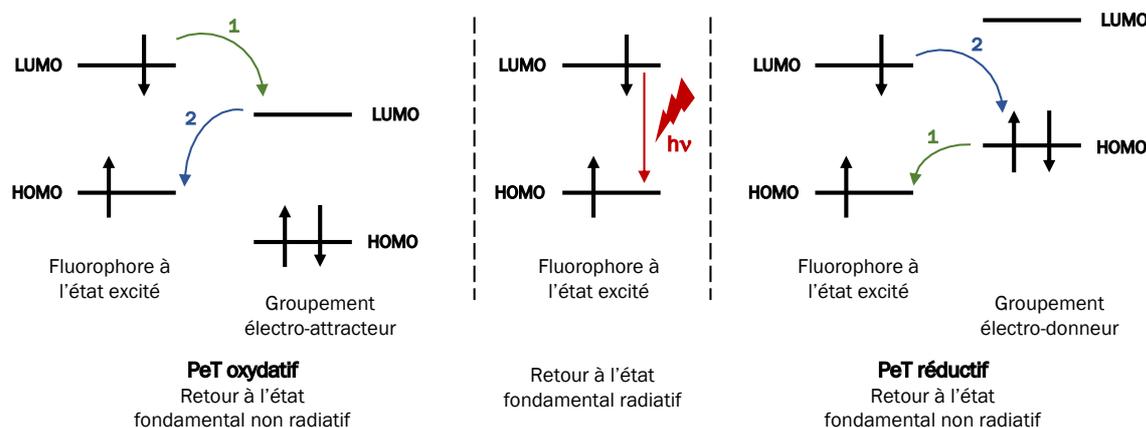
³³ X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 590-659.

³⁴ S. Sasaki, G. P. C. Drummen, G.-i. Konishi, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, *4*, 2731-2743.

³⁵ E. Lippert, W. Rettig, V. Bonačić-Koutecký, F. Heisel, J. A. Miehe, *Photophysics of Internal Twisting*. In *Advances in Chemical Physics*, John Wiley & Sons, Inc. : **1987**..

II.2.2. Transfert d'électron photo-induit

Le phénomène de transfert d'électron photo-induit (PeT, pour "*Photo-induced electron transfert*") est l'un des mécanismes photophysiques fréquemment exploités pour la conception de sondes pro-fluorescentes³⁶. Il se traduit par une inhibition de la fluorescence par un motif accepteur d'énergie, nommé récepteur ou "quencheur". Le processus est basé sur le transfert non radiatif d'un électron de l'état excité du fluorophore vers la LUMO du récepteur spatialement proche ou lié au fluorophore par un espaceur. On parle alors de PeT oxydatif. Le PeT réducteur quant à lui correspond au transfert d'un électron de la HOMO du récepteur vers la HOMO du fluorophore excité, suivi par le transfert non-radiatif de l'électron de la LUMO du fluorophore à l'état excité vers la HOMO du récepteur. Généralement le PeT est de type réducteur (a-PeT) si le quencheur est riche en électrons (e.g., dérivés d'aniline, de phénol, ...) ou oxydatif (d-PeT) si ce groupement est appauvri en électrons (e.g., dérivé de type nitroaryle) (Figure 12). Il est ainsi possible de restaurer la fluorescence du fluorophore *via* la modification chimique du récepteur.



1 et 2 correspondent à la chronologie du transfert d'électrons

Figure 12. Diagramme d'orbitales moléculaires illustrant le retour à l'état fondamental d'un fluorophore *via* un processus de type PeT.

Afin d'illustrer ce phénomène, l'exemple choisi est une sonde sensible à l'activité nitroréductase (NTR) développée par le groupe de W. Feng³⁷ en 2015 (ces enzymes redox seront décrites plus en détails dans le chapitre 2). Cette sonde nommée **Cy7-1** a été construite par simple estérification du motif énolique *meso* d'une cyanine heptaméthine "stabilisée", par l'acide *para*-nitrobenzoïque. Ils ont ainsi montré que **Cy7-1** était sélective et hautement sensible à cette enzyme redox en imageant des tumeurs hypoxiques de type A549 xénogreffées sur des souris. Le mécanisme d'activation est basé sur la réduction du groupement nitro de l'ester arylique qui va

³⁶ Pour des revues sur le phénomène de PeT et son utilisation dans la conception de sondes pro-fluorescentes, voir : a) B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 3-40; b) A. P. de Silva, T. S. Moody, G. D. Wright, *Analyst*, **2009**, 134, 2385-2393; c) W. Zhang, Z. Ma, L. Du, M. Li, *Analyst*, **2014**, 139, 2641-2649; d) B. Daly, J. Ling, A. P. de Silva, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 4203-4211.

³⁷ Y. Li, Y. Sun, J. Li, Q. Su, W. Yuan, Y. Dai, C. Han, Q. Wang, W. Feng, F. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 6407-6416.

ainsi mettre fin au processus de PeT oxydatif, révélant l'émission de fluorescence dans le NIR-I du composé (Figure 13).

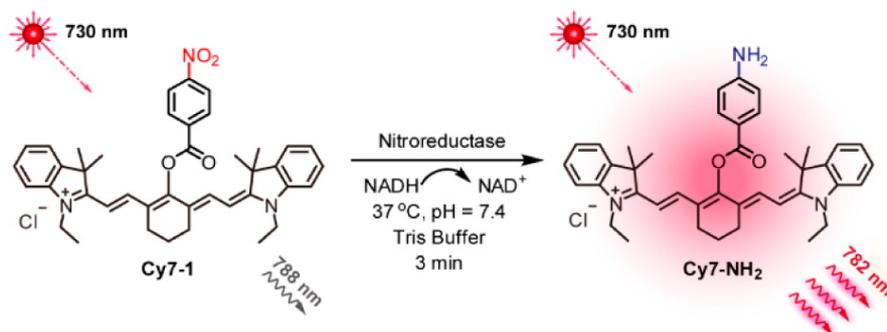


Figure 13. Mécanisme d'activation de la sonde **Cy7-1** développée par le groupe de W. Feng pour la détection d'une activité de type NTR. Illustration issue de la référence 37. © 2015 American Chemical Society.

La modulation du PeT peut aussi se faire *via* la rupture d'un lien covalent entre le fluorophore et le récepteur³⁸ ou la formation d'un complexe métal-ligand³⁹.

II.2.3. Transfert de proton intramoléculaire

Le processus photophysique faisant intervenir un transfert de proton intramoléculaire à l'état excité est nommé ESIPT, pour "*Excited State Intramolecular Proton Transfer*"⁴⁰. Il ne peut se produire qu'avec certains fluorophores capables de former une liaison hydrogène intramoléculaire (formation d'un pseudo-cycle à 6 chaînons). De ce fait, le composé possède un groupement amino ou hydroxyle, jouant le rôle de donneur de protons, qui est proche d'un hétéroatome possédant des doublets libres (e.g., l'atome d'oxygène d'un motif cétonique), jouant quant à lui le rôle d'accepteur de protons. Les fluorophores présentant un phénomène d'ESIPT sont à l'état fondamental sous la forme énon (**E**). Une fois excité, le fluorophore sous la forme énon excité (**E***) tautomérise en forme céton excité (**K***). Ensuite, le retour à l'état fondamental (**K**) s'accompagne d'une émission de fluorescence, enfin le retour à la forme énon (**K**) → (**E**) est non radiatif (Figure 14). De ce fait, les fluorophores de type ESIPT présentent un déplacement de Stokes particulièrement grand et précipitent bien souvent⁴⁰. Ce phénomène de précipitation, souvent décrit pour des applications sur cellules en raison de l'impact qu'un tel phénomène peut entraîner pour la survie cellulaire, peut néanmoins présenter des avantages ; comme une diffusion limitée du fluorophore dans le milieu, ce qui améliore le rapport S/N. La conception de sondes pro-fluorescentes à partir de ces fluorophores se fait, le plus souvent, par une protection de l'énon, par un motif réactif vis-à-vis de l'analyte à détecter, rendant le fluorophore non émissif.

³⁸ Pour deux exemples sélectionnés, voir : a) T.-W. Shiue, Y.-H. Chen, C.-M. Wu, G. Singh, H.-Y. Chen, C.-H. Hung, W.-F. Liaw, Y.-M. Wang, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 5400-5408; b) Z. Li, X. Li, X. Gao, Y. Zhang, W. Shi, H. Ma, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 3926-3932.

³⁹ Pour une revue présentant de nombreux exemples, voir la référence 33.

⁴⁰ Pour plus d'informations sur ce processus et ses applications en détection et bioimagerie, voir : a) J. E. Kwon, S. Y. Park, *Adv. Mater.*, **2011**, 23, 3615-3642; b) A. C. Sedgwick, L. Wu, H.-H. Han, S. D. Bull, X.-P. He, T. D. James, J. L. Sessler, B. Z. Tang, H. Tian, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, 47, 8842-8880.

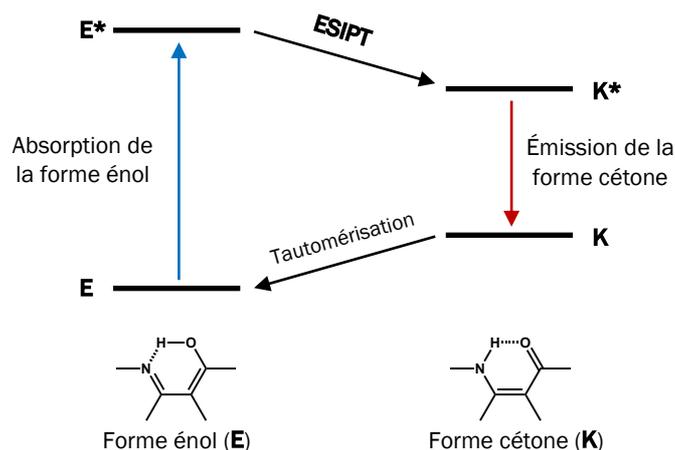
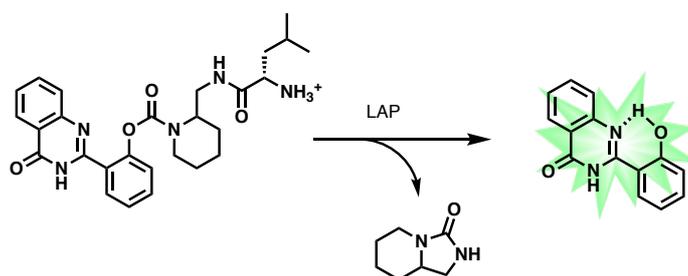


Figure 14. Principe du phénomène d'ESIPT.

Le groupe de J. Hasserodt a développé un chemodensimètre fluorescent pour la détection de la leucine aminopeptidase (LAP), enzyme que l'on détaillera dans le chapitre 2. Ils ont ainsi montré qu'il était possible de détecter cette activité enzymatique au sein de cellules vivantes de type HeLa, via la libération dans le milieu du fluorophore précipitant, 2-(2'-hydroxyphényl)-4(3*H*)-quinazolinone (HPQ), après hydrolyse du lien amide par la LAP et auto-immolation d'un bras espaceur (Figure 15), qui conduit à l'émission d'une fluorescence dans le bleu-vert (bande d'émission large, centrée à 495 nm)⁴¹.

Figure 15. Principe de la sonde de type ESIPT développée par le groupe de J. Hasserodt pour la détection de la LAP⁴¹.

II.2.4. Transfert d'énergie

II.2.4.1. Le FRET

Le transfert d'énergie par résonance de type Förster⁴² (FRET, pour "*F*örster *R*esonance *E*nergy *T*ransfer") est un processus non radiatif par lequel un donneur à l'état excité **D*** (généralement un fluorophore) transfère de l'énergie à un accepteur dans son état fondamental **A**. L'accepteur passe ainsi à l'état excité **A*** et son retour à l'état fondamental peut être radiatif ou non-radiatif suivant qu'il s'agisse d'un fluorophore ou d'un simple chromophore non émissif (Figure 16)⁴³. Le premier

⁴¹ a) O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon, J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 6253-6255; b) M. Prost, L. Canaple, J. Samarut, J. Hasserodt, *ChemBioChem*, **2014**, 15, 1413-1417.

⁴² T. Förster, *Discuss. Faraday. Soc.*, **1959**, 27, 7-17.

⁴³ K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4562-4589.

cas est généralement observé quand le couple donneur-accepteur est constitué de deux fluorophores, le processus permet d'atteindre des longueurs d'ondes d'émission plus élevées, et une augmentation artificielle du déplacement de Stokes (on parle souvent de déplacement de Stokes apparent ou de pseudo-déplacement de Stokes). Lorsque ce type de couple donneur-accepteur est utilisé, la détection est de type ratiométrique. Le deuxième cas est, quant à lui, souvent mis à profit pour la conception de sondes pro-fluorescentes de type "Off-On" et l'accepteur est appelé "quencheur" (les plus populaires étant les colorants azoïques qui dissipent l'énergie de façon non-radiative *via* le processus de photo-isomérisation de leur(s) motif(s) -N=N-, e.g., les colorants BHQ pour "*Black Hole Quencher*"⁴⁴).

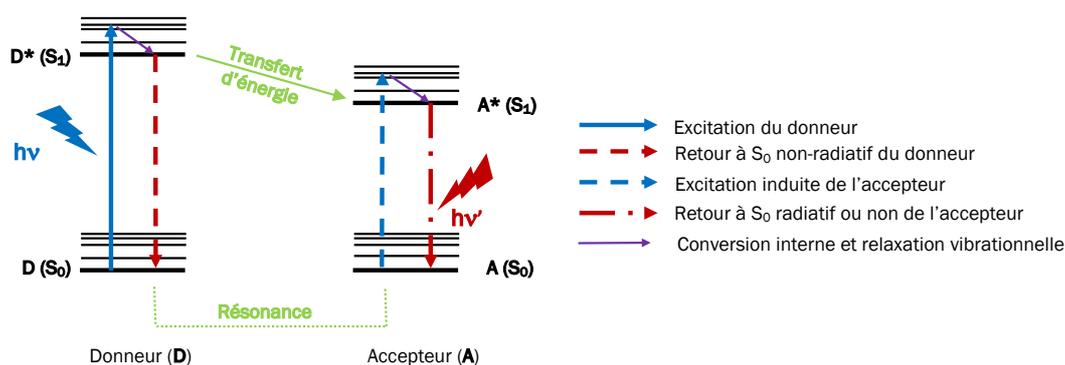


Figure 16. Représentation schématique du FRET entre un donneur et un accepteur.

Afin que ce transfert de type dipôle-dipôle ait lieu, trois critères doivent être réunis : les deux partenaires doivent être suffisamment proches l'un de l'autre (distance comprise entre 10 et 100 Angströms), le spectre d'émission du donneur doit se superposer (du moins en partie) au spectre d'absorption de l'accepteur ; enfin l'alignement des moments dipolaires est également un facteur limitant si l'angle entre les deux composés est égal à 90° (Figure 17)⁴⁵. Il est intéressant de préciser que des cas particuliers existent. Si les deux partenaires sont des fluorophores identiques, on peut obtenir un transfert de type Homo-FRET se traduisant par un "*self-quenching*" du système. Du fait de sa simplicité de mise en œuvre, cette stratégie a été utilisée avec succès pour la conception d'agents d'imagerie activables ciblant des protéases d'intérêt⁴⁶ (e.g., cathepsines, caspases et métalloprotéinases matricielles (MMP)⁴⁷). Avec certaines paires de fluorophores, il est également possible de former un hétérodimère ("*ground state heterodimer*") dont les propriétés sont assimilées à celle d'une molécule unique. Ceci conduit à l'extinction de la fluorescence étant donné que les niveaux d'énergie des deux partenaires sont confondus, le transfert d'énergie est interrompu. Ces sondes "quenchées" permettent également la détection d'activités enzymatiques de type protéasique⁴⁸.

⁴⁴ A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Chem. - Asian J.*, **2017**, *12*, 2008-2028.

⁴⁵ B. Chen, Q. Su, W. Kong, Y. Wang, P. Shi, F. Wang, *J. Mater. Chem. B*, **2018**, *6*, 2924-2944.

⁴⁶ H. Kobayashi, P. L. Choyke, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 83-90.

⁴⁷ C.-H. Tung, S. Bredow, U. Mahmood, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*, 892-896.

⁴⁸ M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. - Eur. J.*, **2003**, *9*, 3466-3471.

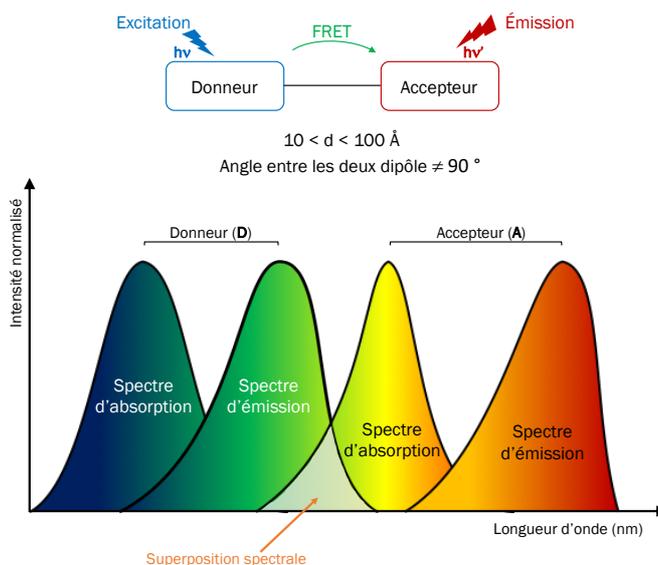


Figure 17. Représentation des trois critères permettant un transfert d'énergie de type FRET.

Ce processus photophysique est utilisé dans la conception de nombreuses sondes pour la détection de différents (bio)analytes⁴⁹, comme par exemple les réductases. En effet, cibler cette classe d'enzyme permet de visualiser les zones de tumeurs hypoxiques mais aussi les différents processus de bio-réduction auxquels elles sont associées⁵⁰. L'exemple choisi ici est une sonde de type ratiométrique pour la détection de la phosphodiesterase type 1 (PDE1), développée en 2000 par l'équipe de T. Nagano⁵¹. Le chemodosimètre fluorescent est composé d'un dérivé de 7-hydroxycoumarine (donneur) et d'un dérivé fluorescéine (accepteur) reliés entre eux par un lien phosphodiester. Lorsque ces deux fluorophores sont liés, l'excitation à 370 nm de la coumarine conduit uniquement à l'émission de la fluorescéine centrée à 515 nm. Après hydrolyse enzymatique, les deux partenaires se retrouvent éloignés et le FRET n'opère plus. L'émission de fluorescence caractéristique du dérivé 7-hydroxycoumarine, centrée à 450 nm est alors observée (Figure 18).

⁴⁹ Pour des revues sur le principe du FRET mis en œuvre dans la conception de sondes fluorogéniques, voir : a) K. Kikuchi, H. Takakusa, T. Nagano, *TrAC* **2004**, 23, 407-415; b) C.-H. Tung, *Biopolymers*, **2004**, 76, 391-403; c) L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, S. Zhu, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, 46, 1462-1473; d) H.-Y. Hu, S. Gehrig, G. Reither, D. Subramanian, M. A. Mall, O. Plettenburg, C. Schultz, *Biotechnol. J.*, **2014**, 9, 266-281; e) C. E. Rowland, C. W. Brown, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, 3, 042006.

⁵⁰ R. B. P. Elmes, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 8935-8956.

⁵¹ H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 1653-1657.

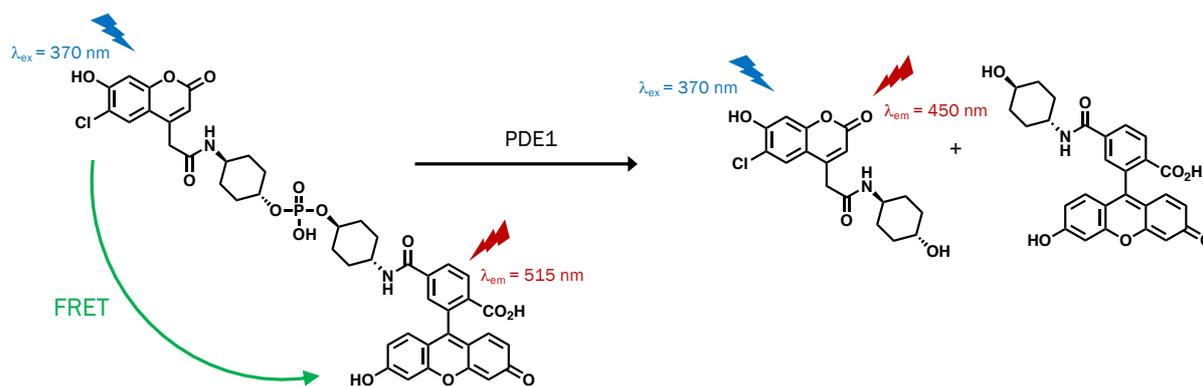


Figure 18. Sonde ratiométrique développée par le groupe de T. Nagano permettant la détection d'une activité PDE1⁵¹.

Enfin, il est intéressant d'évoquer le concept du "dark resonance energy transfer" DRET, proposé par le groupe de Y.-T. Chang, où le donneur n'est pas fluorescent ce qui a comme premier avantage : la diminution du bruit de fond. En effet, il n'est pas rare d'observer lorsque le transfert d'énergie n'est pas efficace à 100%, une fluorescence résiduelle du donneur. Cependant, nous ne parlerons pas ce type de mécanisme dans ce manuscrit, mais plusieurs articles sont disponibles dans la littérature⁵².

II.2.4.2. Le TBET⁵³

Le second processus mettant en jeu un transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur est le transfert d'énergie à travers les liaisons (TBET, pour "Through-Bond Energy Transfer")⁵⁴. Contrairement au FRET, la théorie autour du TBET est moins bien établie et fait toujours l'objet de débats au sein de la communauté des chimistes-photophysiciens. Ce mode de transfert d'énergie ne nécessite pas obligatoirement de proximité spatiale entre les deux partenaires et/ou la superposition des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. Les deux partenaires sont liés par un espaceur conjugué à électrons π (e.g., lien éthyne, phényle, phényléthyne, ...), on parle alors de cassettes TBET. Le seul prérequis est que le donneur et l'accepteur soient perpendiculaires entre eux à l'état fondamental, afin d'éviter que le système ne soit totalement conjugué et ne se comporte comme un fluorophore unique à système π étendu. A l'état excité, la rotation devient possible et les deux partenaires se retrouvent dans le même plan ; un phénomène semblable à une délocalisation électronique se met en place permettant ainsi le passage de l'énergie du donneur vers l'accepteur (Figure 19)⁵⁵.

⁵² Pour des articles sur le DRET, voir : a) A. Samanta, K. K. Maiti, K.-S. Soh, X. Liao, M. Vendrell, U. S. Dinish, S.-W. Yun, R. Bhuvaneshwari, H. Kim, S. Rautela, J. Chung, M. Olivo, Y.-T. Chang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6089-6092; b) D. Su, J. Oh, S.-C. Lee, J. M. Lim, S. Sahu, X. Yu, D. Kim, Y.-T. Chang, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 4812-4818; c) D. Su, C. L. Teoh, N.-Y. Kang, X. Yu, S. Sahu, Y.-T. Chang, *Chem. - Asian J.*, **2015**, *10*, 581-585.

⁵³ Pour la dernière revue sortie sur le sujet, voir : D. Cao, L. Zhu, Z. Liu, W. Lin, *J. Photoch. Photobio. C*, **2020**, Article 100371

⁵⁴ G.-S. Jiao, L. H. Thoresen, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14668-14669.

⁵⁵ Pour des revues sur le TBET et ses applications en détection, bioimagerie et marquage fluorogénique de protéines, voir : a) A. Loudet, C. Thivierge, K. Burgess, *Dojin News*, **2011**, *137*, 1-7; b) J. Fan, M. Hu, P. Zhan, X. Peng, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 29-43; c) Y. Chen, K. Tsao, J. W. Keillor, *Can. J. Chem.*, **2015**, *93*, 389-398.

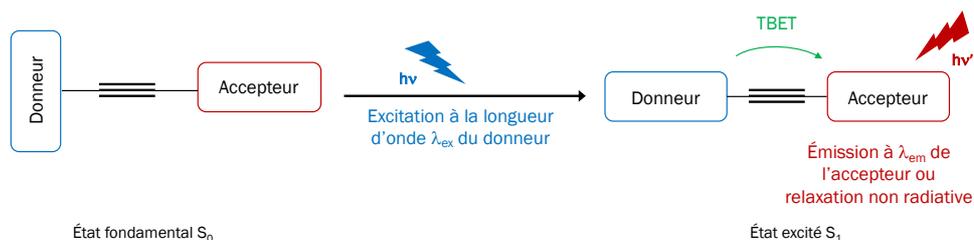


Figure 19. Représentation schématique du processus de TBET à travers un couple donneur-accepteur lié par un pont éthyne.

Au début des années 2000, le groupe de K. Burgess⁵⁶ a été un acteur pionnier dans le développement des sondes fluorescentes basées sur le TBET. Elles se caractérisent notamment par des déplacements de Stokes apparents importants pouvant varier entre 100 nm et 410 nm selon la structure des partenaires fluorescents utilisés⁵⁷ (Figure 20). Des chemosenseurs TBET ont également été développés pour la détection de cations métalliques⁵⁸ ou comme sonde à pH⁵⁹. L'exemple présenté Figure 21 est une cassette TBET 1,8-naphtalimide-rhodamine B réactive vis-à-vis des cations Hg(II). En effet, la complexation de ces derniers par le motif lactame de la rhodamine B conduit à la conversion de la forme spiro lactame, non fluorescente, en la forme ouverte conjuguée, colorée et fluorescente^{58a}.

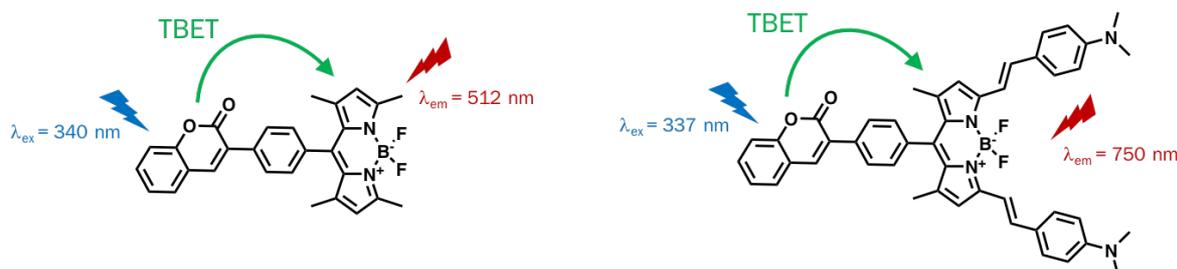


Figure 20. Structure de deux cassettes TBET développés par Zhao et al.⁵⁷ présentant des déplacements de Stokes apparents différents selon la substitution du BODIPY accepteur.

⁵⁶ Pour quelques travaux du groupe de K. Burgess sur le sujet, voir : a) G.-S. Jiao, L. H. Thoresen, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14668-14669; b) J. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1684-1687; c) L. Wu, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9156-9157; d) Y. Ueno, J. Jose, A. Loudet, C. Pérez-Bolívar, P. Anzenbacher, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 51-55.

⁵⁷ Y. Zhao, Y. Zhang, X. Lv, Y. Liu, M. Chen, P. Wang, J. Liu, W. Guo, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 13168-13171.

⁵⁸ Pour des publications récentes sur ce type de chemosenseurs, voir : a) M. Kumar, N. Kumar, V. Bhalla, H. Singh, P. R. Sharma, T. Kaur, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1422-1425; b) X. Qu, Q. Liu, X. Ji, H. Chen, Z. Zhou, Z. Shen, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 4600-4602; c) V. Bhalla, Roopa, M. Kumar, P. R. Sharma, T. Kaur, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 2150-2156.

⁵⁹ W. Lin, L. Yuan, Z. Cao, Y. Feng, J. Song, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 375-379.

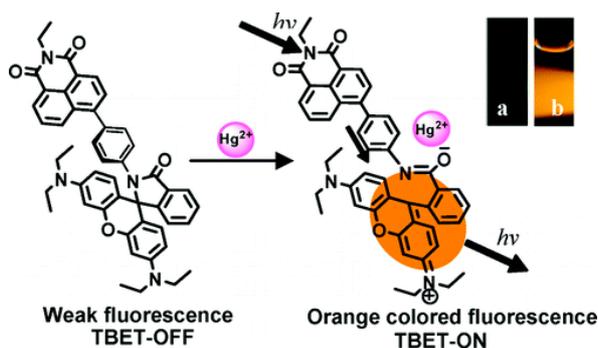


Figure 21. Exemple de cassette TBET pour la détection des cations Hg(II) développée par Kumar et al.^{58a}

Comme pour le DRET, le DTBET pour "Dark Through Bond Energy Transfer", basé sur l'utilisation d'un donneur non fluorescent, a été récemment développé par le groupe de B. Z. Tang. Pour d'avantages de détails sur ce principe, il est possible de se référer à ces travaux⁶⁰.

II.2.5. AIE ("Aggregation-induced emission") et ACQ ("Aggregation-caused quenching")

Un phénomène est souvent observé lorsque la concentration en solution d'un fluorophore augmente, il s'agit de l'agrégation du composé qui résulte de fortes interactions π entre les systèmes conjugués des molécules identiques. Dans cette situation, les molécules promues à leur état excité retournent à leur état fondamental par des processus non radiatif, ce qui conduit à une diminution ou extinction totale de la fluorescence⁶¹. On parle alors d'extinction induite par agrégation (ACQ), ce phénomène limite fortement l'utilisation de ces fluorophores dans des matériaux pour l'optoélectronique, par exemple les diodes électroluminescentes organiques (OLED, pour "Organic Light-Emitting Diode")⁶² où les composés sont utilisés sous forme d'agrégats ou de solides déposés en fines couches minces.

La découverte d'un nouveau processus photophysique au début des années 2000 par le groupe de B. Z. Tang⁶³, l'émission induite par agrégation (AIE), a permis de tirer avantage des phénomènes d'agrégation en solution de certaines espèces photoactives (Figure 22).

De nombreux travaux relatifs à des fluorophores et/ou des sondes "intelligentes" AIE ont été récemment publiés et sont bien résumés dans plusieurs revues^{64,65}. L'exemple choisi, pour illustrer

⁶⁰ Pour des travaux sur le DTBET, voir : a) Y. Chen, W. Zhang, Y. Cai, R. T. K. Kwok, Y. Hu, J. W. Y. Lam, X. Gu, Z. He, Z. Zhao, X. Zheng, B. Chen, C. Gui, B. Z. Tang, *Chemical Science*, **2017**, 8, 2047-2055; b) Y. Jiang, Q. Duan, G. Zheng, L. Yang, J. Zhang, Y. Wang, H. Zhang, J. He, H. Sun, D. Ho, *Analyst*, **2019**, 144, 1353-1360.

⁶¹ K. D. Chaudhuri, *Zeitschrift für Physik*, **1959**, 154, 34-42.

⁶² C.-T. Chen, *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 4389-4400.

⁶³ Pour la première publication proposant le concept d'AIE, voir : J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu, B. Z. Tang, *Chem. Commun.*, **2001**, 1740-1741.

⁶⁴ Pour des revues sur l'AIE, voir : a) J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 11718-11940; b) Y. Hong, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2016**, 4, 022003; c) Q. Zhao, J. Z. Sun, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, 4, 10588-10609; d) I. M. Khan, S. Niazi, M. K. Iqbal Khan, I. Pasha, A. Mohsin, J. Haider, M. W. Iqbal, A. Rehman, L. Yue, Z. Wang, *TrAC*, **2019**, 119, 115637.

⁶⁵ Pour des revues sur les sondes AIE appliquées à la détection d'activités enzymatiques, voir : a) J. Shi, Y. Li, Q. Li, Z. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10, 12278-12294; b) D. Wang, B. Z. Tang, *Acc. Chem. Res.*, **2019**, 52, 2559-2570;

l'utilisation de ce processus dans la détection de bioanalytes, est une sonde à NTR, **TPE-NO₂**, publié en 2016 par le groupe de G. Zhang et D. Zhang⁶⁶ (Figure 23). La réduction du groupement nitro par la NTR en présence de son co-facteur, NADH, conduit à l'élimination du dérivé furane permettant la libération d'une pyridine substituée par un rotor tétraphényléthène (TPE), **TPE-PY**. La diminution de la polarité du composé résulte en une précipitation de **TPE-PY**, qui sous la forme d'agrégats fluoresce à 525 nm. Des tests de la sonde réalisés à l'aide de cellules HeLa en conditions hypoxiques ont permis de démontrer son efficacité en milieu biologique.

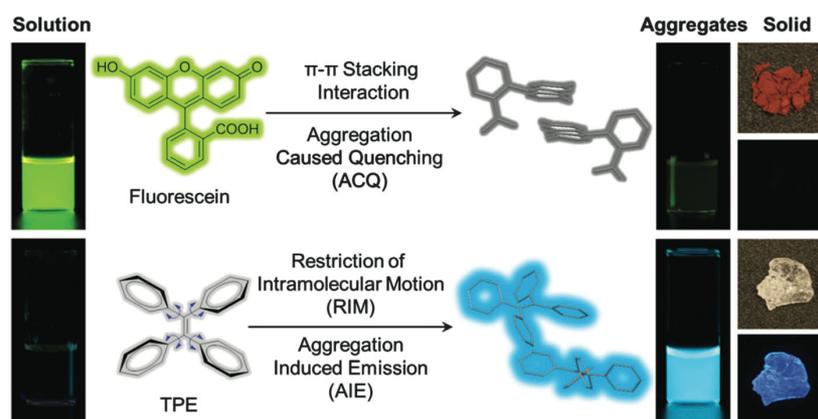


Figure 22. Illustration issue de la revue de B. Z. Tang⁶⁷, présentant les phénomènes ACQ et AIE. En haut, la fluorescéine dont l'émission verte en solution est intense, et qui est "quenchée" sous forme solide ou en solution concentrée. En bas, le TPE, fluorophore (ou rotor) de type AIE, dont l'émission bleue est uniquement observée à l'état agrégé ou solide. © 2016 Wiley-VCH..

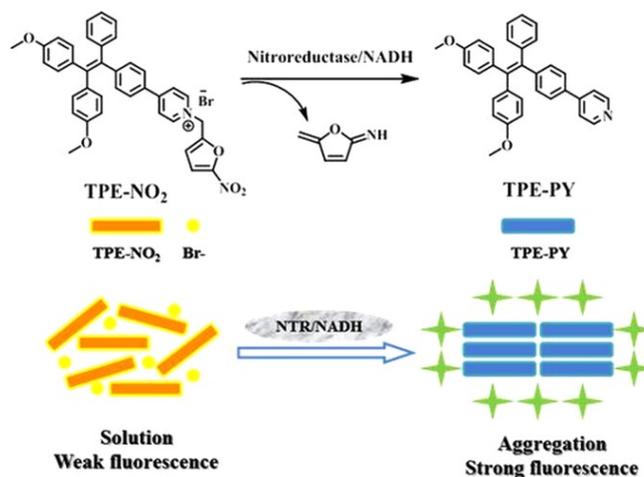


Figure 23. Structure chimique de **TPE-NO₂** et de **TPE-PY** (en haut). Principe du mécanisme de détection de la sonde en présence de NTR et de NADH (en bas)⁶⁶. © 2016 Asian Chemical Editorial Society.

II.2.6. L'effet d'atome lourd

Enfin, nous évoquerons brièvement le processus se nommant l'effet d'atome lourd (ou "*Heavy Atom Effect*" en anglais), qui conduit à la diminution de la fluorescence d'un composé par la

c) T. Xue, J. Shen, K. Shao, W. Wang, B. Wu, Y. He, *Chem. - Eur. J.*, **2020**, *26*, 2521-2528; d) X. Cai, B. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 9868-9886.

⁶⁶ X. You, L. Li, X. Li, H. Ma, G. Zhang, D. Zhang, *Chem. - Asian J.*, **2016**, *11*, 2918-2923.

⁶⁷ S. Chen, H. Wang, Y. Hong, B. Z. Tang, *Mater. Horiz.*, **2016**, *3*, 283-293.

présence au sein de sa structure d'atomes lourds (e.g., Br, I, Se et Te, pour les plus couramment utilisés). En effet, ils favorisent le croisement inter-système, $S_1 \rightarrow T_1$, au détriment de la transition radiative de $S_1 \rightarrow S_0$, ainsi que la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour "Reactive Oxygen Species"), notamment l'oxygène singulet 1O_2 via un transfert d'énergie du dioxygène à l'état fondamental par une réaction d'annihilation triplet-triplet (TTA)⁶⁸. Les atomes lourds sont utilisés dans la conception de sondes fluorogéniques de type "Off-On" où l'émission de fluorescence est retrouvée suite à une réaction de substitution nucléophile induite par l'analyte et qui conduit à leurs éliminations⁶⁹. Enfin, il est mis à profit dans la conversion des fluorophores organiques en photosensibilisateurs pour des applications en thérapie photodynamique (PDT)⁷⁰.

II.3. Sondes pro-fluorescentes enzymo-activables via la modification structurale d'un fluorophore

Les sondes pro-fluorescentes permettant la détection d'une activité enzymatique sont connues depuis les années soixante sous le nom de substrats fluorogéniques d'enzymes⁷¹ (qui sera raccourci dans ce manuscrit par : substrats enzymatiques). Les différents exemples ci-dessus ont montré que la conception de sondes pro-fluorescentes enzymatiques, bien que fondée sur différents processus photophysiques, implique généralement une ou plusieurs modifications structurale(s) plus ou moins complexe(s) du fluorophore⁷².

Comme cela a été évoqué dans la partie II.1., le moyen le plus simple de masquer la fluorescence d'un fluorophore est de substituer l'un ou les deux motifs aniline primaire ou phénol (s'il en possède en son sein) dans le but d'altérer le caractère "push-pull" de la molécule (Figure 8A)⁷³. Il est également possible de masquer des anilines secondaires, toutefois cela dépend de la structure et de la fonctionnalité du motif de reconnaissance choisi. Les dérivés de 7-amino/7-hydroxycoumarine illustrent bien cette stratégie. En effet, en substituant le phénol de la 4-méthylumbelliférone (4-MU) par un groupement acyle (R-C(O))⁷⁴, un phosphate⁷⁵ ou encore un

⁶⁸ Pour les travaux sur la découverte du TTA, voir : C. A. Parker, C. G. Hatchard, *Proc. Chem. Soc.*, **1962**, 147, 574-584.

⁶⁹ Pour un exemple de ce type de sondes, voir : L. He, Q. Xu, Y. Liu, H. Wei, Y. Tang, W. Lin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7, 12809-12813.

⁷⁰ Pour des revues sur le sujet, voir : a) A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 77-88; b) H. Abrahamse, Michael R. Hamblin, *Biochem. J.*, **2016**, 473, 347-364. Pour des travaux sur des dérivés Se-rhodamines, voir : a) J. E. Hill, M. K. Linder, K. S. Davies, G. A. Sawada, J. Morgan, T. Y. Ohulchanskyy, M. R. Detty, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 8622-8634 b) M. W. Kryman, K. S. Davies, M. K. Linder, T. Y. Ohulchanskyy, M. R. Detty, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 4501-4507.

⁷¹ J.-L. Reymond, V. S. Fluxà, N. Maillard, *Chem. Commun.*, **2009**, 34-46.

⁷² Pour deux revues sur les substrats fluorogéniques dérivés de petites molécules, voir : a) X. Chen, M. Sun, H. Ma, *Curr. Org. Chem.*, **2006**, 10, 477-489; b) J. B. Grimm, L. M. Heckman, L. D. Lavis, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2013**, 113, 1-34.

⁷³ Pour deux revues sur l'altération du caractère "push-pull" des fluorophores, voir : a) W. Shi, H. Ma, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8732-8744; b) F. Bureš, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 58826-58851.

⁷⁴ T. J. Jacks, H. W. Kircher, *Anal. Biochem.*, **1967**, 21, 279-285.

⁷⁵ K. R. Gee, W.-C. Sun, M. K. Bhalgat, R. H. Upson, D. H. Klaubert, K. A. Latham, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, **1999**, 273, 41-48.

sulfate⁷⁶, la diversité des enzymes ciblées est simple à atteindre (Figure 24). Toutefois, la 4-MU libérée a tendance à diffuser ce qui peut nuire à la sensibilité de détection. De plus, son intensité de fluorescence dépend du pH du milieu ($pK_a = 7,8$)⁷⁵. Ces deux points seront revus plus en détails dans le chapitre 4.

La fluorescéine et ses dérivés sont aussi souvent utilisés dans la conception de sondes pro-fluorescentes enzymo-activables par substitution de ces groupements hydroxyles. Par exemple, en 2010, le groupe de R. T. Raines publie un dérivé bis-éther d'acétoxyméthyle (AM) de la fluorescéine (Figure 24) permettant la détection d'une activité estérase *in vitro* et *in cellulo*⁷⁷. En effet, la fonctionnalisation des fonctions phénols diminue fortement la polarité de la molécule ce qui favorise sa pénétration cellulaire. Toutefois, ces fluorophores, en plus de présenter une dépendance au pH, sont sensibles au photoblanchiment et l'équilibre entre la forme ouverte et la forme fermée de la spirolactame est parfois difficile à maîtriser.

De plus, en fonction du motif de reconnaissance enzymatique utilisé, l'extinction de la sonde peut ne pas être efficace à 100%, diminuant ainsi le rapport S/N et impactant négativement la sensibilité et la résolution de détection. C'est le cas, par exemple pour la sonde à tyrosinase, présentée dans la Figure 24, dont le motif de substitution n'altère pas suffisamment le système "push-pull" de la molécule⁷⁸.

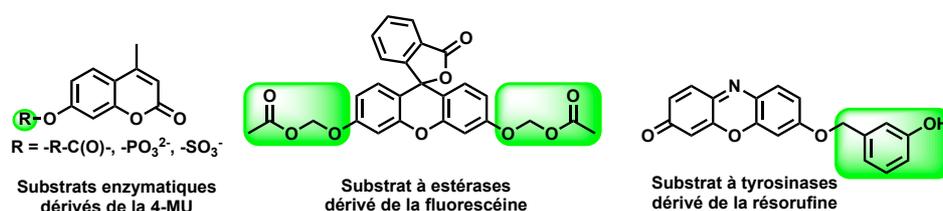


Figure 24. Structure des substrats enzymatiques dérivés de la 4-MU, conçus pour détecter une activité estérases ou lipase ($R = \text{acyle}$)⁷⁴, phosphatase⁷⁵ ($R = \text{PO}_3^{2-}$) et sulfatase⁷⁶ ($R = \text{SO}_3^-$) (à gauche), dérivé de la fluorescéine pour détecter une activité estérase⁷⁷ (au milieu) et dérivé de la résorufine permettant de détecter une activité tyrosinase⁷⁸ (à droite).

Un substrat enzymatique requiert donc de nombreuses caractéristiques, ces performances étant intimement liées à l'efficacité de la réaction fluorogénique libérant le fluorophore⁷⁹. Cette dernière doit fonctionner en milieux aqueux et à pH physiologique en présence de nombreuses biomolécules (protéines, thiols, réducteurs, ...) pouvant interagir avec le substrat et/ou les intermédiaires formés. Les produits de métabolisation doivent en outre présenter une faible toxicité (on pense notamment aux produits de décomposition de la "triggering unit" et/ou du bras espaceur auto-immolable).

⁷⁶ G. G. Guilbault, J. Hieserman, *Anal. Chem.*, **1969**, *41*, 2006-2009.

⁷⁷ L. D. Lavis, T.-Y. Chao, R. T. Raines, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 521-530.

⁷⁸ X. Wu, X. Li, H. Li, W. Shi, H. Ma, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 2443-2446.

⁷⁹ Pour des revues récentes sur les substrats enzymatiques, voir : a) X. Wu, W. Shi, X. Li, H. Ma, *Acc. Chem. Res.*, **2019**, *52*, 1892-1904; b) H. Singh, K. Tiwari, R. Tiwari, S. K. Pramanik, A. Das, *Chem. Rev.*, **2019**, *119*, 11718-11760; c) S. Singha, Y. W. Jun, S. Sarkar, K. H. Ahn, *Acc. Chem. Res.*, **2019**, *52*, 2571-2581.

Afin de surmonter les inconvénients majeurs évoqués aux travers des exemples précédents qui sont : l'extinction de la fluorescence de la sonde non efficace à 100% qui entraîne un bruit de fond élevé et diminue le rapport S/N, la dépendance au pH de fluorophore, l'autofluorescence possible du milieu, la diffusion de la sonde dans le milieu et la sensibilité au photoblanchiment ; mais aussi la possible instabilité du substrat qui peut mener à l'élimination prématurée du fluorophore entraînant ainsi un résultat faux-positif, il existe différentes stratégies.

Une des approches actuellement privilégiée consiste à développer de nouveaux fluorophores à aniline ou à phénol. Notre groupe y contribue d'ailleurs activement *via* la conception de nouveaux dérivés de 7-hydroxycoumarine⁸⁰, de DPP⁸¹ et d'hybrides DHX-hémicyanine⁸² fluorogéniques.

On peut également citer les sondes basées sur le phénomène de chimiluminescence⁸³, qui contrairement aux sondes fluorogéniques ne nécessitent pas une excitation photonique pour produire une émission. Cette caractéristique va permettre de réduire considérablement le bruit de fond résultant de l'auto-fluorescence et de la possible diffusion de la lumière, améliorant ainsi la sensibilité et le rapport S/N⁸⁴.

Une deuxième possibilité pour réduire le bruit de fond initiale de la sonde, est de réaliser la formation *in situ* du fluorophore. Ce concept, connu sous l'anglicisme de "*covalent assembly*"⁸⁵, est basé sur un précurseur "cagé", dont la structure ne dérive pas de celle d'un fluorophore, et qui après réaction avec l'analyte va permettre la formation du fluorophore souhaité. En effet, la réaction domino déclenchée par la réaction entre l'analyte et le motif de reconnaissance va permettre la formation d'un système "*push-pull*" fluorescent (Figure 25). C'est sur ce concept que notre intérêt s'est porté. L'état de l'art, ainsi que les différentes solutions apportées aux principaux inconvénients des sondes conventionnelles, de ce mode de déclenchement seront présentés dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

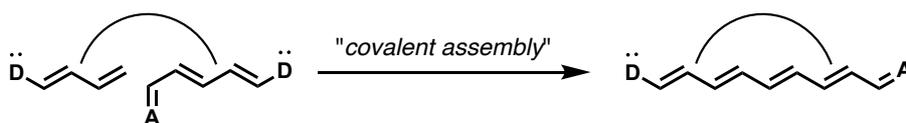


Figure 25. Représentation schématique du concept du "*covalent assembly*" menant à la formation intramoléculaire d'un système "*push-pull*". Illustration inspirée de la dernière revue du groupe de Y. Yang sur les sondes de type "*covalent assembly*"⁸⁵. (D : donneur, A : accepteur).

⁸⁰ a) J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 4175-4178; b) B. Roubinet, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Dyes Pigm.*, **2014**, *110*, 270-284; c) B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, *2015*, 166-182.

⁸¹ F. Ponsot, "Hybrides bactériochlorine-dicétopyrrolopyrrole (DPP) : Nouveaux fluorophores proche infrarouge pour des applications en biodétection/bioimagerie", Thèse de l'Université de Bourgogne Franche-Comté, **2020**.

⁸² H. Chen, B. Dong, Y. Tang, W. Lin, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*, 1410-1422.

⁸³ Pour deux revues récentes sur les sondes chéroluminogéniques, voir : a) N. Hananya, D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 16454-16463; b) S. Gnaim, D. Shabat, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 1389-1394.

⁸⁴ J. Yan, S. Lee, A. Zhang, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 6900-6916.

⁸⁵ Pour la première revue sur les sondes fluorogéniques enzymatiques de type "*covalent assembly*", récemment parue, voir : X. Luo, L. Gu, X. Qian, Y. Yang, *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 9067-9078.

III. Présentation des travaux de thèse

Dans la continuité des travaux de thèse de Sylvain Debieu⁸⁶, qui seront rappelés dans le chapitre 2, l'objectif de mon projet de recherche est de développer de nouvelles sondes pro-fluorescentes basées sur le principe du "covalent assembly", dont l'activation enzymatique conduira à la formation *in situ* d'un fluorophore NIR-I, permettant ainsi de détecter l'analyte ciblé.

Depuis quelques années, notre groupe s'intéresse à l'application de ce principe à la famille des pyronines et en particulier aux dérivés non symétriques (*i.e.*, possédant une aniline primaire et une aniline tertiaire) de ces colorants xanthène⁸⁷. En effet, ces molécules présentent deux avantages majeurs pour la réalisation de mon projet. Elles présentent une aniline primaire facilement fonctionnalisable avec un large éventail de motifs de déclenchement, ce qui permettra d'adapter facilement la structure du substrat à la détection de diverses enzymes. De plus, il est possible, en substituant l'atome d'oxygène intracyclique par un hétéroatome, d'obtenir un déplacement bathochrome significatif des maxima d'absorption et d'émission du fluorophore formé tout en conservant une molécule de taille raisonnable, soluble en milieu biologique et peu sujette à l'agrégation (Figure 26).

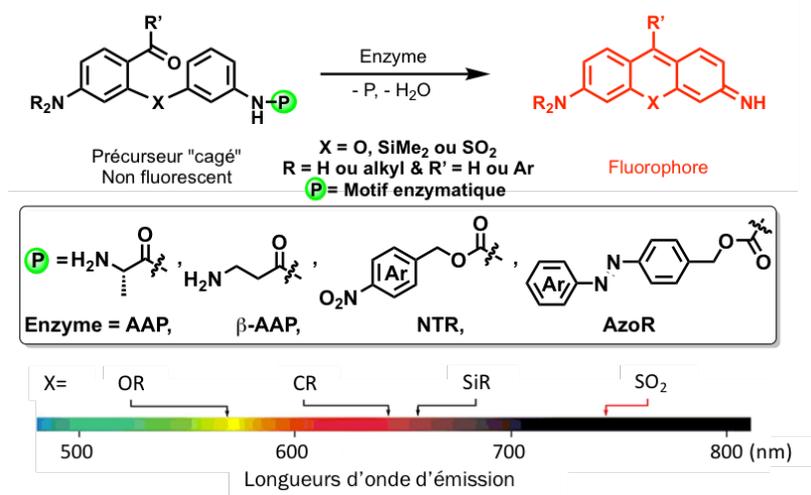


Figure 26. Résumé de mon projet de thèse consistant à appliquer le principe des sondes fluorescentes de type "covalent assembly"   la formation *in situ* d'hétéro-pyronines fluorescentes, déclenchée par une enzyme microbienne.

Dans un premier temps, notre attention s'est portée sur la chimie des hétéro-pyronines (*e. g.*, sulfone-pyronines et Si-pyronines). En effet, peu de travaux ont été réalisés sur ces hétérocycles fluorescents. Il était donc nécessaire, avant de débuter la synthèse de précurseurs "cagés" réactifs vis-à-vis des enzymes ciblées et/ou d'enzymes modèles, de préparer le futur fluorophore formé

⁸⁶ S. Debieu, "Synthèse *in-situ* de fluorophores organiques – Formation de liaisons covalentes par déclenchement enzymatique et applications en biodétection", Thèse de l'Université de Bourgogne, **2017**.

⁸⁷ a) S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 2575-2584; b) S. Debieu, A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2018**, *59*, 1940-1944; c) K. Renault, S. Debieu, J.-A. Richard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 8918-8932.

pour le caractériser d'un point de vue photophysique et d'étudier sa stabilité en milieu aqueux. Ces travaux préliminaires feront l'objet du chapitre 1 de ce manuscrit.

Suite à l'obtention de fluorophores répondant à nos attentes en termes de stabilité en milieu aqueux et à pH physiologique et de propriétés spectrales dans le rouge lointain, le travail de synthèse des précurseurs "cagés" a pu être envisagé et sera décrit dans le chapitre 2.

Finalement, les hétéro-pyronines étant des molécules complexes nécessitant un travail de synthèse minutieux et exigeant, avec des résultats parfois décevants et difficilement reproductibles, nous nous sommes tournés vers une nouvelle famille de fluorophores, les quinoxalin-2(1H)-ones. Ces composés présentant une excellente stabilité en milieu aqueux, nous avons donc pu réaliser la synthèse de différents précurseurs "cagés" réactifs vis-à-vis d'une protéase modèle puis d'une réductase d'intérêt, ainsi que celle des fluorophores de référence (Figure 27). Le protocole de validation d'une sonde de type "covalent-assembly" enzymo-activable mis au point au sein de notre groupe, ainsi que les résultats obtenus sur ce projet seront présentés dans le chapitre 3.

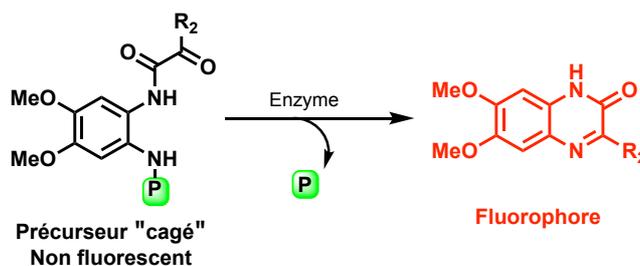


Figure 27. Principe des sondes fluorescentes de type "covalent assembly" appliqué à la synthèse *in situ* de quinoxalin-2(1H)-one déclenchée par une activité enzymatique.

Enfin, le dernier chapitre portera sur la conception d'un substrat fluorogénique conventionnel dérivé d'une *para*-phénylène diamine fluorescente originale. La synthèse de cette sonde sensible à une activité de type aminopeptidase ainsi que les essais *in vivo* réalisés au sein de la société bioMérieux seront décrits.

Chapitre 1

Synthèse de colorants fluorescents de type hétéro-xanthènes

Ce premier chapitre sera consacré au premier objectif de ma thèse à savoir la synthèse de fluorophores à cœur hétéro-xanthène stables à pH physiologique. Cette propriété est indispensable pour la suite de notre projet qui concernent la synthèse et les applications bio-analytiques de sondes pro-fluorescentes dites "cagées". Leur synthèse sera développée dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Avant de présenter les résultats obtenus et de les discuter, la bibliographie concernant les colorants (hétéro)-xanthènes et leurs propriétés spectrales sera exposée. Une première partie consacrée aux dérivés sulfones synthétisés montrera la capacité du motif sulfone (SO₂) intracyclique à provoquer un déplacement bathochrome spectaculaire des caractéristiques spectrales du cœur xanthène. Toutefois, un problème de stabilité des molécules lié aux effets électroniques de ce groupement nous a poussé à changer d'hétéroatome et à synthétiser des pyronines à cœur Si-xanthène ; ces travaux feront l'objet de la seconde partie de ce chapitre. Ces nouveaux dérivés ne présentant pas non plus une stabilité optimale au pH recherché, de nouvelles Si-pyronines non-symétriques ont été étudiées. Leurs synthèses, ainsi que la caractérisation de leurs propriétés spectrales, seront développées dans la dernière partie de ce chapitre.

I. État de l'Art

I.1. Xanthènes

I.1.1. Historique et généralités structurales

Les xanthènes sont des colorants organiques tricycliques formés par un noyau pyrane fusionné à deux cycles benzéniques portant des groupes amino et/ou hydroxyles (substitués ou non) en position *meta* de l'atome d'oxygène intracyclique¹. La structure rigide de ces molécules en fait souvent des bons fluorophores émettant dans la gamme spectrale du bleu-vert (ca. 450-550 nm). Le premier xanthène synthétique a été obtenu en 1871 par A. von Bayer, qui condensa deux molécules de résorcinol avec une molécule d'anhydride phtalique en milieu acide et réussit à isoler la fluoescéine². En 1887, M. Cérésolé synthétise quant à lui la première rhodamine, la tétraméthylrhodamine (TMR) "analogue aminé" de la fluoescéine, en condensant deux molécules de 3-aminophénol avec le même anhydride d'acide³. Enfin, quelques années plus tard, apparaissent la pyronine G (connue également sous les noms : pyronine Y ou *N,N,N',N'*-tétraméthylpyronine) et l'Acridine Red (connue également sous les noms : Acridine Red 3B ou *N,N'*-diméthylpyronine) qui forment ainsi une troisième sous-classe, les pyronines, au sein de la famille des xanthènes.

¹ Pour des exemples de revues générales sur les xanthènes : a) P. Wright, Xanthene Dyes. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, **2014**.; b) L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, 86, 825-843.

² A. Baeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1871**, 4, 555-558.

³ M. Ceresole, *German Patent No. 44002*, **1887**.

Deux distinctions principales de nomenclature sont à noter : les dérivés "diphénylméthanes" (pyronines) et les dérivés "triphénylméthanes" (fluorescéines, rhodamines, fluorones⁴, rosamines et rhodols⁵ mais également les rosoles⁶) substitués par un groupement (hétéro)aryle en position C-9 ou *meso* du cœur xanthène. (Voir Figure 1 pour la numérotation du cœur xanthène)

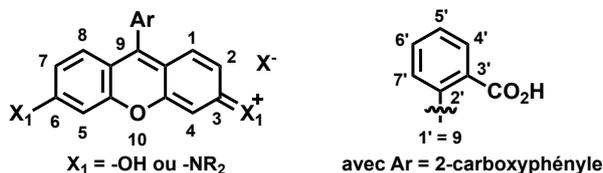


Figure 1. Numérotation des xanthènes et structure du substituant *meso* que l'on retrouve dans les fluorescéines et les rhodamines conventionnelles.

Pour la sous-classe des fluorescéines ($X_1 = OH$ en positions 3 et 6) et des rhodamines ($X_1 = NR_2$), le phényle porte en position 3' une fonction acide carboxylique (CO_2H) qui en solution peut, selon la nature du solvant (polarité) et du pH, être convertie en lactone par attaque nucléophile intramoléculaire sur la double liaison C=C de la position 9. Cette particularité donne lieu à un équilibre entre une forme fluorescente, *i.e.*, "forme ouverte", et une forme non-fluorescente où le composé est de type spyrannique. Ce comportement peut également être provoqué volontairement en jouant sur la nature des substituants du 3'- CO_2H (e.g., amides primaires) ou des groupements 3/6-OH ou 3/6- NR_2 ; il est ainsi souvent mis à profit dans la conception de sondes fluorogéniques utilisables en détection ou en bio-imagerie dans les cas où le (bio-)analyte ciblé est capable d'engendrer une réaction conduisant à la formation de la "forme ouverte"⁷.

Enfin les 9-phényl-xanthènes correspondants ne portant pas de fonction $-CO_2H$ en position *ortho* du *meso*-phényle sont classés respectivement dans la sous-famille des fluorones et des rosamines, le motif *meso*-(hétéro)aryle peut posséder des substituants, même en position 3', mais ce groupement ne donnera pas lieu à un équilibre entre les formes "ouverte" et "fermée" (voir la Figure 2 pour un résumé des structures des différents xanthènes).

⁴ Les fluorones peuvent aussi désigner les dérivés sans substituant phényle en *meso*. Pour un exemple portant sur la 3-hydroxy-6-fluorone voir : J. Shi, X. Zhang, D. C. Neckers, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 4418-4421.

⁵ Pour une revue récente sur les rhodols : Y. M. Poronik, K. V. Vygranenko, D. Gryko, D. T. Gryko, *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48, 5242-5265.

⁶ Pour des travaux sur les rosoles: a) K. S. Hettie, J. L. Klockow, T. E. Glass, F. T. Chin, *Anal. Chem.*, **2019**, 91, 3110-3117; b) J. L. Klockow, K. S. Hettie, E. L. LaGory, E. J. Moon, A. J. Giaccia, E. E. Graves, F. T. Chin, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2020**, 306, 127446.

⁷ Pour des revues sur le sujet : a) X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 1910-1956 ; b) H. N. Kim, M. H. Lee, H. J. Kim, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 1465-1472.

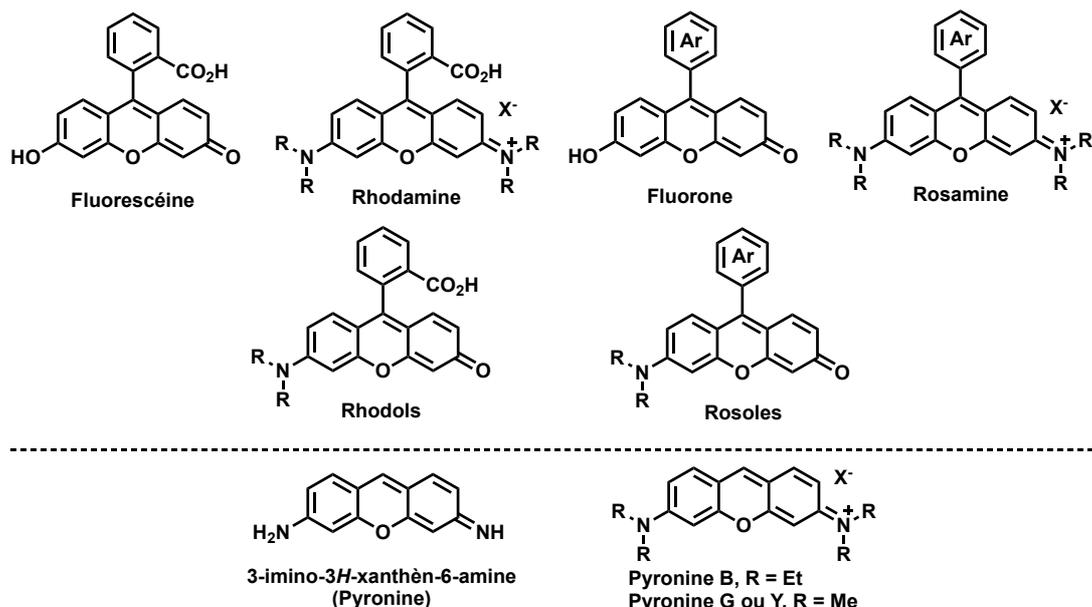
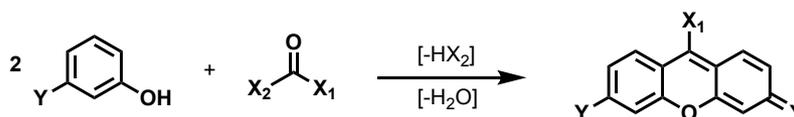


Figure 2. Structure des principales familles de colorants xanthènes.

De manière générale, la même méthode de synthèse s'applique à tous les xanthènes symétriques (*i.e.*, possédant des substituants identiques en positions 3 et 6) et peut être décrite comme le résultat de la condensation de deux phénols *meta*-substitués sur un carbonyle électrophile (aldéhyde, anhydride ou ester) qui portera le substituant de la future position 9. Cette réaction est historiquement effectuée sous catalyse acide à des températures généralement supérieures à 100 °C^{1a} (Schéma 1). Aujourd'hui, de nombreuses autres méthodes de synthèse mettant en jeu des conditions (de température et pH) moins drastiques et plus ou moins sophistiquées sont disponibles⁸.


 Schéma 1. Méthode de synthèse générale des xanthènes avec Y = NR₂ ou OH et X₁C(O)X₂ = aldéhyde, anhydride ou ester. Issue de la revue de P. Wright^{1a}).

Parmi les dérivés diphénylméthane, seules la pyronine Y, la pyronine B et l'Acridine Red sont employées dans des applications de marquage biologique où leurs propriétés fluorescentes sont mises à profit⁹. *A contrario*, les fluorescéines, les rhodamines et leurs dérivés sont les sous-classes les plus utilisées et étudiées pour leurs capacités à fluorescer efficacement dans diverses matrices biologiques ou environnementales plus ou moins complexes. Ces fluorophores sont donc souvent utilisés dans la conception de sondes fluorogéniques, notamment celles qui reposent sur une

⁸ Pour des exemples, voir : a) L. Wu, K. Burgess, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 8711-8718; b) J. B. Grimm, L. D. Lavis, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 6354-6357; c) S. Han, Y. Chen, *Dyes Pigm.*, **2013**, 96, 59-62; d) Z. Lei, X. Li, Y. Li, X. Luo, M. Zhou, Y. Yang, *J. Org. Chem.*, **2015**, 80, 11538-11543.

⁹ P. Prentø, *Biotech. Histochem.*, **2009**, 84, 139-158.

réaction non-réversible avec le (bio-)analyte ciblé¹⁰. Cependant, certains composés sont utilisés comme de simples colorants ou substrats chromogéniques (e.g., le rouge de pyrogallol, utilisé pour la quantification *in vitro* de protéines urinaires¹¹) ou comme photosensibilisateurs (e.g., le rose Bengale¹²) pour générer de l'oxygène singulet (¹O₂) dont la réactivité chimique unique en fait un réactif de choix pour la synthèse de produits naturels (*via* des réactions de photo-oxydation)¹³ ; celle-ci est également mise à profit dans le contexte biomédical avec la thérapie photodynamique (PDT)¹⁴. Dans la suite de cet état de l'art, seule la bibliographique se rapportant aux dérivés portant des amines en position 3 et 6, *i.e.* les pyronines, les rhodamines et les rosamines sera développée.

I.1.2. Propriétés spectrales

Les trois pyronines citées ci-dessus ont des maxima d'absorption et d'émission respectivement voisins de 520 nm et 570 nm (fluorescence jaune-orange) avec des rendements quantiques (ϕ_F) de fluorescence dans l'eau d'environ 20%¹⁵. Ce dernier, ainsi que le temps de vie de fluorescence (τ), sont les paramètres les plus influencés par le milieu environnant ; ceci est notamment dû aux interactions solvant-molécule qui conduisent à des processus de désexcitation non-radiatifs tel que le TICT (voir partie II.2.1. de l'introduction générale) ou l'ULM ("Umbrella-Like Motion")¹⁶. Les propriétés photo-physiques de ces dérivés en milieu physiologique ont été étudiées, montrant que l'addition de dioxygène¹⁷, les interactions avec des organites cellulaires¹⁸, ou encore les réactions d'hydratation de la position C-9 conduisent à la diminution voire à l'extinction de la fluorescence¹⁹.

La TMR sous sa forme zwitterionique présente un maximum d'absorption à 548 nm avec un coefficient molaire d'absorption ϵ de $7.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et un maximum d'émission à 572 nm (région vert-jaune) avec un rendement quantique de 41% dans l'eau²⁰. Les rosamines (souvent nommées abusivement rhodamines) possèdent des propriétés spectrales similaires et sont elles aussi largement étudiées²¹. Pour ces deux sous-classes, le phényle porté par la position *meso* n'est

¹⁰ Pour des revue sur l'utilisation des fluorescéines : a) Y. Duan, M. Liu, W. Sun, M. Wang, S. Liu, Q. X. Li, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2009**, 6, 35-43; b) F. Yan, K. Fan, Z. Bai, R. Zhang, F. Zu, J. Xu, X. Li, *Trends Anal. Chem.*, **2017**, 97, 15-35. Pour une revue sur l'utilisation des rhodamines : c) M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2410-2433.

¹¹ T. Marshall, N. J. Abbott, P. Fox, K. M. Williams, *Electrophoresis*, **1995**, 16, 28-31.

¹² D. C. Neckers, *J. Photochem. Photobiol. A* **1989**, 47, 1-29.

¹³ A. A. Ghogare, A. Greer, *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 9994-10034.

¹⁴ P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3181-3209.

¹⁵ X.-F. Zhang, J. Zhang, X. Lu, *J. Fluoresc.*, **2015**, 25, 1151-1158.

¹⁶ Y. Onganer, E. L. Quitevis, *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 7996-8001.

¹⁷ N. Çelebi, M. Arık, Y. Onganer, *J. Lumin.*, **2007**, 126, 103-108.

¹⁸ Pour des publications sur le sujet : appliqué au glucose : A. A. Essawy, M. S. Attia, *Talanta*, **2013**, 107, 18-24; à l'albumine : A. Salci, M. Toprak, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2017**, 35, 8-16; aux membranes mitochondriale : T. Tomov, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1986**, 13, 29-38.

¹⁹ M. El Baraka, M. Deumié, P. Viallet, T. J. Lampidis, *J. Photochem. Photobiol. A* **1991**, 56, 295-311.

²⁰ I. Johnson, *Histochem. J.*, **1998**, 30, 123-140.

²¹ Pour des exemples, voir : a) R. Bandichhor, A. D. Petrescu, A. Vespa, A. B. Kier, F. Schroeder, K. Burgess, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 1219-1225; b) Y.-H. Ahn, J.-S. Lee, Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4510-4511; c) J.-S. Lee, Y. K. Kim, M. Vendrell, Y.-T. Chang, *Mol. BioSyst.*, **2009**, 5, 411-421; d) R. Sun, X.-D. Liu, Z. Xun, J.-M. Lu, Y.-J. Xu, J.-F. Ge, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2014**, 201, 426-432; e) J. Cheng, J. Song, H. Niu, J. Tang, D. Zhang, Y. Zhao, Y. Ye, *New J.*

pas conjugué avec le cœur xanthylium du fait de la libre rotation autour de la liaison C-C en position 9. Il affecte donc peu leurs valeurs de maxima d'absorption et d'émission par rapport à leurs composés pyronines parents¹⁵. Le groupe de L. D. Lavis a mis en évidence que les caractéristiques spectrales (λ_{abs} , λ_{em} , ϕ_F , ε , τ) des rhodamines/rosamines pouvaient être modulées en jouant sur la substitution des groupements amino en positions 3 et 6²². Le rendement quantique et le temps de fluorescence sont les paramètres les plus influencés par le changement de structure ; $\phi_F = 41\%$ et $\tau = 2,21$ ns pour la TMR et $\phi_F = 88\%$ et $\tau = 3,84$ ns pour la rhodamine substituée par deux motifs azétidine (en lieu et place des groupements diméthylamino présents dans la structure de la TMR). Cette variation peut s'expliquer par l'effet TICT (Figure 3) ; le fluorophore **R** absorbe un photon pour passer dans un état excité **R*** qui est suivi d'un transfert d'électron de l'atome d'azote vers le système cyclique du xanthène, pour donner l'intermédiaire **R_{TICT}**. Cet état est énergétiquement favorable et **R_{TICT}** se relaxe sans émission de photons, (*i.e.*, une désexcitation non radiative de l'état excité).

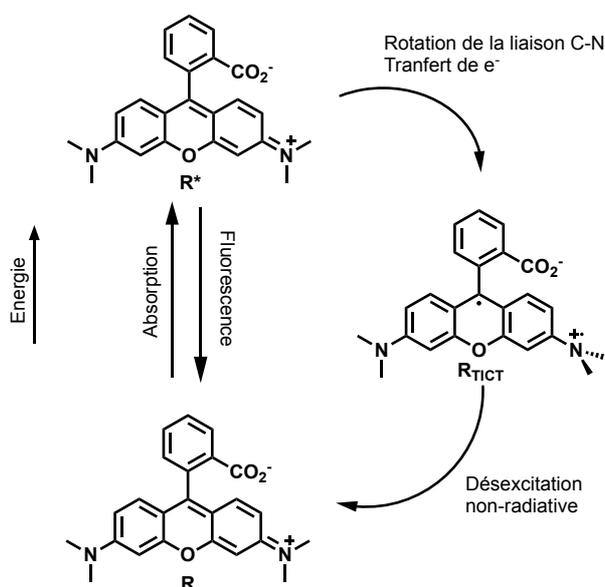


Figure 3. Schéma illustrant le processus du transfert de charge interne twisté (TICT). Inspiré de la publication du groupe de L. Lavis²².

Toutefois, les modulations des maxima d'absorption et d'émission accessibles par cette stratégie restent modérées ; ainsi, par exemple, on n'observe qu'un déplacement bathochrome maximal d'environ 10 nm entre la TMR et la rhodamine substituée par deux motifs pipéridinyle²². Les modulations de structure au niveau des NR₂ ont aussi été très largement étudiées par le groupe de S. W. Hell dans le but d'accroître la résistance au photoblanchiment de ces molécules²³.

Chem., **2016**, *40*, 6384-6388; f) L. Yang, J. Niu, Y. Zhan, Y. Xu, R. Sun, J. Ge, *Chin. J. Chem.*, **2018**, *36*, 42-46; g) Â. Novais, T. Moniz, A. R. Rebelo, A. M. G. Silva, M. Rangel, L. Peixe, *Bioorg. Chem.*, **2018**, *79*, 341-349.

²² J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods*, **2015**, *12*, 244-250.

²³ A. N. Butkevich, M. L. Bossi, G. Lukinavičius, S. W. Hell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 981-989. Pour d'autres travaux du même groupe sur l'influence de la substitution des NH₂ : a) G. Y. Mitronova, V. N. Belov, M. L. Bossi, C. A. Wurm, L. Meyer, R. Medda, G. Moneron, S. Bretschneider, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.*, **2010**, *16*, 4477-4488;

La haute brillance et une bonne stabilité photochimique sont des caractéristiques recherchées dans l'imagerie par fluorescence d'analytes intracellulaires afin d'améliorer la qualité de la détection (notamment le rapport S/N)²⁴. Cependant, afin d'éviter les interférences avec les milieux biologiques complexes, dues principalement à l'auto-fluorescence de certains constituants cellulaires²⁵, la gamme spectrale des maxima d'absorption et d'émission des molécules utilisées est un aspect primordial. Bien que les rhodamines/rosamines conventionnelles aient de bonnes propriétés spectrales par rapport à d'autres classes de fluorophores (e.g., une faible dépendance de la fluorescence vis-à-vis du pH contrairement aux dérivés de coumarine et de fluorescéine), un nombre limité présente une absorption/émission dans le rouge lointain ou le NIR-I (zone où l'absorption des tissus biologiques est la plus faible²⁶ - Figure 4), ce qui les rend inadaptés pour des applications *in vivo* et parfois même complique les expériences sur cellules.

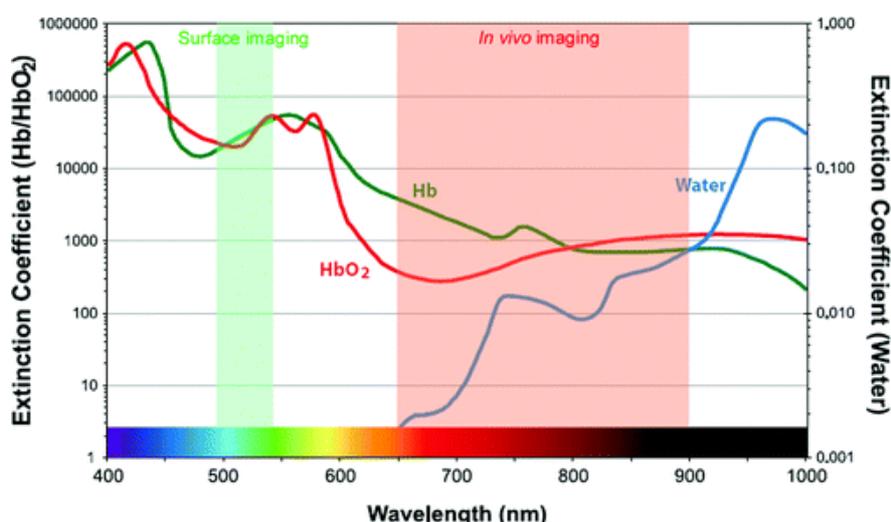


Figure 4. Coefficient d'extinction molaire des principaux constituants biologiques que l'on trouve dans des organismes vivants et représentation de la zone NIR-I du spectre visible. Illustration issue de la revue de Kobayashi *et al.*²⁶. © 2010 American Chemical Society.

Afin d'obtenir des colorants fluorescents de type xanthène possédant des caractéristiques photophysiques dans la gamme spectrale du rouge lointain, voire du NIR-I, deux stratégies ont été principalement explorées et sont exposées ci-dessous.

b) G. Y. Mitronova, S. Polyakova, C. A. Wurm, K. Kolmakov, T. Wolfram, D. N. H. Meineke, V. N. Belov, M. John, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 2015, 337-349; c) A. N. Butkevich, G. Y. Mitronova, S. C. Sidenstein, J. L. Klocke, D. Kamin, D. N. H. Meineke, E. D'Este, P.-T. Kraemer, J. G. Danzl, V. N. Belov, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 3290-3294; d) A. N. Butkevich, V. N. Belov, K. Kolmakov, V. V. Sokolov, H. Shojaei, S. C. Sidenstein, D. Kamin, J. Matthias, R. Vlijm, J. Engelhardt, S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.*, **2017**, 23, 12114-12119; e) A. N. Butkevich, H. Ta, M. Ratz, S. Stoldt, S. Jakobs, V. N. Belov, S. W. Hell, *ACS Chem. Biol.*, **2018**, 13, 475-480.

²⁴ Pour des revues sur le sujet : a) T. Xia, N. Li, X. Fang, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2013**, 64, 459-480; b) Z. Liu, Luke D. Lavis, E. Betzig, *Mol. Cell*, **2015**, 58, 644-659.

²⁵ R. C. Benson, R. A. Meyer, M. E. Zaruba, G. M. McKhann, *J. Histochem. Cytochem.*, **1979**, 27, 44-48.

²⁶ H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2620-2640.

I.1.3. Stratégies de modifications du cœur xanthène pour approcher des longueurs d'ondes dans le NIR-I

La première stratégie, pour induire un déplacement bathochrome significatif des longueurs d'onde d'absorption et d'émission des rhodamines/rosamines, est d'étendre la conjugaison du système π , comme cela est couramment pratiqué avec les colorants de la famille des polyméthine cyanines²⁷. Le groupe de R. P. Haugland, fondateur de la société Molecular Probes (rachetée en 2003 par Invitrogen, et aujourd'hui intégrée au groupe Thermo Fisher Scientific) a été le premier à explorer en profondeur cette voie. Leurs travaux²⁸ ont conduit à la délivrance de plusieurs brevets²⁹ et à la commercialisation d'une nouvelle famille de fluorophores hydrosolubles et bioconjuguables (*i.e.*, possédant une fonction CO₂H activable ou préalablement activée sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimidyle (NHS)) nommés les "Alexa Fluor® dyes" dont ceux présentant des propriétés spectrales dans la gamme 488-633 nm sont des dérivés xanthènes (Figure 5).

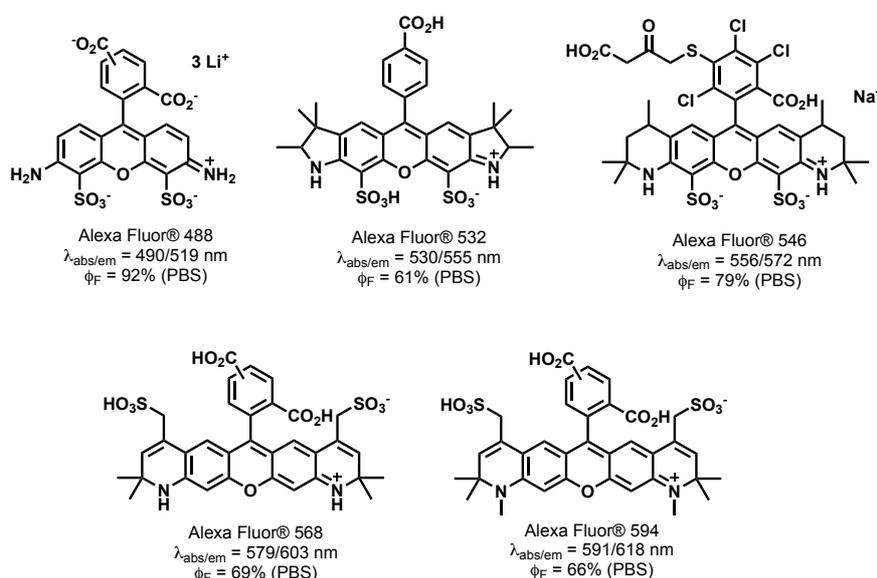


Figure 5. Structures et propriétés photophysiques des "Alexa Fluor® dyes" (PBS = Phosphate Buffered Saline, pour tampon phosphate salin, pH 7,5). Issue de la publication du groupe de R. P. Haugland²⁸.

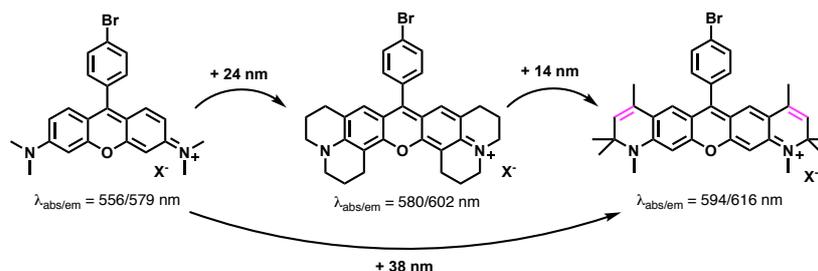
En 2003, le groupe de K. Burgess publie des travaux portant sur l'extension du système π d'analogues de rosamines substituées en position *meso* par un motif *para*-bromophényle³⁰. L'ajout de doubles liaisons sur les cycles pipéridiniques fusionnés au cœur xanthène permet un déplacement bathochrome important comme illustré sur la Figure 6.

²⁷ B. Ballou, L. A. Ernst, A. S. Waggoner, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 795-805.

²⁸ N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung, R. P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.*, **1999**, *47*, 1179-1188.

²⁹ a) F. Mao, W.-Y. Leung, R. P. Haugland, Sulfonated xanthene derivatives synthesis and applications as fluorescent stains. Molecular Probes, Inc., USA . W09915517A1; b) Z. Diwu, J. Liu, R. P. Haugland, K. R. Gee, Novel hydroxyquinoline derivative fluorescent dyes and their biological applications. Molecular Probes, Inc., USA . W02002012195A1.

³⁰ G.-S. Jiao, J. C. Castro, L. H. Thoresen, K. Burgess, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 3675-3677.

Figure 6. Dérivés rosamines développées en 2003 par le groupe de K. Burgess³⁰

Cinq années plus tard, le groupe de M. Lemaire publie une nouvelle voie de synthèse basée sur la réaction de Heck³¹ facilitant l'accès à des dérivés aux systèmes π conjugués étendus, initialement développés par le groupe de R. P. Haugland³². Ces derniers montrent les mêmes propriétés spectrales que les précédents dérivés, cependant leurs rendements quantiques ont été déterminés dans des solvants organiques (Figure 7). Tout comme dans les travaux présentés précédemment (études réalisées dans l'éthanol), aucun de ces dérivés n'a été caractérisé, du point de vue spectral, dans un tampon aqueux (typiquement le PBS à pH 7.4). En effet, l'ajout de cycles (hétéro)aromatiques confère le plus souvent à la structure un caractère hydrophobe marqué et donc une solubilité dans l'eau médiocre et/ou une forte tendance à s'agréger en milieu aqueux. Cela affecte souvent les propriétés spectrales (notamment le rendement quantique de fluorescence) et il est alors indispensable de développer et/ou d'appliquer une méthode d'hydrosolubilisation souvent basée sur l'introduction de groupements polaires, chargés à pH physiologique ou zwitterioniques³³. La difficulté consiste à obtenir des xanthènes bolaamphiphiles³⁴ et non pas des molécules solubles dans l'eau et non fluorescentes car formant des micelles en milieu aqueux. Un important travail de conception moléculaire et de synthèse est donc souvent nécessaire pour obtenir des colorants xanthènes à la fois brillants et utilisables en milieu biologique. Si on fait abstraction du paramètre solubilité, il est intéressant de noter que plusieurs réalisations spectaculaires ont été publiées lors de la dernière décennie avec notamment les aminobenzopyrano-xanthènes (**ABPX**) du groupe de S. Kamino³⁵ ou les dérivés **ECX** du groupe de Y. Yang³⁶ qui possèdent des propriétés spectrales dans la gamme 850-950 nm (Figure 8).

³¹ E. David, J. Lejeune, S. Pellet-Rostaing, J. Schulz, M. Lemaire, J. Chauvin, A. Deronzier, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 1860-1864.

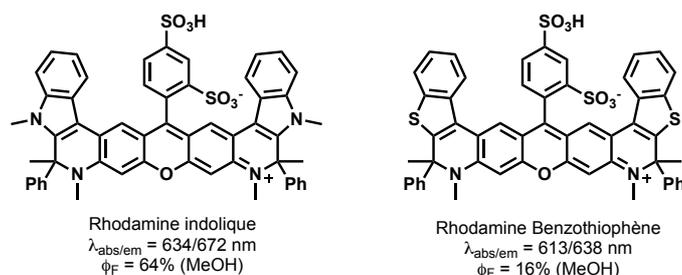
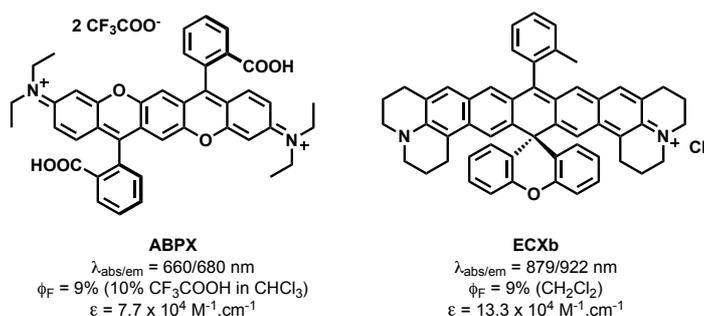
³² J. Liu, Z. Diwu, W.-Y. Leung, Y. Lu, B. Patch, R. P. Haugland, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 4355-4359.

³³ Pour des publications sur des méthodes d'hydrosolubilisations de cœurs xanthènes fluorescents : a) A. Romieu, D. Brossard, M. Hamon, H. Outaabout, C. Portal, P.-Y. Renard, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 279-289; b) V. P. Boyarskiy, V. N. Belov, R. Medda, B. Hein, M. Bossi, S. W. Hell, *Chem. - Eur. J.*, **2008**, 14, 1784-1792; c) A. Romieu, D. Tavernier-Lohr, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire, P.-Y. Renard, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 3304-3308; d) A. Chevalier, C. Mercier, L. Saurel, S. Oregna, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 8815-8817; e) P. Shieh, M. S. Siegrist, A. J. Cullen, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111, 5456-5461; f) A. Chevalier, W. Piao, K. Hanaoka, T. Nagano, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, 3, 044004.

³⁴ J.-H. Fuhrhop, T. Wang, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 2901-2937.

³⁵ Pour des publications du groupe sur le sujet : a) S. Kamino, M. Murakami, M. Tanioka, Y. Shirasaki, K. Watanabe, J. Horigome, Y. Ooyama, S. Enomoto, *Org. Lett.*, **2014**, 16, 258-261; b) M. Tanioka, S. Kamino, A. Muranaka, Y. Ooyama, H. Ota, Y. Shirasaki, J. Horigome, M. Ueda, M. Uchiyama, D. Sawada, S. Enomoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 6436-6439; c) Y. Shirasaki, Y. Okamoto, A. Muranaka, S. Kamino, D. Sawada, D. Hashizume, M. Uchiyama, *J. Org. Chem.*, **2016**, 81, 12046-12051; d) N. Fukino, S. Kamino, M. Takahashi, D. Sawada, *J. Org. Chem.*, **2017**, 82, 13626-13631.

³⁶ Z. Lei, X. Li, X. Luo, H. He, J. Zheng, X. Qian, Y. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 2979-2983.


 Figure 7. Structures et propriétés photophysiques de sulforhodamines à conjugaison étendue³¹.

 Figure 8. Structures et propriétés photophysiques de dérivés xanthènes à conjugaison étendue^{35c,36}.

Afin de pallier au principal défaut de la méthode exposée ci-dessus (*i.e.*, augmentation excessive de la taille et du caractère hydrophobe du colorant xanthène), une seconde stratégie moins intuitive a été envisagée au début des années 2000. Elle repose sur une modification chimique subtile, à savoir la substitution de l'atome d'oxygène intracyclique du cœur xanthène par un atome de carbone disubstitué (typiquement CMe₂) ou plus généralement un motif possédant un hétéroatome (*e.g.*, SiR₂, GeR₂, S, Se, P(O)R, P(O)OR, ...).

Dans les années 2000, le groupe de K. H. Drexhage est le premier à explorer cette voie en synthétisant des dérivés carbo-pyronines et carbo-rosamines³⁷. Celles-ci présentent des déplacements bathochromes de leurs maxima d'absorption et d'émission de plus de 50 nm par rapport à leurs homologues oxygénés. En 2004, c'est au groupe de M. Detty d'exploiter cette stratégie en substituant l'atome oxygène intracyclique de la tétraméthylrosamine par un atome de soufre ou de sélénium afin d'obtenir de bons photosensibilisateurs pour des applications en PDT³⁸. Les longueurs d'ondes sont déplacées de +20 nm et +30 nm respectivement pour le soufre et le sélénium. Ces deux atomes favorisent en outre le passage à l'état triplet de la molécule excitée (*i.e.*, ISC favorisé par l'effet d'atome lourd) ce qui a pour conséquence une forte diminution du rendement quantique de fluorescence de ces composés (de moitié pour la S-tétraméthylrosamine et quasi-nul pour la Se-tétraméthylrosamine) et une forte augmentation du rendement quantique de formation de ¹O₂. Les dérivés S- et Se-xanthènes sont donc généralement de bons photosensibilisateurs contrairement au composé oxygéné parent. La première Si-pyronine,

³⁷ J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, N. U. Kemnitzer, A. Zilles, K. H. Drexhage, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2001**, 57A, 2271-2283.

³⁸ M. R. Detty, P. N. Prasad, D. J. Donnelly, T. Ohulchanskyy, S. L. Gibson, R. Hilf, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 2537-2544.

nommée **TMDHS**, analogue SiMe₂ de la pyronine Y, sera quant à elle synthétisée en 2008 par le groupe de Y. Xiao. Elle présente un maximum d'absorption à 634 nm et un maximum d'émission à 660 nm avec un rendement quantique de 18% dans l'eau³⁹. C'est cette réalisation remarquable qui a inspiré de nombreux groupes de recherche à travers le monde et a permis le développement exponentiel des travaux sur les colorants hétéro-xanthènes. L'étendue de ces réalisations publiées sur une période de moins de 10 ans est bien illustrée par la Figure 9 issue de la revue du groupe de K. Hanaoka et T. Nagano⁴⁰. Un état de l'art non-exhaustif des différents hétéro-xanthènes et plus particulièrement les travaux concernant les sulfone-xanthènes ainsi que les Si-xanthènes sera détaillé dans la prochaine partie.

³⁹ M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao, Y. Xu, *Chem. Commun.*, **2008**, 1780-1782.

⁴⁰ T. Ikeno, T. Nagano, K. Hanaoka, *Chem. - Asian J.*, **2017**, *12*, 1435-1446.

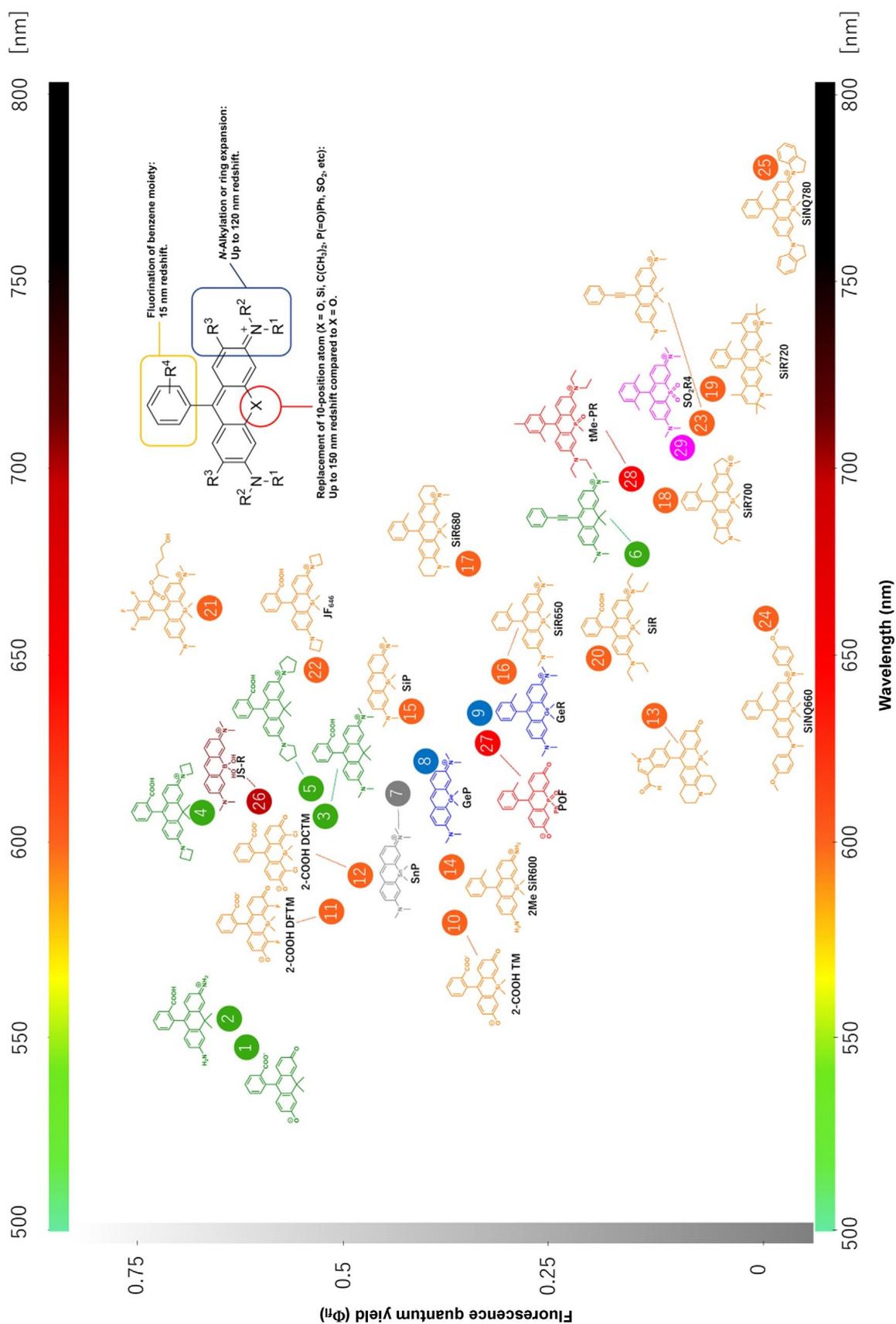


Figure 9. Représentation des différents (hétéro-)xanthènes suivant leurs maxima d'absorption et leur rendement quantique de fluorescence. Illustration issue de la revue de Ikeno *et al.*⁴⁰. © 2017 Wiley-VCH.

I.2. Les Hétéro-xanthènes

Dans cette partie, seules les propriétés spectrales des hétéro-xanthènes seront présentées. Leurs utilisations en tant que fluorophore ou sonde fluorogénique seront discutées dans le chapitre 2.

I.2.1. Hétéro-xanthènes du groupe 13

A ce jour, l'atome de bore (B) est le seul atome du groupe 13 (métalloïde pour B ou métal pauvre pour Al, Ga, In, Tl) à avoir été utilisé comme substitut à l'atome d'oxygène. La première B-pyronine, nommé **JS-R** (qui présente un motif borinate) publiée en 2016 par le groupe de Y. Egawa, présente un maximum d'absorption à 611 nm et un maximum d'émission à 631 nm, soit un déplacement vers le rouge de plus de 60 nm par rapport à la pyronine Y (voir la Figure 2 pour un rappel de sa structure)⁴¹. Une année plus tard, l'équipe de C. I. Stains a synthétisé la B-rosamine, **RF₆₂₀**, dont les maxima d'absorption et d'émission sont peu différents de ceux de **JS-R**⁴² (ca. 10 nm, Figure 10).

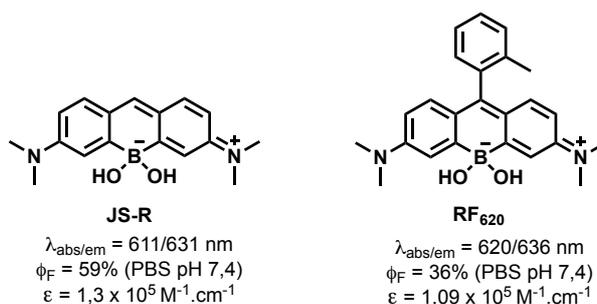


Figure 10. Structures et propriétés spectrales des B-xanthènes. Référence 41 pour **JS-R** et 42 pour **RF₆₂₀**.

Le déplacement bathochrome des maxima d'absorption/émission observés pour **JS-R**, a été rationalisé *via* des calculs de DFT ("*Density Functional Theory*") qui montrent que la LUMO du dérivé boré est plus basse que celle de la pyronine Y. En effet, dans la LUMO de cette dernière, l'atome d'oxygène présente une orbitale en opposition de phase par rapport à celle des atomes de carbone adjacents, ce qui empêche le recouvrement orbitalaire et provoque ainsi une interruption du système π augmentant ainsi la valeur de ce niveau d'énergie. En revanche, l'atome de bore, en configuration sp^3 , ne présente pas cette orbitale, ainsi le système de conjugaison n'est pas interrompu et la LUMO est stabilisée, conduisant ainsi à une réduction de l'écart énergétique HOMO-LUMO⁴¹.

⁴¹ N. Shimomura, Y. Egawa, R. Miki, T. Fujihara, Y. Ishimaru, T. Seki, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 10031-10036.

⁴² X. Zhou, L. Lesiak, R. Lai, J. R. Beck, J. Zhao, C. G. Elowsky, H. Li, C. I. Stains, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 4197-4200.

I.2.2. Hétéro-xanthènes du groupe 14

Parmi les atomes du groupe 14 du tableau périodique, le carbone (C), le silicium (Si), le germanium (Ge) et l'étain (Sn) ont été utilisés comme substitués à l'atome d'oxygène du xanthylum, toujours dans le but de modifier les propriétés spectrales des colorants xanthènes conventionnels. Les maxima d'absorbance et d'émission sont tous décalés vers le rouge suite à la stabilisation (*i.e.*, diminution de l'énergie) de leur LUMO par une conjugaison $\sigma^*-\pi^*$ entre l'orbitale σ^* de la liaison Me-X (X = C, Si, Ge, Sn) et l'orbitale π^* de la liaison X-Csp² du cœur xanthène⁴³. Ces effets sont comparables à ceux observables au sein des siloles et mis en évidence par S. Yamaguchi et K. Tamao suite à l'étude des orbitales frontières du cyclopentadiène et de son analogue silicié⁴⁴. La différence entre les déplacements bathochromes obtenus avec les carbo-xanthènes et les Si-xanthènes s'explique par une stabilisation supplémentaire de la LUMO du dérivé silicié en raison d'une conjugaison $d^*-\pi^*$ absente dans le cas des dérivés CMe₂. Comme le caractère électro-donneur des deux motifs (CMe₂ et SiMe₂) est comparable, la valeur d'énergie de leur HOMO respective est peu différente. Ainsi l'écart énergétique HOMO-LUMO est plus faible dans les cas des Si-xanthènes et donc un déplacement bathochrome plus marqué des maxima est obtenu.

Suite aux travaux du groupe de K. H. Drexhage³⁷ portant sur les carbopyronines, les carborhodamines ont été étudiées indépendamment par les groupes de S. W. Hell et L. Lavis⁴⁵. Les deux dérivés synthétisés par le groupe de L. Lavis, présentent un déplacement bathochrome de leurs maxima d'absorption et d'émission de plus de 50 nm par rapport aux rhodamines correspondantes.

Le groupe de S. W. Hell a rigidifié la structure des carborhodamines à l'aide de cycles fusionnés au cœur carbo-xanthène, permettant ainsi un gain de plus de 80 nm sur les maxima d'absorption et d'émission^{45b}. Par ailleurs, les dérivés des deux groupes présentent de bons rendements quantiques voisins de 60% en milieu aqueux (Figure 11).

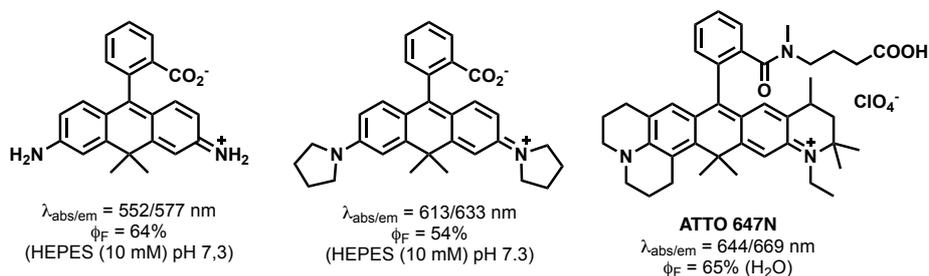


Figure 11. Structures et propriétés photophysiques des carborhodamines développées par le groupe de S.Hell (ATTO 647N) et par le groupe de L. Lavis (molécule de gauche et du milieu)⁴⁵.

⁴³ Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, 6, 600-608.

⁴⁴ S. Yamaguchi, K. Tamao, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 3693-3702.

⁴⁵ a) J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig, L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8, 1303-1310; b) K. Kolmakov, V. N. Belov, C. A. Wurm, B. Harke, M. Leutenegger, C. Eggeling, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 3593-3610.

En 2011, le groupe de T. Nagano publie la synthèse des dérivés SiMe₂, GeMe₂ et SnMe₂, en préparant à la fois les trois dérivés *N,N,N',N'*-tétraméthyl-hétéro-pyronines ainsi que les hétéro-rosamines correspondantes. Pour ces dernières, le motif (2-méthylphényle) a été choisi comme substituant de la position *meso* (Figure 12)⁴³.

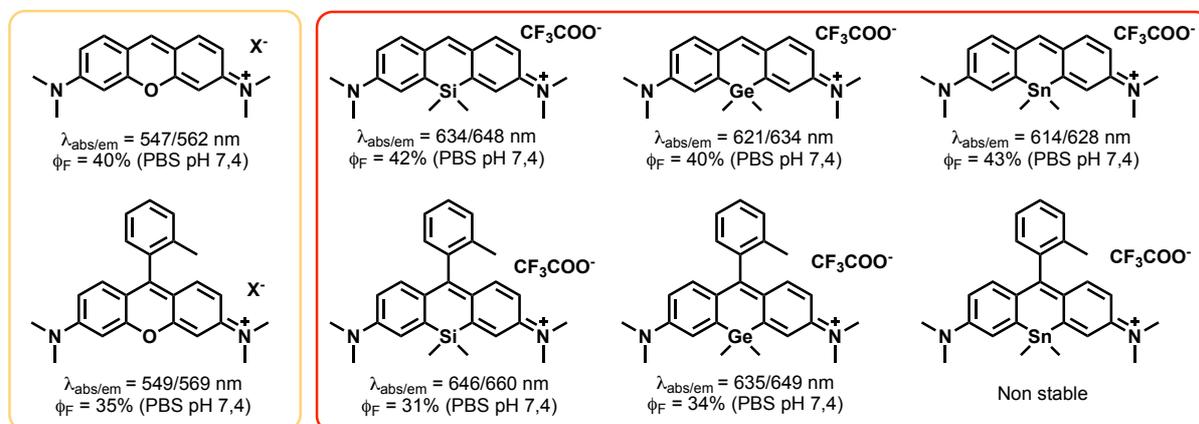


Figure 12. Structures et propriétés photophysiques des dérivés Si, Ge et Sn-xanthènes publiés par le groupe de T. Nagano⁴³.

La substitution par le motif SiMe₂ est celle qui provoque un déplacement vers le rouge des maxima d'absorption et d'émission le plus important et voisin de 100 nm (contre 90 nm pour le motif GeMe₂). Enfin, en dépit de la rapide oxydation de la Sn-pyronine en Sn-xanthone, ses caractéristiques spectrales ont pu être déterminées et présentent un déplacement bathochrome encore moins important, de 80 nm, par rapport à celles de la pyronine Y. La Sn-rosamine se dégradant trop rapidement au contact de l'air, ses propriétés spectrales n'ont pas pu être mesurées. Les rendements quantiques sont peu impactés par le changement d'atome intracyclique et restent du même ordre de grandeur. La diminution des longueurs d'absorption et d'émission en fonction de l'augmentation de la taille de l'atome s'explique par une stabilisation moins marquée de la LUMO due à une plus grande distance de la liaison X-Csp² participant à la conjugaison $\sigma^*-\pi^*$ ⁴⁶. A ce jour, la substitution par le motif SiMe₂ est la modification chimique apportée au cœur xanthène, la plus populaire⁴⁷. Une analyse bibliographique plus détaillée des différentes améliorations/utilisations des colorants Si-xanthènes sera ainsi présentée dans la partie II.2.

I.2.3. Hétéro-xanthènes du groupe 15

L'azote (N), le phosphore pentavalent (P) et plus récemment le bismuth (Bi) sont les atomes du groupe 15 ayant déjà été introduits dans le cœur xanthène, en lieu et place de l'atome d'oxygène

⁴⁶ H. J. Tracy, J. L. Mullin, W. T. Klooster, J. A. Martin, J. Haug, S. Wallace, I. Rudloe, K. Watts, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 2003-2011.

⁴⁷ Pour des revues sur le sujet : a) Y. Kushida, T. Nagano, K. Hanaoka, *Analyst*, **2015**, *140*, 685-695; b) T. Ikeno, T. Nagano, K. Hanaoka, *Chem. - Asian J.*, **2017**, *12*, 1435-1446; c) M. Zhao, Y.-S. Guo, W.-N. Xu, Y.-F. Zhao, H.-Y. Xie, H.-J. Li, X.-F. Chen, R.-S. Zhao, D.-S. Guo, *Trends Anal. Chem.*, **2020**, *122*, Article 115704.

intracyclique. Seules deux N-pyrônines sont connues dans la littérature : la plus populaire est l'orange d'acridine, qui est fréquemment utilisée pour le marquage des acides nucléiques (Figure 13) ; la fixation s'effectue *via* des processus d'intercalation et des liaisons électrostatiques. On peut différencier les ADNs et les ARNs car leur interaction respective avec l'acridine orange conduit à une émission de fluorescence différente. En effet, elle présente des maxima d'absorption et d'émission similaires à ceux de la fluorescéine (respectivement 439 nm et 528 nm dans l'eau) lorsqu'elle est liée à l'ADN. Cependant liée à l'ARN, une émission de fluorescence rouge est observable à 650 nm⁴⁸. La deuxième N-pyrônine a été synthétisée par le groupe de L. Lavis qui a en plus remplacé le groupement diméthylamino par un cycle azétidine²² (Figure 13). L'impact de cette substitution des amines en positions 3 et 6 est similaire à celui observé avec les rhodamines : une amélioration significative du rendement quantique de fluorescence (21% pour l'acridine orange et 52% pour la N-pyrônine azétidine).

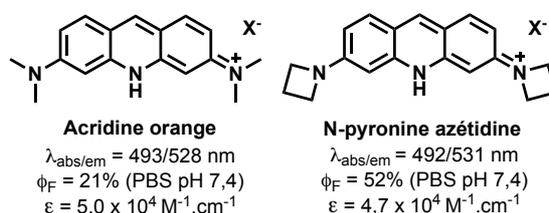


Figure 13. Structure de l'acridine orange et du dérivé N-pyrônine azétidine²².

En 2015, le groupe de T. Wang a décrit la synthèse de trois *N,N,N',N'*-tétraéthyl-P-rosamines dont le *meso*-phényle est non substitué (**PR**), ou porteur d'un (**Me-PR**) ou de trois méthyle(s) (**tMe-PR**)⁴⁹ (Figure 14). En raison de la forte stabilisation de la LUMO qui s'explique une nouvelle fois par la conjugaison $\sigma^*-\pi^*$ et le fort caractère électro-attracteur du P=O, le déplacement bathochrome des maxima d'absorption et d'émission est important par rapport à ceux des rosamines conventionnelles (environ 150 nm).

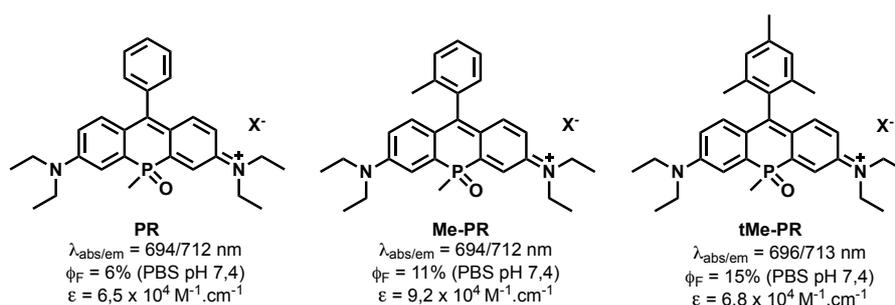


Figure 14. Structures et propriétés photophysiques des dérivés P-rosamines développés par le groupe de T. Wang⁴⁹.

⁴⁸ Y. Kubota, R. F. Steiner, *Biophys. Chem.*, **1977**, 6, 279-289.

⁴⁹ X. Chai, X. Cui, B. Wang, F. Yang, Y. Cai, Q. Wu, T. Wang, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 16754-16758.

La substitution du phényle n'a pas d'influence sur les valeurs des maxima d'absorbance et d'émission, cependant **tMe-PR** présente un meilleur rendement quantique en raison de la rotation restreinte du groupement mésityle en *meso* (ce qui limite un peu les phénomènes de désexcitation non-radiative favorisés par les mouvements moléculaires de rotation/vibration à l'état excité).

Très récemment, le groupe de M. Taki et S. Yamaguchi a publié des travaux sur l'influence de la nature des substituants des groupements NR₂ sur les propriétés photophysiques et la stabilité des P-rosamines à motif intracyclique P(O)R⁵⁰. Le phosphore est introduit dans le cœur xanthène sous la forme d'oxyde de phénylphosphine ce qui va apporter un double avantage : un groupement électro-attracteur plus fort, augmentant ainsi le déplacement vers le rouge des propriétés spectrales et une meilleure photostabilité due à la diminution du niveau d'énergie de l'HOMO. Les études photophysiques montrent que les substituants du groupement NR₂ ne modifient pas significativement les valeurs des maxima d'absorption et d'émission, mais leur encombrement stérique améliore le rendement quantique (dû à une diminution des effets TICT). Enfin, deux P-rosamines substituées par deux motifs *N*-méthylindolinyle ont également été synthétisées. Elles montrent un bon déplacement des longueurs d'ondes vers le rouge (+70 nm) qui s'explique par la rigidification du lien C-N suite à la fusion du cycle à 5 chaînons au cœur xanthène qui limite ainsi les phénomènes de relaxation non-radiative. Comme habituellement observé avec les xanthènes absorbant/émettant dans cette gamme spectrale, le coefficient d'absorption molaire et le rendement quantique ont, quant à eux, diminué (Figure 15).

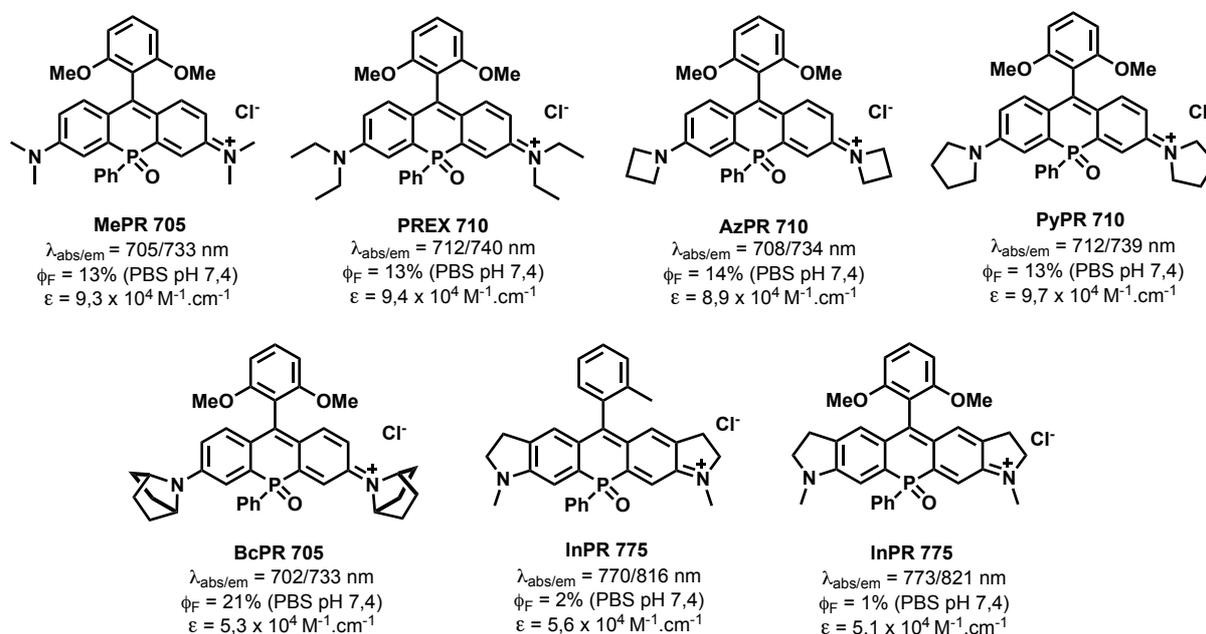


Figure 15. Structures et propriétés photophysiques des P-rosamines à motif intracyclique P(O)R récemment développées par le groupe de M. Taki et S. Yamaguchi⁵⁰.

⁵⁰ M. Grzybowski, M. Taki, K. Kajiwara, S. Yamaguchi, *Chem. Eur. J.*, **2020**, *26*, 7912-7917. Pour d'autres de ce groupe sur le sujet, voir : a) M. Grzybowski, M. Taki, S. Yamaguchi, *Chem. - Eur. J.*, **2017**, *23*, 13028-13032; b) M. Grzybowski, M. Taki, K. Senda, Y. Sato, T. Ariyoshi, Y. Okada, R. Kawakami, T. Imamura, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 10137-10141.

Dans la continuité des recherches portant sur les fluorophores émettant dans une gamme spectrale supérieur à 700 nm, le groupe de C. I. Stains a développé quatre P-rosamines pour lesquelles le motif intracyclique est un P(O)OR (on parle alors de rosamines phosphinates) qu'il a nommé "Nebraska dyes" (Figure 16)⁵¹.

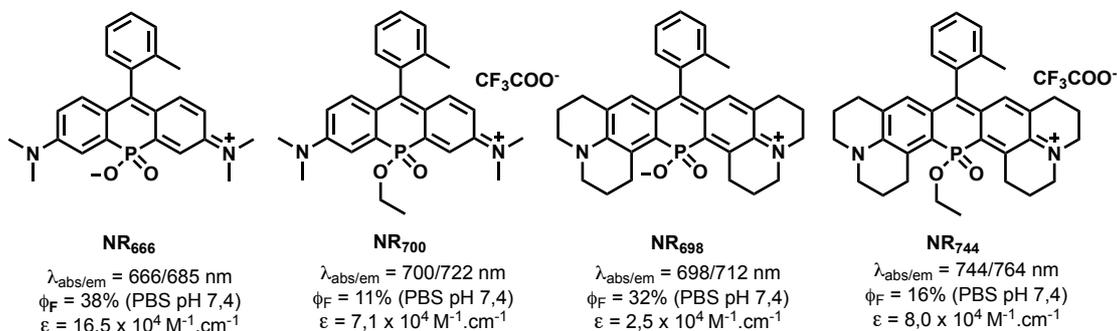


Figure 16. P-rosamines à motif intracyclique phosphinate ("Nebraska dyes") développées par le groupe de C. I. Stains⁵¹.

De même que pour les dérivés P-rosamines précédents, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont très décalées vers le rouge, exactement +116 nm pour la **NR₆₆₆** comparée avec celles de la rosamine conventionnelle. Par ailleurs, il est intéressant de préciser que les auteurs ont démontré que les dérivés ester éthylique **NR₇₀₀** et **NR₇₄₄** présentent des propriétés de pénétration cellulaire intéressantes (validations sur cellules vivantes HeLa) alors que les composés **NR₆₆₆** et **NR₆₉₈** ne sont pas capables de franchir les membranes en raison de la charge négative de leur motif phosphinate déprotoné à pH physiologique. Une fois à l'intérieur des cellules, l'ester éthylique s'hydrolyse et le fluorophore reste donc localisé au sein des cellules. Ces caractéristiques intéressantes ont été mises à profit très récemment en bioimagerie par ce même groupe⁵².

Enfin, le seul dérivé Bi-rosamine publié, a été développé en 2017 par le groupe de T. Hirayama et H. Nagasawa⁵³. Celui-ci présente un maximum d'absorption à 635 nm ($\epsilon = 7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et un maximum d'émission à 658 nm ($\phi_{\text{F}} = 4\%$), soit un déplacement bathochrome de + 80 nm par rapport à la tétraméthylrosamine (Figure 17). Son efficacité en tant que photosensibilisateur a été démontré sur des cellules de carcinome hépatocellulaire (HepG2) et son rendement quantique de formation de $^1\text{O}_2$ de 66 % est supérieur à ceux des hétéro-xanthènes du groupe 16 présenté ci-dessous.

⁵¹ X. Zhou, R. Lai, J. R. Beck, H. Li, C. I. Stains, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 12290-12293.

⁵² a) Y. Fang, G. N. Good, X. Zhou, C. I. Stains, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 5962-5965; b) L. Lesiak, X. Zhou, Y. Fang, J. Zhao, J. R. Beck, C. I. Stains, *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, 18, 2459-2467.

⁵³ T. Hirayama, A. Mukaimine, K. Nishigaki, H. Tsuboi, S. Hirose, K. Okuda, M. Ebihara, H. Nagasawa, *Dalton Trans.*, **2017**, 46, 15991-15995.

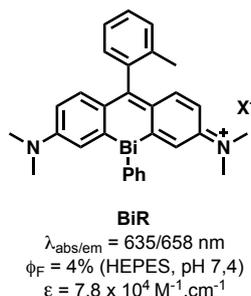


Figure 17. Structure et propriétés photophysiques du dérivé Bi-rosamine **BiR** développé par le groupe de T. Hirayama et H. Nagasawa⁵³.

I.2.4. Hétéro-xanthènes du groupe 16

La première substitution de l'oxygène intracyclique par un autre chalcogène a été envisagée en 2004 par le groupe de M. R. Detty. En effet, ce groupe souhaitait tirer parti de l'effet d'atome lourd induit par cette modification structurale pour favoriser le phénomène d'ISC et donc la production de $^1\text{O}_2$ dans le but ultime d'utiliser ces hétéro-xanthènes comme photosensibilisateurs en PDT³⁸. Les analogues soufré et sélénié de la tétraméthylrosamine ont été synthétisés et présentent des maxima d'absorption et d'émission décalés respectivement de +20 nm et +30 nm dans le méthanol, et des rendements quantiques de formation d' $^1\text{O}_2$ de 21% et 87%⁵⁴ (Figure 18).

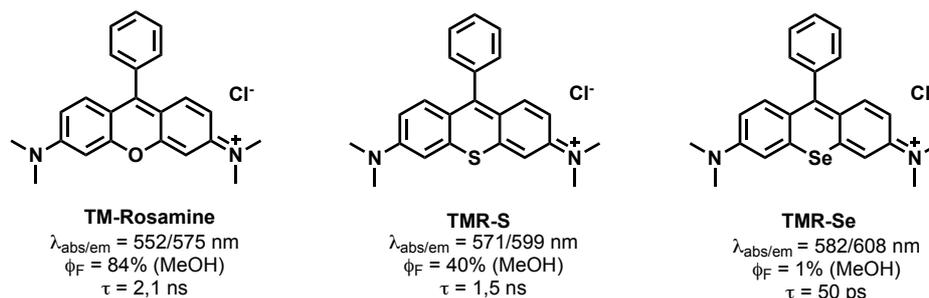


Figure 18. Propriétés photophysiques des analogues chalcogènes publiés par le groupe de M. R. Detty³⁸.

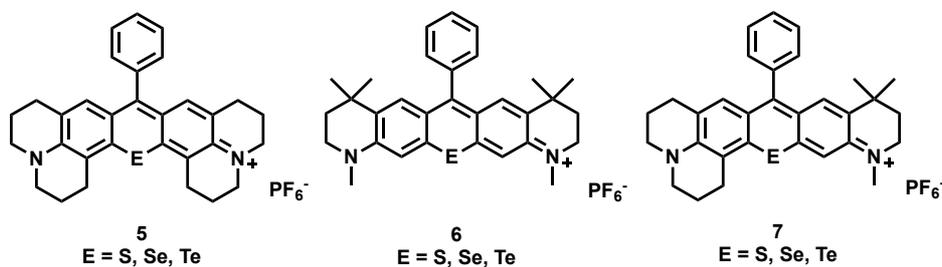
En 2007, le même groupe publie la première rosamine substituée par un atome de tellure (**TMR-Te**)⁵⁵, comme il était prévisible, son maximum d'absorbance est là encore décalé vers le rouge, 597 nm, soit 15 nm de plus que **TMR-Se**. En outre, cette molécule ne fluoresce pas. En 2012, le groupe de T. Nagano utilise cette caractéristique et les propriétés redox du tellure pour synthétiser une sonde fluorogénique réversible capable sous sa forme réduite de réagir avec les ROS et sous sa forme oxydée ($\text{Te}=\text{O}$) de réagir avec des réducteurs biologiques comme le glutathion (GSH). Ainsi, ils ont accédé à un outil de choix pour imager l'état redox des cellules *in vivo*⁵⁶. En effet, la rosamine oxydée **TeOR**, présente des maxima d'absorbance et d'émission respectivement centrés à 669 nm ($\epsilon = 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et 686 nm et le rendement quantique de fluorescence

⁵⁴ T. Y. Ohulchanskyy, D. J. Donnelly, M. R. Detty, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 8668-8672.

⁵⁵ B. Calitree, D. J. Donnelly, J. J. Holt, M. K. Gannon, C. L. Nygren, D. K. Sukumaran, J. Autschbach, M. R. Detty, *Organometallics*, **2007**, *26*, 6248-6257.

⁵⁶ Y. Koide, M. Kawaguchi, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Komatsu, M. Abo, T. Terai, T. Nagano, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 3091-3093.

dans le PBS (pH 7.4) est de 18%. Le groupe de M. R. Detty a intensifié ses recherches sur cette classe d'hétéro-xanthènes et plusieurs dérivés S-, Se-, Te-rosamines, sur lesquelles la substitution des groupements NR₂ varie, ont été synthétisés (Figure 19)⁵⁷. La rigidification induite par la fusion de cycle permet pour les dérivés soufrés et séléniés de moduler légèrement leurs propriétés spectrales. De plus, une fluorescence est observable pour les dérivés tellurés même si le rendement quantique reste très faible (<1%). Les composés **5-Te** et **6-Te** ont été oxydés mais les dérivés Te=O correspondants sont instables. Ainsi, la synthèse de Te-rosamines portant un substituant mésityle en *meso* a été alors envisagée et leur conversion en dérivés Te=O réalisée. Ces deux nouveaux composés présentent des maxima d'absorption et d'émission dans le NIR-I ainsi que des rendements quantiques de fluorescence de 16% dans le MeOH. Ils pourraient servir de plateformes pour le développement de fluorophores performants et utilisables en milieu biologique (Figure 20).



| Composés | λ | ϵ | λ | ϕ |
|-------------|-----------|------------|-----------|--------|
| 5-S | 594 | 1.24 x 10 | 621 | 42% |
| 5-Se | 604 | 1.35 | 631 | 6% |
| 5-Te | 617 | 1.44 | 642 | 0.2% |
| 6-S | 579 | 1.04 | 606 | 53% |
| 6-Se | 590 | 1.36 | 617 | 3% |
| 6-Te | 607 | 1.21 | 632 | 0.2% |
| 7-S | 587 | 1.20 | 614 | 47% |
| 7-Se | 597 | 1.22 | 624 | 2% |
| 7-Te | 610 | 1.27 | 637 | 0.3% |

Figure 19. Structures et propriétés photophysiques des dérivés S-, Se-, Te-rosamines de seconde génération développée par le groupe de M. R. Detty⁵⁷. Les paramètres ont été déterminés en solution dans le MeOH.

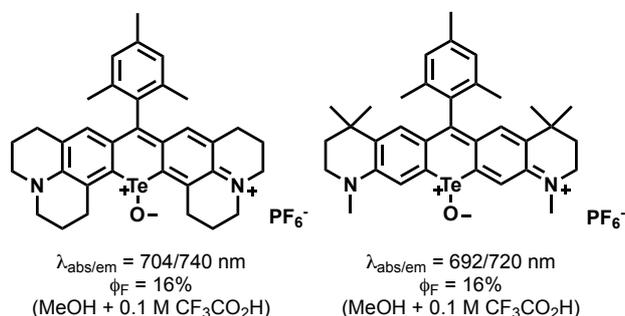


Figure 20. Structures et propriétés photophysiques des dérivés Te(O)-rosamines⁵⁷ stabilisés par introduction d'un substituant mésityle en position *meso*.

⁵⁷ M. W. Kryman, G. A. Schamerhorn, J. E. Hill, B. D. Calitree, K. S. Davies, M. K. Linder, T. Y. Ohulchanskyy, M. R. Detty, *Organometallics*, **2014**, 33, 2628-2640.

Ces différents travaux montrent que pour les hétéro-xanthènes contenant un chalcogène, le déplacement vers le rouge des longueurs d'onde des maxima d'absorption et d'émission est croissant avec la taille des atomes ($O < S < Se < Te$) contrairement à ce qui est observé pour le groupe 14. En effet, celle-ci influence la longueur de liaison entre le chalcogène et les carbones du cœur xanthène ce qui va aussi impacter la valeur de l'angle de ce dernier avec les liens amines. Ainsi, plus l'atome est gros, plus les liens vont être longs et considérés comme un système π conjugué plus grand et dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission seront déplacées vers le rouge^{38,55}. Enfin, les atomes de soufre, de sélénium et de tellure sont des atomes lourds qui vont favoriser le phénomène d'ISC menant à la diminution du rendement quantique de fluorescence des composés.

Enfin, récemment, une nouvelle famille d'hétéro-rosamines présentant un soufre dioxydé SO_2 (*i.e.*, motif sulfone), a attiré notre attention. Les travaux émanant du groupe de W. Guo, rapportent la synthèse de cinq sulfone-rosamines dont les propriétés spectrales notamment dans le PBS (pH 7.4) sont très intéressantes : maxima d'absorption et d'émission supérieurs à 700 nm et des rendements quantiques dans la gamme 5-10% (Figure 21). Les auteurs ont également synthétisé un dérivé sulfone-rhodamine (*i.e.*, possédant le motif 2-carboxyphényle comme substituant *meso*) mais ce composé n'existe en solution que sous la forme lactone non colorée et non fluorescente⁵⁸.

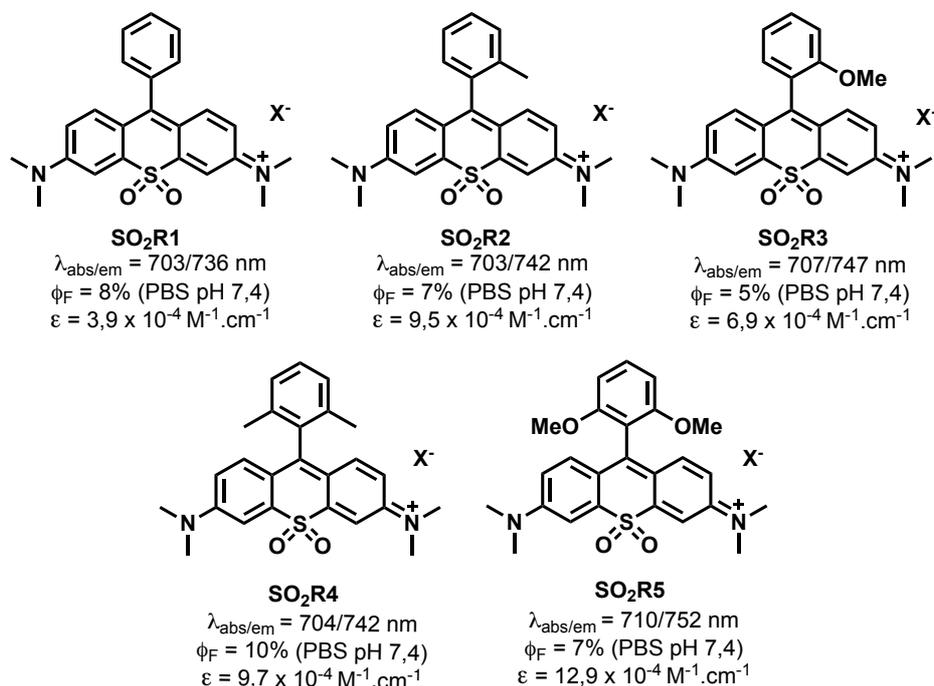


Figure 21. Structure et propriétés photophysiques des sulfone-rosamines développées par le groupe de W. Guo⁵⁸.

Ce déplacement bathochrome est dû, comme précédemment, à une diminution du niveau d'énergie de la LUMO. La stabilisation plus marquée de la LUMO résulte d'une seconde hyperconjugaison s'ajoutant à celle impliquant les orbitales $\sigma^*-\pi^*$; elle met en jeu une interaction entre

⁵⁸ J. Liu, Y.-Q. Sun, H. Zhang, H. Shi, Y. Shi, W. Guo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8, 22953-22962.

l'orbitale vacante d^* de l'atome de soufre et le système π^* du motif xanthène⁵⁹. En plus de cette conjugaison $d^*-\pi^*$, il y a également le caractère fortement électro-attracteur du groupement SO_2 qui diminue d'autant plus l'énergie de la LUMO. Ainsi les maxima d'absorbance/émission sont déplacés dans le NIR-I⁵⁸.

Le potentiel des deux dérivés présentant la meilleure stabilité physico-chimique **SO₂R4** et **SO₂R5** a été illustré par des expériences d'imagerie cellulaire sur des lignées HeLa. Après dix minutes d'incubation, il est possible de voir que les composés ont pénétré les membranes cellulaires et se sont accumulés dans le cytoplasme⁵⁸.

I.3. Vers la synthèse d'hétéro-pyronines

Les caractéristiques spectrales des (hétéro)xanthènes, tels qu'une brillance souvent élevée dans la gamme visible du spectre électromagnétique (400-650 nm), une bonne photostabilité à la fois dans les solvants organiques et les milieux aqueux ainsi que leur bonne stabilité chimique dans diverses conditions de pH, de température et vis-à-vis de nombreux réactifs chimiques, en font des fluorophores de choix pour la conception de systèmes photo-actifs "intelligents" requis dans un large éventail d'applications bio-analytiques ou biomédicales^{1b),10c)}. Ainsi, de nombreuses sondes fluorogéniques dites conventionnelles peuvent être facilement conçues soit par protection réversible des anilines (primaires ou secondaires suivant le colorant xanthène considéré) ou le processus de spirolactonisation/lactamisation impliquant la position *meso* du cœur xanthène⁶⁰.

Les résultats prometteurs sur les sulfone-rosamines décrites par le groupe de W. Guo, nous ont motivés à étudier la substitution de l'oxygène intracyclique des pyronines par le motif SO_2 . En effet, ce changement d'hétéroatome nous permettra de conserver une taille de molécule raisonnable tout en déplaçant les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission dans le NIR-I. Nos travaux sur le développement de nouveaux dérivés sulfone-xanthènes seront présentés dans la partie suivante et seront suivis par ceux portant sur de nouvelles Si-pyronines.

⁵⁹ Pour des publications sur la conjugaison $d^*-\pi^*$ dans des composés sulfonés : a) W. Rettig, E. A. Chandross, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 5617-5624; b) G. Fraenkel, A. Chow, J. Gallucci, S. Q. A. Rizvi, S. C. Wong, H. Finkelstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 5339-5341.

⁶⁰ Pour des revues sur le sujet : a) H. N. Kim, M. H. Lee, H. J. Kim, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1465-1472; b) X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 1910-1956; c) H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian, X.-J. Zhang, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 429-447; d) Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 5003-5015.

II. Résultats et discussion

II.1. Synthèse de dérivés sulfone-xanthènes

Pour rappel et comme ce sera développé dans le second chapitre de ce manuscrit, nous avons pour objectif de synthétiser des sondes pro-fluorescentes dites "cagées" qui seront capables d'être converties en fluorophore (typiquement une hétéro-pyronine) sous l'action du bio-analyte ciblé (typiquement, une enzyme) (Figure 22). Ainsi, il est indispensable qu'à la fois la sonde et le fluorophore formé *in situ* soient totalement stables en conditions physiologiques. De plus, un second objectif de notre projet est de développer une stratégie dont l'exemplification à un large éventail d'analytes sera facile. Pour ce faire, il est nécessaire que notre molécule (*i.e.*, la sonde "cagée") possède au moins une aniline primaire fonctionnalisée par un motif reconnu par l'analyte ciblé. Par conséquent, le fluorophore formé *in situ* sera une (hétéro-)pyronine qui présentera au moins un groupement NH₂. Comme la synthèse d'hétéro-pyronines non-symétriques n'est pas aisée, du moins sur le papier, il est plus simple dans un premier temps (notamment pour obtenir rapidement une preuve de principe) d'envisager des sondes et des hétéro-pyronines possédant deux anilines primaires. Il faudra simplement veiller à synthétiser un précurseur "cagé" présentant également deux groupements NH₂ protégés par le même motif de reconnaissance de l'analyte ciblé.

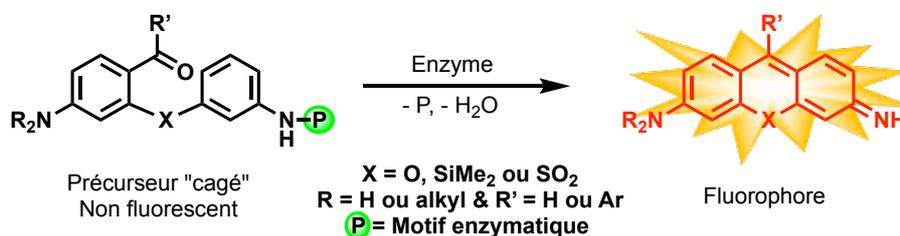
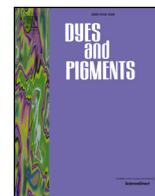


Figure 22. Structure générale des précurseurs "cagés" envisagée pour appliquer le concept de synthèse *in situ* de colorant (hétéro)xanthène au diagnostic microbiologique.

Les sulfone-pyronines et notamment l'analogue SO₂ de la 3-imino-3H-xanthène-6-amine n'étant pas connues dans la littérature, il est nécessaire dans un premier temps de synthétiser ce fluorophore de référence pour en étudier ses propriétés spectrales et sa stabilité en milieu aqueux. La préparation de la première sulfone-pyronine et de la première sulfone-rosamine portant deux groupements NH₂, ainsi que l'étude de leurs propriétés photophysiques et de leurs stabilités en milieu aqueux ont fait l'objet d'une première publication parue en 2018 dans le journal *Dyes and Pigments*⁶¹ (éditeur Elsevier, portail ScienceDirect.com) qui servira de support à la discussion (les molécules **GD17** et **GD34** correspondent respectivement aux molécules **1** et **2** de cet article.)

⁶¹ G. Dejoux, M. Laly, I. E. Valverde, A. Romieu, *Dyes Pigm.*, **2018**, 159, 262-274.

II.1.1. Article 1. "Synthesis, stability and spectral behavior of fluorogenic sulfone-pyronin and sulfone-rosamine dyes"



Synthesis, stability and spectral behavior of fluorogenic sulfone-pyronin and sulfone-rosamine dyes

Garance Dejouy^a, Myriam Laly^a, Ibai E. Valverde^a, Anthony Romieu^{a,b,*}

^a Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21078, Dijon Cedex, France

^b Institut Universitaire de France, 1, Rue Descartes, Bâtiment MONGE, 75231, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Fluorogenic enzyme substrate
Hetero-xanthene dye
NIR dye
Pyrone
Rosamine

ABSTRACT

The first synthesis of sulfone-pyronin and sulfone-rosamine dyes bearing optically tunable primary amino groups (acting as fluorogenic centers) is presented. Sulfone analogs of xanthene-based fluorophores have recently been highlighted as a new class of near-infrared (NIR) fluorescent dyes (Liu et al. ACS Appl Mater Interfaces 2016; 8(35):22953–62), and the availability of fluorogenic derivatives is essential for the rapid construction of “turn-on” reactive probes for chemoselective bioimaging. However, these fluorescent anilines have been found to be unstable in aqueous physiological conditions due to the marked electrophilicity of their *meso*-position and hence its propensity to undergo nucleophilic attack by a water molecule or a hydroxide anion. Further investigations have helped us to determine the acidic pH range at which the sulfone-rosamine **2** is fully-stable and a complete assessment of the photophysical properties could be performed. Its pro-fluorescent character and utility were then proved by the preparation and *in vitro* enzymatic activation of a penicillin G acylase (PGA) sensitive fluorogenic probe.

1. Introduction

Rhodamines and related xanthene dyes (*i.e.*, pyronins, rhodols, and rosamines) are popular visible-wavelength fluorophores as evidenced by their heavy use as optically active reporters in a myriad of applications, particularly in the fields of bioanalysis and bioimaging [1–3]. This broad utility stems from several unique and valuable features inherent in these fluorescent molecules: (1) good to high brightness in both organic solvents and aqueous media often associated with a marked photostability, (2) remarkable chemical stability under harsh conditions of pH and temperature and toward various chemical reagents, (3) cationic character favoring water solubility and cell membrane permeability, and (4) easy modulation of the fluorescence properties through the reversible spirocycle ring-opening process and/or through the protection-deprotection of amino groups [4–7]. Thus, a myriad of fluorescent labeling reagents for biomolecules [8] as well as a huge number of activatable (or “smart”) fluorescent probes for analyte sensing/imaging based on a rhodamine (or pyronin/rhodol/rosamine) scaffold have been developed. Some of them have had a major impact in modern biochemical/biological research [4,5,9], leading sometimes to commercial successes (*e.g.*, dyes belonging to the Alexa Fluor[®] family ranging from Alexa Fluor[®] 488 to Alexa Fluor[®] 635 [10–12], rhodamine

110-based fluorogenic enzyme substrates [13,14], ...). To achieve sensitive and reliable fluorescence detection in complex biological systems or in living organisms, and thus considering biomedical applications for xanthene-based fluorophores, current research efforts are primarily devoted to the design of rhodamines and related compounds having absorption/emission maxima in the spectral range 650–900 nm [15], often called “therapeutic optical window” (or NIR-1 window) [16]. The relevant strategies implemented to achieve this goal can be classified into two main categories: (1) the extension of the π -conjugated system either through the introduction of various fused aromatic rings within the xanthene core [17–30] or the installation of a dimethine bridge connecting another chromophore unit (*e.g.*, dihydroxanthene-hemicyanine fused dyes) [31,32], and (2) the replacement of the 10-position O atom of xanthene by a group 14 element (*i.e.*, C, Si, or Ge) [33–36] or an oxidized-heteroatom such as B(OH)₂ [37], P(O)R [38,39], P(O)OR [40], or Te(O) [41]. This latter approach is particularly attractive because it produces dyes with significantly red-shifted absorption and fluorescence maxima, typically around or above 650 nm, and keeping compact structures and small molecular weights. A further extension of this strategy to Bi [42], S, and Se [43] leads to weakly or non-fluorescent heteroatom-substituted xanthene dyes usable as effective photosensitizers in photodynamic therapy of cancers. In

* Corresponding author. Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21078, Dijon Cedex, France.

E-mail address: anthony.romieu@u-bourgogne.fr (A. Romieu).

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.06.026>

Received 17 May 2018; Received in revised form 17 June 2018; Accepted 17 June 2018

Available online 20 June 2018

0143-7208/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

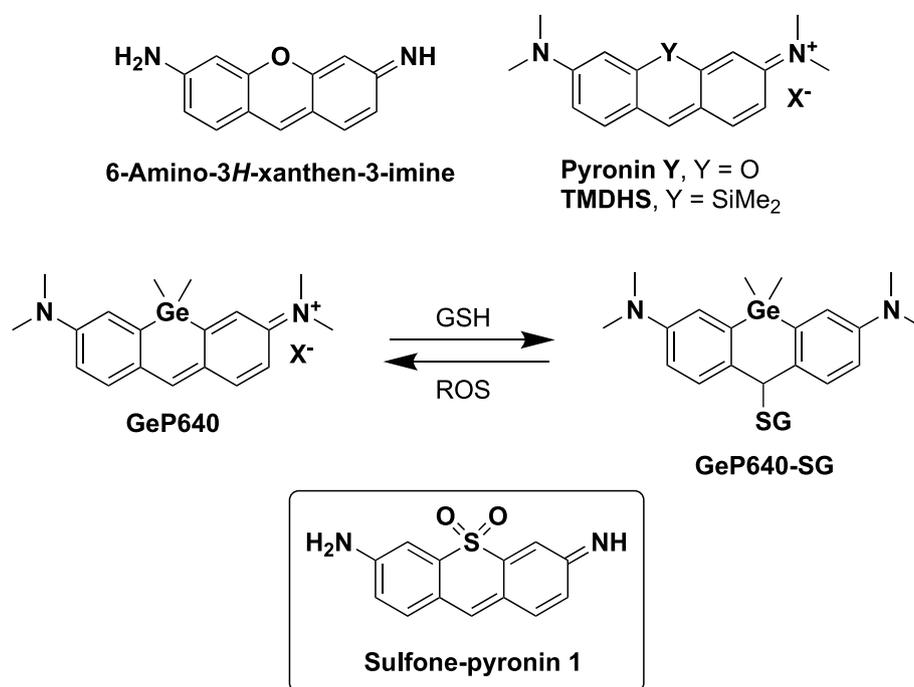


Fig. 1. Structures of already known pyronins and fluorogenic sulfone-pyronin dye 1 studied in this work ($X = Cl^-$ for **pyronin Y** and **TMDHS**, $X^- = CF_3CO_2^-$ for **GeP640**, GSH = glutathione, ROS = reactive oxygen species).

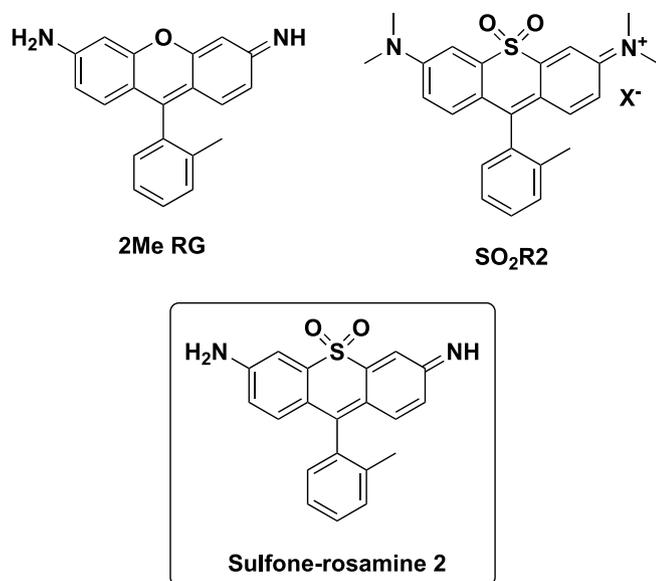


Fig. 2. Structures of already known rosamines and fluorogenic sulfone-rosamine dye 2 studied in this work ($X^- = Cl^-$ for **SO₂R₂**).

addition, a recent work from Liu et al. related to the synthesis and photophysical characterization of sulfone-rhodamines and sulfone-rosamines grabbed your attention [44]. Indeed, these hetero-xanthen dyes show absorption/emission features in the range 700–750 nm, with satisfactory fluorescence quantum yields (5–10%) in simulated physiological conditions (*i.e.*, phosphate-buffered saline (PBS), 20 mM, pH 7.4, containing 0.25% CH_3CN). However, since all these compounds are tetramethylrosamine or tetramethylrhodamine (TMR) analogs, they do not possess an optically tunable primary or secondary amino group for an effective modulation of their fluorescence properties. This aniline substitution pattern prevents their use as fluorescent platforms for developing reaction-based probes for chemoselective sensing/imaging of enzymes, small molecules and metal ions in biological systems [45,46].

To address this problem, we considered the synthesis of sulfone-pyronin and sulfone-rosamine derivatives, through the formal substitution $O \rightarrow SO_2$ in 6-amino-3H-xanthen-3-imine and 6-amino-9-aryl-3H-xanthen-3-imine core structures respectively (Figs. 1 and 2).

Indeed, the installation of primary amino groups imparts a powerful fluorescence “ON-OFF” switching mechanism based on a protection-deprotection strategy to these NIR dyes [6]. The straightforward access to efficient small-molecule fluorogenic probes for *in vivo* molecular imaging of disease-related enzymes (mainly, proteases) [47–51], should, therefore, be facilitated using these fluorescent anilines. In this Article, we report the first results of this ambitious project, through the preparation and spectral characterization of two original fluorogenic sulfone-xanthen dyes. Emphasis will also be put on the pH-dependent stability of these compounds that has never been reported to date. Finally, in order to demonstrate the fluorogenic behavior of this novel class of “smart” NIR dyes, an enzyme-responsive “turn-on” fluorescent probe selectively activated by penicillin G acylase has been synthesized and validated through *in vitro* fluorescence assay.

2. Experimental

2.1. Chemicals and instruments

Unless noted otherwise, all commercially available reagents and solvents were used without further purification. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. The spots were directly visualized or through illumination with a UV lamp ($\lambda = 254/365$ nm). Column chromatography purifications were performed manually either on silica gel (40–63 μm or 63–200 μm) from Sigma-Aldrich (technical grade) or Geduran® Si 60 silica gel (40–63 μm) from Merck Millipore. Some chromatographic purifications were performed using an automated flash chromatography purification system (Interchim puriFlash™ 430) with puriFlash™ columns (silica gel, 25 μm). THF and CH_3CN (HPLC-grade) were dried over alumina cartridges using a solvent purification system PureSolv PS-MD-5 model from Innovative Technology. Anhydrous $C_2H_4Cl_2$ was purchased from Sigma-Aldrich. Peptide synthesis-grade DIEA and TFA were provided by Iris Biotech GmbH. The HPLC-gradient grade CH_3CN used for HPLC-MS

analyses was obtained from Carlo Erba. CH₃CN used in semi-preparative RP-HPLC purifications was obtained from Biosolve or VWR (technical, +99% but distilled prior to use). All aq. buffers used in this work and aq. mobile-phases for HPLC were prepared using water purified with a PURELAB Ultra system from ELGA (purified to 18.2 MΩ cm). Penicillin G acylase (PGA, from *Escherichia coli*) was provided by Iris Biotech GmbH. *n*-Butyllithium (BuLi) solution (in hexanes, Acros) was titrated before using (colorimetric titration with menthol + 2,2'-bipyridine or 2,2-diphenylacetic acid in dry THF) [52,53] and 2-bromotoluene was distilled prior to use.

2.2. Instruments and methods

Lyophilization steps were performed with a Christ Alpha 2–4 LD plus. ¹H-, ¹³C and ¹⁹F NMR spectra were recorded either on a Bruker Avance III 500 MHz or on a Bruker Avance III HD 600 MHz spectrometer (equipped with double resonance broad band probes). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non-deuterated solvent signal [54]. *J* values are expressed in Hz. IR spectra were recorded with a Bruker Alpha FT-IR spectrometer equipped with a universal ATR sampling accessory. The bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimeters (cm⁻¹). Elemental analyses (C, H, N, S) were performed on a Thermo Scientific Flash EA 1112 instrument. HPLC-MS analyses were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump + autosampler at 20 °C + column oven at 25 °C) equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS) and a MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer. HPLC-fluorescence analyses were performed with the same instrument coupled to a RS fluorescence detector (Thermo-Dionex, FLD 3400-RS). Purifications by semi-preparative HPLC were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument equipped with a RS Variable Detector (four distinct wavelengths). Ion chromatography analyses were performed using an ion chromatograph Thermo Scientific Dionex ICS 5000 equipped with a conductivity detector CD (Thermo Scientific Dionex) and a conductivity suppressor ASRS-ultra II 4 mm (Thermo Scientific Dionex). Low-resolution mass spectra (LRMS) were recorded on a Thermo Scientific MSQ Plus single quadrupole equipped with an electrospray (ESI) source (direct introduction or LC-MS coupling). UV-visible spectra were obtained either on a Varian Cary 50 scan (single-beam) or an Agilent Cary 5000 UV-VIS-NIR (double beam) spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Hellma, 100-QS, 45 × 12.5 × 12.5 mm, pathlength: 10 mm, chamber volume: 3.5 mL), at 25 °C (using a temperature control system combined with water circulation). Fluorescence spectroscopic studies (scan and kinetics modes) were performed with an HORIBA Jobin Yvon Fluorolog spectrofluorometer (software FluorEssence) at 25/37 °C (using a temperature control system combined with water circulation), with a standard fluorometer cell (Labbox, LB Q, light path: 10 mm, width: 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). The absorption spectra of sulfone-xanthene dyes were recorded (220–800 nm) in the corresponding solvent with concentrations in the range 10–50 μM. Excitation/emission spectra were recorded after emission/excitation at the suitable wavelength (see Table 1, shutter: Auto Open, excitation slit = 5 nm and emission slit = 5 nm). All fluorescence spectra were corrected. Fluorescence quantum yields were measured at 25 °C by a relative method using the suitable standard (see Table 1, dilution by a factor of 3 between absorption and fluorescence measurements). The following equation was used:

$$\Phi_F(x) = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2\Phi_F(s)$$

where *A* is the absorbance (in the range of 0.01–0.1 A.U.), *F* is the area under the emission curve, *n* is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts *s* and *x* represent standard and unknown, respectively.

Table 1

Experimental conditions used for the determination of fluorescence quantum yields.

| Fluorophore ^a | Solvent | λ Ex (nm) | Standard (std) | Φ _{F(std)} /solvent | Φ _F |
|--------------------------|---|-----------|----------------|------------------------------|----------------|
| 1 | CH ₃ CN + 10% TFA ^b | 580 | Cy 5.0 [55] | 0.2/PBS ^c | 0.14 |
| 2 | H ₂ O + 0.1% FA ^d | 600 | Cy 5.0 [55] | 0.2/PBS ^c | 0.06 |

^a Stock solutions (1.0 mg/mL) of fluorophores were prepared in spectroscopic grade DMSO.

^b Refractive index = 1.337.

^c Refractive index = 1.337.

^d Refractive index = 1.333.

2.3. High-performance liquid chromatography separations

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments and purification steps: **System A:** RP-HPLC-MS (Phenomenex Kinetex C₁₈ column, 2.6 μm, 2.1 × 50 mm) with CH₃CN (+0.1% FA) and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2.5) as eluents [2% CH₃CN (0.1 min) followed by a linear gradient from 2% to 100% (5 min) of CH₃CN, then 100% CH₃CN (1.5 min)] at a flow rate of 0.5 mL/min. Quadruple UV-visible detection was achieved at 220, 260, 600 and 700 nm (+ diode array detection in the range 200–800 nm). LR ESI-MS detection in the positive/negative mode (full scan, 100–2000 a.m.u., peaking format: centroid, needle voltage: 3.0 kV, probe temperature: 350 °C, cone voltage: 75 V and scan time: 1 s.) **System B:** system A with the following gradient [50% CH₃CN (0.1 min) followed by a linear gradient from 50% to 100% (6.5 min) of CH₃CN, then 100% CH₃CN (0.5 min)]. Quadruple UV-visible detection was achieved at 220, 300, 650 and 700 nm. **System C:** semi-preparative RP-HPLC (SiliCycle SiliaChrom C₁₈ column, 10 μm, 20 × 250 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% CH₃CN (5 min), followed by a linear gradient from 0% to 10% (4 min) and 10%–100% (90 min) of CH₃CN] at a flow rate of 20.0 mL/min. Quadruple UV-visible detection was achieved at 220, 300, 310 and 640 nm. **System D:** system C with the following gradient [10% CH₃CN (5 min), followed by a linear gradient from 10% to 15% (2.5 min) and 15%–100% (170 min) of CH₃CN]. Quadruple UV-Vis detection was achieved at 220, 240, 490 and 640 nm. **System E:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% CH₃CN (5 min), followed by a linear gradient from 0% to 10% (5 min) and 10%–100% (90 min) of CH₃CN] at a flow rate of 4.0 mL/min. Quadruple UV-Vis detection was achieved at 220, 260, 490 and 645 nm. **System F:** system A with the following gradient [5% CH₃CN (0.1 min) followed by linear gradient from 5% to 100% (6.5 min) of CH₃CN, then 100% CH₃CN (1 min)]. Quadruple UV-visible detection was achieved at 220, 300, 650 and 700 nm (+ diode array detection in the range 200–800 nm). **System G:** system C with the following gradient [30% CH₃CN (5 min), followed by a linear gradient from 30% to 50% (10 min) and 50%–100% (65 min) of CH₃CN]. Dual UV detection was achieved at 220 and 240 nm. **System H:** system E with the following gradient [10% CH₃CN (5 min), followed by a linear gradient from 10% to 30% (10 min), 30%–50% (10 min) and 50%–100% (65 min) of CH₃CN]. Dual UV detection was achieved at 220 and 240 nm. **System I:** system A with the following gradient [5% CH₃CN (0.1 min) followed by a linear gradient from 5% to 100% (5 min) of CH₃CN, then 100% CH₃CN (3 min)] and dual UV (220 et 260 nm) or fluorescence detection, achieved at 45 °C at the following Ex/Em channels: 634/673 nm and 643/687 nm (sensitivity: 1, PMT auto, filter wheel auto).

2.4. Synthesis of sulfone-pyronin

2.4.1. Sulfone analog of 3,6-diamino-9H-xanthene (3)

4,4'-Diaminodiphenylmethane (4 g, 20 mmol, 1 equiv) was added

into fuming $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-SO}_3$ (96%, 20 mL). The resulting mixture was stirred at 80 °C overnight. The reaction was checked for completion by TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9: 1, v/v) and aq. 5.0 M solution of NaOH was added until a pH of 9 was reached. The resulting mixture was extracted with EtOAc (4 × 100 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and finally evaporated to dryness to give compound **3** as a white amorphous solid (4.66 g, yield 83%). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9: 1, v/v) = 0.37; IR (ATR): ν 3432, 3369, 3355 (NH_2), 1637, 1607, 1489 (S=O stretch), 1437, 1422, 1308, 1275, 1175, 1308, 1275, 1174, 1154, 1133 (S=O stretch), 1040, 963, 921, 855, 831, 796, 700, 689, 632; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.18 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.14 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 6.73 (dd, 2H, J = 8.2 Hz, J = 2.4 Hz), 5.54 (s, 4H, NH), 3.84 (s, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 147.9, 137.6, 129.5, 125.1, 117.2, 107.0, 31.1; HPLC (system A): t_R = 3.2 min, purity = 97% (at 240 nm); LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): m/z = 260.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ and 302.3 $[\text{M} + \text{H} + \text{CH}_3\text{CN}]^+$, calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 260.1; Elemental anal.: Found C, 59.6; H, 4.7; N, 10.8; S, 12.6 $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requires C, 60.0; H, 4.7; N, 10.8; S, 12.3.

2.4.2. Sulfone analog of 3,6-diaminoxanthone (**4**) via FeCl_3 -mediated oxidation

Compound **3** (745 mg, 2.9 mmol, 1 equiv) was dissolved in aq. 2.0 M HCl (20 mL). Then, a solution of FeCl_3 (1.4 g, 8.6 mmol, 3 equiv) in 20 mL of aq. 2.0 M HCl was added. The resulting reaction mixture was stirred at 90 °C overnight. The reaction was monitored by RP-HPLC (system A). Despite an incomplete conversion of the starting material (SM), the mixture was cooled to RT and quenched by addition of an aq. 20% NaOH solution until a pH of 8 was reached. The resulting aq. phase was extracted with EtOAc (4 × 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and finally evaporated to dryness. The resulting residue was purified by flash-column chromatography on a silica gel (Sigma-Aldrich 40–63 μm ; mixture pentane/EtOAc 1: 1, v/v as eluent) to give two distinct batches containing both the starting compound and the desired ketone with the following ratio determined by RP-HPLC (system A) (batch 1: 239 mg, ketone/SM 47: 52 and batch 2: 307 mg, ketone/SM 76: 24, see ESI, Fig. S6). Despite several attempts, it was not possible to obtain a pure sample of ketone **4** in significant amount and these pre-purified mixtures were used in the next step without further purification. Conversely, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -mediated oxidation led to a crude product easier to purify due to complete conversion of SM, but isolated with a dramatically lower yield (4%).

Compound **3** (200 mg, 0.8 mmol, 1 equiv) and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (380 mg, 1.6 mmol, 2 equiv) was dissolved in a mixture DMF/ H_2O (2: 1, v/v, 12 mL). The resulting reaction mixture was stirred at 80 °C for 5 h. Monitoring was achieved by RP-HPLC (system A) and revealed no progress. A further amount of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (1 equiv) was added and the reaction mixture was left under stirring at 80 °C for a further 4 h. The RP-HPLC monitoring revealed the total conversion of SM into the expected product along with numerous side-products. Solvent were removed and the residue was dissolved in EtOAc (30 mL) and washed with aq. 5% K_2CO_3 . Organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and finally evaporated to dryness. The resulting residue was purified by automated flash-column chromatography with a silica gel cartridge (25 g, 25 μm , heptane/EtOAc with a step gradient from 60: 40 to 30: 70, v/v as eluent) to give the desired product as a yellow amorphous solid (9 mg, yield 4%). R_f (EtOAc/heptane 6: 4, v/v) = 0.33; IR (ATR): ν 3476, 3443, 3367, 3346, 3227, 2922 (weak, trace of EtOAc), 1725 (weak, trace of EtOAc), 1624, 1581, 1524, 1503, 1483, 1374, 1335, 1309, 1280, 1185, 1130, 1083, 919, 847, 768, 704, 687, 669; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.12 (d, 2H, J = 2.5 Hz), 6.87 (dd, 2H, J = 8.5 Hz, J = 2.5 Hz), 6.79 (bs, 4H, NH); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 174.2, 154.0, 142.2, 130.8, 117.5, 116.9, 105.3; LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): m/z = 275.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 274.0; HPLC (system F): t_R = 3.7 min, purity = 99% (at 260 nm); UV-vis (recorded during the HPLC analysis): λ_{max} = 249 nm, 266 nm, 311 nm and 389 nm; Elemental anal.: Found C, 56.5; H, 4.2; N, 8.5; S, 11.0 $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. 0.17 EtOAc requires C, 56.8; H, 4.0; N, 9.6; S, 11.0.

during the HPLC analysis): λ_{max} = 249 nm, 266 nm, 311 nm and 389 nm; Elemental anal.: Found C, 56.5; H, 4.2; N, 8.5; S, 11.0 $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. 0.17 EtOAc requires C, 56.8; H, 4.0; N, 9.6; S, 11.0.

2.4.3. Sulfone-pyronein/sulfone-xanthidrol (1/5)

Impure ketone **4** (batch 1, 239 mg, 0.87 mmol, 1 equiv, please note: mole number was calculated by considering ketone as a pure compound) was dissolved in dry THF (25 mL) and the resulting solution was cooled to 4 °C with an ice-water bath. Then, NaBH_4 (8 mg, 0.21 mmol, 0.25 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at RT for 1 h. Monitoring was achieved by RP-HPLC (system A) and revealed no progress of this hydride-mediated reduction. A further amount of NaBH_4 (0.75 equiv) was added and prolonged heating at 40 °C for 3 days led to complete consumption of the ketone. The reaction mixture was cooled to 4 °C with an ice-water bath and quenched by adding aq. 1.0 M HCl. The crude mixture was diluted with aq. TFA 0.1% and CH_3CN and purified by semi-preparative RP-HPLC (system C, t_R = 29.8–30.6 min). The product-containing fractions were lyophilized to give the TFA salt of sulfone-xanthidrol **5** as a yellow amorphous solid (9 mg, yield < 5%). This pure sample contains minor amount of blue-colored sulfone-pyronein **1**. Despite several attempts (in various deuterated solvents: $\text{CD}_3\text{CN-}D_2\text{O}$, $\text{DMSO-}d_6$ and $\text{DMSO-}d_6$ + $D_2\text{O-DCl}$), it was not possible to obtain good quality and interpretable ^1H and ^{13}C NMR spectra. LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): m/z = 259.1 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ dehydration occurred during the ionization process within ESI probe, calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 276.1; HPLC (system A): t_R = 2.8 min, purity = 92% (at 260 nm); UV-vis (recorded during the HPLC analysis): λ_{max} = 229 nm and 304 nm (weak).

2.5. Synthesis of sulfone-rosamine

2.5.1. Sulfone analog of *N,N,N',N'*-tetraallyl-3,6-diamino-9H-xanthene (**6**)

To a suspension of bis-aniline **3** (3.1 g, 11.5 mmol, 1 equiv) and anhydrous K_2CO_3 (6.3 g, 46 mmol, 4 equiv) in dry CH_3CN (100 mL), was added allyl bromide (7 g, 57.5 mmol, 5 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at 80 °C overnight. Reaction monitoring was achieved by RP-HPLC (system B), additional equivalents of allyl bromide (2 equiv) were added and the mixture was left under stirring at 80 °C for a further 6 h. After cooling to RT, the mixture was filtered over a dicalite 4158 pad which was rinsed with CH_2Cl_2 (70 mL). The filtrate was evaporated to dryness and the resulting residue was purified by automated flash-column chromatography with a silica gel cartridge (80 g, 25 μm , heptane/EtOAc with a step gradient from 100: 0 to 0: 100, v/v as eluent) to give the desired *N,N,N',N'*-tetraallyl derivative **6** (4.1 g, yield 81%) as yellow amorphous solid. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{heptane}$ 9: 1, v/v) = 0.47; IR (ATR): ν 3084, 3055, 3005, 2978, 2849, 1642, 1604, 1497, 1438, 1420, 1391, 1362, 1332, 1292, 1281, 1259, 1210, 1179, 1140, 1042, 990, 953, 934, 921, 908, 844, 815, 788, 705, 670, 624, 608, 554; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.33 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.09 (d, 2H, J = 2.7 Hz), 6.85 (dd, 2H, J = 8.6 Hz, J = 2.8 Hz), 5.85 (m, 4H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH-allyl}$), 5.14 (m, 8H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH-allyl}$), 3.99 (d, 8H, J = 4.6 Hz, $\text{CH}_2\text{-allyl}$), 3.93 (s, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 147.4, 138.0, 134.0, 130.0, 125.8, 116.3, 115.9, 105.7, 52.94, 31.2; LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): m/z = 421.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 420.2; HPLC (system A): t_R = 6.0 min, purity = 98% (at 260 nm); UV-vis (recorded during the HPLC analysis): λ_{max} = 232 nm, 271 nm and 337 nm (weak).

2.5.2. Sulfone analog of *N,N,N',N'*-tetraallyl-3,6-diaminoxanthone (**7**)

p-Chloranil (6.6 g, 26.8 mmol, 3 equiv) was added into a solution of compound **6** (3.7 g, 8.9 mmol, 1 equiv) in $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ (100 mL) and the resulting reaction mixture was heated at reflux overnight. The reaction was monitored by RP-HPLC (system B), found to be not complete but accompanied by the formation of side-products. Thus, the reaction was quenched by adding aq. 20% Na_2SO_3 (80 mL) and stirring for 30 min.

Thereafter, the aq. phase was extracted with CH_2Cl_2 (3×100 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and finally evaporated to dryness. The resulting residue was subjected to a first column chromatography on a silica gel (Sigma-Aldrich 63–200 μm ; pentane- CH_2Cl_2 8: 2, v/v as eluent) to give a mixture containing the desired ketone as the major product. A second column chromatography purification over smaller particle size silica gel (Merck Geduran[®] Si 60 40–63 μm ; pentane- CH_2Cl_2 with a step gradient from 5: 5 to 1: 9, v/v as eluent) provided the targeted ketone **7** in a pure form (970 mg, yield 25%) as a green amorphous solid. R_f (CH_2Cl_2 -pentane 6: 4, v/v) = 0.23; IR (ATR): ν 3085, 2983, 2916, 1633, 1581 (C=O stretch), 1535, 1513, 1441, 1395, 1360, 1330, 1313, 1296, 1251, 1226, 1200, 1178, 1135, 1043, 993, 946, 921, 901, 767, 703, 669, 622; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.01 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.06 (m, 4H), 5.89 (m, 4H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$ -allyl), 5.17 (m, 8H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$ -allyl), 4.14 (d, 8H, $J = 4.3$ Hz, CH_2 -allyl); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 174.9, 152.2, 142.5, 133.0, 130.9, 118.4, 117.0, 116.0, 104.4, 53.1; LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): $m/z = 435.2$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 434.2; HPLC (system B): $t_R = 3.5$ min, purity = 97% (at 300 nm); UV-vis (recorded during the HPLC analysis): $\lambda_{\text{max}} = 428$ nm; Elemental anal.: Found C, 68.8; H, 6.5; N, 6.2; S, 6.3 $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ requires C, 69.1; H, 6.0; N, 6.5; S, 7.4.

2.5.3. Sulfone analog of *N,N,N',N'*-tetraallyl-6-amino-9-(*o*-tolyl)-3H-xanthen-3-imine (**8**)

To a flame-dried flask flushed with argon were added freshly distilled 2-bromotoluene (240 μL , 2 mmol, 1 equiv) and dry THF (5 mL). The solution was cooled to -78°C , and 2.3 M BuLi solution in hexanes (870 μL , 2 mmol, 1 equiv) was added dropwise over 5 min. The resulting reaction mixture was stirred at -78°C for 1 h. The halogen-lithium exchange reaction was checked for completion by ^1H NMR (quenching of ArLi formed with MeOH). A solution of ketone **7** (255 mg, 0.58 mmol, 0.3 equiv) in dry THF (10 mL) was added dropwise (over 10 min) to the crude ArLi solution at -78°C and after that, the mixture was warmed to RT. The reaction was checked for completion by TLC. Thereafter, the mixture was cooled to 4°C with an ice-water bath, aq. saturated NH_4Cl (10 mL) was added slowly and stirred at RT for 10 min. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3×50 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and finally evaporated to dryness. The resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 -TFA (9: 1, v/v, 10 mL) and the reaction mixture was stirred at RT for 30 min (a bright green color typical of *N,N,N',N'*-tetraalkyl-sulfone-rosamines immediately appeared). The dehydration reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B). Finally, volatiles were evaporated to dryness to give the crude sulfone-rosamine **8**, which was used in the next step without further purification. LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): $m/z = 509.2$ [M]⁺, calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ 509.2; HPLC (system B): $t_R = 5.6$ min; UV-vis (recorded during the HPLC analysis): $\lambda_{\text{max}} = 701$ nm. *During the course of this acid-mediated dehydration reaction, partial deprotection of anilines was observed. Sulfone-rosamines bearing only two or three N-allyl substituents were identified in batch of crude 8.* Triallyl derivative: LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): $m/z = 469.2$ [M]⁺, calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ 469.2; HPLC (system B): $t_R = 5.3$ min; UV-vis (recorded during the HPLC analysis): $\lambda_{\text{max}} = 685$ nm. Diallyl derivative: LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): $m/z = 429.2$ [M]⁺, calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ 429.2; HPLC (system B): $t_R = 4.9$ min; UV-vis (recorded during the HPLC analysis): $\lambda_{\text{max}} = 672$ nm.

2.5.4. Sulfone analog of 6-amino-9-(*o*-tolyl)-3H-xanthen-3-imine (**2**)

Crude *N*-tetraallyl derivative **8** (301 mg) and 1,3-dimethylbarbituric acid (413 mg, 2.6 mmol, 4.4 equiv, based on 0.58 mmol of **8** theoretically obtained with a quantitative yield for the previous step) were dissolved in degassed $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ (7 mL). Catalytic amount of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (76 mg, 65.7 μmol , 0.11 equiv) was added and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 5 h. The reaction was checked for

completion by RP-HPLC (system B). Thereafter, the crude mixture was evaporated to dryness without heating over 35°C and the resulting residue was diluted with aq. TFA 0.1% and CH_3CN and purified by semi-preparative RP-HPLC (system D). A first pure sample of sulfone-rosamine **2** ($t_R = 36.1$ – 39.1 min) was recovered as a TFA salt after freeze-drying (dark blue amorphous powder, 12.2 mg). The second batch of lower purity was subjected to a second RP-HPLC purification (system E, $t_R = 35.1$ – 43.3 min). The product-containing fractions were lyophilized to give further 33 mg of **2** (overall yield 20%, based on mass percentage of TFA = 13.1% determined by ion chromatography, see ESI). IR (ATR): ν 3316, 3064, 1671, 1581, 1527, 1377, 1335, 1312, 1225, 1198, 1145, 1048, 904, 834, 799, 757, 720, 689, 663, 569, 445, 431; *Correct quality and interpretable ^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained only after addition of D_2O in $\text{DMSO}-d_6$ (without heavy water, broad and poorly resolved peaks for aromatic protons/carbons were observed, reflecting the cationic resonance hybrid structure of **2**). Consequently, signals assigned to hydrated form (deuterated triaryl carbinol derivative **9**) were mainly observed.* ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6 + 5\%$ D_2O): δ 8.11 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.34 (pt, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.21 (pt, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.11 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 6.63 (dd, 2H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 6.55 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 1.37 (s, 3H, CH_3 -tolyl); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6 + 5\%$ D_2O): δ 148.5 (2C), 145.2, 136.7 (2C), 134.7, 131.6, 130.3 (2C), 128.6 (2C), 127.5, 126.4, 125.4, 118.2 (2C), 105.3 (2C), 70.8, 20.1; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = -73.8$ (s, 3F, CF_3 -TFA); LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling): $m/z = 349.0$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 348.1; HPLC (system F): $t_R = 3.7$ min, purity = 95% (at 300 nm), purity = 100% (at 650 nm).

2.6. PGA-sensitive probe (**10**)

Sulfone-rosamine **2** (27 mg, 0.08 mmol, 1 equiv) and DIEA (69 μL , 0.40 mmol, 5 equiv) were dissolved in dry CH_3CN (5 mL) and cooled to 4°C . PhAcCl (21 μL , 0.16 mmol, 2 equiv) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at RT for 1 h. Reaction monitoring was achieved by RP-HPLC (system F), additional equivalents of PhAcCl (2 equiv) were added at 4°C and the mixture left under stirring at RT for a further 30 min. MeOH (10 μL) was added to quench the excess of acyl chloride and volatiles were evaporated to dryness. The resulting residue was dissolved with aq. TFA 0.1% and CH_3CN and purified by semi-preparative RP-HPLC (system G). This first purification has led to recovery of a batch of impure probe **10** ($t_R = 29.7$ – 32.1 min) which was subjected to a second RP-HPLC purification (system H, $t_R = 32.2$ – 32.7 min). The product-containing fractions were lyophilized to give less than 1 mg of **10**, as a white amorphous powder. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.22 (dd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 7.89 (d, 2H, $J = 2.3$ Hz), 7.78 (dd, 2H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.7$ Hz), 7.45–7.30 (m, 12H), 7.08 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.92 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 3.76 (s, 4H, CH_2 -PhAc), 1.27 (s, 3H, CH_3 -tolyl); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): *quantity isolated was too small for visualization of all carbon peaks, despite of extended acquisition time on a 500 MHz spectrometer equipped with a BBI probe (four times more sensitive in carbon than a standard 300 MHz spectrometer);* LRMS (ESI, positive mode, LC-MS coupling, cone voltage 75 V): $m/z = 585.3$ [M]⁺, *elimination of chlorine atom occurred during the ionization process within ESI probe*, calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$ 585.2 (for major isotope); LRMS (ESI, positive mode, direct introduction, cone voltage 30 V): $m/z = 620.3$ (100), 621.3 (25) and 622.3 (10) [M]⁺, calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ 620.2 (for major isotope), *due to the lack of easily protonable sites within this molecule, only the radical cation as molecular ion was observed. Too avoid chlorine elimination during the ionization process, cone voltage was reduced (30 V vs. 75 V);* HPLC (system I): $t_R = 6.1$ min, purity = 91% (at 260 nm); UV (recorded during the HPLC analysis): $\lambda_{\text{max}} = 228$ nm (+shoulder at 270 nm); UV (PBS, pH 7.4): $\lambda_{\text{max}} = 249$ nm ($\epsilon = 16\,410\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) and 275 nm ($\epsilon = 15\,740\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$), broad absorption band between 220 and 280 nm ($\epsilon = 15\,910\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ at 260 nm); UV (AcONa, pH 3.5): broad absorption

band between 220 and 280 nm (ϵ 16 500 M⁻¹ cm⁻¹ at 260 nm).

2.7. In vitro activation of fluorogenic “turn-on” probe **10** by PGA - experimental details

2.7.1. Stock solution of probe and enzyme

Stock solution (1 mg/mL) of PGA-sensitive probe **10** was prepared in HPLC-grade CH₃CN (final concentration: 1.6 mM) and subsequently diluted with phosphate buffer (PB, 100 mM, pH 7.4) or acetate buffer (100 mM, pH 3.5) for UV-vis absorption, fluorescence measurements and enzyme kinetics. Commercial PGA (841 U/mL), aliquoted (samples of 100 μ L) and kept frozen at -20 °C, directly used without dilution.

2.7.2. Fluorescence assays

All assays were performed at 37 °C (using a temperature control system combined with water circulation and conducted with magnetic stirring). For probe **10** (final concentration in 3.5 mL fluorescence quartz cell: 1 μ M), the fluorescence emission of the released sulfone-rosamine **2** was monitored at λ = 685 nm (slit = 5 nm) (Ex λ = 640 nm, slit = 5 nm) over time with measurements recorded every 5 s (overall duration 3600 s). 1 U of PGA (1.2 μ L) was added after 5 min of incubation of the probe in buffer. For kinetic performed in PB, TFA (25–50 μ L) was added after 30 min of incubation, for far-red fluorescence unveiling. Blank experiments to assess the stability of the probe in aqueous buffers, were achieved in the same way but without adding the enzyme.

2.7.3. HPLC-fluorescence analyses

Enzymatic reaction mixtures from fluorescence assays were directly analyzed by RP-HPLC-fluorescence (injected volume: 10 μ L, system I).

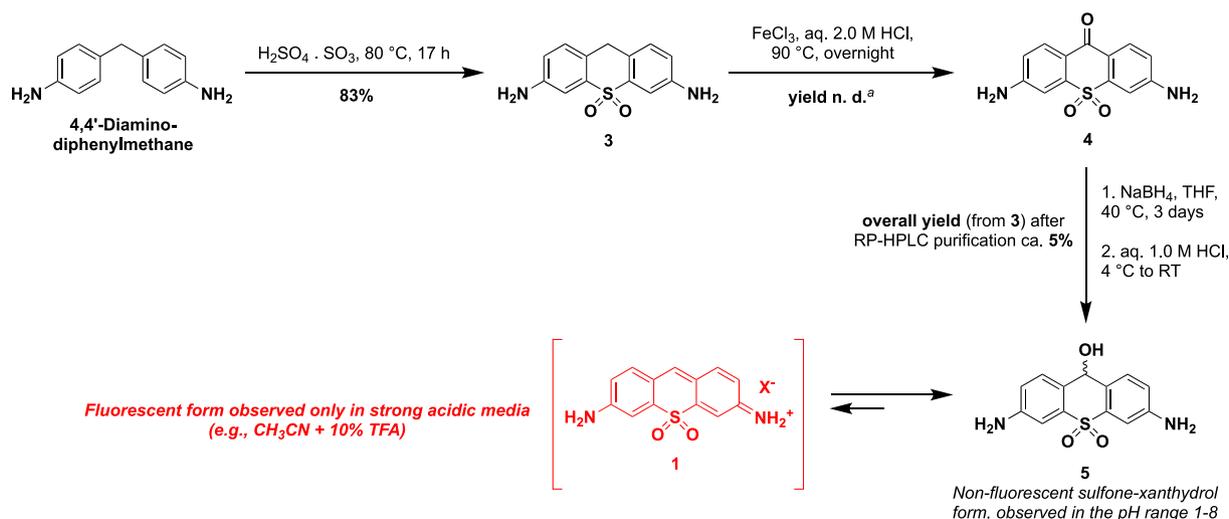
3. Results and discussion

3.1. Synthesis and stability of sulfone analog of 6-amino-3H-xanthen-3-imine

Contrary to rhodamines and rosamines, little work has been devoted to the synthesis of heteroatom analogs of pyronins. The only fluorescent molecules already described in the literature, are derived from the pyronin Y scaffold (O atom is replaced by SiMe₂ or GeMe₂ moiety, Scheme 1) [56–60] and thus not usable as “smart” photoactive platforms due to the lack of optically tunable primary/secondary amino group(s). Consequently, the analytical use of these fluorophores was not considered, except Ge-pyronin **GeP640** used as a thiol-sensitive “ON-

OFF” probe and suitable for reversible and dynamic fluorescence imaging of cellular redox self-regulation (i.e., real-time change in the balance between reactive oxygen species (ROS) stress and glutathione (GSH) antioxidant repair processes) [59]. In order to devise effective synthetic routes toward hetero-pyronins bearing two primary anilines, strategies previously explored for preparing hetero-analogs of *N,N,N',N'*-tetraalkyl-rhodamines/rosamines could be a key source of inspiration even if the temporary protection of amino groups might be required both to enhance the solubility of synthesis intermediates and to prevent undesired side-reactions. However, for the synthesis of sulfone analog of 6-amino-3H-xanthen-3-imine (sulfone-pyronin **1**), we thought that the first steps of synthetic strategy recently proposed by Liu et al. for preparing sulfone-rosamines [44], could be directly applied to commercial 4,4'-diaminodiphenylmethane (Scheme 1). First, one-pot sulfonylation/cyclization leading to cyclic sulfone **3** was achieved with oleum acting as both electrophilic sulfonylating agent and solvent, at 80 °C for 12 h. Acid neutralization with an excess of NaOH and liquid-liquid extraction were enough to recover **3** in a pure form with a good 83% yield. Next, all attempts to directly obtain sulfone-pyronin **1** through oxidative aromatization of this latter 3,6-diamino-hetero-xanthen derivative failed. Indeed, the use of DDQ in DMF led to a complex mixture of many unidentified products along with a minute proportion of **1**. Other oxidants such as FeCl₃ in aq. 4.0 M HCl (at 50 °C) or NaIO₄ in CH₃CN-H₂O mixture (at 60 °C) provided the 9-keto derivative **4**. Consequently, we have considered an alternative aromatization procedure involving oxidation of the activated methylene group to ketone, followed by reduction to the corresponding benzhydryl alcohol and final acid-mediated dehydration. Thus, **3** was treated with an excess of FeCl₃ (3 equiv) in aq. 2.0 M HCl at 90 °C for 12 h, to give 3,6-diamino-9H-xanthen-9-one **4**. Despite several chromatographic purification attempts, it was not possible to obtain this ketone in a pure form and a mixture of **3** and **4** was used in the next step. Other oxidants were tested (i.e., activated MnO₂ in DMF and at Na₂S₂O₈ in DMF-H₂O mixture at 80–90 °C). Despite a complete conversion of **3**, an increased number of side-products was observed causing a dramatic drop in the isolated yield of pure **4** (see paragraph 2.4.2). Reduction was achieved using a moderate excess of NaBH₄ in dry THF, and the resulting sulfone-xanthydrolyl **5** was subjected to an acidic treatment to yield the blue-colored sulfone-pyronin **1**. Due to its high polarity, this fluorophore was readily purified by semi-preparative RP-HPLC, but despite the use of acidic aq. mobile phase (i.e., aq. TFA 0.1%, pH 1.9), almost complete conversion of **1** into its colorless and non-emissive C9-benzhydryl form **5** was observed during this liquid chromatographic isolation procedure.

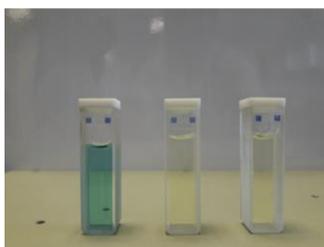
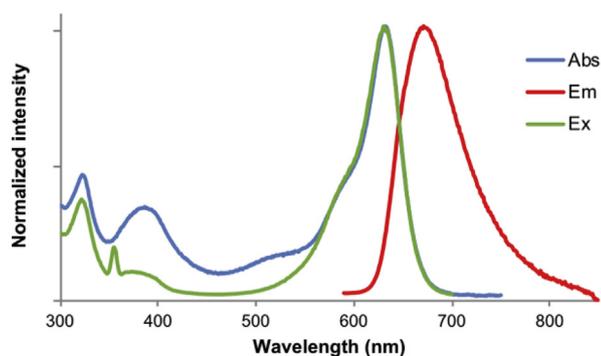
This surprising result is explained on the basis of nucleophilic attack



Scheme 1. Synthesis of sulfone-pyronin **1** (in square brackets to reflect that this fluorophore is not stable under standard conditions) in equilibrium with its hydrated form namely sulfone-xanthydrolyl **5** (TFA salt, X⁻ = CF₃CO₂⁻, RT = room temperature). ^ayield not determined because it was impossible to isolate ketone **3** in a pure form.

of a water molecule at the C9 position of **1** whose electrophilic character is strengthened by the strong electron-withdrawing ability of the sulfone group. To the best of our knowledge, very few examples of hetero-xanthene dyes with *meso*-position highly sensitivity towards nucleophilic addition have been already highlighted in the literature [39]. Worth mentioning in this context is Ge-pyronin **GeP640** reactive towards biological thiols at physiological pH (*vide supra*) and not under acidic conditions [59]. The structure of **5** was confirmed by ESI mass spectrometry (see ESI, Fig. S13) but we did not manage to get well-resolved and interpretable NMR spectra whatever the deuterated solvent used ($\text{CD}_3\text{CN-D}_2\text{O}$, $\text{DMSO-}d_6$ and $\text{DMSO-}d_6 + \text{D}_2\text{O-DCl}$), probably, due to rapid equilibrium between different forms including **1** and **5**. Its good purity (92%) was confirmed by RP-HPLC analysis and the mass percentage of TFA (23.4%) in sample was determined by ion chromatography. Furthermore, this benzhydryl alcohol exhibits a marked electronic absorption in the UV-A range (Abs $\lambda_{\text{max}} = 329 \text{ nm}$ with $\epsilon = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in DMSO). To determine the spectral features of the blue-colored and fluorescent form **1**, we explored different solvent conditions that may prevent or minimize Michael type addition of water and thus favoring the predominance of this full π -conjugated molecule. Thus, in CH_3CN containing 10% of TFA, we observe a broad and intense absorption band centered at $\lambda = 632 \text{ nm}$ ($\epsilon = 19570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) assigned to the 0-0 band of the S0→S1 transition (Fig. 3). A less-pronounced shoulder peak at the higher-energy side is also noticed and is attributed to the vibronic relaxation (the 0–1 vibrational band). Excitation at 580 nm leads to a significantly Stokes-shifted intramolecular charge transfer (ICT) emission band centered at 671 nm (full-width half maximum, $\Delta\lambda_{1/2\text{max}} = 75 \text{ nm}$). For fluorophore solutions with concentration below $10 \mu\text{M}$, a linear relationship between absorbance and fluorescence emission was obtained and thus the accurate determination of fluorescence quantum yield was achieved ($\Phi_F = 14\%$ determined using sulfoindocyanine dye Cy 5.0 as standard ($\Phi_F = 20\%$ in PBS) [55]).

However, for higher concentrations, the absorption and excitation spectra were not perfectly superimposable (Fig. 3), suggesting the presence of several absorbing species in solution, and the persistence of equilibrium between forms **1** and **5** even in strong acidic medium. All



Left : $\text{CH}_3\text{CN} + 10\% \text{ TFA}$
 Middle : aq. $0.1\% \text{ TFA}$, pH 1.9
 Right : PBS, pH 7.4

Fig. 3. (Top) Normalized absorption (blue), excitation (Em 710 nm, slit 5 nm, green) and emission (Ex 580 nm, slit 5 nm, red) spectra of sulfone-pyronin **1** in $\text{CH}_3\text{CN} + 10\% \text{ TFA}$ at 25°C . (Bottom) Picture of solutions (concentration: $18.5 \mu\text{M}$) of sulfone-pyronin **1**/sulfone-xanthidrol **5** in $\text{CH}_3\text{CN} + 10\% \text{ TFA}$, aq. $0.1\% \text{ TFA}$ (pH 1.9) and PBS (pH 7.4) respectively.

these experimental observations clearly confirm the poor stability of sulfone-pyronins in aq. media whatever the pH value, that precludes their use as fluorescent reporters in bioanalytical applications. However, one can speculate that this novel type of NIR fluorophores may be useful for devising novel reaction-based sensing schemes readily applicable to non-aqueous environments or matrices. Indeed, analytes that are able to react with 9-OH of sulfone-xanthidrols to convert it into good leaving group (e.g., electrophilic pollutants or chemical warfare agents including phosgene and organophosphorus compounds) [61], will trigger 1,6-elimination process leading to aromatization and fluorescence unveiling (Fig. 4) [62]. In order to improve the aq. stability of sulfone-xanthene dyes, we next explored the synthesis of sulfone-rosamines for which C-9 position is sterically hindered through its substitution with an aryl group.

3.2. Synthesis of sulfone analog of 6-amino-9-(*o*-tolyl)-3H-xanthen-3-imine

Among the set of sulfone analogs of *N,N,N',N'*-tetramethylrosamines reported by Liu et al., the dye molecule **SO₂R2** bearing *o*-tolyl group as C-9 aryl substituent is easily synthesized through the nucleophilic addition of the corresponding organolithium reagent to the sulfone-xanthone (yield 52%) [44]. Furthermore, this sulfone-rosamine exhibits a quite satisfying stability within the pH range 2–8 allowing to achieve its complete photophysical characterization in simulated physiological conditions (Abs/Em $\lambda_{\text{max}} = 703/742 \text{ nm}$, $\Phi_F = 7.3\%$). In view of these results, we planned the preparation of the fluorogenic version of **SO₂R2** bearing two optically tunable primary amino groups (Scheme 2). As previously mentioned (*vide supra*) and by analogy with the synthetic route towards phospha-fluorescein, published by Fukazawa et al. [63], the allyl moiety was used as protecting group (both to remove NH "acidic" protons and to enhance solubility of intermediates in organic solvents) that is stable under a variety of conditions (especially in the presence of ArLi) and easily removed by Pd(0)-catalysis under mild and neutral conditions.

First, *N,N'*-tetraalkylation of 3,6-diamino-sulfone-xanthene **3** was performed using an excess of allyl bromide (7 equiv) and anhydrous K_2CO_3 (4 equiv), in dry CH_3CN and under reflux. A careful monitoring of this reaction through TLC and HPLC-MS analyses was required to avoid over-allylation, particularly at the C-9 activated benzhydryl-type position. Purification by conventional flash-column chromatography on silica gel provided **6** in good 81% yield. Since we suspected that the allyl moieties may not be inert to harsh acidic conditions (aq. 2.0 M HCl at 90°C) typically used in FeCl_3 -mediated oxidation reactions (*vide supra*), the use of *o*-chloranil (3,4,5,6-tetrachloro-1,2-benzoquinone) was preferred to convert **6** into the sulfone-xanthone intermediate **7**. The use of 1,2-dichloroethane ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$) instead of CH_2Cl_2 as solvent, allowed us to heat the reaction mixture at a higher reflux temperature and thus to significantly increase the rate of this oxidation process. However, the modest 25% isolated yield may be partly explained by difficulties encountered during the chromatographic purifications used to separate the targeted ketone **7** from side-products. Thereafter, a nucleophilic addition of freshly prepared *o*-tolyllithium, followed by dehydroxylation using a 10% TFA in CH_2Cl_2 afforded the green-colored *N,N,N',N'*-tetraallyl-sulfone-rosamine **8**. During the course of this latter acidic treatment and purification attempts of **8**, we noted the significant premature cleavage (probably photo-assisted) of some allyl protecting groups leading to a mixture of several sulfone-rosamines that could not be separated by conventional silica gel column chromatography. Finally, this crude mixture was subjected to a short treatment with cat. amount of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ and large excess of 1,3-dimethylbarbituric acid (4.4 equiv) in degassed $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ to achieve complete deprotection of primary anilines and to afford blue-colored sulfone-rosamine **2**. Careful monitoring of this reaction through HPLC-MS analyses was found to be essential because a too long reaction time led to complete disappearance of this free aniline-based fluorophore and formation of many numerous unidentified side-products. Purification was achieved

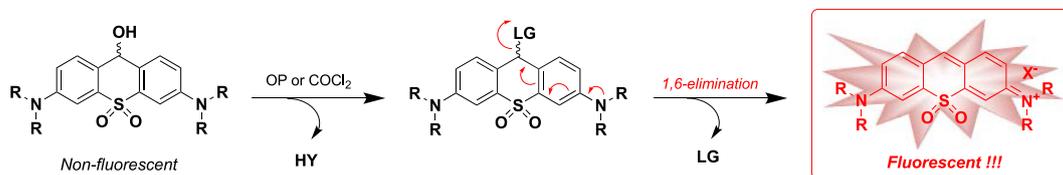


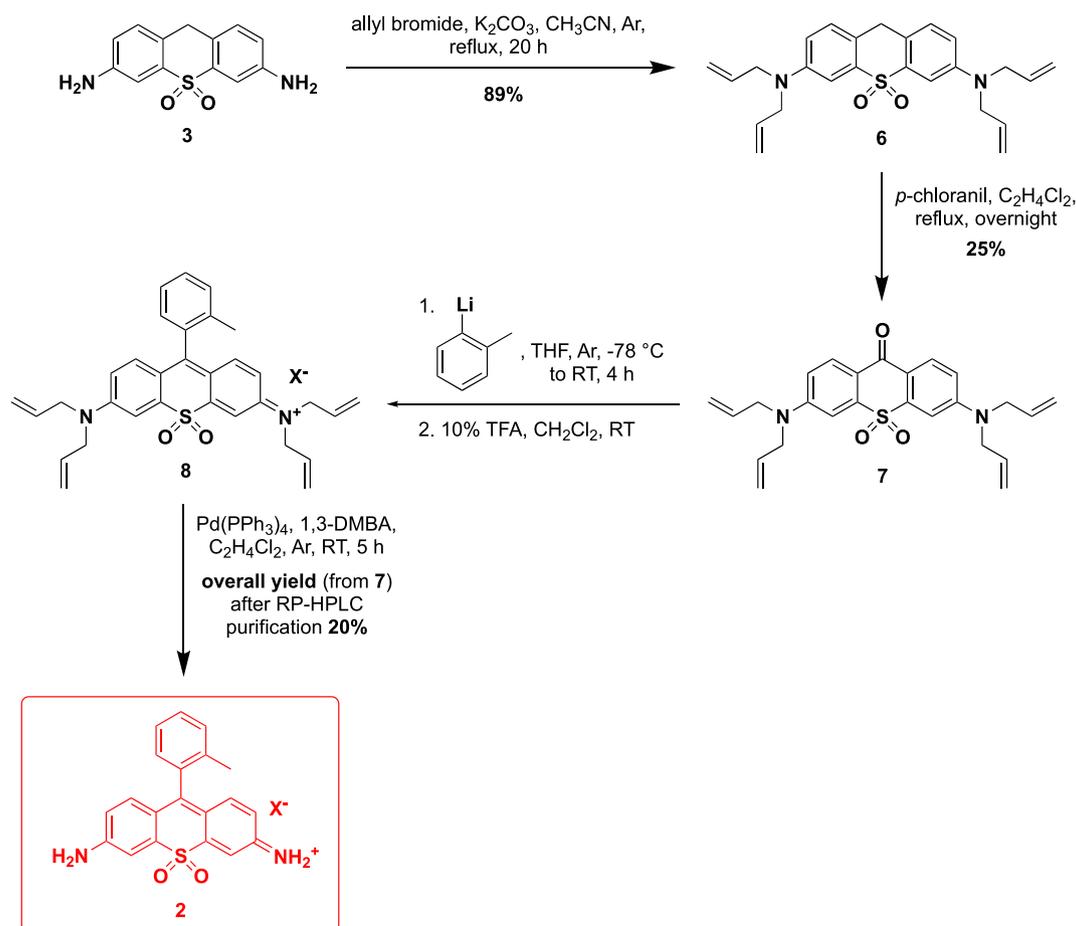
Fig. 4. Proposed reaction-based sensing mechanism for the detection of organophosphorus compounds (OP = organophosphate or organophosphonate) or phosgene using a sulfone-xanthene derivative as fluorogenic probe (R = Me or Et, $Y^- = Cl^-$ or leaving group of OP, LG = leaving group = OC(O)Cl in the case of phosgene, $X^- = Cl^-$ in the case of phosgene).

by RP-HPLC to give **2** as a TFA salt (mass percentage of TFA in freeze-dried sample = 13.1%, determined by ion chromatography) and in a moderate yet not optimized overall yield (20%) from **7**. All spectroscopic data (see ESI for the corresponding spectra, Figs. S24–S30), especially IR, NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structure assigned. Its high level of purity was confirmed by RP-HPLC analysis and found to be in the range 95–100% depending on the wavelength used for UV–visible detection.

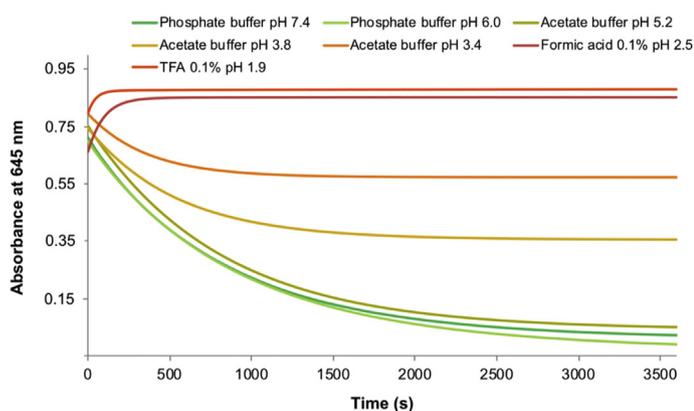
3.3. Stability and photophysical characterization of sulfone analog of 6-amino-9-(*o*-tolyl)-3H-xanthen-3-imine

To know if *meso*-substitution is an effective way to dramatically improve the aqueous stability of sulfone-xanthene scaffold, it was deemed necessary to study the spectral behavior of 9-(*o*-tolyl) derivative **2** over the pH range 1.9–7.4. This was achieved by incubating this fluorophore in various buffers (*i.e.*, phosphate, acetate and HPLC acidic mobile phases), and monitoring its absorbance at 645 nm over time, which is lost upon conversion to non-fluorescent triaryl carbinol **9**

(Fig. 5). To our surprise, sulfone-rosamine **2** exhibits a short half-life of ca. 10 min in buffers whose pH > 5 (see Fig. 5 for pseudo first-order rate constants and hydrolysis half-lives and ESI for details about determination of kinetics parameters), which prevents its photophysical characterization under simulated physiological conditions, contrary to what has been achieved by Liu et al. with *N,N,N',N'*-tetramethyl sulfone-rosamine **SO₂R2** [44]. A possible hypothesis to explain these apparently contradictory results, is that the greater electron-donating ability of dimethylamino groups as compared with amino groups may reduce the electrophilicity of C-9 position in **SO₂R2** and thus the reactivity of this sulfone-xanthene dye toward water molecule or hydroxide anion. In acetate buffers, **2** is shown to hydrolyze more slowly ($k_{1,obs} = 8.6 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ and $6.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ at pH 3.8 and 3.4 respectively) and incomplete conversion to colorless triaryl methanol **9** is achieved (60% and 35% at pH 3.8 and 3.4 respectively), suggesting that the NIR fluorescence of sulfone-rosamine **2** could be unveiled and observed in acidic aqueous buffered environments. This trend is enhanced in aqueous solutions with pH lower than 2.5. Indeed, in aq. TFA 0.1% and in aq. formic acid 0.1%, the fluorophore is fully-stable which has



Scheme 2. Synthesis of sulfone-rosamine **2** (TFA salt, $X^- = CF_3CO_2^-$, RT = room temperature, 1,3-DMBA = 1,3-dimethylbarbituric acid).



| Buffer, pH | $k_{1,obs}$ (sec ⁻¹) | Hydrolysis $t_{1/2}$ (min) |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------|
| PB, pH 7.4 | $1.1 \cdot 10^{-3}$ | 10.5 |
| PB, pH 6.0 | $1.2 \cdot 10^{-3}$ | 9.6 |
| Acetate, pH 5.2 | $1.1 \cdot 10^{-3}$ | 10.9 |
| Acetate, pH 3.8 | $8.6 \cdot 10^{-4}$ | n. d. |
| Acetate, pH 3.4 | $6.3 \cdot 10^{-4}$ | n. d. |

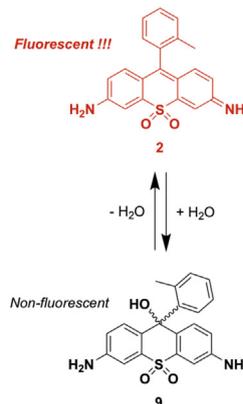


Fig. 5. Aqueous stability of sulfone-rosamine **2** at 25 °C: (Top left) UV-vis absorbance over time; (Bottom left) determination of pseudo first-order rate constants ($k_{1,obs}$) and hydrolysis half-life ($t_{1/2}$) (n. d. = not determined due to incomplete hydrolysis). (Right) Sulfone-rosamine **2** in equilibrium with its hydrated form **9**. Please note: the slight increase of absorbance at 645 nm observed during the incubation of **2** in aq. acidic solutions (pH < 2.5) is explained by the presence of a small amount of hydrated form **9** in DMSO stock solution of **2** which is rapidly converted into blue-colored sulfone-rosamine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

made possible its purification by RP-HPLC (*vide supra*).

Therefore, we decided to investigate the photophysical properties of **2** in aq. formic acid 0.1% (pH 2.5) (Fig. 6). The UV-vis absorption spectrum is quite similar to that of sulfone-pyrone **1** recorded in CH₃CN + 10% TFA (*vide supra*), and displays a maximum at 643 nm (ϵ 17 420 M⁻¹ cm⁻¹). The fluorescence emission curve shows a peak maximum at 687 nm (full-width half maximum, $\Delta\lambda_{1/2max}$ = 75 nm). By comparison with parent rosamine **2Me RG** (Abs/Em λ_{max} = 498/520 nm in PBS, pH 7.4) [64,65], the replacement of the xanthene 10-position O atom by a sulfone group leads, on the one hand, to the expected dramatic red-shift in the fluorescence maxima, and on the other hand, to unanticipated increase of Stokes shift (44 nm/995 cm⁻¹ compared to 22 nm/850 cm⁻¹ for **2Me RG**). This might be attributed to an excited-state ICT. This latter effect is greatly enhanced in sulfone-rosamine dyes because of the strong electron withdrawing capability of the SO₂ moiety [30,66]. Interestingly, a good matching between the absorption and excitation spectra is observed (Fig. 6), supporting the lack of H-type aggregates in acidic aqueous solutions. Thus, it was possible to determine the fluorescence quantum yield (Φ_F = 6%) using sulfoindocyanine dye Cy 5.0 as standard (Φ_F = 20% in PBS) [55], which is of the same order of magnitude as those reported by Liu et al. for *N,N,N',N'*-tetramethyl sulfone-rosamine dyes in PBS at physiological

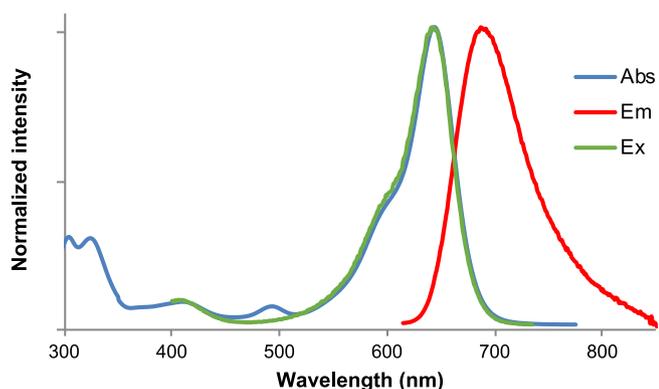


Fig. 6. Normalized absorption (blue), excitation (Em 750 nm, slit 5 nm, green) and emission (Ex 600 nm, slit 5 nm, red) spectra of sulfone-rosamine **2** in aq. 0.1% formic acid (pH 2.5) at 25 °C. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

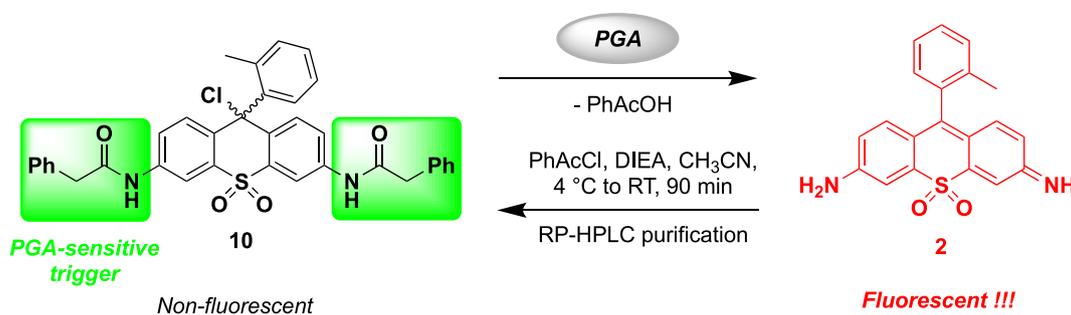
pH [44].

In the light of all this, it is obvious that these hetero-xanthene-based fluorophores may find applications in sensing and bioimaging, through their implementation as chemodosimeters or probes in sample matrices or in living biological systems which the pH level is sufficiently low to unveil their NIR emission [67]. A valuable example might be the development of fluorescent probes that target acidic organelles known to play specific and indispensable roles in cellular processes [68–71]. In this context, the lysosome, a key constituent of cellular digestive system containing hydrolytic enzymes that function only under acidic conditions, could be an attractive target. However, the ability of NIR fluorescent scaffold **2** to be readily converted into enzyme-sensitive “smart” probes still has to be demonstrated.

3.4. Fluorogenic reactivity of sulfone-rosamine **2**. synthesis and *in vitro* validations of PGA-sensitive probe **10**

To demonstrate that the primary amino groups of sulfone-rosamine **2** can be used as effective fluorescence switches for enzyme sensing purposes, we planned to synthesize a “turn-on” amidase-responsive fluorescent probe (Scheme 3). Penicillin G acylase (PGA, also known as penicillin amidase) was chosen as model protease because this hydrolytic enzyme has two clear advantages: (1) a structurally simple substrate (phenylacetamide) than can be easily installed on the sulfone-rosamine **2** through amidification of its primary anilines and (2) a commercial availability at low cost [72]. The relevance of this choice is supported by the routine use of PGA as biocatalyst for the synthesis of β -lactam antibiotics, since it allows for the deprotection of phenylacetyl-protected amines [73], or to perform *in vitro* validations of self-immolative molecular systems used as diagnostic probes, molecular amplifiers or drug delivery systems [74–76]. Bis-amidation of **2** was achieved by treatment with an excess of phenylacetyl chloride (PhAcCl, 4 equiv) and DIEA (5 equiv) in dry CH₃CN (Scheme 3).

The only difficulty associated with this synthetic procedure was related to the isolation of the PGA-sensitive probe **10** with a satisfying yield. Indeed, during the reaction monitoring by TLC and HPLC-MS analyses, we observed that the chlorine atom at the C-9 position could be replaced by various nucleophile species (e.g., MeOH, water, formic acid, ...) leading to a mixture of bis-phenylacetamide derivatives of sulfone-rosamine. Two successive purifications by RP-HPLC provided a pure sample of fluorogenic PGA substrate **10**. Spectroscopic data, in



Scheme 3. Synthesis of PGA-sensitive probe **10** and its enzymatic activation.

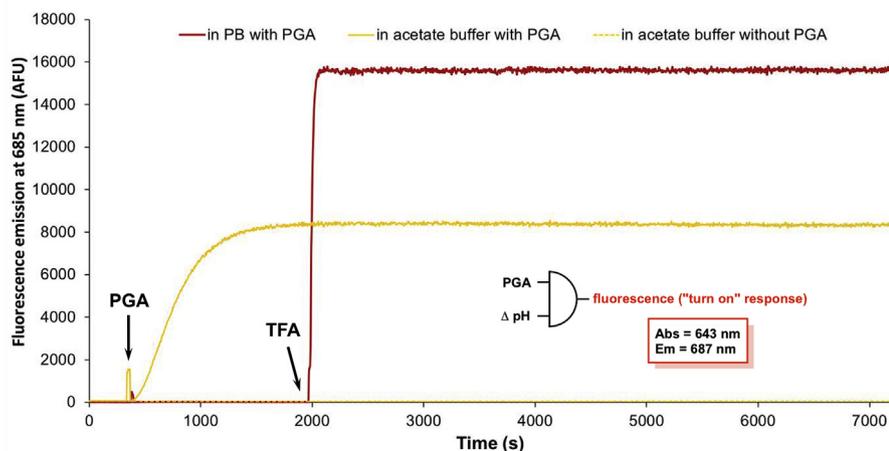


Fig. 7. Time-dependent changes in the far-red fluorescence intensity (Ex/Em 640/685 nm, slit 5 nm) of fluorogenic probe **10** (acting as a “AND” fluorescent molecular logic gate, concentration: 1 μ M) in the presence of PGA (1 U) at 37 °C. Please note: PGA was added after 5 min of incubation of probe in buffer alone. For enzymatic activation performed in phosphate buffer (pH 7.4), TFA was added after 33 min of incubation with enzyme for fluorescence unveiling. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

particular ^1H NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structure assigned. As expected, **10** proved to be colorless (only UV absorbance in the range 220–280 nm is observed, see ESI for the corresponding spectra, Fig. S35) and non-fluorescent in both phosphate and acetate buffers (pH 7.4 and 3.4 respectively) and its sensing response to PGA was studied by time-dependent fluorescence analysis (Fig. 7).

First, this fluorescence-based *in vitro* enzyme assay was performed at physiological pH (phosphate buffer, pH 7.4) and at 37 °C, where both stability and activity of PGA are assumed to be optimal [77]. Since sulfone-rosamine **2**, released upon enzymatic cleavage of carboxamide bonds, is not stable under these buffered conditions (*vide supra*), the strong far-red fluorescence signal at 685 nm (Ex at 640 nm) assigned to this hetero-xanthene dye, was observed only after adding excess of TFA to dramatically lower the pH of the assay mixture. To avoid the use of this exogenous reagent for fluorescence unveiling, we next explored enzymatic activation of probe **10** in acetate buffer (pH 3.4). In such cases, a significant and gradual increase of far-red fluorescence of sulfone-rosamine **2** (Ex/Em 640/685 nm) was observed. A plateau indicating the complete hydrolysis of **10** by PGA, was reached within about 30 min and a 70-fold increase in fluorescence was finally obtained (460-fold increase in phosphate buffer after addition of TFA, see ESI for the corresponding fluorescence emission spectra, Figs. S35 and S36). Furthermore, no fluorescence signal changes were observed in the absence of amidase, confirming the full stability of the probe in aqueous buffers. Finally, the presence of sulfone-rosamine dye **2** in these enzymatic reaction mixtures was unambiguously confirmed by RP-HPLC analyses (fluorescence detection, $t_R = 3.8$ min) and compared with an authentic sample of synthetic sulfone-rosamine **2** used as reference (Fig. 8). All these results demonstrate the potential utility of sulfone-rosamine dyes bearing primary aniline(s), as fluorogenic labels in reaction-based probes. Furthermore, PGA-sensitive probe **10** acts as a two-input “AND” molecular logic gate [78,79] because its cloaked fluorescence reporter signal is “turned-on” by the combined action of

two distinct biostimuli: enzyme activity and acidification (Fig. 7).

4. Conclusion

In summary, sulfone analogs of 6-amino-3H-xanthen-3-imine and rosamine **2Me RG** were successfully synthesized for the first time. These NIR hetero-xanthene dyes are attractive fluorogenic scaffolds for the rapid construction of “smart” probes currently used in reaction-based detection strategies. Spectral characterization of these fluorophores in various solvent media has shed light on their poor aqueous stability, especially at physiological pH. This is perfectly explained by the high electrophilicity of their *meso*-position which easily undergoes attack with water molecule (or hydroxide ion) to give a colorless and non-fluorescent benzhydrol/triaryl methanol derivative. The synthesis of unsymmetrical sulfone-pyrone/rosamine dyes bearing both a strong electron-donating dialkylamino group and a remaining primary aniline may be a possible way to improve the aqueous stability of the sulfone-xanthene chromophore, by reducing the nucleophile sensitivity of its C-9 position. Indeed, Liu et al. did not observe hydration of *N,N,N',N'*-tetramethyl-sulfone-rosamines (bearing a mono- or di-*o*-substituted aryl group as *meso*-substituent) in the pH range 2–8. To the best of our knowledge, the present study is the first and the only one which highlights the stability issue of hetero-xanthene-based fluorophores in aqueous media, particularly on those for which the 10-O atom is replaced by a strong electron-withdrawing group. This matter will need to be taken into consideration for future work devoted to long-wavelength heteroxanthene-based fluorophores and their bioanalytical applications. Gratifyingly, a good stability of fluorescent sulfone-rosamine **2** was observed under acidic buffered conditions. This feature, combined with the presence of fluorogenic centers (*i.e.*, primary amino groups) within the sulfone-xanthene scaffold open the way for designing “smart” fluorescent probes for sensing and imaging within specific cellular acidic organelles (*e.g.*, lysosomes). In this latter context, the development of “AND” molecular logic gates for the concomitant

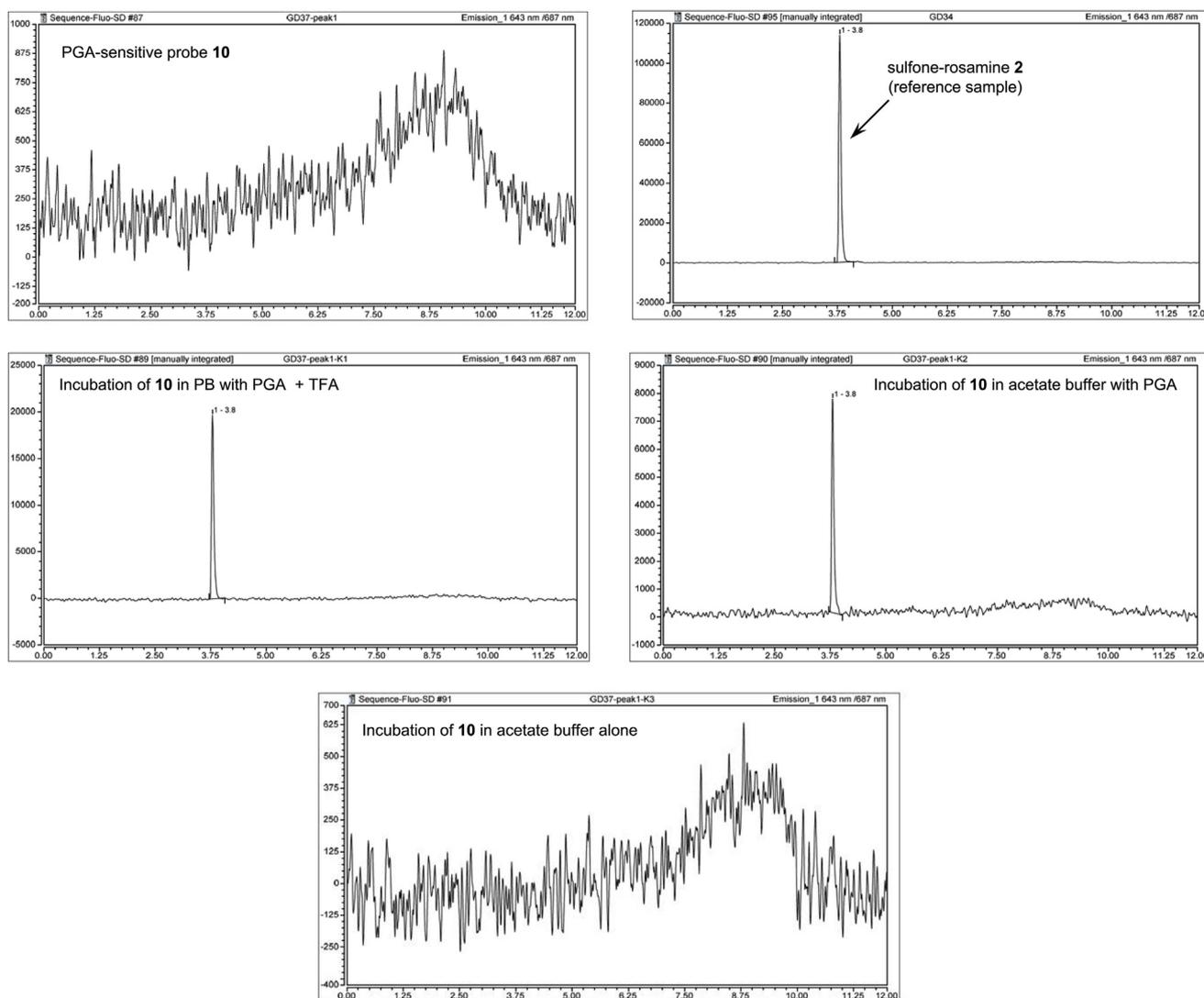


Fig. 8. RP-HPLC elution profiles (fluorescence detection, system H) of enzymatic reaction mixtures from fluorescence assays (see Fig. 7). (Top left) fluorogenic probe **10** before incubation with PGA; (Middle left) fluorogenic probe **10** after incubation with PGA (1 U, 2 h, 37 °C) in PB (pH 7.4) and TFA; (Middle right) fluorogenic probe **10** after incubation with PGA (1 U, 2 h, 37 °C) in acetate buffer (pH 3.5); (Bottom) blank = fluorogenic probe **10** incubated in acetate buffer alone; (Top right) Authentic sample of sulfone-rosamine **10**.

detection of two biological events (e.g., enzyme activation and pH changes) associated to a pathological state should be particularly interesting, for diagnostic purposes [78,80].

Acknowledgements

This work is supported by the CNRS, Université de Bourgogne and Conseil Régional de Bourgogne through the “Plan d’Actions Régional pour l’Innovation (PARI)” and the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” programs. G. D. gratefully acknowledges the Burgundy Franche-Comté region for his Ph. D. grant. Financial support from Institut Universitaire de France (IUF), the Burgundy region (“FABER” programme, PARI Action 6, SSTIC 6 “Imagerie, instrumentation, chimie et applications biomédicales”) and GDR CNRS “Agents d’Imagerie Moléculaire” (AIM) 2037 are also greatly acknowledged. The authors thank the “Plateforme d’Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l’Université de Bourgogne” (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) for access to analytical instrumentation. COBRA lab (UMR CNRS 6014) and Iris Biotech company are warmly thanked for the generous gift of some chemical reagents used in this work. The authors also thank Dr. Sylvain Debieu and Dr. Jean-Alexandre Richard

(ICES, A*STAR, Singapore) for helpful discussion, M. Sylvain Orenge (bioMérieux, R&D Microbiologie) for his interest in this work, M. Valentin Quesneau for the photography shown in Fig. 3, Miss Mare-José Penouilh (University of Burgundy, PACSMUB) for training in the use of 600 MHz NMR spectrometer and M. Marcel Soustelle (University of Burgundy, ICMUB, UMR CNRS 6302) for elemental analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.06.026>.

References

- [1] Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem Soc Rev* 2009;38:2410–33.
- [2] Wright P, Staff Ub. Xanthene dyes. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. John Wiley & Sons, Inc; 2014.
- [3] Lavis LD. Teaching old dyes new tricks: biological probes built from fluoresceins and rhodamines. *Annu Rev Biochem* 2017;86:825–43.
- [4] Kim HN, Lee MH, Kim HJ, Kim JS, Yoon J. A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spiroactam ring-opening to sensing ions. *Chem Soc Rev* 2008;37:1465–72.

- [5] Chen X, Pradhan T, Wang F, Kim JS, Yoon J. Fluorescent chemosensors based on spiroirring-opening of xanthenes and related derivatives. *Chem Rev* 2012;112:1910–56.
- [6] Tang Y, Lee D, Wang J, Li G, Yu J, Lin W, Yoon J. Development of fluorescent probes based on protection-deprotection of the key functional groups for biological imaging. *Chem Soc Rev* 2015;44:5003–15.
- [7] Zhang R, Yan F, Huang Y, Kong D, Ye Q, Xu J, Chen L. Rhodamine-based ratiometric fluorescent probes based on excitation energy transfer mechanisms: construction and applications in ratiometric sensing. *RSC Adv* 2016;6:50732–60.
- [8] Gonçalves MST. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem Rev* 2008;109:190–212.
- [9] Zheng H, Zhan X-Q, Bian Q-N, Zhang X-J. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chem Commun* 2013;49:429–47.
- [10] Mao F, Leung W-Y, Haugland RP. Sulfonated xanthene derivatives synthesis and applications as fluorescent stains, Molecular Probes, Inc., WO9915517.
- [11] Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung W-Y, Haugland RP. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1179–88.
- [12] Berlier JE, Rothe A, Buller G, Bradford J, Gray DR, Filanowski BJ, Telford WG, Yue S, Liu J, Cheung C-Y, Chang W, Hirsch JD, Beechem JM, Haugland RP, Haugland RP. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1699–712.
- [13] Leytus SP, Melhado LL, Mangel WF. Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases. *Biochem J* 1983;209:299–307.
- [14] Leytus SP, Patterson WL, Mangel WF. New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. Amino acid and dipeptide derivatives of rhodamine. *Biochem J* 1983;215:253–60.
- [15] Sun Y-Q, Liu J, Lv X, Liu Y, Zhao Y, Guo W. Rhodamine-inspired far-red to near-infrared dyes and their application as fluorescence probes. *Angew Chem Int Ed* 2012;51:7634–6.
- [16] Hong G, Antaris AL, Dai H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nat Biomed Eng* 2017;1:0010. <http://dx.doi.org/10.1038/s41551-016-0010>.
- [17] Liu J, Diwu Z, Leung W-Y, Lu Y, Patch B, Haugland RP. Rational design and synthesis of a novel class of highly fluorescent rhodamine dyes that have strong absorption at long wavelengths. *Tetrahedron Lett* 2003;44:4355–9.
- [18] David E, Lejeune J, Pellet-Rostaing S, Schulz J, Lemaire M, Chauvin J, Deronzier A. Synthesis of fluorescent rhodamine dyes using an extension of the Heck reaction. *Tetrahedron Lett* 2008;49:1860–4.
- [19] Romieu A, Tavernier-Lohr D, Pellet-Rostaing S, Lemaire M, Renard P-Y. Water solubilization of xanthene dyes by post-synthetic sulfonation in organic media. *Tetrahedron Lett* 2010;51:3304–8.
- [20] Chen J, Liu W, Zhou B, Niu G, Zhang H, Wu J, Wang Y, Ju W, Wang P. Coumarin and rhodamine-fused deep red fluorescent dyes: synthesis, photophysical properties, and bioimaging in vitro. *J Org Chem* 2013;78:6121–30.
- [21] Wang C, Wong KM-C. Selective Hg²⁺ sensing behaviors of rhodamine derivatives with extended conjugation based on two successive ring-opening processes. *Inorg Chem* 2013;52:13432–41.
- [22] Kamino S, Murakami M, Tanioka M, Shirasaki Y, Watanabe K, Horigome J, Ooyama Y, Enomoto S. Design and syntheses of highly emissive aminobenzopyrano-xanthene dyes in the visible and far-red regions. *Org Lett* 2014;16:258–61.
- [23] Zhang M, Liu X, Yang M, Zheng S, Bai Y, Yang B-q. A series of deep red fluorescent dyes: synthesis, theoretical calculations and bioimaging applications. *Tetrahedron Lett* 2015;56:5681–8.
- [24] Niu G, Liu W, Zhou B, Xiao H, Zhang H, Wu J, Ge J, Wang P. Deep-red and near-infrared xanthene dyes for rapid live cell imaging. *J Org Chem* 2016;81:7393–9.
- [25] Shirasaki Y, Okamoto Y, Muranaka A, Kamino S, Sawada D, Hashizume D, Uchiyama M. Fused-fluoran leuco dyes with large color-change derived from two-step equilibrium: iso-aminobenzopyranoxanthenes. *J Org Chem* 2016;81:12046–51.
- [26] Zhang M, Zheng S-t, Liu X-j, Long Y, Yang B-q. A series of novel NIR fluorescent dyes: synthesis, theoretical calculations and fluorescence imaging applications in living cells. *Dyes Pigments* 2016;125:220–8.
- [27] Zhao Y, Ren Y, Li H, Han T, Chen H, Guo W. A new far-red naphthorhodamine dye: synthesis, fluorescent probe and bioimaging applications. *Dyes Pigments* 2016;132:255–61.
- [28] Huang K, Jiao X, Liu C, Wang Q, Qiu X, He S, Zhao L, Zeng X. Synthesis of a novel π -extended hybrid rhodamine dye with far-red fluorescence emission and its application in bioimaging. *Dyes Pigments* 2017;145:561–9.
- [29] Lei Z, Li X, Luo X, He H, Zheng J, Qian X, Yang Y. Bright, stable, and biocompatible organic fluorophores absorbing/emitting in the deep near-infrared spectral region. *Angew Chem Int Ed* 2017;56:2979–83.
- [30] Liu C, Jiao X, Wang Q, Huang K, He S, Zhao L, Zeng X. A unique rectilinearly π -extended rhodamine dye with large Stokes shift and near-infrared fluorescence for bioimaging. *Chem Commun* 2017;53:10727–30.
- [31] Sun W, Guo S, Hu C, Fan J, Peng X. Recent development of chemosensors based on cyanine platforms. *Chem Rev* 2016;116:7768–817.
- [32] Chen H, Dong B, Tang Y, Lin W. A unique “integration” strategy for the rational design of optically tunable near-infrared fluorophores. *Acc Chem Res* 2017;50:1410–22.
- [33] Kolmakov K, Belov VN, Wurm CA, Härke B, Leutenegger M, Eggeling C, Hell SW. A versatile route to red-emitting carbopyronine dyes for optical microscopy and nanoscopy. *Eur J Org Chem* 2010:3593–610.
- [34] Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes utilizing photoinduced electron transfer. *ACS Chem Biol* 2011;6:600–8.
- [35] Kushida Y, Nagano T, Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their applications in bioimaging. *Analyst* 2015;140:685–95.
- [36] Ikeno T, Nagano T, Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their unique photophysical properties for fluorescent probes. *Chem - Asian J* 2017;12:1435–46.
- [37] Zhou X, Lesiak L, Lai R, Beck JR, Zhao J, Elowsky CG, Li H, Stains CI. Chemoselective alteration of fluorophore scaffolds as a strategy for the development of ratiometric chemodosimeters. *Angew Chem Int Ed* 2017;56:4197–200.
- [38] Chai X, Cui X, Wang B, Yang F, Cai Y, Wu Q, Wang T. Near-infrared phosphorus-substituted rhodamine with emission wavelength above 700 nm for bioimaging. *Chem - Eur J* 2015;21:16754–8.
- [39] Grzybowski M, Taki M, Yamaguchi S. Selective conversion of P=O-Bridged rhodamines into P=O-Rhodols: solvatochromic near-infrared fluorophores. *Chem - Eur J* 2017;23:13028–32.
- [40] Zhou X, Lai R, Beck JR, Li H, Stains CI. Nebraska Red: a phosphinate-based near-infrared fluorophore scaffold for chemical biology applications. *Chem Commun* 2016;52:12290–3.
- [41] Koide Y, Kawaguchi M, Urano Y, Hanaoka K, Komatsu T, Abo M, Terai T, Nagano T. A reversible near-infrared fluorescence probe for reactive oxygen species based on Te-rhodamine. *Chem Commun* 2012;48:3091–3.
- [42] Hirayama T, Mukaimine A, Nishigaki K, Tsuboi H, Hirotsawa S, Okuda K, Ebihara M, Nagasawa H. Bismuth-rhodamine: a new red light-excitable photosensitizer. *Dalton Trans* 2017;46:15991–5.
- [43] Detty MR, Prasad PN, Donnelly DJ, Ohulchanskyy T, Gibson SL, Hilf R. Synthesis, properties, and photodynamic properties in vitro of heavy-chalcogen analogues of tetramethylrosamine. *Bioorg Med Chem* 2004;12:2537–44.
- [44] Liu J, Sun Y-Q, Zhang H, Shi H, Shi Y, Guo W. Sulfone-rhodamines: a new class of near-infrared fluorescent dyes for bioimaging. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:22953–62.
- [45] Chan J, Dodani SC, Chang CJ. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat Chem* 2012;4:973–84.
- [46] Grimm JB, Heckman LM, Lavis LD. The chemistry of small-molecule fluorogenic probes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;113:1–34.
- [47] Chen X, Sun M, Ma H. Progress in spectroscopic probes with cleavable active bonds. *Curr Org Chem* 2006;10:477–89.
- [48] Drake CR, Miller DC, Jones EF. Activatable optical probes for the detection of enzymes. *Curr Org Synth* 2011;8:498–520.
- [49] Razzugin A, Ma N, Rao J. Strategies for in vivo imaging of enzyme activity: an overview and recent advances. *Chem Soc Rev* 2011;40:4186–216.
- [50] Chen L, Li J, Du L, Li M. Strategies in the design of small-molecule fluorescent probes for peptidases. *Med Res Rev* 2014;34:1217–41.
- [51] Singh K, Rotaru AM, Beharry AA. Fluorescent chemosensors as future tools for cancer biology. *ACS Chem Biol* 2018. <http://dx.doi.org/10.1021/acscmbio.8b00014>, in press.
- [52] Lin H-S, Paquette LA. A convenient method for determining the concentration of Grignard reagents. *Synth Commun* 1994;24:2503–6.
- [53] Kofron WG, Baclawski LM. A convenient method for estimation of alkyllithium concentrations. *J Org Chem* 1976;41:1879–80.
- [54] Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, Bercaw JE, Goldberg KI. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 2010;29:2176–9.
- [55] Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem* 1993;4:105–11.
- [56] Fu M, Xiao Y, Qian X, Zhao D, Xu Y. A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom. *Chem Commun* 2008:1780–2.
- [57] Horváth P, Šebej P, Šolomek T, Klán P. Small-molecule fluorophores with large Stokes shifts: 9-aminopyronin analogues as clickable tags. *J Org Chem* 2015;80:1299–311.
- [58] Nie H, Qiao L, Yang W, Guo B, Xin F, Jing J, Zhang X. UV-assisted synthesis of long-wavelength Si-pyronine fluorescent dyes for real-time and dynamic imaging of glutathione fluctuation in living cells. *J Mater Chem B* 2016;4:4826–31.
- [59] Nie H, Jing J, Tian Y, Yang W, Zhang R, Zhang X. Reversible and dynamic fluorescence imaging of cellular redox self-regulation using fast-responsive near-infrared Ge-Pyronines. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:8991–7.
- [60] Wei L, Chen Z, Shi L, Long R, Anzalone AV, Zhang L, Hu F, Yuste R, Cornish VW, Min W. Super-multiplex vibrational imaging. *Nature* 2017;544:465–70.
- [61] Chen L, Wu D, Yoon J. Recent advances in the development of chromophore-based chemosensors for nerve agents and phosgene. *ACS Sens* 2018;3:27–43.
- [62] A reaction-based probe for detecting 2-chloroethyl ethyl sulfide (2-CEES, mustard gas analog) whose the activation mechanism involves reaction of meso-position and aromatization to thiopyronin dye, was recently reported Zhang Y, Lv Y, Wang X, Peng A, Zhang K, Jie X, Huang J, Tian Z. A turn-on fluorescent probe for detection of sub-ppm levels of a sulfur mustard simulant with high selectivity. *Anal Chem* 2018;90:5481–8.
- [63] Fukazawa A, Suda S, Taki M, Yamaguchi E, Grzybowski M, Sato Y, Higashiyama T, Yamaguchi S. Phospha-fluorescein: a red-emissive fluorescein analogue with high photobleaching resistance. *Chem Commun* 2016;52:1120–3.
- [64] Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K. Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew Chem Int Ed* 2013;52:13028–32.
- [65] Shin N, Hanaoka K, Piao W, Miyakawa T, Fujisawa T, Takeuchi S, Takahashi S, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Tahara T, Tanokura M, Nagano T, Urano Y.

- Development of an azoreductase-based reporter system with synthetic fluorogenic substrates. *ACS Chem Biol* 2017;12:558–63.
- [66] Tian Z, Tian B, Zhang J. Synthesis and characterization of new rhodamine dyes with large Stokes shift. *Dyes Pigments* 2013;99:1132–6.
- [67] Hou J-T, Ren WX, Li K, Seo J, Sharma A, Yu X-Q, Kim JS. Fluorescent bioimaging of pH: from design to applications. *Chem Soc Rev* 2017;46:2076–90.
- [68] Xu W, Zeng Z, Jiang J-H, Chang Y-T, Yuan L. Discerning the chemistry in individual organelles with small-molecule fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed* 2016;55:13658–99.
- [69] Zhu H, Fan J, Du J, Peng X. Fluorescent probes for sensing and imaging within specific cellular organelles. *Acc Chem Res* 2016;49:2115–26.
- [70] Yue Y, Huo F, Lee S, Yin C, Yoon J. A review: the trend of progress about pH probes in cell application in recent years. *Analyst* 2017;142:30–41.
- [71] Jiao X, Li Y, Niu J, Xie X, Wang X, Tang B. Small-molecule fluorescent probes for imaging and detection of reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in biological systems. *Anal Chem* 2018;90:533–55.
- [72] For instance, only 100 euros for 1000 units, see <https://www.iris-biotech.de/de/ez50150>.
- [73] Yang Y, Chen Y, Aloysius H, Inoyama D, Hu L. Enzyme and targeted activation of prodrugs. *Enzyme technologies: pluripotent players in discovering therapeutic agents*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2014. p. 213–5.
- [74] Gnaïm S, Shabat D. Quinone-methide species, a gateway to functional molecular systems: from self-immolative dendrimers to long-wavelength fluorescent dyes. *Acc Chem Res* 2014;47:2970–84.
- [75] Alouane A, Labruère R, Le Saux T, Schmidt F, Jullien L. Self-immolative spacers: kinetic aspects, structure–property relationships, and applications. *Angew Chem Int Ed* 2015;54:7492–509.
- [76] Roth ME, Green O, Gnaïm S, Shabat D. Dendritic, oligomeric, and polymeric self-immolative molecular amplification. *Chem Rev* 2016;116:1309–52.
- [77] Guranda DT, Volovik TS, Sedas VK. pH stability of penicillin acylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:1386–90.
- [78] Romieu A. “AND” luminescent “reactive” molecular logic gates: a gateway to multi-analyte bioimaging and biosensing. *Org Biomol Chem* 2015;13:1294–306.
- [79] Erbas-Cakmak S, Kolemen S, Sedgwick AC, Gunnlaugsson T, James TD, Yoon J, Akkaya EU. Molecular logic gates: the past, present and future. *Chem Soc Rev* 2018;47:2228–48.
- [80] Kolanowski JL, Liu F, New EJ. Fluorescent probes for the simultaneous detection of multiple analytes in biology. *Chem Soc Rev* 2018;47:195–208.

II.1.2. Conclusions et perspectives

Cette première étude nous a conduit à la conclusion que malheureusement les sulfone-pyronines (et les sulfone-rosamines peu encombrées au niveau de leur substituant aryle en *meso*) ne pouvaient pas être utilisables dans le contexte de notre projet et plus globalement dans le domaine de la biodétection selon la modalité de fluorescence. Leur instabilité en milieu aqueux est en effet rédhibitoire. Le caractère électrophile marqué de la position *meso* des sulfone-xanthènes favorise l'addition d'eau (ou d'un anion hydroxyde) sur cette position pour conduire à une molécule non colorée et non fluorescente. Cette problématique avait été brièvement abordée dans la publication du groupe de W. Guo⁵⁸, où les auteurs évoquaient l'addition d'eau sur l'analogue SO₂ de la tétraméthylrosamine (**SO₂R1**). Cependant, les valeurs des maxima d'absorption et d'émission ainsi que du rendement quantique de fluorescence dans le PBS (pH 7,4) avaient été données dans l'article ; ce qui nous a laissé croire que les colorants de type sulfone-xanthène envisagés pourraient être stables en conditions physiologiques. Par ailleurs, nous nous sommes aperçus *a posteriori* que les sulfone-rosamines publiées par Guo et son équipe n'avaient jamais été utilisées (depuis leur publication en 2016) dans une application bio-analytique ou de bio-imagerie même par ce groupe de recherche qui semble privilégier l'usage des analogues Si-xanthènes. Nous avons également contacté W. Guo qui nous a avoué que ses investigations sur ces molécules, au départ attractives, ont été abandonnées.

La différence notable entre les dérivés publiés par le groupe de W. Guo et nos deux composés **GD17** et **GD34**, est la nature des groupements amino (NMe₂ vs. NH₂). Dans notre cas, l'application visée nécessite de posséder au moins une aniline primaire (*vide supra*), afin de pouvoir la substituer par un motif de reconnaissance de l'enzyme ciblée. Dans un souci de simplicité synthétique, nous avons fait le choix de débiter notre étude avec des sulfone-pyronines/rosamines symétriques (*vide supra*). Mais en comparant la stabilité de **GD34**, qui existe exclusivement sous sa forme hydratée pour un pH > 4, et **SO₂R2**, son analogue tétraméthylé, dont la forme colorée et fluorescente semble majoritaire à pH 7, la nature des substituants des groupements NR₂ semble donc être à nouveau un paramètre important. En effet, l'influence des substituants sur les propriétés spectrales et le caractère électrophile de la position *meso* a d'ailleurs été montrée sur divers hétéro-xanthènes comme déjà évoqué dans la première partie de ce chapitre. Cependant les paramètres photophysiques profondément influencés par la nature des NR₂ sont en général le rendement quantique et durée de vie de fluorescence. Dans le cas des sulfone-hétéroxanthènes, il semblerait que la présence de substituants alkyles sur les anilines apporte un gain en électrons (effet inductif donneur +I) qui pourrait compenser en partie le caractère électrophile marqué de la position *meso* qui résulte à la fois du caractère fortement électro-attracteur d'électrons du SO₂ et de l'absence d'effet mésomère donneur +M pour l'hétéroatome intracyclique.

Un autre moyen de limiter l'addition nucléophile de la molécule d'eau ou de l'anion hydroxyde (OH^-) sur la position *meso* serait d'encombrer d'avantage le phényle présent sur cette position. En effet, comme le montrent les travaux du groupe de W. Guo (Figure 20), parmi les cinq dérivés sulfone-rosamine étudiés, ceux dont le *meso*-phényle est substitué par deux méthyles ou deux méthoxy sur ses positions *ortho* (i.e., **SO₂R4** et **SO₂R5**) sont totalement stables jusqu'à pH 10 (Figure 23 et pour un rappel des structures voir Figure 21).

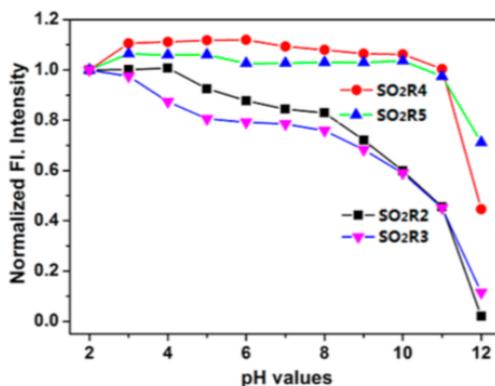


Figure 23. Intensité de fluorescence normalisée des sulfone-rosamines **SO₂R2-5** en fonction du pH du tampon dans lequel ils sont solubilisés. Figure issue de la publication du groupe de W. Guo⁵⁸. © 2016 American Chemical Society.

Bien que la possibilité de synthétiser une sulfone-rosamine totalement stable en milieu aqueux (à pH physiologique) est réelle, notre but ultime est d'accéder à des précurseurs "cagés" dont la structure présente une fonction aldéhyde (Figure 22). La formation *in situ* d'une sulfone-rosamine impliquerait de concevoir un précurseur "cagé" possédant une bis-arylcétone. Or cette fonction est beaucoup moins réactive qu'un aldéhyde (notamment vis-à-vis des attaques nucléophiles) et il n'est donc pas certain que le processus domino déclenché par l'analyte soit effectif. La substitution de l'une des deux anilines primaires de la sulfone-pyronine **GD17** serait également envisageable, cependant le gain de stabilité hydrolytique supposé être apporté par la présence et les effets électroniques de l'alkylation d'une seule aniline nous a semblé largement insuffisant.

Au vu des nombreux travaux portant sur les fluorophores à cœur Si-xanthène⁴⁷, nous avons pensé que ce changement d'hétéroatome permettrait d'obtenir des hétéro-pyroneines stables en milieu aqueux. En effet, contrairement au groupement sulfone, le motif SiMe_2 n'est pas électro-attracteur ce qui devrait contribuer à une diminution significative du caractère électrophile de la position *meso*.

II.2. Synthèse et étude physico-chimique d'une Si-pyronine

La publication du premier dérivé Si-pyronine³⁹ en 2008, suivi des travaux du groupe de T. Nagano sur les hétéro-xanthènes du groupe 14⁴³ a suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche notamment ceux impliqués dans le développement d'agents d'imagerie fluorescents (soit pour l'imagerie moléculaire *in vivo* ou pour la microscopie de super résolution, microscopie

STED par exemple) ou de sondes fluorogéniques. Ainsi les dérivés Si-xanthènes, où l'atome d'oxygène intracyclique est substitué par un motif SiR₂, sont déjà nombreux à être utilisés dans ces domaines^{47a}). Néanmoins, la synthèse de ces colorants Si-xanthènes est souvent complexe, chronophage et requiert un certain savoir-faire expérimental. Les différentes voies d'accès à ces hétérocycles silylés vont être brièvement présentées ci-dessous, ainsi que quelques exemples d'applications.

II.2.1. Les dérivés Si-rhodamines/rosamines

II.2.1.1. Les voies de synthèse connues

La première Si-pyronine, **TMDHS**, synthétisée en 2008 par le groupe de Y. Xiao, a été préparée à partir du dérivé bis-bromoaryle bis(2-bromo-4-*N,N*-diméthylphényl)méthane, lui-même obtenu à partir de la 3-bromoaniline commerciale. L'étape suivante est basée sur une réaction développée en 1957 par le groupe de C. H. Hitchcock et qui porte son nom : la réaction de Hitchcock⁶². Elle est la première méthode ayant permis la formation de liaisons Si-C. Comme illustré dans le Schéma 2, elle consiste donc en un double échange halogène-lithium suivi d'une double substitution nucléophile du bis-lithien formé sur l'atome de silicium électrophile du dérivé dichlorosilane.

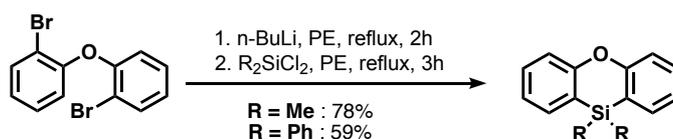


Schéma 2. Schéma réactionnel de la réaction de Hitchcock appliquée à la formation de dérivés 10-phénoxy-silane issu de la publication princeps de 1957^{62a}. (PE = éther de pétrole pour "petroleum ether")

C'est donc cette réaction qui a été remise au goût du jour pour répondre à la problématique de la formation de cœurs Si-xanthène, comme le montre la troisième étape de la synthèse de la TMDHS³⁹. Le dérivé Si-dihydropyronine ainsi obtenu est au final aromatisé à l'aide du 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) dans le méthanol pour donner la Si-pyronine désirée (Schéma 3).

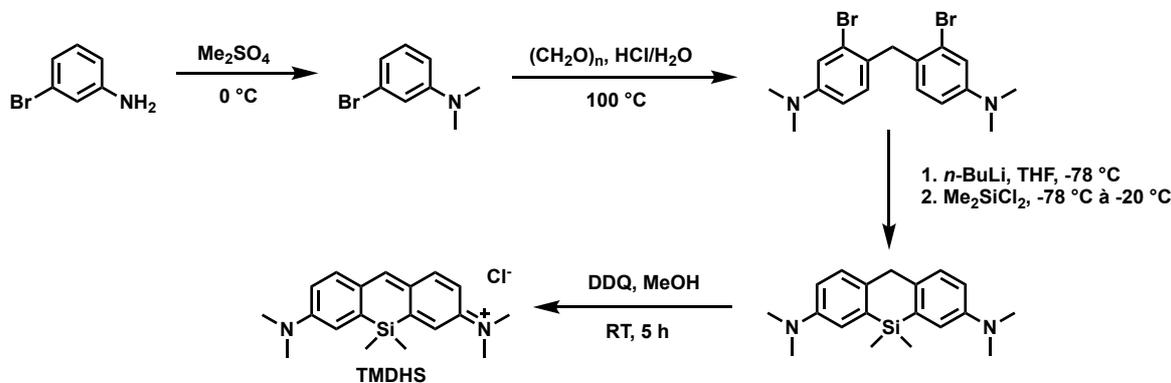


Schéma 3. Voie de synthèse de la Si-pyronine **TMDHS** développée par le groupe de Y. Xiao³⁹.

⁶² a) C. H. S. Hitchcock, F. G. Mann, A. Vanterpool, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 4537-4546; b) Pour une revue récente sur la synthèse des hétérocycles silylés, voir : M. Durandetti, T. Boddart, *Actual. Chim.*, **2018**, 434, 11-17.

En 2012, le groupe de T. Nagano a étendu cette stratégie à la préparation de plusieurs Si-rosamines⁶³ (Voir Figure 25 dans la partie II.2.1.2.). L'intermédiaire clé, la Si-xanthone, est obtenue après oxydation de la Si-pyronine. La réaction d'addition nucléophile d'un aryllithien sur l'intermédiaire Si-xanthone conduit après déshydratation (en milieu acide) à la Si-rosamine désirée (Schéma 4).

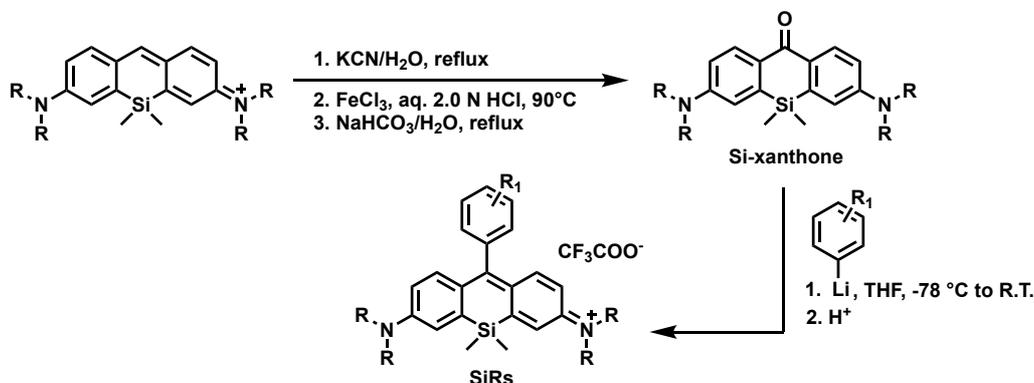


Schéma 4. Voie de synthèse des Si-rosamines SiRs développée par le groupe de T. Nagano⁶³.

Une méthode générale pour obtenir des Si-rhodamines (**SiRBs**) a été décrite en 2014 par le groupe de T. Wang et Q. Wu.⁶⁴ Ici, l'intermédiaire clé est un diaryldiméthylsilane (**DASE**) préparé via une réaction de Hitchcock intermoléculaire entre deux dérivés de type 3-bromo-*N,N*-dialkylaniline. Après une réaction de condensation avec un dérivé 2-carboxybenzaldéhyde, en présence d'une quantité catalytique de bromure de cuivre (II), à 140 °C en tube scellé, la **SiRB** est obtenue avec un rendement compris entre 10% et 50%, dépendant de la nature et la position du substituant du dérivé 2-carboxybenzaldéhyde (Schéma 5).

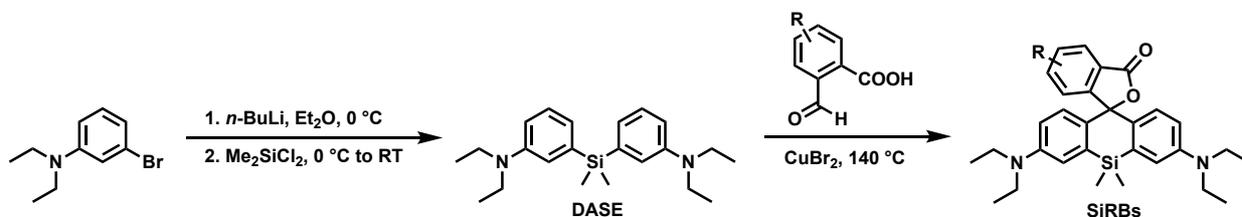


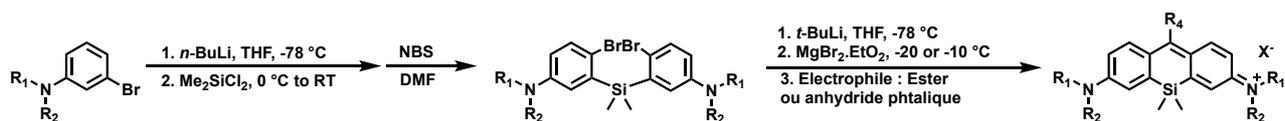
Schéma 5. Voie de synthèse des **SiRBs** proposée par le groupe de T. Wang et Q. Wu⁶⁴.

Enfin, en 2017, le groupe de L. Lavis a proposé une voie plus générale d'accès aux dérivés Si-xanthènes⁶⁵ qui commence toujours d'un dérivé 3-bromo-*N,N*-dialkylaniline. L'intermédiaire clé est obtenu après une réaction de Hitchcock⁶² suivie d'une réaction de dibromation réalisée en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS). Il peut ainsi réagir après échange halogène-métal soit avec un aryl-ester pour conduire à une Si-rosamine ou soit à un anhydride phtalique pour former une Si-rhodamine (Schéma 6).

⁶³ Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, W. Piao, M. Kusakabe, N. Saito, T. Terai, T. Okabe, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 5029-5031.

⁶⁴ B. Wang, X. Chai, W. Zhu, T. Wang, Q. Wu, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 14374-14377.

⁶⁵ J. B. Grimm, T. A. Brown, A. N. Tkachuk, L. D. Lavis, *ACS Cent. Sci.*, **2017**, *3*, 975-985.

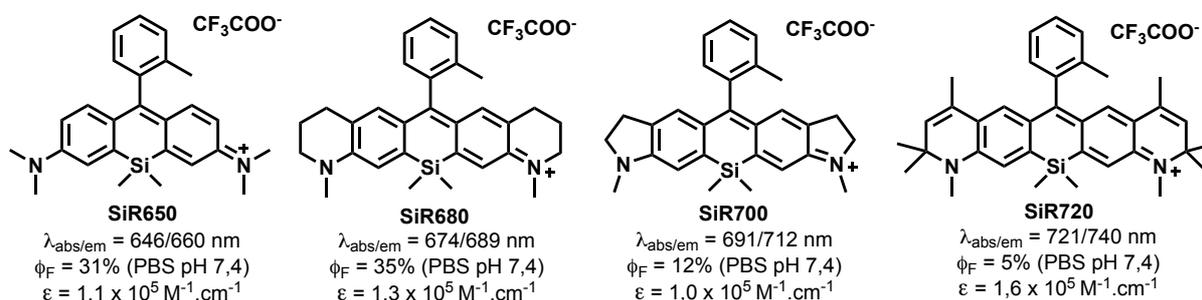

 Schéma 6. Voie de synthèse générale des Si-xanthènes développée par le groupe de L. Lavis⁶⁵.

II.2.1.2. Quelques exemples d'applications des Si-xanthènes fluorescents

L'imagerie de fluorescence *in vivo* nécessitant l'utilisation de marqueurs présentant des maxima d'absorption et d'émission situés dans la gamme spectrale du NIR-I, et au regard de ce que nous venons d'évoquer, il est logique que les Si-xanthènes aient été très utilisés notamment pour le développement de sondes performantes en milieu biologique⁴⁷. Dès leur première publication sur cette classe d'hétéro-xanthènes, le groupe de T. Nagano a montré le potentiel de ces fluorophores en synthétisant et en validant une sonde fluorogénique basée sur le principe du PeT, pour la détection des cations Zn (II) en milieu biologique (validée sur cellules vivantes de type HeLa)⁴³ (Figure 24).


 Figure 24. Sonde fluorogénique à cœur Si-rosamine développée par le groupe de T. Nagano pour la détection des cations Zn (II). Illustration issue de la publication de Koide *et al.*⁴³ © 2011 American Chemical Society.

Un an plus tard, la même équipe a étudié l'influence de différents groupements NR₂ du cœur xanthène sur les propriétés spectrales des Si-rosamines. Trois nouveaux dérivés ont ainsi été synthétisés⁶³ (Figure 25).


 Figure 25. Structures et propriétés spectrales des SiRs de seconde génération synthétisés par le groupe de T. Nagano⁶³.

Les très bonnes propriétés spectrales dans le NIR-I de ces nouvelles Si-rosamines ont conduit les auteurs à étudier plus en détails les dérivés **SiR680** et **SiR700** qui présentent de bons rendements quantiques en milieu physiologique simulé. Ainsi, des tests de photostabilité en milieu aqueux (PBS, pH 7.4) ont montré une meilleure résistance au photoblanchiment que celle des

fluorophores de référence actuellement utilisés en imagerie de fluorescence *in vivo*, la pentaméthine cyanine Cy 5.5⁶⁶ (Figure 26).

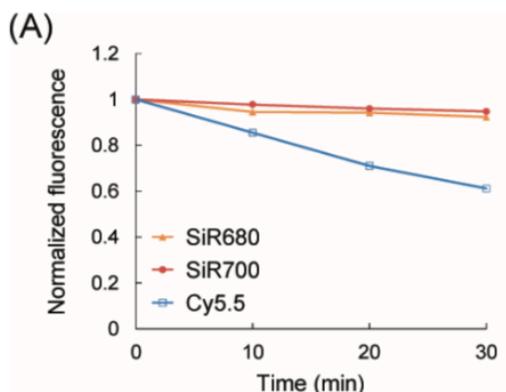


Figure 26. Expérience de photoblanchiment : variations de l'émission de fluorescence (à 660 nm, 712 nm et 703 nm) d'une solution (1 μ M) de **SiR680**, **SiR700** et Cy 5.5 en fonction du temps dans le PBS à pH 7,4 au cours d'une irradiation à une puissance de 40mW/cm², filtre Cy5. Illustration issue de la publication de Koide *et al.*⁶³. © 2012 American Chemical Society.

Un dérivé bioconjugué de **SiR700** possédant un ester activé de type *N*-hydroxysuccinimide (NHS) a été synthétisé et utilisé pour effectuer le marquage covalent d'un anticorps. Cet immunoconjugué fluorescent est capable de reconnaître la glycoprotéine ténascine-C surexprimée dans les tissus cancéreux et ainsi permettre le ciblage et le marquage spécifiques d'une tumeur xéno greffée. Les tests *in vivo* ont été réalisés sur souris et montrent une persistance du marquage au-delà de 10 jours (Figure 27).

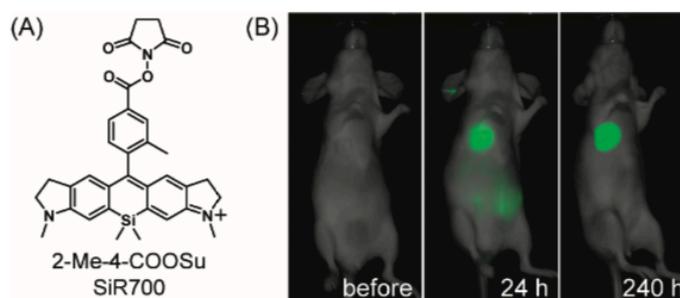


Figure 4. *In vivo* tumor imaging with SiR700-labeled anti-tenascin-C antibody (SiR700-RCB1). Xenograft tumor model mice prepared with human malignant meningioma HKBMM cells were intravenously injected with 300 μ L of 130 μ g/mL SiR700-RCB1 (D/A = 1.6). The tumor fluorescence images were obtained before and at 24 h after the injection.

Figure 27. (A) Structure du dérivé bioconjugué de **SiR700**. (B) Imagerie de fluorescence *in vivo* d'une souris possédant une tumeur xéno greffée, à l'aide d'un immunoconjugué fluorescent **SiR700-RCB1**. Illustration issue de la publication de Koide *et al.*⁶³. © 2012 American Chemical Society.

⁶⁶ S. R. Mujumdar, R. B. Mujumdar, C. M. Grant, A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 356-362.

De nombreuses autres sondes fluorescentes dérivées des Si-xanthènes ont été développées. Certaines, fondées sur le phénomène de PeT, permettent la détection *in vivo* de divers analytes comme les cations Ca^{2+} ⁶⁷, des ROS⁶⁸, l'oxygène singulet⁶⁹, le monoxyde d'azote (NO)⁷⁰ ou encore plus récemment l'ion peroxydite (ONOO^-)⁷¹. Le mécanisme de spirocyclisation effectif au sein des rhodamines a également été mis en œuvre dans la conception d'un certain nombre de sondes fluorogéniques⁷². Par exemple, le groupe de T. Nagano a publié, toujours en 2012, une sonde fluorescente NIR-I pour la détection de l'acide hypochloreux (HClO)^{72a} (Figure 28). Le mécanisme d'activation de la fluorescence repose sur une réaction d'oxydation d'un motif thioéther en acide sulfonique (sous forme sulfonate à pH physiologique), provoquant une ouverture du cycle de type tétrahydrothiophène et la formation de la Si-rosamine colorée et fluorescente.

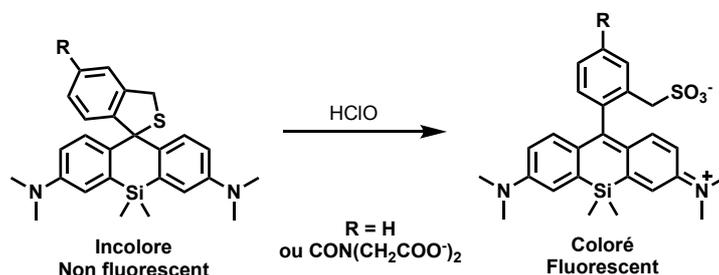


Figure 28. Sonde fluorogénique à cœur Si-rosamine développée par le groupe de T. Nagano pour la détection *in vivo* de HClO^{73a}.

D'autres exemples de la littérature décrivent des sondes pour la détection des cations Fe^{2+} ^{72f}, Cu^{2+} ^{72e}, ou encore Hg^{2+} ^{72g}, ... Cependant, parmi tous les composés publiés, très peu possèdent des anilines primaires, requis pour la mise en œuvre de notre approche d'assemblage covalent (décrite dans le prochain chapitre). Les rares exemples connus, que l'on doit une nouvelle fois au groupe de K. Hanaoka et T. Nagano montrent l'utilisation d'une Si-rosamine (analogue de la rhodamine 110) pour la détection d'activités enzymatiques de type protéase (caspase-3, protéase à cystéine jouant un rôle clé dans le phénomène d'apoptose) et azoréductase (AzoR, enzyme redox

⁶⁷ a) T. Egawa, K. Hanaoka, Y. Koide, S. Ujita, N. Takahashi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 14157-14159; b) T. Egawa, K. Hirabayashi, Y. Koide, C. Kobayashi, N. Takahashi, T. Mineno, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, Y. Ikegaya, N. Matsuki, T. Nagano, K. Hanaoka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, 52, 3874-3877.

⁶⁸ H. Zhang, J. Liu, C. Liu, P. Yu, M. Sun, X. Yan, J.-P. Guo, W. Guo, *Biomaterials*, **2017**, 133, 60-69.

⁶⁹ S. Kim, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 11707-11715.

⁷⁰ a) B. Wang, S. Yu, X. Chai, T. Li, Q. Wu, T. Wang, *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22, 5649-5656; b) Z. Mao, H. Jiang, X. Song, W. Hu, Z. Liu, *Anal. Chem.*, **2017**, 89, 9620-9624.

⁷¹ a) J. Miao, Y. Huo, H. Shi, J. Fang, J. Wang, W. Guo, *J. Mater. Chem. B*, **2018**, 6, 4466-4473; b) J. Tang, Q. Li, Z. Guo, W. Zhu, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, 17, 1875-1880.

⁷² Pour des exemples sur le sujet : a) Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 5680-5682; b) T. Wang, Q.-J. Zhao, H.-G. Hu, S.-C. Yu, X. Liu, L. Liu, Q.-Y. Wu, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8781-8783; c) W. Zhu, X. Chai, B. Wang, Y. Zou, T. Wang, Q. Meng, Q. Wu, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 9608-9611; d) T. F. Brewer, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 10886-10889; e) B. Wang, X. Cui, Z. Zhang, X. Chai, H. Ding, Q. Wu, Z. Guo, T. Wang, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 6720-6728; f) T. Hirayama, H. Tsuboi, M. Niwa, A. Miki, S. Kadota, Y. Ikeshita, K. Okuda, H. Nagasawa, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 4858-4866; g) J. Tao, X.-C. Wang, X.-Q. Chen, T.-C. Li, Q.-P. Diao, H.-F. Yu, T. Wang, *Dyes Pigm.*, **2017**, 137, 601-607; h) Y. Huo, J. Miao, L. Han, Y. Li, Z. Li, Y. Shi, W. Guo, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 6857-6864; i) R. Wirth, P. Gao, G. U. Nienhaus, M. Sunbul, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141, 7562-7571.

surexprimée en conditions hypoxiques) *via* la déprotection d'un groupement NH₂ masqué sous forme d'amide ou de pont diazo⁷³ (Figure 29).

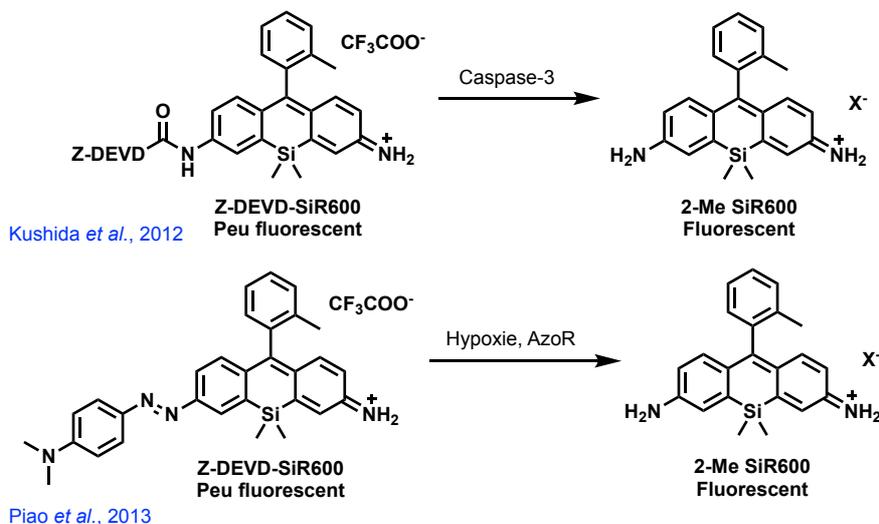


Figure 29. Exemples de sondes pro-fluorescentes dérivées d'une Si-rosamine à anilines primaires et dont le mécanisme d'activation par une protéase/réductase repose sur la déprotection du groupement amino^{73a,b}.

Plus récemment, des travaux portant sur l'utilisation de dérivés Si-pyronines comme sondes intracellulaires pour la détection du thiol biologique GSH ont été publiés par le groupe de J. Jing et X. Zhang⁷⁴. Ce type de sondes fonctionne selon un mode "On-Off", c'est-à-dire qu'elle est initialement fluorescente puis, suite à la réaction d'addition nucléophile du GSH (*via* son groupement thiol) sur la position *meso*, la disparition de la conjugaison étendue du système électronique π se traduit pas une perte de la couleur et de la fluorescence du Si-xanthène (Figure 30).

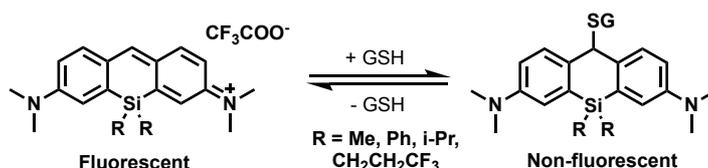


Figure 30. Principes des sondes fluorogéniques "On-Off" à cœur Si-pyronine et utilisées pour la détection du GSH⁷⁴.

Ces travaux permettent de conclure que les Si-pyronines sont stables en milieu aqueux et à pH physiologique. Toutefois, leur sensibilité vis-à-vis des thiols biologiques pourrait être problématique pour notre application suivant la nature et la composition du milieu à analyser. Afin de procéder à l'étude de la stabilité d'une Si-pyronine dont les deux amines sont libres, la synthèse

⁷³ a) Y. Kushida, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai, T. Ueno, K. Yoshida, M. Uchiyama, T. Nagano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 3908-3911; b) W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano, K. Hanaoka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, 52, 13028-13032. Pour des Si-xanthènes à anilines primaires et dont le mécanisme d'activation par une protéase/réductase repose sur la déprotection du groupement amino : c) W. Piao, K. Hanaoka, T. Fujisawa, S. Takeuchi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 13713-13719; d) M. Chiba, M. Kamiya, K. Tsuda-Sakurai, Y. Fujisawa, H. Kosakamoto, R. Kojima, M. Miura, Y. Urano, *ACS Cent. Sci.*, **2019**, 5, 1676-1681.

⁷⁴ H. Nie, L. Qiao, W. Yang, B. Guo, F. Xin, J. Jing, X. Zhang, *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4, 4826-4831.

de **GD81**, analogue silicié de la 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (nommé pyronine **AR129** dans ce manuscrit) a été entreprise et ses propriétés spectrales ainsi que sa stabilité en solution aqueuse ont été comparées à ceux de son analogue oxygéné. Ces travaux ont fait l'objet d'une seconde publication parue en 2019 dans le journal *Tetrahedron Letters*⁷⁵ (éditeur Elsevier, portail ScienceDirect.com) qui servira de support à la discussion (les molécules **AR129** et **GD81** correspondent respectivement aux molécules **1** et **2** de cet article).

II.2.2. Article 2. "Quest for novel fluorogenic xanthene dyes: Synthesis, spectral properties and stability of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (pyronin) and its silicon analog"

⁷⁵A. Romieu, G. Dejoux, I. E. Valverde, *Tetrahedron Lett.*, **2018**, 59, 4574-4581.



Quest for novel fluorogenic xanthene dyes: Synthesis, spectral properties and stability of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (pyronin) and its silicon analog

Anthony Romieu^{a,b,*}, Garance Dejoux^a, Ibai E. Valverde^a

^aICMUB, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21078 Dijon Cedex, France

^bInstitut Universitaire de France, 1, Rue Descartes, Bâtiment MONGE, 75231 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2018

Revised 7 November 2018

Accepted 9 November 2018

Available online 10 November 2018

Keywords:

Amino group protection-deprotection

Fluorescent probe

Hetero-xanthene dye

Protease

Pyronin

ABSTRACT

To expand the range of primary aniline fluorophores available and suitable for the design of fluorogenic protease probes, the synthesis of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (known as pyronin) and its silicon analog (Si-pyronin) was explored and presented here. A comprehensive photophysical study of these two fluorescent anilines, confirms the effectiveness of the heteroatom-substitution approach (O → SiMe₂) to yield dramatic red-shifts in absorption and fluorescence maxima of the xanthene scaffold (+85 nm). However, it also revealed its adverse effect on the hydrolytic stability of the Si-pyronin, especially at physiological pH. The pro-fluorescent character and utility of these two fluorogenic (hetero)xanthene dyes are also proved by the preparation and *in vitro* validation of activatable fluorescence “turn-on” probes for penicillin G acylase (PGA).

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Fluorescent organic dyes bearing one or two primary aniline moieties are now recognized as being essential chemical tools for the design of analyte-responsive fluorescent probes applied to sensing/imaging applications [1,2]. Indeed, the protection-deprotection of an optically tunable amino group is often an easy-to-implement method that produces optimal fluorescence “OFF-ON” response and thus high sensitivity for the detection of a target analyte (*i.e.*, enzyme) in complex media (Fig. 1) [3]. The vast majority of fluorogenic anilines currently available are based on benzo[*a*]phenoxazine, coumarin, *N*-alkyl 1,8-naphthalimide and xanthene scaffolds. Well-known examples are oxazine 9 (cresyl violet analog) [4], coumarin 120 (*i.e.*, 7-amino-4-methylcoumarin) [5], *N*-butyl-4-amino-1,8-naphthalimide [6] and rhodamine 110 [2] or its disulfonated analog Alexa Fluor[®] 488 [7] (Fig. 1).

Recently, research efforts have been focused on the development and practical applications of alternative aniline-based fluorophores [8], with higher performances in terms of water solubility, cell permeability, (bio)conjugation ability (for further functionalization) and/or spectral properties (especially, high brightness and optimum excitation/emission wavelengths to min-

imize spectral interferences inherent to sample/medium to be analyzed). Among the various fluorogenic core structures explored, great attention has been paid to rhodamine 110 analogs for which the size of π -conjugated system was expanded or the bridging oxygen atom was replaced by a group 14 element (*i.e.*, C, Si or Ge) [9,10–13]. Less common hybrid structures having a dimethine bridge between an aniline and a second chromophore unit, have also been explored to rapidly access to near-infrared (NIR) fluorogenic dyes for more challenging biosensing/bioimaging applications, especially *in vivo* [14–17] (Fig. 1).

Surprisingly, none of these studies concerned the most structurally simple xanthene dyes known: pyronins and succineins whereas these diphenylmethane derivatives exhibit remarkable optical properties in the green-yellow spectral range [18]. Despite the reactivity of their *meso*-position towards nucleophiles, that may be problematic for some applications in complex biological media, there is a renewed interest for this class of fluorescent anilines. Indeed, the amino-group protection-deprotection strategy can be easily applied to give valuable activatable (or “smart”) fluorescent probes. Furthermore, *in situ* formation of the electronic push–pull conjugated backbone of pyronin dyes, from a non-fluorophore caged precursor and *via* a cascade reaction triggered by the analyte to be detected, has been recently demonstrated by the Yang group and us. This enabled the emergence of “covalent-assembly” type probes whose potential utility and superior performances in terms of detection sensitivity were highlighted through

* Corresponding author at: ICMUB, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21078 Dijon Cedex, France.

E-mail address: anthony.romieu@u-bourgogne.fr (A. Romieu).

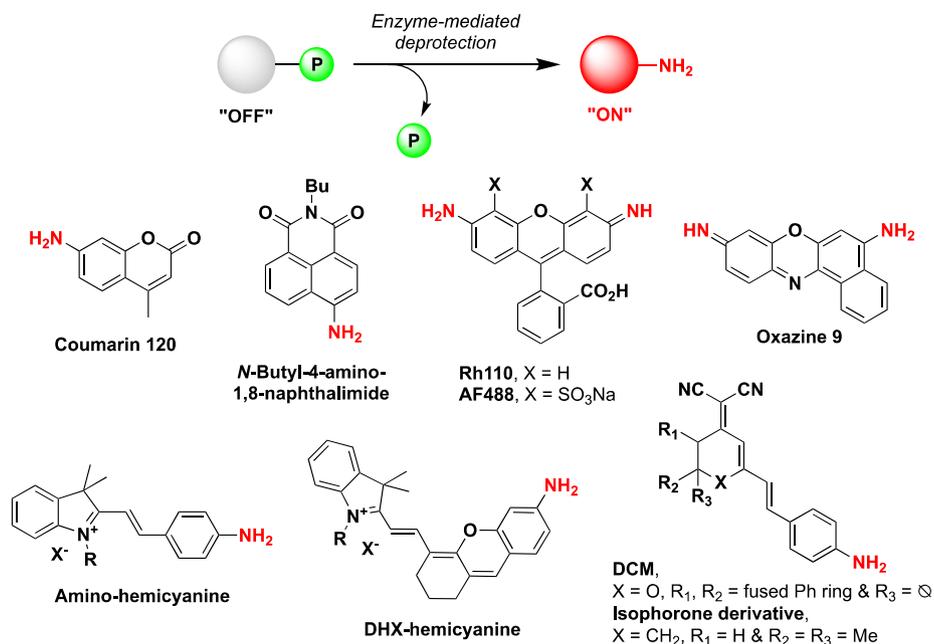


Figure 1. (Top) Principle of the amino group protection-deprotection strategy applied to "OFF-ON" fluorogenic detection of enzyme activity; (middle) structures of fluorescent anilines used in the design of conventional fluorogenic enzyme substrates (Rh110 = rhodamine 110, AF488 = Alexa Fluor® 488); (bottom) aniline-based fluorophores specifically developed for biosensing/bioimaging applications in living cells or *in vivo* (DHX = dihydroxanthene, DCM = dicyanomethylene-4H-pyran chromophore).

the sensing of several analytes including Sarin nerve agent mimics [19], Hg(II) cations [20] and amidases/proteases (*i.e.*, penicillin G acylase (PGA) and leucine aminopeptidase (LAP)) [21].

In this context, we strongly believe that the chemistry of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine **1** (Fig. 2), the only fluorogenic pyronin known to date [22], is worthwhile exploring to identify novel aniline-based fluorophores with valuable properties. We have thus revisited the synthesis of **1** and here we report for the first time its spectroscopic and photophysical characterizations. The preparation and spectral features of its silicon analog (Si-pyronin **2**) are also described for the first time [23,24]. The ability of these two anilines to act as effective optical reporters in fluorogenic enzyme substrates has been finally assessed through the preparation and *in vitro* validation of PGA-activated fluorescent probes.

Results and discussion

Synthesis of pyronin **1** and its silicon analog **2**

To date, the synthesis of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine **1**, through a conventional acid-catalyzed condensation between two molecules of 3-aminophenol and formaldehyde followed by spontaneous aromatization, has been described in only one publication written in German [22] (Scheme 1). The work-up of the reaction mixture was not trivial, time-consuming and involved liquid-liquid extractions with butanol, two size-exclusion chro-

matography over a Sephadex LH-20 column and a counter-ion exchange process to obtain **1** as a perchlorate salt. Furthermore, the sole reported characterization data was curiously a UV-vis absorption spectrum recorded in phosphate buffer (PB, 10 mM, pH 7.0).

In this context, we revisited the purification protocol of this polar fluorophore with a view both to simplify it and to rapidly obtain a highly pure sample for spectroscopic characterization and photophysical studies. Butanol was replaced by the more conventional and less expensive solvent mixture CHCl₃-iPrOH (3:1, v/v) [25], and the crude pyronin was easily purified by semi-preparative RP-HPLC using a conventional liquid mobile phase (*i.e.*, step gradient of CH₃CN in aq. TFA 0.1%, pH 1.9). From 1.11 g of cheap starting material 3-aminophenol, it was possible to recover 80 mg of **1** after only two independent HPLC purification runs (overall duration per run = 60 min). This aniline-based fluorophore was fully characterized by IR, ¹H, ¹³C and ¹⁹F NMR and ESI mass spectrometry (see Figs. S4–S9) and all these spectroscopic data were in agreement with the structure assigned. Its high purity (>95%) was confirmed by RP-HPLC analysis and the mass percentage of TFA (31%, ca. 1 TFA per molecule of fluorophore) in freeze-dried sample was determined by ion chromatography [26].

The synthetic route devised to obtain the silicon analog of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (Si-pyronin **2**) through the formal substitution O → SiMe₂ in the pyronin core structure is depicted in Scheme 2. The key step in the preparation of Si-xanthen dyes (*e.g.*, TMDHS and silicon analogs of some pyronin/rosamine derivatives) is the silylation/cyclization process involving the dilithium reagent generated from **4** by halogen-metal exchange and SiMe₂Cl₂ [12,24,27,28]. Contrary to silicon-containing dyes previously published, the lack of alkyl substituents in both amino groups necessarily implies the temporary protection of primary anilines. By analogy with the synthetic routes towards silicon-fluorescein and sulfone-rosamine, respectively published by the Hanaoka group [29] and us [26], the allyl moiety was used as protecting group (both to remove NH "acidic" protons and to enhance solubility of intermediates in organic solvents) that is stable under a variety

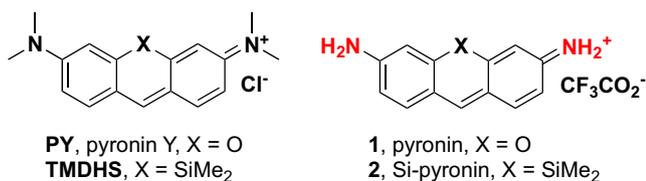
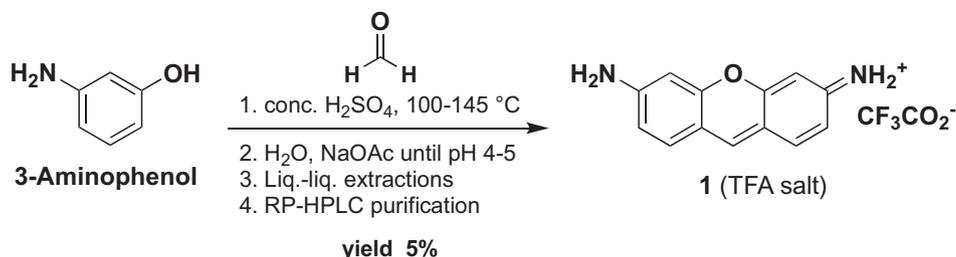
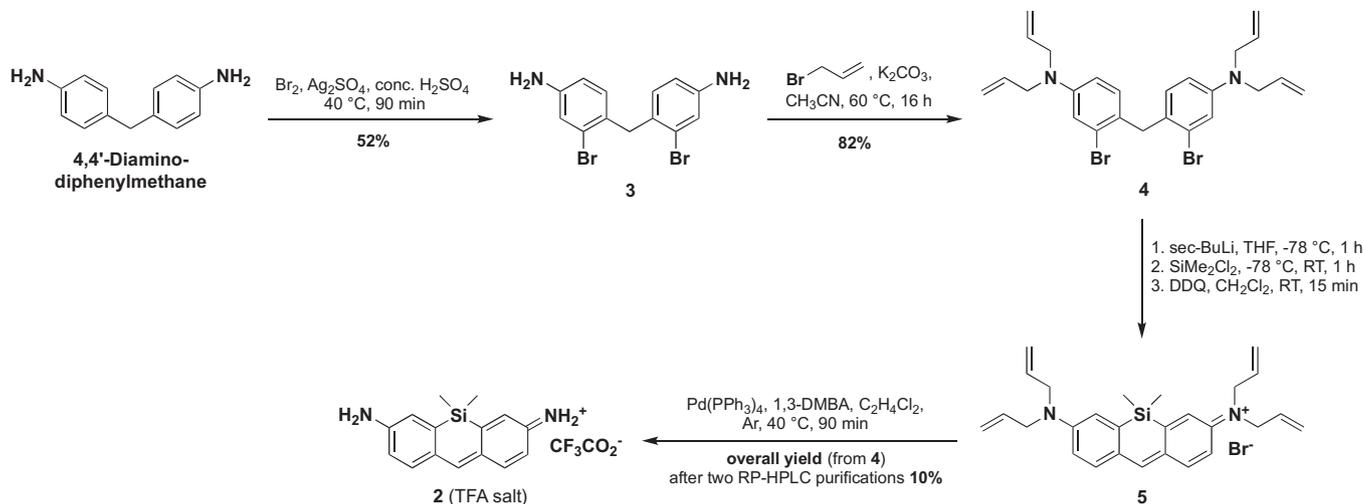


Figure 2. Structures of already known (hetero)pyronins and fluorogenic analogs studied in this work.

Scheme 1. Synthesis of fluorogenic pyronin **1** (purification protocol revisited).Scheme 2. Synthesis of fluorogenic Si-pyronin **2** (DDQ = 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, 1,3-DMBA = 1,3-dimethylbarbituric acid).

of conditions (especially in the presence of RLi/ArLi) and easily removed by Pd(0)-catalysis under mild and neutral conditions.

Thus, the preparation of Si-pyronin **2** began with *meta*-bis-bromination of 4,4'-diaminodiphenylmethane. This $S_E\text{Ar}$ reaction was performed using bromine and Ag_2SO_4 in concentrated H_2SO_4 at 40°C for 1 h [30], and purification by automated flash-column chromatography over $25\ \mu\text{m}$ silica gel was effective to perform challenging separation between **3** and its undesired regioisomers. N,N' -Tetraalkylation of **3** was achieved with an excess of allyl bromide (5.1 equiv.) and anhydrous K_2CO_3 (4 equiv.) in dry CH_3CN at 60°C . Purification by conventional column chromatography over silica gel provided the key synthetic intermediate **4** in a good 82% yield. Next, halogen-metal exchange reaction with *sec*-BuLi (2.5 equiv.) in dry THF at -78°C , generated the 2,2'-methylenebis (aryllithium) species, on which the subsequent reaction with

SiMe_2Cl_2 (1.8 equiv.) and finally DDQ-mediated oxidation in $\text{CH}_2\text{-Cl}_2$, afforded the blue-colored N,N,N',N' -tetraallyl-Si-pyronin **5**. Our first attempts to isolate this dye in a pure form by column chromatography over silica gel failed because a disproportionation reaction was occurred in the presence of air to give a mixture of **5** and its reduced and keto forms (Figs. S24 and S25). Consequently, it became more relevant to do only washings with aq. NaHCO_3 in order to remove reduced hydroquinone form of DDQ and to subject directly the crude **5** to Tsuji-Trost deallylation conditions. Thus, this final deprotection step was readily achieved by treatment with a cat. amount of $\text{Pd(PPh}_3)_4$ and a large excess of 1,3-dimethylbarbituric acid (4.4 equiv) in degassed $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ at 40°C . Purification by semi-preparative HPLC afforded pure Si-pyronin **2** as a TFA salt (mass percentage of TFA in freeze-dried sample = 33.5%, determined by ion chromatography, ca. 1 TFA per molecule of fluo-

Table 1

Photophysical properties of fluorophores and PGA-sensitive probes studied in this work, determined at 25°C .

| Cmpd | Solvent | λ_{max} Abs (nm) ^a | λ_{max} Em (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) | Φ_{F} (%) ^{b,c} |
|---------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | PBS | 496 | 514 | 81 400 | 92 |
| TMDHS ^d | H_2O | 634 | 653 | 64 200 | 18 |
| 2 | aq. FA 0.1% ^e | 580 | 597 | 42 200 | 89 |
| 2 | NaOAc | 580 | 597 | 47 900 | 89 |
| 7 | PB | 238 | - ^f | 23 000 | - ^f |
| 9 | PB | 267 | - ^f | 22 650 | - ^f |
| 9 | NaOAc | 265 | - ^f | 28 600 | - ^f |

^a Further bands with maxima within the UV spectral range are also observed in spectra of **1** (241, 260, 280 and 320 nm) and **2** (290 and 308 nm).

^b Determined using fluorescein as a standard ($\Phi_{\text{F}} = 95\%$ in 0.1 M NaOH, Ex at 450 nm) for **1** and SR101 as a standard ($\Phi_{\text{F}} = 95\%$ in EtOH, Ex at 545 nm) for **2** [31].

^c Absolute fluorescence quantum yield was also determined using an integration sphere (45% in PBS for **1** and 56% in CH_3CN for **2**, see Supplementary data for details).

^d Values determined and reported by Fu et al [27].

^e 0.1% aqueous formic acid (pH 2.5).

^f Non-fluorescent.

rophore) and in a moderate yet not optimized overall yield (10%) from **4**. The structure was proven by NMR (^1H , ^{13}C , ^{19}F and ^{29}Si) and ESI mass analyses (see Supplementary data and Figs. S26–S33) and the high level of purity (>99% whatever the wavelength used for the UV-vis detection) was confirmed by RP-HPLC-based analytical control (see Supplementary data and Figs. S33 and S34).

Stability and photophysical characterization of pyronin **1** and its silicon analog **2**

Since the bioanalytical applications envisioned for these fluorogenic dyes generally involve to work under physiological condi-

tions, the photophysical properties of these two compounds were primarily determined in phosphate buffered saline (PBS, 100 mM + 150 mM NaCl, pH 7.4). However, the poor stability of Si-pyronin **2** under these simulated physiological conditions (*vide infra*) pushed us to consider acidic buffers as the aq. solvents for the photophysical characterization of this hetero-xanthene dye (see Table 1 for absorption/emission properties and Fig. 3 for the corresponding spectra).

Pyronin **1** exhibits spectral features in the green region, quite similar to popular fluorophores namely fluorescein and Alexa Fluor[®] 488. The perfect matching between the absorption and excitation spectra (Fig. 3A) confirms the lack of non-fluorescent H-type aggregates in neutral aqueous solutions. This may be credited to the small compact size and hydrophilic character of this xanthene dye. The same photophysical study has been considered with the silicon analog **2** but we found that this compound is unstable in aq. physiological conditions due to the marked electrophilicity of its *meso*-position (*i.e.*, C-9 position of xanthene scaffold) and hence its propensity to undergo nucleophilic attack by a water molecule or a hydroxide anion. Indeed, despite lower electronegativity of Si atom compared to O atom (1.9 against 3.5 in Linus Pauling's scale), the lack of electron-donating ability through +M effect seems to be critical in this regard. The same poor hydrolytic stability was also evidenced in PB and ultrapure water, by the rapid discoloration of initially pink solutions visible to the naked eye. To establish the pH range at which Si-pyronin **2** is fully stable and thus selecting the appropriate aq. medium for photophysical measurements, its spectral behavior was studied over the pH range 3.5–9.5 through incubation in various buffers (NaOAc, PB and borate, for 15 min at 23 °C) and subsequent absorbance measurement at 580 nm. By drawing a pH-dependent absorption curve (Fig. 4), we were able to determine the pK value of the corresponding hydration equilibrium between Si-pyronin **2** and Si-xanthidrol **6** (pK = 6.5). Furthermore, this curve clearly shows that the hydrolytic stability of **2** is optimal at pH < 5. It is worth stating that pyronin **1** was found to be full-stable within the same pH range (see Supplementary data and Fig. S3), supporting our hypothesis about the electrophilic character of *meso*-position weakened by +M effect of O-10 atom (*vide supra*).

We decided to investigate the photophysical properties of **2** in NaOAc buffer (100 mM, pH 4.8). **2** shows strong and sharp absorption (full-width half maximum, FWHM, $\Delta\lambda_{1/2 \text{ max}} = 40 \text{ nm}$) and emission bands in the orange-red region of the spectrum (see Fig. 3B). The absorption maximum is centered at 580 nm, with a

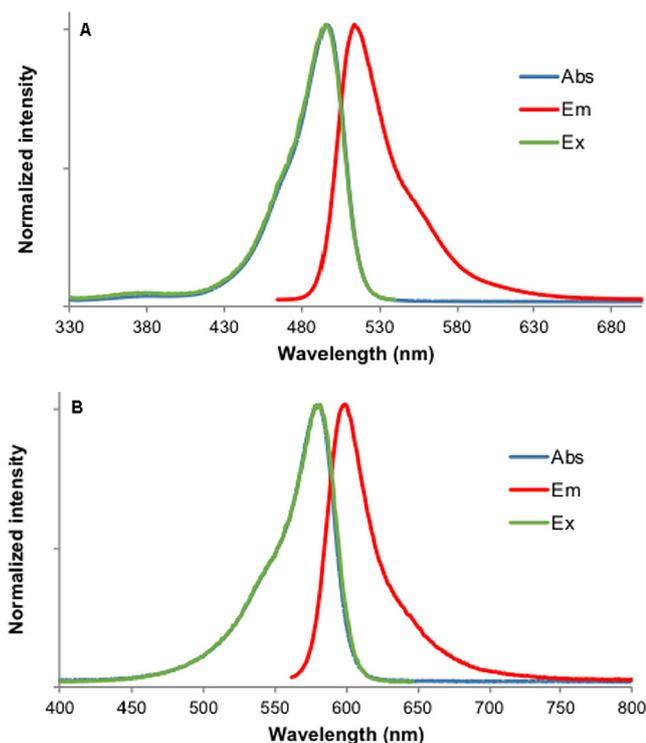


Figure 3. Normalized absorption (blue), excitation (Em 550 or 660 nm, slit 5 nm, green) and emission (Ex 450 or 545 nm, slit 5 nm, red) spectra of pyronin **1** in PBS (pH 7.4) (A) and Si-pyronin **2** in NaOAc buffer (pH 4.8) (B) at 25 °C.

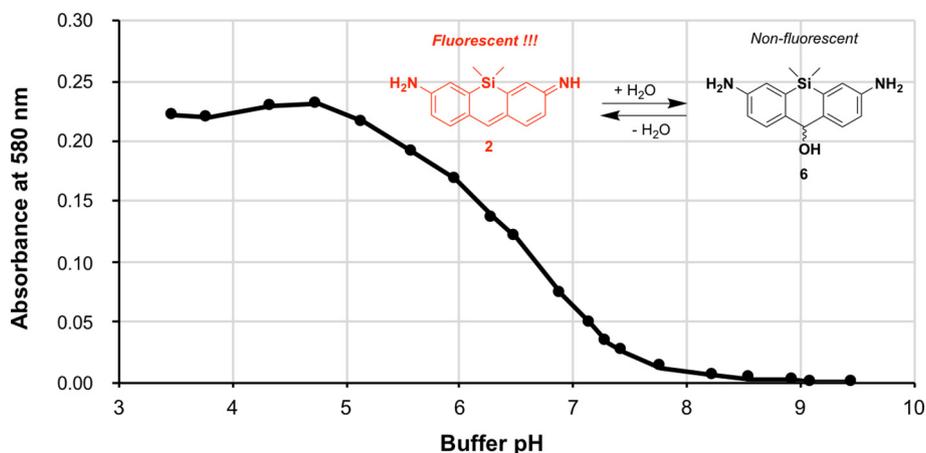


Figure 4. pH-Dependent maximum absorbance (580 nm) curve for Si-pyronin **2** (concentration: 4.5 μM in the corresponding buffer, 15 min of incubation before absorbance measurement).

85 nm bathochromic shift compared with pyronin **1**. Molar extinction coefficient ($\epsilon = 47\,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) is of the same order of magnitude as that of silicon analog of pyronin Y (TMDHS, $\epsilon = 64\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ in water) [27]. The emission band peaked at 595 nm is very narrow (25 nm FWHM) and the value of relative fluorescence quantum yield ($\Phi_F = 89\%$) is really impressive and equivalent to that of larger fluorophores exhibiting the same spectral features (e.g., sulforhodamine 101, SR101, MW = 606.7, Abs/Em 575/595 nm, $\Phi_F = 95\%$ in EtOH). As observed for pyronin **1**, the absorption and excitation spectra are perfectly superimposable (Fig. 3B), suggesting the presence of a single absorbing species in solution, and the lack of equilibrium between Si-xanthene and Si-xanthidrol forms in NaOAc buffer.

In order to complement our study devoted to these two unusual fluorescent anilines, it was essential to demonstrate their fluorogenic behavior through the reversible masking of their primary amino groups, in the context of fluorescence “turn-on” detection of analytes.

Fluorogenic reactivity of pyronin **1** and its silicon analog **2**. Synthesis and *in vitro* validation of PGA-sensitive probes **7** and **9**

To achieve this goal, we explored the synthesis of two unusual PGA substrates in which the green/orange-red fluorescence of pyronin/Si-pyronin reporter is unveiled through two distinct and sequential events: enzymatic hydrolysis of phenylacetamide moieties and 1,6-elimination process promoted by the released phenologous amine. PGA (also known as penicillin amidase, EC 3.5.1.11) was chosen as model protease because this hydrolytic enzyme has two clear advantages: (1) a structurally simple substrate (phenylacetamide) than can be easily installed on a wide range of fluorescent anilines through amidification of their primary amino group (s) and (2) a commercial availability at low cost [32].

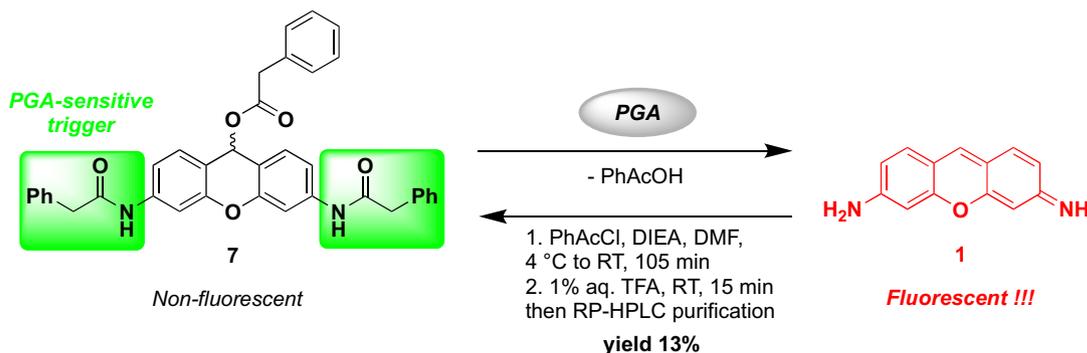
Bis-amidation of **1** and **2** was achieved by treatment with an excess of phenylacetyl chloride (PhAcCl, 17 equiv.) and DIEA (4–4.5 equiv.) in dry DMF (Schemes 3 and 4). We intentionally used a large excess of acyl chloride in order to promote the introduction of phenylacetoxo (PhAcO-) moiety onto the *meso*-position. Indeed, once complete, the reaction was quenched by adding aq. TFA 1% to produce a significant amount of phenylacetic acid (PhAcOH) that may be able to displace chloride or other leaving groups onto the C-9 position of the (hetero)xanthene scaffold. In the case of pyronin **1**, these conditions led to the desired fluorogenic PGA substrate **7** as the major product. After isolation by semi-preparative RP-HPLC, the structure of **7** was confirmed by NMR and ESI mass analyses (see Supplementary data, Figs. S35–S37).

Conversely, when Si-pyronin **2** was subjected to the same acylation conditions, the expected PGA-sensitive probe **8** was only

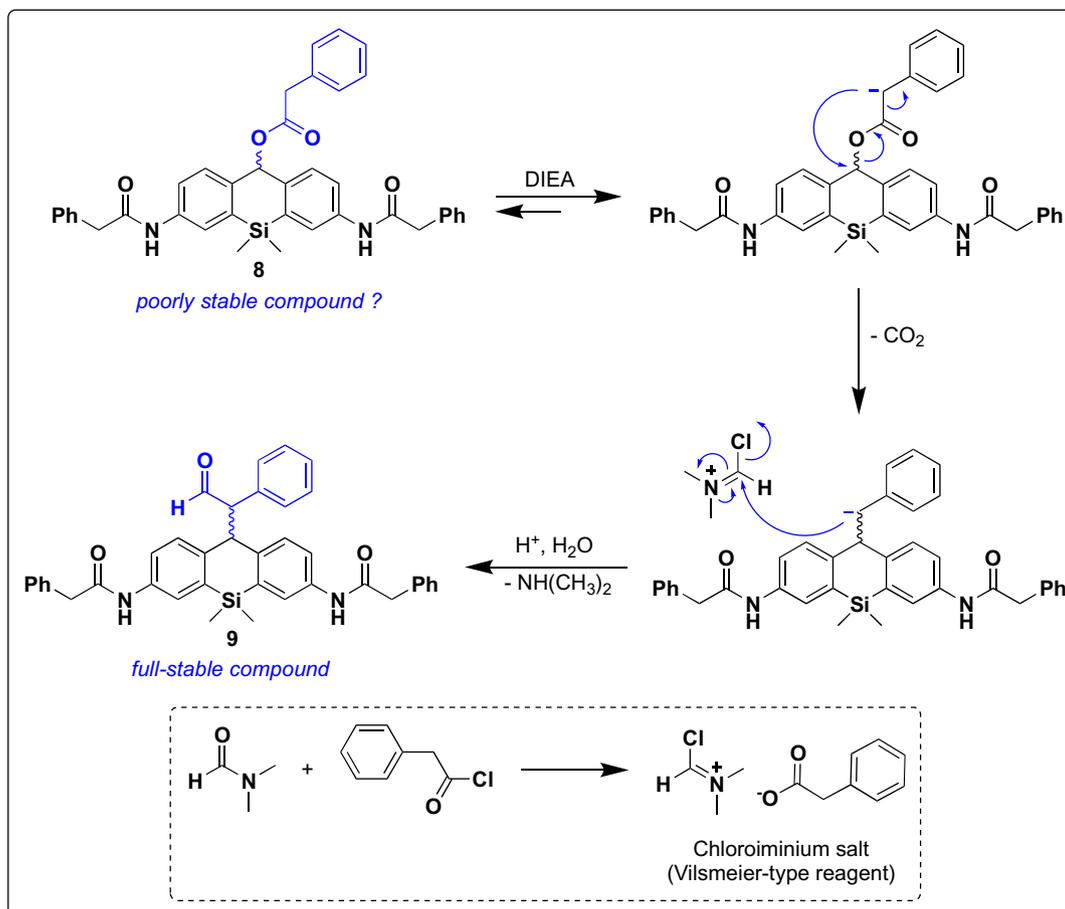
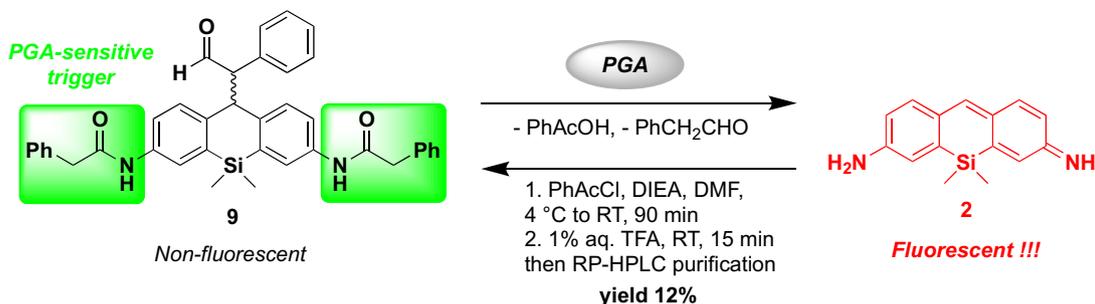
formed as a minor product. Surprisingly, the major compound isolated by semi-preparative RP-HPLC was identified as the α -phenyl 9-Si-pyronin-acetaldehyde derivative **9** (see Supplementary data for NMR and ESI mass analyses, Figs. S41–S43). The proposed mechanism to explain the conversion of **8** into **9**, via a Vilsmeier-type reaction is shown in Scheme 4. Once again, the unexpected reactivity of phenylacetoxo ester **8** in line with its poor stability in aq. buffers (see Supplementary data), can be explained by the fact that the electropositivity of the intracyclic Si atom cannot fully compensate the electrophilicity of the C-9 position.

As expected, the two probes **7** and **9** exhibit absorption only in the UV range (220–370 nm, Figs. S40 and S46) and are non-fluorescent in both acetate and phosphate buffers (pH 4.8 and 7.4 respectively). Their sensing response to commercial PGA (from *Escherichia coli*) was studied by time-dependent fluorescence analyses. The resulting kinetic curves are shown in Fig. 5 for **9** (see Fig. S51 for the curves obtained with **7**). When the enzymatic activation was performed at pH 4.8 (pH where the released Si-pyronin is full-stable but not optimal for stability and activity of PGA), a significant and gradual increase of orange-red fluorescence of Si-pyronin (Ex/Em 580/595 nm) was observed (Fig. 5). A plateau indicating the complete hydrolysis of **9** by PGA and subsequent aromatization of the intermediate through 1,6-elimination process (the rate-limiting step of probe activation) was reached only after a lengthy incubation time (>6 h).

However, after 15 h (overnight incubation), a dramatic 2600-fold increase in fluorescence was obtained (Fig. S53). Furthermore, no fluorescence signal changes were observed in the absence of amidase, confirming the full stability of the probe **9** in acetate buffer. Interestingly, the same fluorescence-based *in vitro* assay conducted in PB (pH 7.4) provided a lower but significant “OFF-ON” response (a 9-fold decrease compared to enzyme activation in NaOAc buffer, Fig. S54) whereas Si-pyronin **2** is assumed to be unstable under these simulated physiological conditions. A stabilization/protective effect of the local environment of enzyme in contact with **2** could be advanced to explain this unexpected but positive result. Further experiments are currently in progress to clarify the behavior of fluorescent Si-pyronin **2** in complex biological media. Finally, the presence of Si-pyronin dye **2** in the enzymatic reaction mixtures was unambiguously confirmed by RP-HPLC analyses (fluorescence detection, $t_R = 3.5$ min) and compared with an authentic sample of synthetic Si-pyronin **2** used as reference (Figs. S56 and S57). The same methodology was used to identify the fluorescent species (pyronin **1**) found in enzymatic reaction mixtures related to activation of probe **7** with PGA (Fig. S55). All these results demonstrate the potential utility of O-/Si-pyronin dyes bearing two primary anilines, as fluorogenic labels in enzyme-activatable molecular probes.



Scheme 3. Synthesis of PGA-sensitive probe **7** and its enzymatic activation.



Scheme 4. (Top) Synthesis of PGA-sensitive probe **9** and its enzymatic activation; (bottom) proposed mechanism to explain the conversion of **8** into **9**.

Conclusion

To the best of our knowledge, the present work is the first comprehensive survey devoted to the synthesis and characterizations of the most structurally simple fluorogenic xantheno dyes known to date. These fluorophores namely 3-imino-3*H*-xantheno-6-amine **1** and its silicon analog Si-pyronein **2** exhibit outstanding spectral properties in aq. solution, and dramatic bathochromic shift as a result of the substitution of the pyronin oxygen bridge atom by silicon enables to cover a wide spectral range from green to red (ca. 450–650 nm) while keeping a small compact size and a marked hydrophilic character. A study of the hydrolytic stability of Si-pyronein **2** has outlined the pH range (pH < 5) of aq. media wherein this orange-red emitter is actually usable. The availability of two primary anilines within the (hetero)xantheno core structure of these dyes gives them a unique fluorogenic reactivity and to place them high in the list of fluorophores applicable to the design of reaction-

based small-molecule probes for analyte sensing/bioimaging. Since the reactivity of the *meso*-position can be finely tuned by the heteroatom-substitution approach (O → SiMe₂), the nucleophilic displacement of the C-9 substituent of fluorogenic enzyme substrates related to **8**, may be an entrance gate towards “smart” theranostic drug delivery agents that provide a cytotoxic chemotherapeutic response while facilitating fluorescence imaging of cancer cells [33].

Acknowledgments

This work is supported by the CNRS, Université de Bourgogne and Conseil Régional de Bourgogne through the “Plan d’Actions Régional pour l’Innovation (PARI) and the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” programs. G. D. gratefully acknowledges the Burgundy Franche-Comté region for his Ph. D. grant and bioMerieux company (R&D Microbiology) as industrial sponsor. Financial support from Institut Universitaire de France

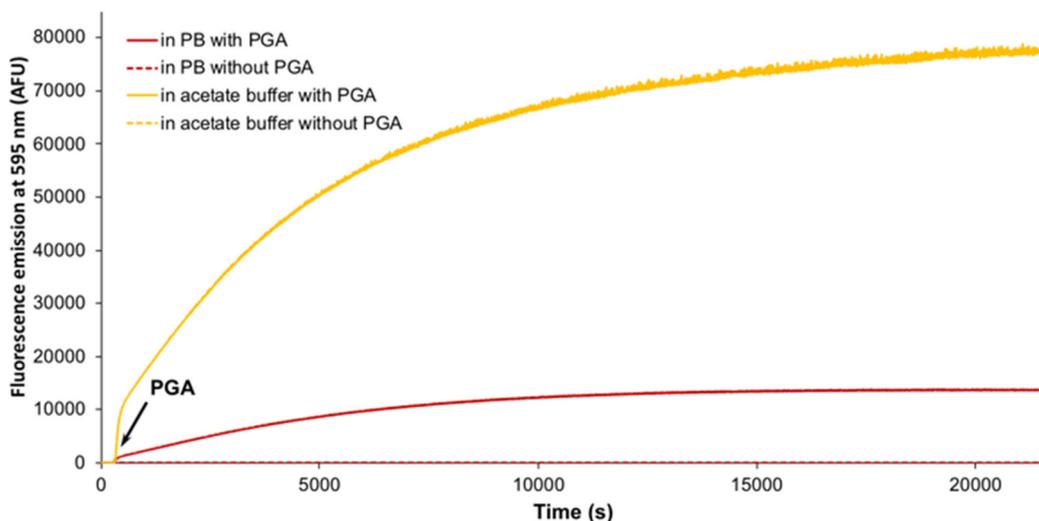


Figure 5. Time-dependent changes in the orange-red fluorescence intensity (Ex/Em 580/595 nm, slit = 5 nm) of fluorogenic probe **9** (concentration: 1 μ M) in the presence of PGA (1 U) at 37 $^{\circ}$ C. Please note: PGA was added after 5 min of incubation of probe in buffer alone.

(IUF, 2013–2018), the Burgundy region ("FABER" programme, PARI Action 6, SSTIC 6 "Imagerie, instrumentation, chimie et applications biomédicales") and GDR CNRS "Agents d'Imagerie Moléculaire" (AIM) 2037 are also greatly acknowledged. The authors thank the "Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université Bourgogne" (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) for access to spectroscopy instrumentation. COBRA lab (UMR CNRS 6014) and Iris Biotech company are warmly thanked for the generous gift of some chemical reagents used in this work. The authors also thank Dr. Sylvain Debieu for preliminary research about fluorogenic pyronin dyes, Dr. Myriam Laly (University of Burgundy, PACSMUB) for the determination of TFA content in samples purified by RP-HPLC, Dr. Ewen Bodio (University of Burgundy, ICMUB, UMR CNRS 6302, OCS team) for access to SAFAS Xenius XC spectrofluorimeter (equipped with an integrating sphere) and Dr. Jean-Franck Bussotti / M. Olivier Chaudon (SAFAS Monaco company) for their precious advice regarding the determination of absolute fluorescence quantum yields.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data (all synthetic procedures, spectroscopic and photophysical characterizations of fluorophores and PGA-sensitive probes, stability studies, *in vitro* fluorescence assays and HPLC-fluorescence analyses described in this work) associated with this article can be found, in the online version: Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.11.031>.

References

- For selected reviews, see:
 - X. Chen, M. Sun, H. Ma, *Curr. Org. Chem.* 10 (2006) 477–489;
 - C.R. Drake, D.C. Miller, E.F. Jones, *Curr. Org. Synth.* 8 (2011) 498–520;
 - J. Chan, S.C. Dodani, C.J. Chang, *Nat. Chem.* 4 (2012) 973–984;
 - J.B. Grimm, L.M. Heckman, L.D. Lavis, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 113 (2013) 1–34;
 - W. Chyan, R.T. Raines, *ACS Chem. Biol.* 13 (2018) 1810–1823;
 - H.-W. Liu, L. Chen, C. Xu, Z. Li, H. Zhang, X.-B. Zhang, W. Tan, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 7140–7180;
 - K. Singh, A.M. Rotaru, A.A. Beharry, *ACS Chem. Biol.* 13 (2018) 1785–1798.
- M. Beija, C.A.M. Afonso, J.M.G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2410–2433.
- Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 5003–5015.
- For selected examples, see:
 - C.J.F. Van Noorden, E. Boonacker, E.R. Bissell, A.J. Meijer, J. van Marle, R.E. Smith, *Anal. Biochem.* 252 (1997) 71–77;
 - Y. Hu, H. Li, W. Shi, H. Ma, *Anal. Chem.* 89 (2017) 11107–11112.
- J.K.P. Weder, K.-P. Kaiser, *J. Chromatogr. A* 698 (1995) 181–201.
- For selected examples, see:
 - W.C. Silvers, B. Prasai, D.H. Burk, M.L. Brown, R.L. McCarley, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 309–314;
 - S.U. Hettiarachchi, B. Prasai, R.L. McCarley, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 7575–7578;
 - Q. Jin, L. Feng, D.-D. Wang, Z.-R. Dai, P. Wang, L.-W. Zou, Z.-H. Liu, J.-Y. Wang, Y. Yu, G.-B. Ge, J.-N. Cui, L. Yang, *A.C.S. Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 28474–28481;
 - X. Chen, X. Ma, Y. Zhang, G. Gao, J. Liu, X. Zhang, M. Wang, S. Hou, *Anal. Chim. Acta* 1033 (2018) 193–198.
- F. Mao, W.-Y. Leung, R.P. Haugland, WO Patent (1999), 9915517;
 - N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M.K. Bhalgat, P.J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung, R.P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.* 47 (1999) 1179–1188;
 - J.E. Berlier, A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D.R. Gray, B.J. Filanoski, W.G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.-Y. Cheung, W. Chang, J.D. Hirsch, J.M. Beechem, R.P. Haugland, R.P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.* 51 (2003) 1699–1712.
- For unsymmetrical analogs of sulforhodamine 101 bearing a primary aniline, see:
 - A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Chem. – Eur. J.* 20 (2014) 8330–8337;
 - A. Chevalier, W. Piao, K. Hanaoka, T. Nagano, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Methods Appl. Fluoresc.* 3 (2015), 044004.
- J.B. Grimm, A.J. Sung, W.R. Legant, P. Hulamm, S.M. Matlosz, E. Betzig, L.D. Lavis, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 1303–1310.
- K. Kolmakov, V.N. Belov, C.A. Wurm, B. Harke, M. Leutenegger, C. Eggeling, S.W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* (2010) 3593–3610.
- For reviews about Si-xanthenes dyes and related probes, see:
 - Y. Kushida, T. Nagano, K. Hanaoka, *Analyst* 140 (2015) 685–695;
 - T. Ikeno, T. Nagano, K. Hanaoka, *Chem. – Asian J.* 12 (2017) 1435–1446.
- Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *ACS Chem. Biol.* 6 (2011) 600–608.
- For selected examples of Si-rosamines, see:
 - Y. Kushida, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai, T. Ueno, K. Yoshida, M. Uchiyama, T. Nagano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3908–3911;
 - W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano, K. Hanaoka, *Angew. Chem., Int. Ed.* 52 (2013) 13028–13032;
 - N. Shin, K. Hanaoka, W. Piao, T. Miyakawa, T. Fujisawa, S. Takeuchi, S. Takahashi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, M. Tanokura, T. Nagano, Y. Urano, *A.C.S. Chem. Biol.* 12 (2017) 558–563.
- For examples of probes based on amino-hemicyanine dye, see:
 - F. Kong, Y. Zhao, Z. Liang, X. Liu, X. Pan, D. Luan, K. Xu, B. Tang, *Anal. Chem.* 89 (2017) 688–693;
 - M. Hu, C. Yang, Y. Luo, F. Chen, F. Yang, S. Yang, H. Chen, Z. Cheng, K. Li, Y. Xie, *J. Mater. Chem. B* 6 (2018) 2413–2416.
- For examples of probes based on DHX-hemicyanine hybrids, see:
 - X. Xie, X.E. Yang, T. Wu, Y. Li, M. Li, Q. Tan, X. Wang, B. Tang, *Anal. Chem.* 88 (2016) 8019–8025;
 - X. He, Y. Hu, W. Shi, X. Li, H. Ma, *Chem. Commun.* 53 (2017) 9438–9441;
 - L. Li, W. Shi, X. Wu, X. Li, H. Ma, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6771–

- 6777;
d) J. Xing, Q. Gong, R. Zou, Z. Li, Y. Xia, Z. Yu, Y. Ye, L. Xiang, A. Wu, J. Mater. Chem. B 6 (2018) 1449–1451.
- [16] For examples of probes based on DCM scaffold, see::
a) W. Sun, J. Fan, C. Hu, J. Cao, H. Zhang, X. Xiong, J. Wang, S. Cui, S. Sun, X. Peng, Chem. Commun. 49 (2013) 3890–3892;
b) Y. Zheng, M. Zhao, Q. Qiao, H. Liu, H. Lang, Z. Xu, Dyes Pigm. 98 (2013) 367–371;
c) J. Fan, W. Sun, Z. Wang, X. Peng, Y. Li, J. Cao, Chem. Commun. 50 (2014) 9573–9576;
d) X. Wu, X. Sun, Z. Guo, J. Tang, Y. Shen, T.D. James, H. Tian, W. Zhu, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 3579–3588;
e) D. Yu, F. Huang, S. Ding, G. Feng, Anal. Chem. 86 (2014) 8835–8841;
f) S. Cao, Z. Pei, Y. Xu, Y. Pei, Chem. Mater. 28 (2016) 4501–4506;
g) K. Gu, Y. Liu, Z. Guo, C. Lian, C. Yan, P. Shi, H. Tian, W.-H. Zhu, A.C.S. Appl. Mater. Interfaces 8 (2016) 26622–26629;
h) L. Cui, Y. Shi, S. Zhang, L. Yan, H. Zhang, Z. Tian, Y. Gu, T. Guo, J. Huang, Dyes Pigm. 139 (2017) 587–592;
i) W. Feng, M. Li, Y. Sun, G. Feng, Anal. Chem. 89 (2017) 6106–6112;
j) Y. Kong, J. Smith, K. Li, J. Cui, J. Han, S. Hou, M.L. Brown, Bioorg. Med. Chem. 25 (2017) 2226–2233;
k) P. Liu, B. Li, C. Zhan, F. Zeng, S. Wu, J. Mater. Chem. B 5 (2017) 7538–7546;
l) Y. Liu, S. Zhu, K. Gu, Z. Guo, X. Huang, M. Wang, H.M. Amin, W. Zhu, P. Shi, A. C.S. Appl. Mater. Interfaces 9 (2017) 29496–29504;
m) R.R. Nawimanage, B. Prasai, S.U. Hettiarachchi, R.L. McCarley, Anal. Chem. 89 (2017) 6886–6892;
n) L.J. O'Connor, I.N. Mistry, S.L. Collins, L.K. Folkes, G. Brown, S.J. Conway, E.M. Hammond, A.C.S. Cent. Sci. 3 (2017) 20–30;
o) Z. Wang, H. Wu, P. Liu, F. Zeng, S. Wu, Biomaterials 139 (2017) 139–150.
- [17] For examples of probes based on isophorone scaffold, see::
a) T. Liu, J. Lin, Z. Li, L. Lin, Y. Shen, H. Zhu, Y. Qian, Analyst 140 (2015) 7165–7169;
b) K. Xiang, Y. Liu, C. Li, B. Tian, T. Tong, J. Zhang, Dyes Pigm. 123 (2015) 78–84;
c) K. Xiang, Y. Liu, C. Li, B. Tian, J. Zhang, RSC Adv. 5 (2015) 52516–52521;
d) W. Zhang, F. Liu, C. Zhang, J.-G. Luo, J. Luo, W. Yu, L. Kong, Anal. Chem. 89 (2017) 12319–12326;
e) T. Liu, J. Ning, B. Wang, B. Dong, S. Li, X. Tian, Z. Yu, Y. Peng, C. Wang, X. Zhao, X. Huo, C. Sun, J. Cui, L. Feng, X. Ma, Anal. Chem. 90 (2018) 3965–3973.
- [18] a) F.H. Kasten, Stain Technol. 37 (1962) 265–275;
b) P. Wright, U.b. Staff In; John Wiley & Sons, Inc, 2014.
- [19] Z. Lei, Y. Yang, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 6594–6597.
- [20] L. Song, Z. Lei, B. Zhang, Z. Xu, Z. Li, Y. Yang, Anal. Methods 6 (2014) 7597–7600.
- [21] a) S. Debieu, A. Romieu, Org. Biomol. Chem. 15 (2017) 2575–2584;
b) S. Debieu, A. Romieu, Tetrahedron Lett. 59 (2018) 1940–1944.
- [22] W. Müller, Justus Liebigs Ann. Chem. (1974) 334–335.
- [23] Si-pyronin 2 is claimed in a patent but never synthesized: Y. Urano, M. Kamiya, A. Morozumi, S. Uno, K. Umezawa WO Patent 2016136328, 2016.
- [24] For recent examples of unsymmetrical Si-rosamines bearing a primary aniline, see::
a) K. Hanaoka, Y. Kagami, W. Piao, T. Myochin, K. Numasawa, Y. Kuriki, T. Ikeno, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, T. Nagano, Y. Urano, Chem. Commun. 54 (2018) 6939–6942;
b) R.J. Iwatate, M. Kamiya, K. Umezawa, H. Kashima, M. Nakadate, R. Kojima, Y. Urano, Bioconjugate Chem. 29 (2018) 241–244.
- [25] I.E. Valverde, A.F. Delmas, V. Aucagne, Tetrahedron 65 (2009) 7597–7602.
- [26] G. Dejouy, M. Laly, I.E. Valverde, A. Romieu, Dyes Pigm. 159 (2018) 262–274.
- [27] M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao, Y. Xu, Chem. Commun. (2008) 1780–1782.
- [28] a) T. Pastierik, P. Šebej, J. Medalová, P. Štacko, P. Klán, J. Org. Chem. 79 (2014) 3374–3382;
b) H. Nie, L. Qiao, W. Yang, B. Guo, F. Xin, J. Jing, X. Zhang, J. Mater. Chem. B 4 (2016) 4826–4831;
c) H. Zhang, J. Liu, L. Wang, M. Sun, X. Yan, J. Wang, J.-P. Guo, W. Guo, Biomaterials 158 (2018) 10–22;
d) M. Du, B. Huo, J. Liu, M. Li, A. Shen, X. Bai, Y. Lai, L. Fang, Y. Yang, J. Mater. Chem. C 6 (2018) 10472–10479.
- [29] T. Egawa, Y. Koide, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai, T. Nagano, Chem. Commun. 47 (2011) 4162–4164.
- [30] J.H. Gorvin, J. Chem. Soc. (1955) 83–89.
- [31] A.M. Brouwer, Pure Appl. Chem. 83 (2011) 2213–2228.
- [32] For instance, only 100 euros for 1000 units, see <https://www.iris-biotech.de/ez50150>.
- [33] For reviews, see::
a) R. Kumar, W.S. Shin, K. Sunwoo, W.Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya, J.S. Kim, Chem. Soc. Rev. 44 (2015) 6670–6683;
b) M.H. Lee, A. Sharma, M.J. Chang, J. Lee, S. Son, J.L. Sessler, C. Kang, J.S. Kim, Chem. Soc. Rev. 47 (2018) 28–52.

II.2.3. Conclusions et perspectives

A ce stade, nous avons pu montrer que la stabilité hydrolytique des hétéro-pyronines était améliorée *via* la substitution du groupement sulfone par un motif SiMe₂, tout en conservant un déplacement bathochrome significatif des maxima d'absorption et d'émission par rapport à la pyronine. Le motif SiMe₂ diminue donc le caractère électrophile de la position *meso*. Cependant, même si la Si-pyronine **GD81** est stable dans une gamme de pH plus étendue que la sulfone-pyronine **GD17**, la limite supérieure de pH reste inférieure au pH physiologique. Ainsi, elle peut être utilisée comme sonde pro-fluorescente conventionnelle activable par déprotection d'une ou de ses deux amines primaires mais seulement dans des milieux dont le pH <5. Au-delà de cette valeur, en raison de l'équilibre entre la forme conjuguée fluorescente et la forme Si-xanthidrol non-fluorescente, la réponse fluorogénique "Off-On" pourrait ne pas être suffisamment intense car une partie de la Si-pyronine **GD81** s'hydraterait immédiatement en solution aqueuse (Figure 31).

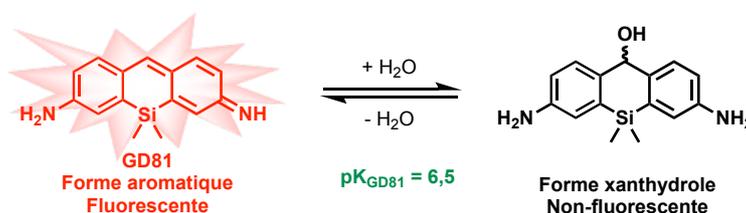


Figure 31. Équilibre d'hydratation de la Si-pyronine GD81.

Afin d'obtenir une valeur de pK^{76} supérieure à 7,5, il est donc nécessaire de "stabiliser" d'avantage la position *meso* du Si-xanthène en diminuant son caractère électrophile. Dans les travaux de Nie *et al.*, une étude de stabilité sur une gamme de pH allant de 4 à 14 montre que les Si-pyrone synthétisées sont toutes stables à pH 7 (pour un rappel des structures voir la Figure 30). Ces composés possèdent des groupements NMe₂, ce qui montre une nouvelle fois l'importance de la substitution des anilines. De plus, d'autres travaux plus récents ont également attiré notre attention. Ils concernent deux fluorophores à cœur Si-xanthène non-symétrique (*i.e.*, portant une aniline tertiaire et une aniline primaire ; cette dernière pouvant jouer le rôle d'interrupteur de fluorescence, on parle également de centre fluorogénique).

Les premiers travaux ont été publiés par le groupe de Y. Urano⁷⁷ et présentent une sonde fluorogénique de type "Off-On" pour la détection d'une activité enzymatique de type γ -glutamyltransférase (GHT), sonde nommée γ -Glu-HMJSiR. Le cœur Si-xanthène est substitué par un motif julolidine et une amine primaire protégée par un motif reconnu et hydrolysé par la GHT (Figure 32, amide de l'acide L-glutamique). La détection de l'enzyme *via* la libération du fluorophore

⁷⁶ Le pK correspond à la constante d'équilibre à partir de laquelle l'hétéro-xanthène est entièrement sous sa forme hydrolysée. Elle a été déterminée par des études de stabilité hydrolytique des composés dans différents tampons sur une large gamme de pH variable.

⁷⁷ R. J. Iwatate, M. Kamiya, K. Umezawa, H. Kashima, M. Nakadate, R. Kojima, Y. Urano, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29*, 241-244.

HMJSiR a été démontrée à la fois sur cellules vivantes (lignée SHIN3 surexprimant la GHT) puis dans le contexte *ex vivo* en utilisant des souris xéno greffées par des cellules tumorales SHIN3 (cancer de l'ovaire).

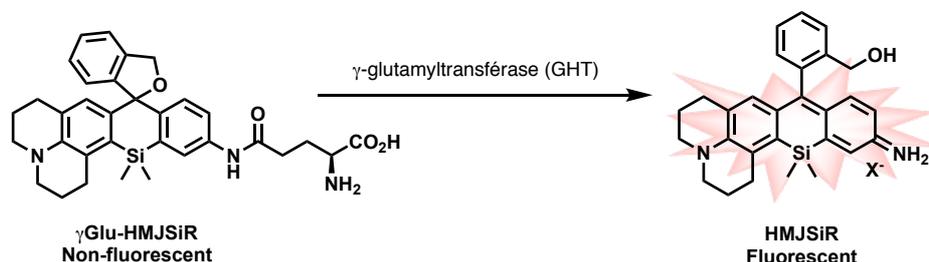


Figure 32. Sonde pro-fluorescente dérivée d'une Si-rosamine non symétrique dont la déprotection de l'amine primaire via l'hydrolyse d'un lien amide permet la détection fluorogénique "Off-On" de la GHT⁷⁷.

La continuité de ces travaux, que l'on doit également au groupe de Y. Urano associé à celui de K. Hanaoka, concerne le développement d'une nouvelle voie de synthèse de Si-rosamines non-symétriques permettant de diversifier la nature de leur aniline tertiaire⁷⁸. Après avoir étudié l'influence des différents substituants sur les propriétés spectrales, la sonde **azoSiR640**, dérivé de la Si-rosamine non-symétrique la plus performante, a été développée (Figure 33). Elle permet la détection de l'hypoxie au sein du système sanguin d'une souris, en ciblant comme biomarqueur de ce phénomène l'activité enzymatique de type AzoR. Ainsi, la bioréduction du pont diazo catalysée par cette enzyme redox conduit à la libération à l'aniline fluorescente **2,6-diMe SiR640**.

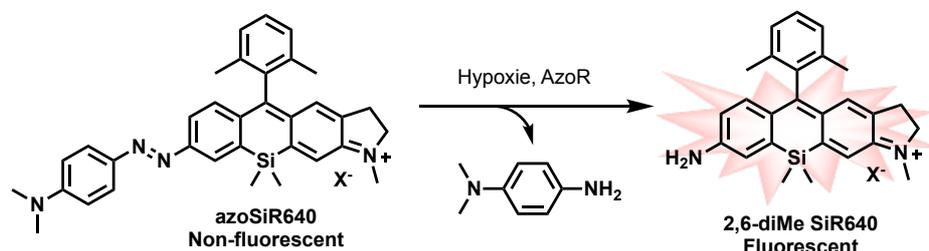


Figure 33. Sonde pro-fluorescente dérivée d'un Si-rosamine non symétrique dont la déprotection de l'amine primaire via la réduction d'un pont diazo permet la détection fluorogénique "Off-On" de l'AzoR et donc d'imager l'hypoxie ⁷⁸.

Enfin, ces travaux mettent en lumière les avantages de la désymétrisation du cœur Si-xanthène sur la modulation des longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission qui subissent un déplacement bathochrome d'environ 40 nm (Figure 34).

⁷⁸ K. Hanaoka, Y. Kagami, W. Piao, T. Myochin, K. Numasawa, Y. Kuriki, T. Ikeno, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, T. Nagano, Y. Urano, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 6939-6942.

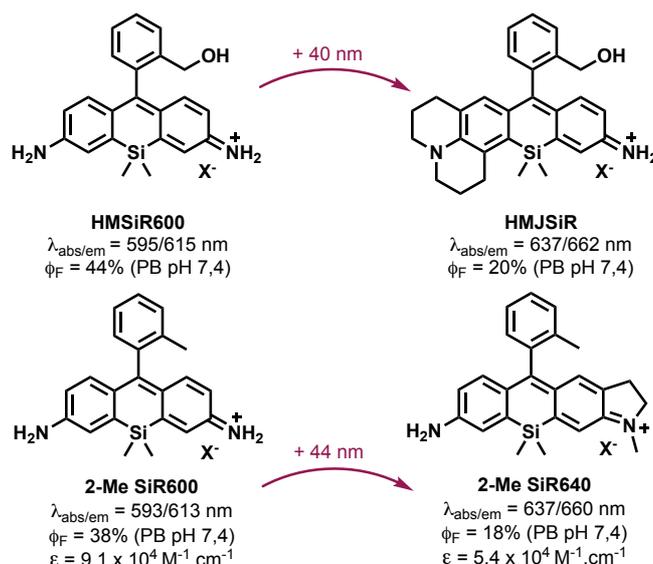


Figure 34. Structures et propriétés photophysiques des Si-rosamines non-symétriques développées par les groupes de Y. Urano et K. Hanaoka.

Ainsi, il nous est apparu pertinent d'envisager la synthèse de Si-pyronines non-symétriques, avec l'espoir de bénéficier du caractère électro-donneur des motifs *N*-méthylindoline ou julolidine (*i.e.*, aniline tertiaire de nos Si-pyronines) pour diminuer l'électrophilie de la position *meso* du cœur Si-xanthène. Un effet bénéfique sur les valeurs des maxima d'absorption et d'émission de ces dérivés par rapport à ceux de la Si-pyronine **GD81** est également attendu.

II.3. Synthèses et études physico-chimiques de Si-pyronines non-symétriques

La synthèse de la Si-pyronine non-symétrique portant un motif *N*-méthylindoline, **GD99**, ainsi que celle portant un motif julolidine, **GD192**, l'étude de leur stabilité en solution aqueuse ainsi que la caractérisation de leurs propriétés photophysiques ont fait l'objet d'une troisième publication parue en 2020 dans le journal *Dyes and Pigments*⁷⁹ (éditeur Elsevier, portail ScienceDirect.com) qui servira de support à la discussion (les molécules **GD99** et **GD192** correspondent respectivement aux molécules **4** et **5** de cet article).

II.3.1. Article 3. "Synthetic routes to novel fluorogenic pyronins and silicon analogs with far-red spectral properties and enhanced aqueous stability"

⁷⁹ G. Dejoux, K. Renault, I. E. Valverde, A. Romieu, *Dyes Pigm.*, **2020**, 108496. Un preprint de cet article est également disponible en accès libre (OA) sur le site ChemRxiv.org, voir : <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12055893.v1>



Synthetic routes to novel fluorogenic pyronins and silicon analogs with far-red spectral properties and enhanced aqueous stability

Garance Dejoux¹, Kevin Renault¹, Ibai E. Valverde, Anthony Romieu^{*}

Institut de Chimie Moléculaire de L'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, Avenue Alain Savary, 21000, Dijon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Aqueous stability
Far-red emission
Fluorogenic aniline
Julolidine
Pyronin
Si-pyronin

ABSTRACT

Fluorogenic detection of reactive (bio)analytes is often achieved with “smart” probes, whose activation mechanism causes the release of aniline-based fluorophores. Indeed, the protection-deprotection of their primary amino is the simplest way to induce dramatic and valuable changes in spectral features of the fluorogenic reporter. In this context, and due to their small size and intrinsic hydrophilicity, we focused on pyronin dyes and related heteroatom analogs (*i.e.*, formal derivatives of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine and its silicon analog) for their use as optically tunable aniline-based fluorophores. To overcome some severe limitations associated with the use of such fluorogenic scaffolds (*i.e.*, poor aqueous stability and spectral features only in the green-yellow spectral range), the synthesis of novel unsymmetrical derivatives of (Si)-pyronins bearing a single bulky tertiary aniline (*i.e.*, *N*-methylindoline and julolidine) was explored and presented in this Article. This structural alteration has been found to be beneficial to dramatically lower electrophilicity of the *meso*-position and to reach attractive fluorescence properties within the far-red spectral region.

1. Introduction

Among the various types of fluorescent molecules belonging to the xanthene family (*i.e.*, all molecules being derived from the same molecular unit, namely 9*H*-xanthene) [1], pyronin dyes occupy a unique and even paradoxical position compared to other popular subclasses such as fluoresceins [2], rhodamines [3–8], rhodols [9] and rosamines [10]. Indeed, due to their structural simplicity [11], their preparation through formal condensation between one molecule of formaldehyde and two molecules of 3-(dialkylamino)phenols [12,13], was considered shortly thereafter the discovery and synthesis of fluorescein and tetramethylrhodamine by von Bayer (*ca.* in 1871) and Ceresole (*ca.* in 1887) respectively [14]. However, for several decades, only the historic symmetrical pyronin dyes (pyronin B and pyronin Y also known as pyronin G, Fig. 1) have been practically used, especially as biological staining agents visualized by fluorescence microscopy [1,15]. In contrast to chemistry of fluoresceins and rhodamines that has been the subject of many spectacular and valuable advances [14], few efforts directed to synthesis, structural and properties optimization of pyronin-based fluorophores have been done until recently [16–19]. The current growing interest for reactivity-based fluorescent probes changes things

somewhat. Indeed, the number of chemo/biosensing or bioimaging agents using a pyronin as fluorogenic label, and rationally designed to address specific analytical or biological questions, is constantly rising, leading to new requirements in terms of spectral and physico-chemical properties for the selected photoactive unit [20–34] (Fig. 1). Among the different fluorescent probe design strategies commonly used for selective detection of (bio)analytes through chemical reactions, those based either on (1) protection-deprotection of an amino group (*i.e.*, aniline-based pro-fluorophores) [35–37] or (2) “covalent-assembly” principle [38] are readily implementable to pyronin scaffolds. Some recent examples of the literature illustrate this trend and highlight benefits in terms of sensing performances, that might arise from it [39–43] (Fig. 1).

In this context, we strongly believe that chemistry of unsymmetrical pyronin structures bearing a primary aniline (*i.e.*, an optically tunable amino group) is worthwhile exploring, both to identify novel fluorogenic scaffolds with valuable properties and to devise novel synthetic routes to high-performance pyronin fluorophores. To the best of our knowledge, only two examples of primary anilines based on pyronin scaffold have already been described in the literature (3-imino-3*H*-xanthen-6-amine and AR116, Fig. 1) [41,44]. A one-step synthesis

^{*} Corresponding author.

E-mail address: anthony.romieu@u-bourgogne.fr (A. Romieu).

¹ These authors contributed equally to this work.

through a conventional acid-catalyzed condensation reaction (*vide supra*) provides after tedious and time-consuming purification procedures these fluorophores in poor to modest yields even if our group has recently proposed a less straightforward but more effective synthetic approach towards these fluorophores [43].

Another valuable feature of pyronin scaffold is the facile modulation of its absorption and fluorescence maxima through the formal replacement of intracyclic oxygen atom by a group 14 element (*i.e.*, CMe₂ [46–48], SiMe₂ [26,45,49,50], or GeMe₂ [25,51]). This heteroatom-substitution approach is now viewed as the easiest way to obtain xanthenes analogs with spectral features in the red and/or far-red regions while keeping a small compact size, hydrophilic character and less propensity for aggregation-caused quenching (ACQ) [52] in aq. environment. Despite these benefits, our group has recently emphasized the poor aq. stability (at physiological pH) of silicon analog of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine, due to the marked electrophilicity of its *meso*-position (*i.e.*, C-9 position of xanthenes scaffold) which undergoes nucleophilic attack by a water molecule or a hydroxide anion. Indeed, despite lower electronegativity of Si atom compared to O atom (1.9 against 3.5 in Linus Pauling's scale), the lack of electron-donating ability through +M effect seems to be critical in this regard [50]. To overcome this major issue that currently prevents symmetrical hetero-pyronins to find applications in sensing and bioimaging, desymmetrization of their core structure through the introduction of a tertiary aniline moiety with enhanced electron-donating ability, deserves to be explored.

The present Article is put forward in that context. Indeed, we report the synthesis and photophysical characterizations of novel unsymmetrical pyronins **2** and **3** bearing both an optically tunable primary amino group and a tertiary aniline donor unit (Fig. 1). In addition, alternative synthetic routes have also been devised to their silicon analogs (Si-pyronins **4** and **5**, Fig. 2) finally subjected to a pH-dependent stability study aimed at identifying novel far-red fluorogenic molecules usable in

physiological conditions.

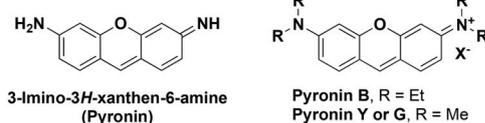
2. Experimental

See ESI pour experimental details related to photophysical characterizations and HPLC analyses/purifications.

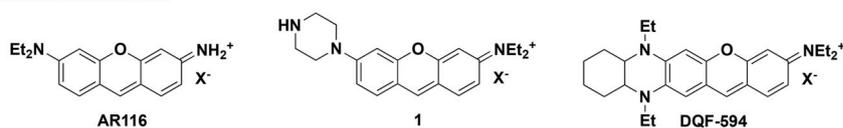
2.1. General

Unless otherwise noted, all commercially available reagents and solvents were used without further purification. TLC were carried out on Merck Millipore DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. The spots were directly visualized or through illumination with UV lamp ($\lambda = 254/365$ nm). Column chromatography purifications were performed on silica gel (40–63 μm or 63–200 μm) from VWR. Some chromatographic purifications were performed using an automated flash chromatography purification system (Interchim puriFlash® 430) with puriFlash® columns (silica gel, 25 μm). THF (HPLC-grade, Fisher Chemical) was dried over alumina cartridges immediately prior to use, by means of a solvent purification system PureSolv PS-MD-5 model from Innovative Technology. Anhydrous DMSO and 1,2-dichloroethane (DCE) were purchased from Carlo Erba and Sigma-Aldrich respectively, and stored over 3 Å molecular sieves. TFA was provided by Iris Biotech GmbH. The HPLC-gradient grade CH₃CN used for HPLC-MS analyses was obtained from Carlo Erba or VWR. Formic acid (FA, puriss p.a., ACS reagent, reagent grade, $\geq 98\%$) was provided by Sigma-Aldrich. All aq. buffers used in this work and aq. mobile-phases for HPLC were prepared using water purified with a PURELAB Ultra system from ELGA (purified to 18.2 M Ω cm). *sec*-Butyllithium (*sec*-BuLi) solution (ca. 1.3 M in cyclohexane/hexanes 92:8, v/v, Acros Organics) was titrated before using (colorimetric titration with menthol + 2,2'-bipyridine in dry THF) [53]. *N*-Methyl-5-carboxaldehyde-6-bromoindoline [1428258-90-5],

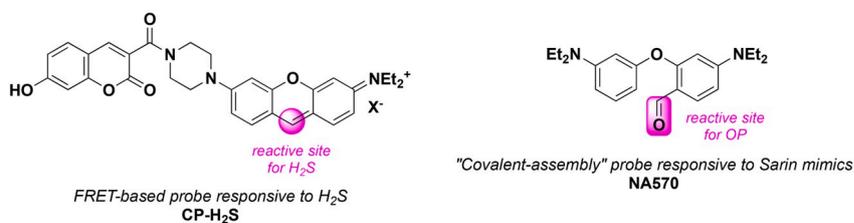
Symmetrical pyronin dyes:



Unsymmetrical pyronin dyes:



Pyronin-based activatable fluorescent probes:



Present work on unsymmetrical pyronin dyes:

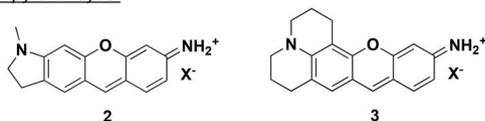


Fig. 1. Structures of the most popular pyronins and unsymmetrical derivatives reported in the literature [24,41,45]; selected examples of reaction-based fluorescent probes based either on FRET mechanism or “covalent-assembly” principle [24,39]; structures of unsymmetrical pyronin dyes studied in the present work ($X = \text{Cl}^-$ for pyronin **B** and **Y**, $X^- = \text{CF}_3\text{CO}_2^-$ for AR116, **2** and **3**, for DQF-594 and CP-H₂S, the nature of X^- was not specified by the authors).

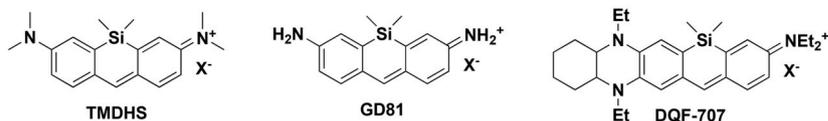
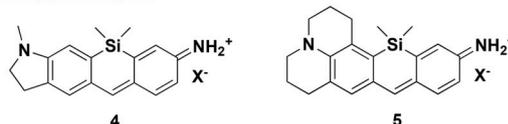
Si pyronin dyes reported in the literature:*Present work on unsymmetrical Si-pyronin dyes:*

Fig. 2. Structures of Si-pyronin dyes already reported in the literature [45,49,50]; structures of unsymmetrical Si-pyronin dyes studied in the present work ($X = Cl^-$ for TMDHS, $X^- = CF_3CO_2^-$ for GD81, 4 and 5, for DQF-707, the nature of X^- was not specified by the authors).

N-Boc-3-aminophenol [19962-06-2] and *N*-Boc-3-iodoaniline [1433 90-49-2] were prepared according to literatures procedures [43,54–56].

2.2. Instruments and methods

1H -, ^{13}C -, ^{19}F and ^{29}Si -NMR spectra were recorded either on a Bruker Avance III 400 MHz or 500 MHz or on a Bruker Avance III HD 600 MHz spectrometer (equipped with double resonance broad band probes). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non-deuterated solvent signal [57]. J values are expressed in Hz. IR spectra were recorded with a Bruker Alpha FT-IR spectrometer equipped with a universal ATR sampling accessory. The bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimeters (cm^{-1}). HPLC-MS analyses were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump + autosampler at 20 °C + column oven at 25 °C) equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS) and MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer. Purifications by semi-preparative HPLC were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (semi-preparative pump HPG-3200BX) equipped with a RS Variable Detector (VWD-3400RS, four distinct wavelengths within the range 190–800 nm). Lyophilization steps were performed with a Christ Alpha 2–4 LD plus. Ion chromatography analyses (for TFA quantification) were performed using an ion chromatograph Thermo Scientific Dionex ICS 5000 equipped with a conductivity detector CD (Thermo Scientific Dionex) and a conductivity suppressor ASRS-ultra II 4 mm (Thermo Scientific Dionex). Low-resolution mass spectra (LRMS) were recorded on a Thermo Scientific MSQ Plus single quadrupole equipped with an electrospray (ESI) source (LC-MS coupling mode).

2.3. Synthesis of unsymmetrical pyronin bearing *N*-methylindoline as donor unit

2.3.1. Mixed bis-aryl ether (7)

A mixture of *N*-Methyl-5-carboxaldehyde-6-bromoindoline (300 mg, 1.25 mmol, 1.0 equiv.), *N*-Boc-3-aminophenol (444 mg, 2.12 mmol, 1.7 equiv.), finely ground K_3PO_4 (531 mg, 2.5 mmol, 2 equiv.), CuI (24 mg, 0.125 mmol, 0.1 equiv.) and picolinic acid (31 mg, 0.25 mmol, 0.2 equiv.) in dry DMSO (3 mL) was stirred in a sealed tube at 90 °C overnight. The reaction was checked for completion by TLC (heptane-EtOAc 8:2, v/v) and diluted with EtOAc. Then, the resulting mixture was washed with deionized H_2O three times and brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-column chromatography over silica gel (eluent: step gradient of EtOAc in heptane from 10% to 30%) to obtain the compound 7 (136 mg, 0.38 mmol, yield 30%) as a yellow amorphous powder. IR (ATR, neat): ν 644, 686, 727, 772, 817, 879, 906, 941, 969, 981, 998, 1060, 1150, 1233, 1268, 1287, 1342, 1366, 1384, 1438, 1474, 1492, 1520, 1577, 1597, 1653, 1722, 2248, 2852, 2927, 2974, 3300; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10.08 (s, 1H, H-aldehyde), 7.55 (t, $J = 1.2$ Hz,

1H), 7.23 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.17–7.13 (m, 2H), 6.68 (ddd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.2$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 3.54 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 2.98 (td, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 1.49 (s, 9H, CH_3 -Boc); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 187.0, 162.8, 159.1, 158.0, 152.7, 140.1, 130.2, 125.9, 123.0, 117.1, 113.7, 113.2, 109.3, 94.9, 80.9, 55.1, 33.9, 28.4, 26.9; HPLC (system A): $t_R = 5.2$ min (purity 93% at 260 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 313.3 [$M - tBu + H$]⁺ (90), 369.2 [$M + H$]⁺ (100), 737.3 [$2M + H$]⁺ (10), calcd for $C_{21}H_{25}N_2O_4^+$ 369.2; LRMS (ESI-, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 366.8 [$M - H$]⁻ (80), 413.3 [$M + FA - H$]⁻ (100), 781.1 [$2M + FA - H$]⁻ (55), calcd for $C_{21}H_{24}N_2O_4^-$ 367.2.

2.3.2. Unsymmetrical pyronin (2)

Mixed bis-aryl ether 7 (80 mg, 0.22 mol, 1 equiv.) was dissolved in 55:45 (v/v) TFA-DCM mixture (1.25 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 h and at 55 °C for 21 h. The reaction was checked for completion by TLC (DCM-MeOH 9:1, v/v). Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-column chromatography over silica gel (eluent: step gradient of MeOH in DCM from 0% to 10%) to give 25.5 mg of the desired xanthen dye (yield 31%). A further purification was achieved by semi-preparative RP-HPLC (system B, $t_R = 29.0$ – 34.0 min) to obtain pyronin 2 with the optimal purity suitable for photophysical characterizations (>95%). TFA salt of 2 was recovered (after freeze-drying) as a red amorphous powder (10 mg, 27 μ mol, yield 12%, based on TFA mass = 34.4% determined by ionic chromatography). IR (ATR, neat): ν 610, 628, 651, 677, 716, 727, 741, 775, 798, 826, 844, 877, 931, 959, 982, 1123, 1168, 1198, 1299, 1323, 1338, 1380, 1411, 1516, 1541, 1575, 1601, 1620, 1655, 1669, 1683, 1799, 1997, 2012, 2166, 2188, 2311, 2359, 2421, 2811, 2934, 3124, 3282, 3320; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 8.36 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.91 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 3.96 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD): δ 162.9, 161.8, 160.3, 159.0, 145.4, 135.9, 134.0, 126.3, 117.4, 117.3, 114.8, 98.34, 91.6, 56.2, 33.7, 30.7, 26.8, 24.2; ^{19}F NMR (470 MHz, CD_3OD): δ -76.9 (s, 3F, CF_3 -TFA); HPLC (system A): $t_R = 3.4$ min (purity 99% at 260 nm, >99% at 450 nm and >99% at 500 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 251.3 [$M + H$]⁺ (100), calcd for $C_{16}H_{15}N_2O^+$ 251.1.

2.4. Synthesis of unsymmetrical pyronin bearing julolidine as donor unit

2.4.1. Mixed bis-aryl ether (8)

A mixture of commercial 8-hydroxyjulolidine 9-carboxaldehyde (638 mg, 2.94 mmol, 1.7 equiv.), *N*-Boc-3-iodoaniline (552 mg, 1.73 mmol, 1 equiv.), finely ground K_3PO_4 (732 mg, 3.45 mmol, 2 equiv.), CuI (33 mg, 0.17 mmol, 0.1 equiv.) and picolinic acid (43 mg, 0.35 mmol, 0.2 equiv.) in dry DMSO (4.2 mL) was heated in a sealed tube at 90 °C overnight. The reaction was checked for completion by TLC (DCM

100%) and diluted with EtOAc. Then, the resulting mixture was washed with deionized H₂O three times and brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-column chromatography over silica gel (eluent: step gradient of EtOAc in heptane from 10% to 20%) to obtain the compound **8** (247 mg, 0.63 mmol, yield 37%) as a yellow amorphous powder. IR (ATR, neat): ν 656, 685, 726, 768, 832, 860, 905, 956, 980, 1006, 1049, 1070, 1129, 1148, 1197, 1235, 1269, 1281, 1306, 1341, 1366, 1390, 1454, 1492, 1519, 1589, 1652, 1722, 2058, 2249, 2843, 2933, 2843, 3294; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.82 (s, 1H, H-aldehyde), 7.42 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.13 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.89 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.46–6.42 (m, 1H), 3.28 (dd, J = 6.6 Hz, J = 4.9 Hz, 2H), 3.23 (dd, J = 6.6 Hz, J = 4.9 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.50 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.03–1.91 (m, 2H), 1.89–1.78 (m, 2H), 1.48 (s, 9H, CH₃-Boc); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 187.5, 159.8, 154.3, 152.6, 149.4, 140.1, 130.2, 126.5, 118.3, 117.1, 112.6, 112.1, 109.4, 105.7, 80.8, 50.2, 49.8, 28.4, 27.5, 21.4, 21.1, 20.6; HPLC (system A): t_R = 5.5 min (purity 97% at 260 nm); LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 353.2 [M - tBu + H]⁺ (100), 409.4 [M + H]⁺ (60), 817.5 [2 M + H]⁺ (5), calcd for C₂₄H₂₉N₂O₄⁺ 409.2; LRMS (ESI-, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 453.3 [M + FA - H]⁻ (100), calcd for C₂₅H₂₉N₂O₆⁻ 453.2.

2.4.2. Unsymmetrical pyronin (3)

Mixed bis-aryl ether **8** (100 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 55:45 (v/v) TFA-DCM mixture (1.6 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction was checked for completion by TLC (DCM-MeOH 9:1, v/v). Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-column chromatography over silica gel (eluent: step gradient of MeOH in DCM from 0% to 10%) to give 18 mg of the desired xanthene dye (yield 17%). A further purification was achieved by semi-preparative RP-HPLC (system C, t_R = 39.0–48.0 min) to obtain pyronin **3** with the optimal purity suitable for photophysical characterizations (>95%). TFA salt of **3** was recovered (after freeze-drying) as a red amorphous powder (15.6 mg, 40 μ mol, yield 16% based on TFA mass = 34% determined by ionic chromatography). IR (ATR, neat): ν 614, 648, 715, 734, 755, 797, 823, 843, 935, 973, 1029, 1042, 1118, 1158, 1194, 1307, 1324, 1342, 1364, 1412, 1445, 1501, 1529, 1580, 1598, 1654, 1685, 2854, 2944, 3093, 3320; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.21 (s, 1H), 7.57 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.84 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.56 (t, J = 5.8 Hz, 4H), 2.91 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.03 (m, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD): δ 160.4, 159.1, 154.1, 154.0, 145.4, 134.1, 129.9, 126.2, 116.9, 115.9, 114.6, 106.40, 98.4, 52.3, 51.7, 28.3, 21.6, 20.5, 20.5; ¹⁹F NMR (470 MHz, CD₃OD): δ -76.9 (s, 3F, CF₃-TFA). HPLC (system A): t_R = 3.9 min (purity >99% at 260 nm, >99% at 450 nm and >99% at 500 nm). LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 291.3 [M + H]⁺ (100), calcd for C₁₉H₁₉N₂O⁺ 291.3.

2.5. Synthesis of unsymmetrical Si-pyronin bearing *N*-methylindoline as donor unit

2.5.1. *N,N*-diallyl Si-pyronin (14)

To a solution of bis(bromoaryl) derivative **12** (see ESI for its synthesis, 444 mg, 0.93 mmol, 1 equiv.) in dry THF (20 mL) was added slowly *sec*-BuLi (2.05 mL, 2.15 mmol, 2.3 equiv.) at -78 °C under argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred for 30 min at the same temperature and then dichlorodimethylsilane (Me₂SiCl₂, 259 μ L, 2.15 mmol, 2.3 equiv.) in dry THF (8 mL) was added slowly at 0 °C. The reaction mixture was stirred at -12 °C for 20 min and then allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. Thereafter, the reaction mixture was quenched with sat. aq. sat. NH₄Cl (10 mL) and extracted with DCM (3 \times 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in DCM (10 mL) and DDQ

(212 mg, 0.93 mmol, 1 equiv.) was added. The aromatization reaction was found to be complete within 20 min as indicated by the rapid appearance of an intense blue color, the reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A). Thereafter, the organic layer was washed with aq. NaHCO₃ (pH 7.5–8.0) (3 \times 60 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. Purification was done by automated flash-column chromatography with a silica gel cartridge (25 g, 25 μ m, eluent: step gradient of EtOAc in heptane from 50% to 100%, over 2 h) to give a mixture of the desired product **14**, Si-xanthone and a residual amount of DDQ. *Please note: to prevent complete oxidation of Si-pyronin into Si-xanthone, the crude mixture was used without further purification in the next step.* HPLC (system A): t_R = 4.7 min; LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 373.2 [M]⁺, calcd for C₂₄H₂₉N₂Si⁺ 373.2; UV-vis (recorded during RP-HPLC analysis): λ_{max} 320 and 652 nm. For Si-xanthone derivative: HPLC (system A): t_R = 4.2 min; LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 389.2 [M + H]⁺, calcd for C₂₄H₂₉N₂O⁺ 389.2; UV (recorded during RP-HPLC analysis): λ_{max} 251, 291 and 353 nm.

2.5.2. Unsymmetrical Si-pyronin (4)

Impure *N,N*-diallyl Si-pyronin **14** (133 mg) and 1,3-dimethylbarbituric acid (112 mg, 0.72 mmol, 2.3 equiv., based on 0.31 mmol of **14** assumed as a pure product) were dissolved in degassed DCE (15 mL). Catalytic amount of Pd(PPh₃)₄ (58 mg, 50 μ mol, 0.14 equiv.) was added and the resulting reaction mixture was stirred at 35 °C for 45 min. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A). Thereafter, the organic layer was washed with deionized H₂O (50 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a 1:1 mixture of 0.1% aq. TFA and CH₃CN and purified by semi-preparative RP-HPLC (system D). The product-containing fractions (t_R = 35.0–39.2 min) were lyophilized to give **4** as a bluish-purple amorphous powder (23 mg, 55 μ mol, overall yield 6% for the two steps and based on TFA mass = 31% determined by ionic chromatography). IR (ATR, neat): ν 3320, 3123 (broad), 1686, 1658, 1624, 1592, 1543, 1516, 1500, 1475, 1450, 1415, 1396, 1354, 1321, 1283, 1187, 1156 (broad), 1124, 1112, 1058, 1025, 654, 605, 828, 799, 779, 749, 718, 697, 665, 597, 501, 418, 396; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.60 (s, 1H), 7.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.14 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 6.77 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.5 Hz, 1H), 3.95 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.11 (t, J = 7.6 Hz, 2H) 0.45 (s, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN): δ 160.4, 158.3, 155.9, 153.8, 146.1, 142.8, 136.7, 135.4, 130.0, 128.6, 123.2, 116.2 (2C), 56.2, 34.5, 26.3, -1.6 (2 C, Si (CH₃)₂); ¹⁹F NMR (470 MHz, CD₃CN): δ -75.8 (s, 3F, CF₃-TFA); ²⁹Si NMR (99 MHz, CD₃CN): δ -18.1 (s, 1Si, Si(CH₃)₂). HPLC (system A): t_R = 3.8 min (purity >98% at 300 nm and >99% at 650 nm); UV-vis (recorded during the HPLC analysis): λ_{max} 313 and 629 nm; LRMS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 293.3 [M + H]⁺, calcd for C₁₈H₂₁N₂Si⁺ 293.1;

2.6. Synthesis of unsymmetrical Si-pyronin bearing julolidine as donor unit

2.6.1. *N,N*-diallyl Si-pyronin (15)

To a solution of bis(bromoaryl) derivative **13** (see ESI for its synthesis, 530 mg, 1.03 mmol, 1 equiv.) in dry THF (40 mL) was added slowly *sec*-BuLi (2.15 mL, 2.57 mmol, 2.5 equiv.) at -78 °C under argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred for 1 h at the same temperature and then Me₂SiCl₂ (337 μ L, 2.8 mmol, 2.8 equiv.) in dry THF (10 mL) was added slowly at -15 °C. The reaction mixture was stirred at -15 °C for 20 min and then allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. Thereafter, the reaction mixture was quenched with aq. sat. NH₄Cl (10 mL) and extracted with DCM (4 \times 40 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in DCM (30 mL) and DDQ (227 mg, 1.0 mmol, 0.9 equiv.) was added. The aromatization reaction was found to be complete

within 20 min as indicated by the rapid appearance of an intense blue color, the reaction was checked for completion by RP-HPLC (systeme A). Thereafter, the organic layer was washed with aq. NaHCO₃ (pH 7.5–8.0) (50 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. HPLC (system A): $t_R = 4.9$ min; LMRS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 413.3 [M]⁺, calcd for C₂₇H₃₃N₂Si⁺ 413.2; UV–vis (recorded during RP-HPLC analysis): λ_{max} 321 and 644 nm. *Please note: due to the propensity of this Si-pyronin to be rapidly oxidized to Si-xanthone, the mixture was used in the next step without further purification.*

2.6.2. Unsymmetrical Si-pyronin (5)

Impure *N,N*-diallyl Si-pyronin **15** (425 mg) and 1,3-dimethylbarbituric acid (321 mg, 2.06 mmol, 2.2 equiv., based on 0.95 mmol of **15** assumed as a pure product) were dissolved in degassed DCE (50 mL). Pd (PPh₃)₄ (178 mg, 150 μ mol, 0.15 equiv.) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A). Thereafter, the organic layer was washed with deionized H₂O (50 mL), brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a 1:2 mixture of 0.1% aq. TFA and CH₃CN and purified by semi-preparative RP-HPLC (system E, six distinct injections). A first pure sample of Si-pyronin **5** ($t_R = 44.5$ – 45.5 min) was recovered as TFA salt after freeze-drying (dark purple amorphous powder, 7.3 mg). The combined batches of lower purity was subjected to a second RP-HPLC purification (system F). The product-containing fractions ($t_R = 30.3$ – 31.2 min) were lyophilized to give a further amount (ca. 2 mg) of **5** (10 mg, 20 μ mol, overall yield 2% for the two steps and based on TFA mass = 34% determined by ionic chromatography). HPLC (system A): $t_R = 4.2$ min (purity >99% at 300 nm and >99% at 650 nm); UV–vis (recorded during the HPLC analysis): λ_{max} 303 and 623 nm; LMRS (ESI+, recorded during RP-HPLC analysis): m/z 333.2 [M + H]⁺, calcd for C₂₁H₂₅N₂Si⁺ 333.2. *Please note: purity control by RP-HPLC-MS of Si-pyronin 5 was achieved few days after isolation/lyophilization of this compound and a stock solution in DMSO (1.0 mg/mL) was prepared and used for photophysical characterizations. However and unfortunately, full spectroscopic characterization of this fluorophore through NMR measurements was not completed immediately, and an unexpected TFA-mediated degradation occurring at the solid state and despite storage at 4 °C, has led to the loss of this product.*

2.7. Determination of the equilibrium constant related to aq. stability of Si-pyronin dyes

Stock solution of Si-pyroneins (TFA salt) **4** and **5** was prepared in spectroscopic grade DMSO (1.0 mg/mL, 2.9 mM and 2.1 mM respectively). Each compound was incubated in the corresponding buffer (NaOAc, PB, borate or carbonate-bicarbonate buffer to cover the pH range 3.5–10.9) at 23 °C (laboratory air-conditioned temperature) for 15 min (concentration: 5.0 μ M and 3.5 μ M respectively, 5 μ L of stock solution in 3 mL of buffer). Thereafter, visible absorption spectrum (400–700 nm) of each solution was recorded at 25 °C. The absorbance at $\lambda_{max} = 626$ nm or 620 nm was noted and plotted versus the buffer pH value. Curve fitting was achieved with OriginPro 8 software (fit sigmoidal, Boltzmann function) that also provided the inflection point whose the x-coordinate corresponds to the pK of the equilibrium dye-pseudobase.

3. Results and discussion

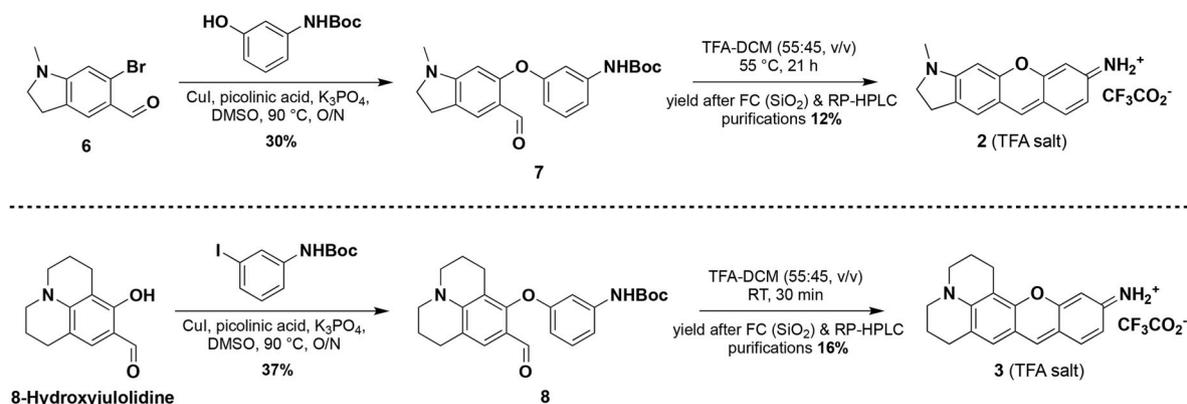
3.1. Synthesis of unsymmetrical pyronin dyes bearing a tertiary aniline unit

Prior to the present work, and to our knowledge, only three examples of unsymmetrical pyronin dyes have been described in the literature, **1** [24], DQF594 [45] and AR116 [41] (Fig. 1). MeSO₃H- or TFA-mediated

condensation reaction between 4-(diethylamino)salicylaldehyde and the corresponding 3-aminophenol/*meta*-anisidine derivative directly provided the corresponding xanthene-based fluorophore. Unfortunately, for AR116, both conversion rate and isolated yield are very poor due to (1) the preferred formation of imine derivative upon reaction between aldehyde and primary aniline and (2) purification difficulties linked to minor differences in polarity between AR116 and starting 4-(diethylamino)salicylaldehyde. To overcome these problems, we recently developed an efficient alternative synthetic route to AR116, inspired by the work of Anzalone et al. on the gram scale synthesis of oxazine and xanthene fluorophores [58]. This method is based on a two-step synthesis starting from a copper-catalyzed Ullmann-type C–O cross-coupling reaction between 4-(diethylamino)salicylaldehyde and *N*-Boc-3-iodoaniline, followed by an unprecedented TFA-mediated domino deprotection/cyclization/aromatization reaction (isolated overall yield 14% vs. <2% for one-step protocol). The advantages of this are multiple: (1) facile isolation of the intermediate mixed bis-aryl ether through flash-column chromatography over silica gel, that avoids possible contamination of AR116 with starting salicylaldehyde, (2) ease of implementation even at large scale with cheap reagents and (3) versatility due to the broad scope of bis-aryl ether synthesis under Ullmann conditions. With the twin goals of demonstrating the potential of this synthesis approach and improving spectral features (especially fluorescence quantum yield) of fluorogenic pyronin dye AR116, we applied this effective two-step protocol to the preparation of two analogs bearing *N*-methylindoline or julolidine moiety instead of *N,N*-diethylaniline fragment (Fig. 1).

As depicted in Scheme 1, *N*-methylindoline pyronin dye **2** was readily obtained from *N*-methyl-5-carboxaldehyde-6-bromoindoline **6** and *N*-Boc-3-aminophenol. Ullmann-type reaction was achieved under conditions previously optimized and the targeted mixed bis-aryl ether **7** was easily isolated in a pure form and with a moderate 30% yield. Prolonged incubation (21 h) of **7** in TFA-DCM (55:45, v/v) at 55 °C was identified as the conditions most suited to perform Boc-deprotection/cyclization/aromatization cascade reaction leading to unsymmetrical pyronin dye **2**. Once again, facile chromatographic isolation over silica gel column provided **2** with a satisfying purity. Optimal purity (>95%) required for photophysical measurements was readily achieved by further purification by semi-preparative RP-HPLC. The synthetic access to julolidine pyronin dye **3** was further facilitated by the commercial availability of one coupling partner assumed to be reactive in Ullmann-type cross-coupling: 8-hydroxyjulolidine-9-carboxaldehyde. Unlike the former synthesis (*vide supra*), the presence of reactive phenol moiety in this latter molecule involved the use of a *meta*-halogenoaniline as the second coupling reaction partner (instead of *meta*-hydroxyaniline for synthesis of **7**). Thus, *N*-Boc-3-iodoaniline was reacted with 8-hydroxyjulolidine-9-carboxaldehyde under the same conditions as those employed for synthesizing **7**. The resulting mixed bis-aryl ether **8** was next subjected to the acidic conditions TFA-DCM (55:45, v/v) found to be effective for its conversion to pyronin dye **3**. Gratifyingly, we noted that the reaction is complete within 30 min without requiring heating.

The marked difference between **2** and **3** in the efficacy of intramolecular cyclization/dehydration domino process (after Boc removal) may be explained by superior rigidity of julolidine fragment that favors a coplanar structure for bis-aryl ether intermediate and hence the spatial proximity between reactive formyl group and phenylogous amine [59]. As in the case of **2**, two chromatographic purifications (flash-chromatography over silica gel followed by semi-preparative RP-HPLC) gave unsymmetrical pyronin dye **3** in a pure form (>95%), as a TFA salt and with an isolated yield of 16%. All spectroscopic data (see ESI for the corresponding spectra, Figs. S6–S13 and S20–S27), especially IR, NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structures assigned. The purity of pyronin samples was confirmed by RP-HPLC analyses with UV–vis detection at different wavelengths. Mass percentage of TFA in pyronin samples was determined by ionic chromatography (see ESI for the results, Figs. S14 and S28).



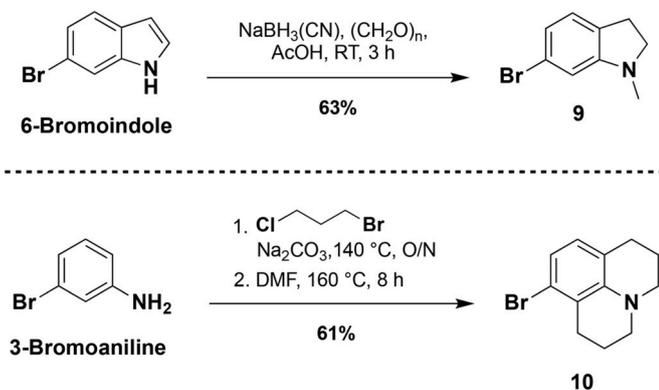
Scheme 1. Synthesis of unsymmetrical pyronin dyes **2** (top) and **3** (bottom) (FC (SiO₂) = flash-column chromatography over silica gel, O/N = overnight, RT = room temperature).

3.2. Synthesis of unsymmetrical Si-pyronin dyes bearing a tertiary aniline unit

To the best of our knowledge, there is only one example of unsymmetrical Si-pyronin dye described in the literature, *i.e.*, the silicon analog of **DQF594** (*vide supra*), named **DQF707** and published during the course of our work [45]. All synthetic strategies towards Si-xanthene dyes such as **DQF707**, symmetrical Si-pyronin **GD81**, Si-fluoresceins, Si-rhodamines and Si-rosamines are always based on the Hitchcock reaction (*i.e.*, bis-lithiation of a bis(bromoaryl) derivative and subsequent trapping with SiMe₂Cl₂) as the key step [60,61]. To apply this popular methodology to the preparation of silicon analogs of *N*-methylindoline- and julolidine-based pyronin dyes **4** and **5**, synthetic efforts must be focused on unsymmetrical bis(bromoaryl) derivatives **12** and **13**. Synthetic routes to these latter two key synthons are summarized in Schemes 2 and 3.

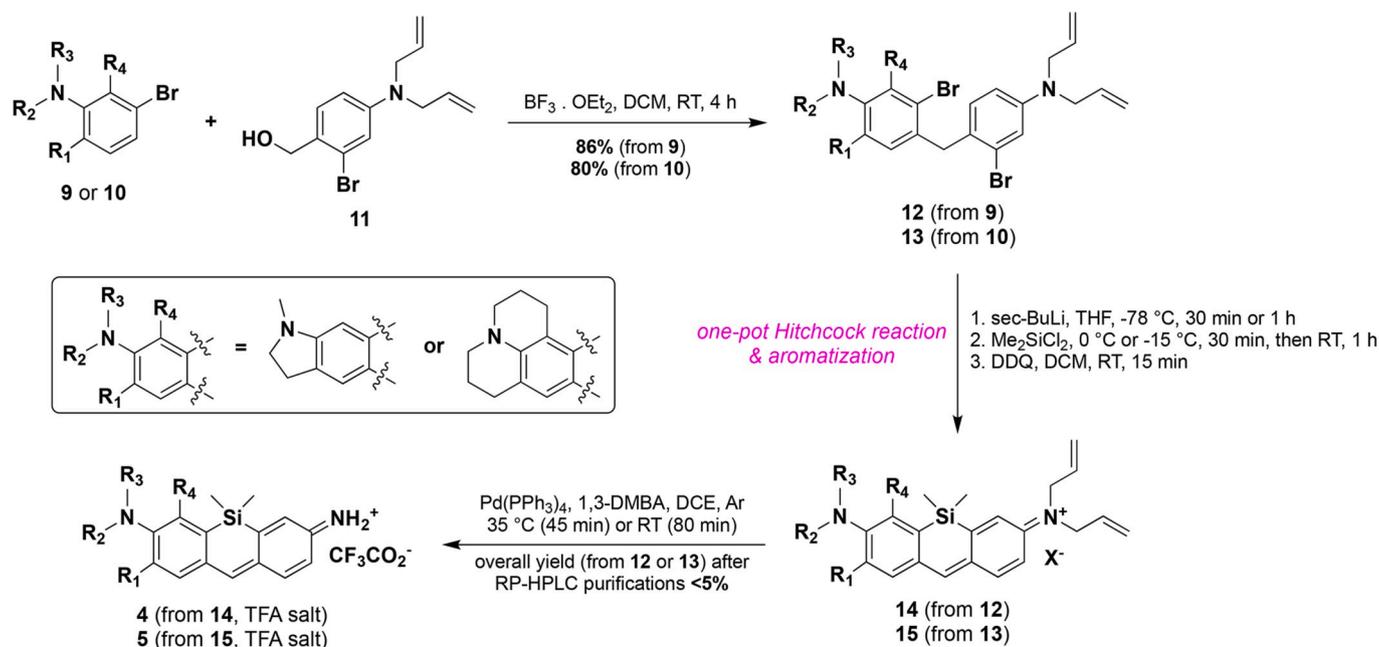
Firstly, on the one hand, the one-pot reduction and *N*-methylation (through reductive amination reaction) of commercial 6-bromoindole provided after conventional column chromatography over silica gel 6-bromo-1-methylindoline **9** in a satisfying 63% yield [62]. On the other hand, 8-bromojulolidine **10** was synthesized from 3-bromoaniline, which was reacted with 1-bromo-3-chloropropane (acting as both alkylating agent and solvent) with Na₂CO₃ at 140 °C overnight. Then, to achieve bis-cyclization through S_EAr reaction, DMF was added and the reaction mixture was stirred at 160 °C for 8 h [63]. **10** was recovered in a pure form by conventional flash-column chromatography over regular silica gel (yield 61%).

The next step was the formation of the unsymmetrical bis(bromoaryl) derivatives **12** and **13** through a Friedel-Crafts alkylation



Scheme 2. Synthesis of *N*-methylindoline and julolidine derivatives **9** (top) and **10** (bottom) (AcOH = glacial acetic acid, RT = room temperature, O/N = overnight).

reaction between 6-bromo-1-methylindoline **9** (or 8-bromojulolidine **10**) and a benzyl-type cation generated from 4-(diallylamino)-2-bromobenzyl alcohol **11** (see ESI for its synthesis) in the presence of BF₃·Et₂O in DCM [64]. This reaction provided **12** and **13** in good reproducible yields (86% and 80% respectively). Concerning the practical implementation of the sophisticated Hitchcock reaction, it is important to note that the formation of dilithiated anion intermediate was found to be slower for the julolidine-based bis(bromoaryl) derivative **13** (1 h instead of 30 min for *N*-methylindoline counterpart). This may be explained by higher steric hindrance of julolidine moiety. Moreover, the reaction mixture temperature at which Me₂SiCl₂ was added, has been identified as a critical point for the success of the reaction. Several attempts were required to find the right temperature for each of the two compounds: 0 °C for reaction conducted with *N*-methylindoline derivative **12** and -15 °C for the julolidine counterpart **13**. Thereafter, the resulting Si-dihydropyronin derivatives were rapidly oxidized with DDQ (less than 15 min) to afford, in both cases, bluish-purple colored *N,N*-diallyl Si-pyronin dyes **14** and **15**. To avoid premature degradation of these fluorophores (observed during our initial attempts), crude reaction mixture were directly subjected to Tsuji-Trost de-allylation conditions [50,65]. Thus, final deprotection step was achieved by treatment of **14** and **15** with cat. amount of Pd(PPh₃)₄ and a large excess of 1,3-dimethylbarbituric acid (1,3-DMBA) in degassed DCE at 35 °C for 45 min for *N*-methylindoline-based Si-pyronin **4** and at room temperature for 80 min for julolidine-based Si-pyronin **5**. For both compounds, purification was achieved by semi-preparative RP-HPLC and several elution conditions have been sequentially applied for each sample to recover the desired unsymmetrical Si-pyronin dyes **4** and **5** in a pure form (>95%). This is why poor values of isolated yields (6% and 2% respectively) are not actually representative of the combined conversion rates observed for the four-step process (bis-lithiation, silylation, aromatization and de-allylation). Spectroscopic data collected for these Si-xanthene derivatives (see ESI for the corresponding spectra, Figs. S31-S37 and S41-S42) were in agreement with the structures assigned. The purity of Si-pyronin samples was confirmed by RP-HPLC analyses with UV-vis detection at different wavelengths. Mass percentage of TFA in pyronin samples was again determined by ionic chromatography (see ESI for the results, Figs. S38 and S43). Curiously, we found that TFA salt of julolidine-based Si-pyronin dye **5** is not stable under solid form, even during storage at 4 °C while no degradation was observed for its stock solutions (1.0 mg/mL) prepared in DMSO and stored at room temperature or in the fridge during long periods. This means that a counter-ion exchange process will have to be implemented prior to the long-term storage of this valuable fluorophore.



Scheme 3. Synthesis of unsymmetrical Si-pyrone dyes **4** and **5** ($X^- = \text{Br}^-$ or Cl^- , Ar = argon atmosphere, DCE = 1,2-dichloroethane, DDQ = 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, 1,3-DMB = 1,3-dimethylbarbituric acid, RT = room temperature).

3.3. Aqueous stability and photophysical characterization of pyronin dyes **2** and **3** and their silicon analogs **4** and **5**

Biosensing/bioimaging applications envisioned for reaction-based fluorescent probes based on fluorogenic primary anilines such as (Si-)pyronins presently developed, generally involve to work under physiological conditions. Therefore, the photophysical properties of compounds **2–5** were determined in phosphate buffered saline (PBS, 100 mM + 150 mM NaCl, pH 7.5) together with the known pyronin dyes 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine and **AR116** already synthesized by our group [50]. Table 1 provides the corresponding spectral features and the overlaid absorption/excitation/emission profiles are displayed in Fig. 3.

All novel (Si-)pyronins display a broad and intense absorption band with a maximum in the range 519–625 nm, depending on the bis(amino)xanthen substitution pattern and the nature of intracyclic heteroatom, and mainly assigned to the 0-0 band of the $S_0 \rightarrow S_1$ transition. In the case of pyronins **2** and **3**, a similar interpretation than the one proposed for the parent symmetrical compound 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine by Megelski et al. [66], is sensible: (1) the intense $S_0 \rightarrow S_1$ absorption band can be attributed to π, π^* transition (HOMO \rightarrow LUMO) and (2) the less pronounced, slightly blue-shifted shoulder peak is assigned to

Table 1

Photophysical properties of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (pyronin), **AR116** and (Si-)pyronin fluorophores studied in this work, determined in PBS at 25 °C.

| Fluorophore ^a | λ Abs (nm) ^b | λ Em (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) | Stokes shift (cm^{-1}) | Φ_f ^c |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------|---|-----------------------------------|-----------------------|
| Pyronin | 496 | 514 | 81 400 | 706 | 0.92 |
| AR116 | 527 | 548 | 64 800 | 727 | 0.06 |
| 2 | 519 | 540 | 66 800 | 749 | 0.76 |
| 3 | 540 | 561 | 57 400 | 693 | 0.72 |
| 4 | 625 | 651 | 47 200 | 639 | 0.27 |
| 5 | 620 | 640 | 40 600 | 504 | 0.42 |

^a Stock solutions (1.0 mg/mL) of fluorophores were prepared either in spectroscopic grade DMSO.

^b Only 0-0 band of the $S_0 \rightarrow S_1$ transition is reported.

^c For experimental conditions used for such determination, see Table S1 and references [41,50].

HOMO-1 \rightarrow LUMO transition. Indeed, energy levels of HOMO and HOMO-1 are so similar. For Si-xanthen dyes and thus for silicon analogs **4** and **5**, the low-lying LUMO energy level caused by the additional $\sigma^* - \pi^*$ conjugation, with the contribution of the σ^* of the heteroatom and π^* of the adjacent carbons, is now well established and suggests that both HOMO \rightarrow LUMO and HOMO \rightarrow LUMO+1 transitions are responsible for broadening the $S_0 \rightarrow S_1$ absorption band.

In line with well-known features of rhodamines, the absorption maximum of pyronin scaffold is significantly red-shifted with an increasing electron-donating ability of the amino group of aniline fragment: $\text{NH}_2 < N\text{-methylindoline} \approx \text{-NEt}_2 < \text{julolidine}$. Since no study has ever compared absorption properties of a xanthen scaffold bearing either *N*-methylindoline or julolidine moieties as tertiary aniline units [67], the present work helps to show that the first one is less effective to cause a significant bathochromic shift and may even be regarded as a weaker electron donor than the conventional diethylamino group. *N*-methylindoline and julolidine moieties are often used to promote rigidization of the core xanthen fluorophore bearing them, giving large increase in fluorescence quantum yield [59,62,64] as the result of reduced rotational or vibrational deactivation pathways of the excited state. This feature has been observed with the triptych **AR116/2/3**, as the Φ_f value changes from 6% to 72%–76% for an emission maximum being in the wavelength range 540–560 nm. Although unsymmetrical pyronin dyes **2** and **3** exhibit a more pronounced hydrophobic character, especially the julolidine derivative, no formation of non-emissive H-type aggregates occurred in neutral aq. solutions as evidenced by the perfect matching between the absorption and excitation spectra recorded in PBS, even at high concentrations in the range 5–20 μM .

Despite this tremendous improvement of fluorescence efficiency of the pyronin scaffold, the major limitation of these fluorogenic anilines is related to their absorption/emission maxima outside the far-red region or the NIR-I “therapeutic optical window” (*i.e.*, from 650 to 900 nm). Among the different possible molecular design strategies to obtain long-wavelength fluorescent analogs of xanthen dyes, the heteroatom-substitution approach historically proposed by the Qian group in 2008 [49], then studied in details by the Hanoka-Nagano-Urano group for preparing a set of practical Si-rhodamine and Si-rosamine derivatives [64,68], knows an overwhelming success. This is evidenced by the dozens fluorescent probes, imaging or phototherapy agents bearing an

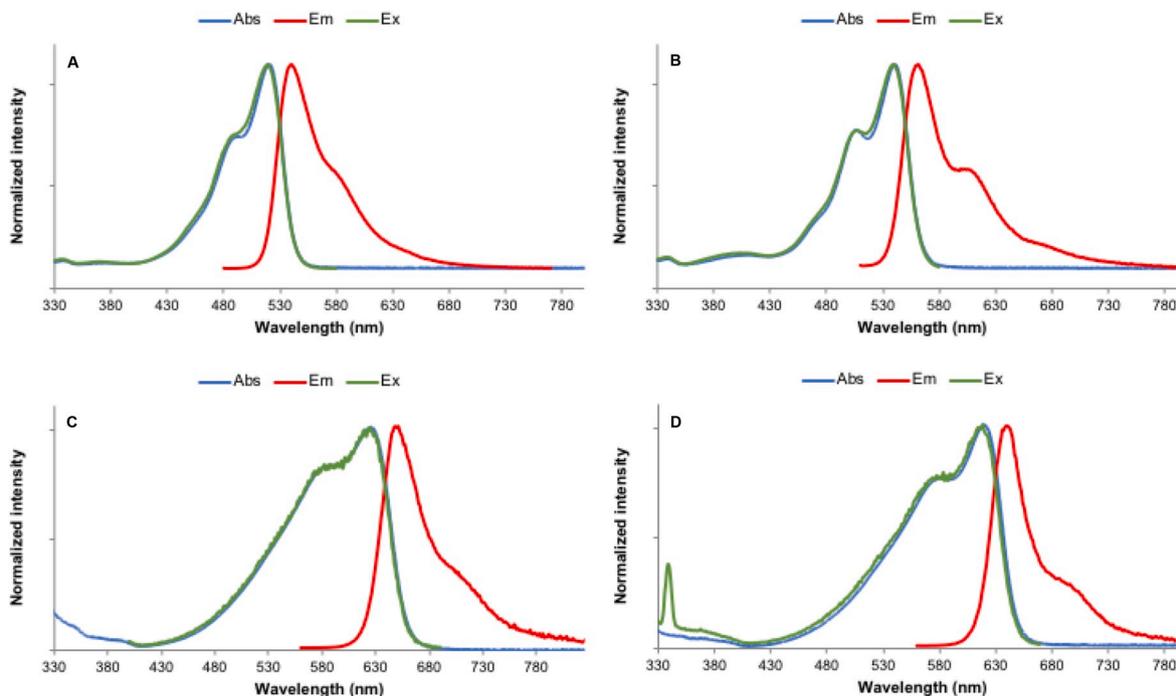


Fig. 3. Normalized absorption (blue), excitation (Em 600 nm for 2–3 or 710 nm for 4 or 680 nm for 5, green) and emission (Ex 470 nm for 2, 500 nm for 3 and 545 nm for 4–5, red) spectra of unsymmetrical (Si-)pyronins 2 (A), 3 (B), 4 (C) and 5 (D) in PBS at 25 °C. Please note: for the excitation spectrum of 5 in PBS, the peak at 340 nm ($\lambda_{Ex}/2$) is assigned to Rayleigh scattering. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

hetero-xanthen dye within their core structure and acting as reporter or photosensitizer, which are published in the literature (both articles and patents) and reviewed in some recent and comprehensive digests [67, 69–73]. As the Qian group already observed with symmetrical pyronin Y, replacement (O \rightarrow SiMe₂) on the xanthen framework of unsymmetrical pyronins 2 and 3 produced strong far-red fluorophores 4 and 5 with 100/110 nm and 80/80 nm bathochromic shift respectively of their absorption/emission maxima. Interestingly, the assumed difference in electron-donating ability between *N*-methylindoline and julolidine moieties (*vide supra*) does not significantly influence the position of absorption/emission bands of such Si-pyronin dyes. The limited effect of aniline *N*-substituents on HOMO-LUMO energy gap of xanthen scaffold seems to be a common trend to silicon-based and related hetero-pyronin dyes [67]. This may be explained by a less effective electronic conjugation between the donating group and π -system, linked to changes in molecular orbitals (*i.e.*, electron density and geometry) induced by atom substitution (O \rightarrow SiMe₂). This hypothesis will deserve further investigation by means of *ab initio* calculations. Compared to yellow-orange emissive pyronin dyes 2 and 3, fluorescence quantum yields of 4 and 5 (27% and 42% for emission centered at 650 nm and 640 nm respectively) are altered but remain satisfactory for the far-red spectral region and are within the typical range for Si-pyronin, Si-rhodamine and Si-rosamine derivatives. The slight decrease in fluorescence quantum yield of the unsymmetrical Si-pyronin dye containing the *N*-methylindoline moiety compared to julolidine counterpart is consistent with what has been observed by Butkevich et al. with symmetrical and Si-rhodamines [74]. Interestingly, the overlaying of absorption and excitation spectra confirms that the introduction of the lipophilic SiMe₂ moiety did not favor aggregation of 4 and 5 in aq. solution. In addition to these valuable assets required for applications in complex biological media, the most noticeable result arising from the molecular design strategy based on both heteroatom substitution and desymmetrization through mono *N*-substitution, is undoubtedly the marked stability of Si-pyronin dyes 4 and 5 in an aq. medium over a wide range of pH, compared to parent *N*-unsubstituted Si-pyronin **GD81** (see introduction and Fig. 2). By drawing pH-dependent absorption curves (Fig. 4 and ESI

for fitted curves, Fig. S44), we were able to determine the pK value of the corresponding hydration equilibrium between Si-pyronin and Si-xanthydroly forms (pK = 8.3 and 9.8 for 4 and 5 respectively). Furthermore, curves clearly show that the hydrolytic stability of 4 and 5 is optimal at pH < 7 and pH < 8 respectively. These various characterizations have enabled us to identify novel julolidine-based Si-pyronin dye 5 as an attractive fluorogenic aniline for designing activatable far-red fluorescent probes, that may be regarded as a useful complement to mono-julolidine-based Si-rosamine **HMJSiR** recently reported by the Urano group [75].

4. Conclusion

In summary, novel analogs of 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine (pyronin), the structurally simplest member of the class of xanthen-based fluorophores, bearing an intracyclic silicon atom and/or a single tertiary aniline donor unit were successfully synthesized. First, we devised an original two-step synthetic strategy to readily achieve structural desymmetrization of pyronin scaffold, based on a copper-catalyzed Ullmann cross-coupling reaction as the key step. As a natural extension of our work, this versatile methodology could also be applied to facile preparation of other xanthen-based fluorophores such as rhodamines, rhodols and rosamines, with the dual aim of providing molecular diversity and fine tuning spectral properties of these photoactive compounds. The synthetic access to silicon analogs of these unsymmetrical pyronin dyes was less straightforward and more laborious because the Hitchcock methodology is always a prerequisite in the preparation of Si-xanthen derivatives and demands a tedious case-to-case optimization of the reaction conditions (reaction times, reaction temperature, number of equiv. of lithiated reagent, ...). However, the availability of Si-pyronin dyes 4 and 5 has enabled us to perform some photophysical and stability studies in simulated physiological conditions. The latter ones clearly support the relevance of molecular design strategy based on both heteroatom substitution (O \rightarrow SiMe₂) and molecular desymmetrization of xanthen scaffold through incorporation of a bulky tertiary aniline fragment, to obtain high-performance aniline-based

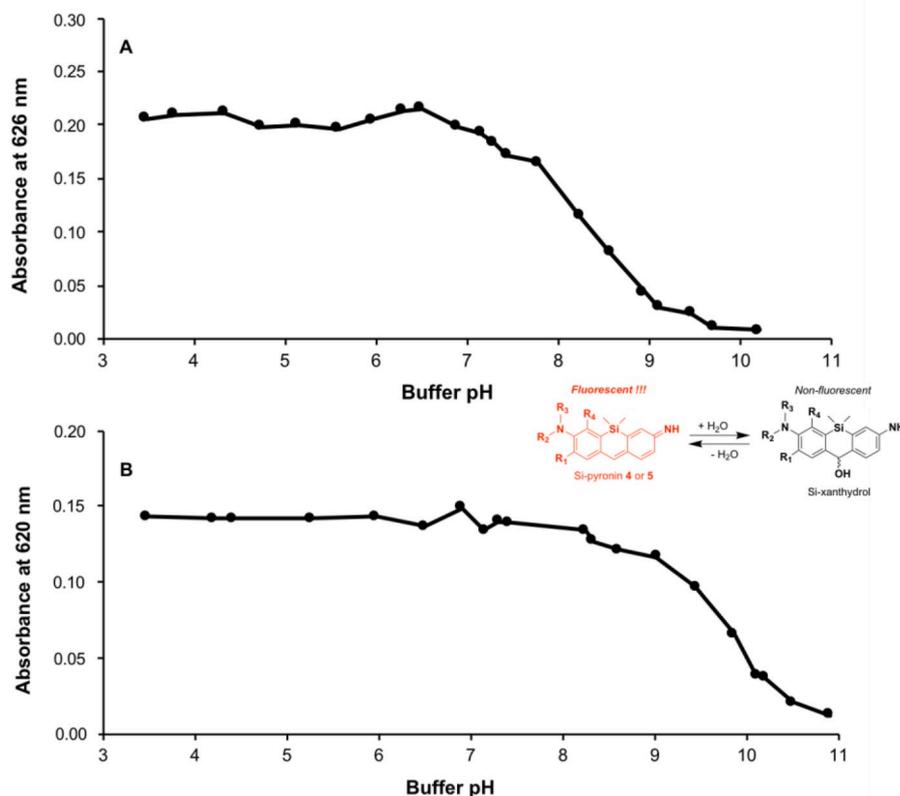


Fig. 4. pH-Dependant maximum absorbance (626 nm or 620 nm) curve for Si-pyroneins 4 (A) and 5 (B) (concentration: 5.0 or 3.5 μ M in the corresponding buffer, 15 min of incubation before absorbance measurement).

fluorophores. Interestingly, in addition to their use as fluorogenic dyes in “smart” probes based on protection-deprotection of a primary amino group [35–37], these novel (Si-)pyronin derivatives will be very useful as references to validate “covalent-assembly” fluorescent probes based on *in situ* formation of (Si-)pyronin triggered by the analyte to be detected [39–43]. Finally, tunable reactivity of their *meso*-position towards different nucleophiles can be used to design reversible reaction-based fluorescent probes particularly well suited for real-time imaging of redox status changes *in vivo* [76–78].

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Garance Dejouy: Investigation, Writing - original draft. **Kevin Renault:** Investigation, Writing - original draft. **Ibai E. Valverde:** Supervision, Writing - review & editing. **Anthony Romieu:** Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgements

This work is part of the project “Pharmacoiagerie et Agent Thera-nostiques”, supported by the Université de Bourgogne and Conseil Régional de Bourgogne through the Plan d’Actions Régional pour l’Innovation (PARI) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs. GDR CNRS “Agents d’Imagerie Moléculaire” (AIM) 2037 is also thanked for its interest in this research topic. G. D. gratefully acknowledges the Burgundy Franche-Comté

region for her Ph. D. grant, Doctoral School Carnot-Pasteur (ED553, University of Burgundy) and Agence Nationale de la Recherche (ANR, AAPG 2018, DetectOP_BChE, ANR-18-CE39-0014), for funding her participation to IC3EM 2020. A further financial support from ANR (AAPG 2018, PRCI LuminoManufacOligo, ANR-18-CE07-0045-01), especially for the post-doc fellowship of K. R., is also greatly acknowledged. COBRA lab (UMR CNRS 6014) and Iris Biotech company are warmly thanked for the generous gift of some chemical reagents used in this work. The authors also thank the “Plateforme d’Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l’Université de Bourgogne” (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) for access to spectroscopy instrumentation, Dr. Myriam Laly (University of Burgundy, PACSMUB) for the determination of TFA content in samples purified by semi-preparative RP-HPLC, Dr. Valentin Quesneau (UBFC, ICMUB) for useful discussions and critical reading of the manuscript, Dr. Valérie Chalansonnet and M. Sylvain Orenge (bioMérieux company, R&D Microbiology) for their interest in this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108496>.

References

- [1] Wright P, Staff Ub. Xanthene dyes. In: Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, Inc; 2014. <https://doi.org/10.1002/0471238961.2401142023090708.a01.pub2>.
- [2] Duan Y, Liu M, Sun W, Wang M, Liu S, Li QX. Recent progress on synthesis of fluorescein probes. Mini-Reviews Org Chem 2009;6:35–43. <https://doi.org/10.2174/157019309787316111>.
- [3] Kim HN, Lee MH, Kim HJ, Kim JS, Yoon J. A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions. Chem Soc Rev 2008;37:1465–72. <https://doi.org/10.1039/b802497a>.

- [4] Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem Soc Rev* 2009;38:2410–33. <https://doi.org/10.1039/b901612k>.
- [5] Chen X, Pradhan T, Wang F, Kim JS, Yoon J. Fluorescent chemosensors based on spiroring-opening of xanthenes and related derivatives. *Chem Rev* 2012;112:1910–56. <https://doi.org/10.1021/cr200201z>.
- [6] Zheng H, Zhan X-Q, Bian Q-N, Zhang X-J. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chem Commun* 2013;49:429–47. <https://doi.org/10.1039/c2cc35997a>.
- [7] Fu M, Zhang X, Wang J, Chen H, Gao Y. Progress of synthesis and separation of regioisomerically pure 5(6)-substituted rhodamine. *Curr Org Chem* 2016;20:1584–90. <https://doi.org/10.2174/1385272820666160202004127>.
- [8] Zhang R, Yan F, Huang Y, Kong D, Ye Q, Xu J, Chen L. Rhodamine-based ratiometric fluorescent probes based on excitation energy transfer mechanisms: construction and applications in ratiometric sensing. *RSC Adv* 2016;6:50732–60. <https://doi.org/10.1039/C6RA06956H>.
- [9] Poronik YM, Vygranenko KV, Gryko D, Gryko DT. Rhodols - synthesis, photophysical properties and applications as fluorescent probes. *Chem Soc Rev* 2019;48:5242–65. <https://doi.org/10.1039/C9CS00166B>.
- [10] Ahn Y-H, Lee J-S, Chang Y-T. Combinatorial rosamine library and application to in vivo glutathione probe. *J Am Chem Soc* 2007;129:4510–1. <https://doi.org/10.1021/ja068230m>.
- [11] Kasten FH. Comparisons of pyronin dyes obtained from various commercial sources. *History Stain Technol* 1962;37:265–75. <https://doi.org/10.3109/10520296209114486>.
- [12] Biehringer J. *Pyronines Chem Ber* 1894;27:3299–305.
- [13] Clunas S, Strory JMD, Rickard JE, Horsley D, Harrington CR, Wischik CM. Preparation of 3,6-disubstituted xanthylium salts for treatment of tauopathies, (WisTa Laboratories Ltd., Singapore). WO2010067078.
- [14] Lavis LD. Teaching old dyes new tricks: biological probes built from fluoresceins and rhodamines. *Annu Rev Biochem* 2017;86:825–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839>.
- [15] Prento P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples Biotech. *Histochem* 2009;84:139–58. <https://doi.org/10.1080/10520290902908810>.
- [16] Wu L, Burgess K. Fluorescent amino- and thiopyronin dyes. *Org Lett* 2008;10:1779–82. <https://doi.org/10.1021/ol800526s>.
- [17] Han S, Chen Y. One-pot synthesis of N, N, N, N-tetraethyl-9H-xanthene-3,6-diamine and its conversion to pyronine B Dyes. *Pigm* 2013;96:59–62. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.03.034>.
- [18] Butkevich AN, Sednev MV, Shojai H, Belov VN, Hell SW. PONY Dyes: direct addition of P(III) nucleophiles to organic fluorophores. *Org Lett* 2018;20:1261–4. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00270>.
- [19] Bachman JL, Escamilla PR, Boley AJ, Pavlich CI, Anslын EV. Improved xanthone synthesis, stepwise chemical redox cycling. *Org Lett* 2019;21:206–9. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03661>.
- [20] Liu J, Sun Y-Q, Zhang H, Huo Y, Shi Y, Guo W. Simultaneous fluorescent imaging of Cys/Hcy and GSH from different emission channels. *Chem Sci* 2014;5:3183–8. <https://doi.org/10.1039/c4sc00838c>.
- [21] Sun Y-Q, Liu J, Zhang H, Huo Y, Lv X, Shi Y, Guo W. A mitochondria-targetable fluorescent probe for dual-channel NO imaging assisted by intracellular cysteine and glutathione. *J Am Chem Soc* 2014;136:12520–3. <https://doi.org/10.1021/ja504156a>.
- [22] Kawagoe R, Takashima I, Usui K, Kanegae A, Ozawa Y, Ojida A. Rational design of a ratiometric fluorescent probe based on arene-metal-ion contact for endogenous hydrogen sulfide detection in living cells. *Chembiochem* 2015;16:1608–15. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500249>.
- [23] Zhang H, Liu J, Sun Y-Q, Huo Y, Li Y, Liu W, Wu X, Zhu N, Shi Y, Guo W. A mitochondria-targetable fluorescent probe for peroxynitrite: fast response and high selectivity. *Chem Commun* 2015;51:2721–4. <https://doi.org/10.1039/c4cc09122a>.
- [24] He L, Yang X, Liu Y, Weiying L. Colorimetric and ratiometric fluorescent probe for hydrogen sulfide using a coumarin-pyronine FRET dyad with a large emission shift. *Anal. Methods* 2016;8:8022–7. <https://doi.org/10.1039/c6ay02537d>.
- [25] Nie H, Jing J, Tian Y, Yang W, Zhang R, Zhang X. Reversible and dynamic fluorescence imaging of cellular redox self-regulation using fast-responsive near-infrared Ge-pyronines. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:8991–7. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b01348>.
- [26] Nie H, Qiao L, Yang W, Guo B, Xin F, Jing J, Zhang X. UV-assisted synthesis of long-wavelength Si-pyronine fluorescent dyes for real-time and dynamic imaging of glutathione fluctuation in living cells. *J Mater Chem B* 2016;4:4826–31. <https://doi.org/10.1039/c6tb00938g>.
- [27] Kawagoe R, Takashima I, Uchinomiya S, Ojida A. Reversible ratiometric detection of highly reactive hydropersulfides using a FRET-based dual emission fluorescent probe. *Chem Sci* 2017;8:1134–40. <https://doi.org/10.1039/C6SC03856E>.
- [28] Yang L, Niu J-Y, Sun R, Xu Y-J, Ge J-F. The application of mitochondrial targetable pyronine-pyridinium skeleton in the detection of nitroreductase. *Sens Actuators, B* 2018;259:299–306. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.011>.
- [29] Zhang H, Liu J, Hu B, Wang L, Yang Z, Han X, Wang J, Bai W, Guo W. Dual-channel fluorescence diagnosis of cancer cells/tissues assisted by OATP transporters and cysteine/glutathione. *Chem Sci* 2018;9:3209–14. <https://doi.org/10.1039/c7sc05407f>.
- [30] Kang Y-F, Niu L-Y, Yang Q-Z. Fluorescent probes for detection of biothiols based on "aromatic nucleophilic substitution-rearrangement" mechanism. *Chem Lett* 2019;30:1791–8. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.08.013>.
- [31] Malek A, Bera K, Biswas S, Perumal G, Das AK, Doble M, Thomas T, Prasad E. Development of a next-generation fluorescent turn-on sensor to simultaneously detect and detoxify mercury in living samples. *Anal Chem* 2019;91:3533–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05268>.
- [32] Ren M, Wang L, Lv X, Liu J, Chen H, Wang J, Guo W. Development of a benzothiazole-functionalized red-emission pyronin dye and its dihydro derivative for imaging lysosomal viscosity and tracking endogenous peroxynitrite. *J Mater Chem B* 2019;7:6181–6. <https://doi.org/10.1039/c9tb01525f>.
- [33] Yang M, Fan J, Sun W, Du J, Peng X. Mitochondria-anchored colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for visualizing cysteine/homocysteine in living cells and *Daphnia magna* model. *Anal Chem* 2019;91:12531–7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03386>.
- [34] Kim KH, Singha S, Jun YW, Reo YJ, Kim HR, Ryu HG, Bhunia S, Ahn KH. Far-red/near-infrared emitting, two-photon absorbing, and bio-stable amino-Si-pyronin dyes. *Chem Sci* 2019;10:9028–37. <https://doi.org/10.1039/C9SC02287B>.
- [35] Chen X, Sun M, Ma H. Progress in spectroscopic probes with cleavable active bonds. *Curr Org Chem* 2006;10:477–89. <https://doi.org/10.2174/138527206776055312>.
- [36] Grimm JB, Heckman LM, Lavis LD. The chemistry of small-molecule fluorogenic probes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;113:1–34. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386932-6.00001-6>.
- [37] Tang Y, Lee D, Wang J, Li G, Yu J, Lin W, Yoon J. Development of fluorescent probes based on protection-deprotection of the key functional groups for biological imaging. *Chem Soc Rev* 2015;44:5003–15. <https://doi.org/10.1039/c5cs00103j>.
- [38] He T, He H, Luo X, Yang Y, Yang Y. Small molecular fluorescent probes based on covalent assembly. *Sci Sinica Chim* 2017;47:945–54. <https://doi.org/10.1360/N032017-00047>.
- [39] Lei Z, Yang Y. A concise colorimetric and fluorimetric probe for sarin related threats designed via the "Covalent-Assembly" approach. *J Am Chem Soc* 2014;136:6594–7. <https://doi.org/10.1021/ja502945q>.
- [40] Song L, Lei Z, Zhang B, Xu Z, Li Z, Yang Y. A zero-background fluorescent probe for Hg²⁺ designed via the "covalent-assembly" principle. *Anal. Methods* 2014;6:7597–600. <https://doi.org/10.1039/C4AY01729C>.
- [41] Debieu S, Romieu A. In situ formation of pyronin dyes for fluorescence protease sensing. *Biomol Chem* 2017;15:2575–84. <https://doi.org/10.1039/C7OB00370F>.
- [42] Debieu S, Romieu A. Kinetics improvement of protease-mediated formation of pyronin dyes. *Tetrahedron Lett* 2018;59:1940–4. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.010>.
- [43] Renault K, Debieu S, Richard J-A, Romieu A. Deeper insight into the protease-sensitive "covalent-assembly" fluorescent probes for practical biosensing applications. *Biomol Chem* 2019;17:8918–32. <https://doi.org/10.1039/C9OB01773A>.
- [44] Müller W. Preparation of the 3,6-diaminoxanthylium cation Justus liebig's annalen der Chemie. 1974. p. 334–5. <https://doi.org/10.1002/jlac.197419740218>.
- [45] Ren T-B, Xu W, Zhang W, Zhang X-X, Wang Z-Y, Xiang Z, Yuan L, Zhang X-B. A general method to increase Stokes shift by introducing alternating vibronic structures. *J Am Chem Soc* 2018;140:7716–22. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04404>.
- [46] Drexhage K-H, Arden-Jacob J, Frantzeskos J, Zilles A. Carbopyronine fluorescent dyes, their production and their use as markers for biological compounds, (Germany). WO2000064986.
- [47] Arden-Jacob J, Frantzeskos J, Kemnitzer NU, Zilles A, Drexhage KH. New fluorescent markers for the red region. *Spectrochim. Acta, Part A* 2001;57A:2271–83. [https://doi.org/10.1016/s1386-1425\(01\)00476-0](https://doi.org/10.1016/s1386-1425(01)00476-0).
- [48] Gu L, Yang B, Liu F, Bai Y. Efficient synthetic route to carbopyronine fluorescent dye intermediate. *Chin. J Chem* 2009;27:1199–201. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200990202>.
- [49] Fu M, Xiao Y, Qian X, Zhao D, Xu Y. A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom. *Chem Commun* 2008:1780–2. <https://doi.org/10.1039/B718544H>.
- [50] Romieu A, Dejoy I, Valverde IE. Quest for novel fluorogenic xanthene dyes: synthesis, spectral properties and stability of 3-imino-3H-xanthen-6-amine (pyronin) and its silicon analog. *Tetrahedron Lett* 2018;59:4574–81. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.11.031>.
- [51] Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes utilizing photoinduced electron transfer. *ACS Chem Biol* 2011;6:600–8. <https://doi.org/10.1021/cb1002416>.
- [52] Zhai D, Xu W, Zhang L, Chang Y-T. The role of "disaggregation" in optical probe development. *Chem Soc Rev* 2014;43:2402–11. <https://doi.org/10.1039/C3CS60368G>.
- [53] Lin H-S, Paquette LA. A convenient method for determining the concentration of Grignard reagents. *Synth. Commun* 1994;24:2503–6. <https://doi.org/10.1080/00397919408010560>.
- [54] Lin C-K, Wang Y-F, Cheng Y-C, Yang J-S. Multisite constrained model of trans-4-(N,N-Dimethylamino)-4'-nitrostilbene for structural elucidation of radiative and nonradiative excited states. *J Phys Chem A* 2013;117:3158–64. <https://doi.org/10.1021/jp310770s>.
- [55] Adusumalli SR, Rawale DG, Singh U, Tripathi P, Paul R, Kalra N, Mishra RK, Shukla S, Rai V. Single-site labeling of native proteins enabled by a chemoselective and site-selective chemical technology. *J Am Chem Soc* 2018;140:15114–23. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b10490>.
- [56] Viswanadham B, Mahomed AS, Friedrich HB, Singh S. Efficient and expeditious chemoselective BOC protection of amines in catalyst and solvent-free media. *Res Chem Intermed* 2017;43:1355–63. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2702-9>.
- [57] Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, Bercaw JE, Goldberg KI. NMR chemical shifts of trace impurities: common

- laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 2010;29:2176–9. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
- [58] Anzalone AV, Wang TY, Chen Z, Cornish VW. A common diaryl ether intermediate for the gram-scale synthesis of oxazine and xanthene fluorophores. *Angew Chem, Int Ed* 2013;52:650–4. <https://doi.org/10.1002/anie.201205369>.
- [59] Varejão JOS, Varejão EVV, Fernandes SA. Synthesis and derivatization of julolidine: a powerful heterocyclic structure. *Eur J Org Chem* 2019;2019:4273–310. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900398>.
- [60] Hitchcock CHS, Mann FG, Vanterpool A. The preparation and properties of 10 : 10-disubstituted phenoxsilanes. 913 *J Chem Soc* 1957;4537–46. <https://doi.org/10.1039/JR9570004537>.
- [61] Durandetti M, Boddaet T. Formation de liaisons Si-C pour la synthèse d'hétérocycles silylés. *L'Act Chim* 2018;434:11–7.
- [62] Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Piao W, Kusakabe M, Saito N, Terai T, Okabe T, Nagano T. Development of NIR fluorescent dyes based on Si-rhodamine for in vivo imaging. *J Am Chem Soc* 2012;134:5029–31. <https://doi.org/10.1021/ja210375e>.
- [63] Lei Z, Li X, Luo X, He H, Zheng J, Qian X, Yang Y. Bright, stable, and biocompatible organic fluorophores absorbing/emitting in the deep near-infrared spectral region. *Angew Chem, Int Ed* 2017;56:2979–83. <https://doi.org/10.1002/anie.201612301>.
- [64] Hanaoka K, Kagami Y, Piao W, Myochin T, Numasawa K, Kuriki Y, Ikeno T, Ueno T, Komatsu T, Terai T, Nagano T, Urano Y. Synthesis of unsymmetrical Si-rhodamine fluorophores and application to a far-red to near-infrared fluorescence probe for hypoxia. *Chem Commun* 2018;54:6939–42. <https://doi.org/10.1039/c8cc02451k>.
- [65] Dejouy G, Laly M, Valverde IE, Romieu A. Synthesis, stability and spectral behavior of fluorogenic sulfone-pyronin and sulfone-rosamine dyes. *Dyes Pigments* 2018; 159:262–74.
- [66] Megelski S, Lieb A, Pauchard M, Drechsler A, Glaus S, Debus C, Meixner AJ, Calzaferri G. Orientation of fluorescent dyes in the nano channels of zeolite L. *J Phys Chem B* 2001;105:25–35. <https://doi.org/10.1021/jp002582c>.
- [67] Wang L, Du W, Hu Z, Uvdal K, Li L, Huang W. Hybrid rhodamine fluorophores in the visible/NIR region for biological imaging. *Angew Chem, Int Ed* 2019;58:14026–43. <https://doi.org/10.1002/anie.201901061>.
- [68] Takahashi S, Kagami Y, Hanaoka K, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Uchiyama M, Koyama-Honda I, Mizushima N, Taguchi T, Arai H, Nagano T, Urano Y. Development of a series of practical fluorescent chemical tools to measure pH values in living samples. *J Am Chem Soc* 2018;140:5925–33. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b00277>.
- [69] Kushida Y, Nagano T, Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their applications in bioimaging. *Analyst* 2015;140:685–95. <https://doi.org/10.1039/C4AN01172D>.
- [70] Ikeno T, Nagano T, Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their unique photophysical properties for fluorescent probes. *Chem - Asian J* 2017;12:1435–46. <https://doi.org/10.1002/asia.201700385>.
- [71] Deng F, Xu Z. Heteroatom-substituted rhodamine dyes: structure and spectroscopic properties. *Chin. Chem Lett* 2019;30:1667–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2018.12.012>.
- [72] Li M, Li Y, Wang X, Cui X, Wang T. Synthesis and application of near-infrared substituted rhodamines. *Chin. Chem Lett* 2019;30:1682–8. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.06.036>.
- [73] Zhao M, Guo Y-S, Xu W-N, Zhao Y-F, Xie H-Y, Li H-J, Chen X-F, Zhao R-S, Guo D-S. Far-red to near-infrared fluorescent probes based on silicon-substituted xanthene dyes for sensing and imaging. *Trends. Anal Chem* 2020;122:115704. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115704>.
- [74] Butkevich AN, Ta H, Ratz M, Stoldt S, Jakobs S, Belov VN, Hell SW. Two-color 810 nm STED nanoscopy of living cells with endogenous SNAP-tagged fusion proteins. *ACS Chem Biol* 2018;13:475–80. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00616>.
- [75] Iwatate RJ, Kamiya M, Umezawa K, Kashima H, Nakadate M, Kojima R, Urano Y. Silicon rhodamine-based near-infrared fluorescent probe for γ -glutamyltransferase. *Bioconjugate Chem* 2018;29:241–4. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00776>.
- [76] Chu T-s, Lu R, Liu B-t. Reversibly monitoring oxidation and reduction events in living biological systems: recent development of redox-responsive reversible NIR biosensors and their applications in in vitro/in vivo fluorescence imaging. *Biosens. Bioelectron* 2016;86:643–55. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.039>.
- [77] Kaur A, Kolanowski JL, New EJ. Reversible fluorescent probes for biological redox states. *Angew Chem, Int Ed* 2016;55:1602–13. <https://doi.org/10.1002/anie.201506353>.
- [78] Li B, He Z, Zhou H, Zhang H, Cheng T. Reversible fluorescent probes for chemical and biological redox process. *Chin. Chem Lett* 2017;28:1929–34. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2017.08.055>.

Nous avons ainsi réussi à synthétiser deux Si-pyronines stables à pH physiologique *via* la stratégie de désymétrisation du cœur Si-xanthène. La réaction de Hitchcock est cependant capricieuse et nécessite des conditions expérimentales pointues, pas toujours facile à reproduire et fortement dépendantes de la structure du substrat de type bis-bromoaryle considéré. En effet, si l'échange halogène-lithium a été optimisé *via* l'utilisation du sec-BuLi et par un suivi rigoureux de la réaction par des analyses HPLC-MS régulières, les conditions favorisant l'addition nucléophile sur le diméthylchlorosilane restent encore à améliorer. Il a aussi été remarqué que l'obtention des différents dérivés était facilitée en travaillant sur des échelles >250 mg. Toutefois, ces problèmes synthétiques mis de côté, le déplacement bathochrome des maxima d'absorption et d'émission est bien obtenu et la gamme de stabilité de pH a bien été étendue. Par la suite, il pourrait être intéressant de démontrer le caractère fluorogénique de ces fluorophores *via* la synthèse d'une sonde pro-fluorescente réactive (par exemple) vis-à-vis de la pénicilline G acylase ("Penicillin G Acylase" ou "Penicillin Amidase", PGA) qui est l'enzyme modèle régulièrement utilisée au sein de notre laboratoire.

III. Conclusions et Perspectives

Ce premier chapitre nous a permis de développer de nouvelles hétéro-pyronines portant des anilines primaires (*i.e.*, groupements NH₂ fluorogéniques). Pour la première fois, les analogues sulfone de la 3-imine-3*H*-xanthen-6-amine et d'une rosamine fluorogénique ont été synthétisés et caractérisés du point de vue photophysique. Ces études ont montré que ces fluorophores sont peu stables en milieux aqueux et tout particulièrement à pH physiologique. Cette instabilité peut s'expliquer par le fort pouvoir électro-attracteur du SO₂ qui exalte l'électrophilie de la position *meso*, facilitant ainsi l'addition d'eau conduisant à une forme hydratée non-fluorescente de type sulfone-xanthidrol. Il n'était donc ni envisageable ni pertinent de poursuivre nos travaux vers la synthèse des précurseurs "cagés" susceptibles de conduire à la formation *in situ* de ces fluorophores après activation par l'analyte ciblé (*e.g.*, la PGA). Cependant, la stabilité de la sulfone-rosamine **GD34** en tampon aqueux permet d'envisager l'utilisation de ces nouveaux fluorophores rouge lointain comme marqueurs spécifiques d'organites cellulaires à contenu acide (*e.g.*, lysosomes)⁸⁰.

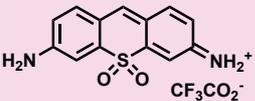
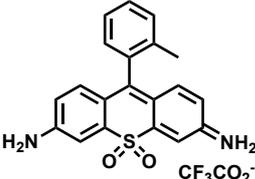
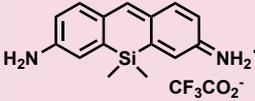
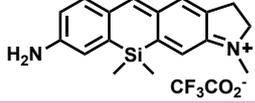
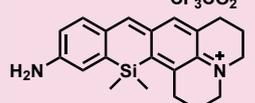
La capacité de la substitution du groupement sulfone par un motif SiMe₂ à stabiliser la position *meso* du cœur hétéro-pyronine a été démontrée. Toutefois, même si le caractère électro-donneur du motif SiMe₂ permet d'améliorer la stabilité de l'hétéro-xanthène, la Si-pyronine symétrique obtenue n'est pas stable à pH physiologique. La conception de dérivés non-symétriques a permis d'étendre la gamme de pH dans laquelle la forme aromatique fluorescente est largement majoritaire, mais aussi de déplacer les maxima d'absorption et d'émission vers le rouge lointain.

⁸⁰ Pour des revues sur le sujet : a) W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang, L. Yuan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, *55*, 13658-13699; b) H. Zhu, J. Fan, J. Du, X. Peng, *Acc. Chem. Res.*, **2016**, *49*, 2115-2126; c) Y. Yue, F. Huo, S. Lee, C. Yin, J. Yoon, *Analyst*, **2017**, *142*, 30-41.

Le tableau 1 résume les propriétés photophysiques en milieu aqueux de ces fluorophores (λ_{abs} , λ_{em} , ϵ , ϕ_F). Il serait intéressant dans l'avenir de démontrer le caractère fluorogénique de ces fluorophores afin d'envisager leur utilisation comme sondes pro-fluorescentes conventionnelles dans la détection d'analytes biologiques.

Les dernières réussites, à savoir l'identification des composés **GD99** et **GD192**, nous ont permis d'envisager la synthèse de précurseurs "cagés" de ces fluorophores qui seront utilisés comme sondes de type "covalent assembly" activables par une protéase modèle, la PGA. Ces travaux vont être développés dans le chapitre suivant.

Tableau 1. Propriétés spectrales des hétéro-xanthènes synthétisés et présentés dans ce premier chapitre.

| Molécule | Absorbance λ_{max} (nm) | Émission λ_{max} (nm) | Coeff. d'absorption molaire ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$) | Rendement quantique ϕ_F |
|--|------------------------------------|----------------------------------|--|--|
|  GD17 | 634 | 673 | 19 570 | 14% (CH ₃ CN + 10 % TFA) |
|  GD34 | 643 | 687 | 17 420 | 6% (H ₂ O + 0,1% acide formique) |
|  GD81 | 580 | 597 | 40 050 | 89% (H ₂ O + 0,1% acide formique) |
|  GD99 | 625 | 651 | 45 930 | 27% (PBS, pH 7,4) |
|  GD192 | 620 | 640 | 40 630 | 42% (PBS, pH 7,4) |

Chapitre 2

Sondes de type "*covalent assembly*"
conduisant à la formation *in situ*
d'hétéro-pyronines fluorescentes

Ce deuxième chapitre est consacré à la synthèse de nouvelles sondes de type "*covalent assembly*" conduisant à la formation des Si-pyronines non symétriques stables à pH physiologique, *i.e.*, **GD99** et **GD192** décrites dans le chapitre précédent. Dans un premier temps, le concept de l'assemblage covalent sera illustré à l'aide de quelques exemples issus de la littérature. Une attention particulière sera accordée aux travaux portant sur la formation *in situ* de dérivés pyronines. Les travaux portant sur le développement de précurseurs "cagés" conduisant après activation enzymatique à la génération *in situ* d'un colorant fluorescent de type Si-pyronine seront détaillés dans la partie suivante. Les différentes stratégies envisagées ainsi que les difficultés rencontrées seront discutées.

I. État de l'Art

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction générale, les fluorophores organiques sont des marqueurs de choix pour étudier de nombreux phénomènes biologiques et cela dans divers contextes biologiques plus ou moins complexes (allant du *in vitro* au *in vivo*). De plus, la conception de sondes fluorogéniques mettant en jeu un fluorophore repose généralement sur la mise en œuvre d'un ou de plusieurs processus photophysiques différents (PeT, ICT, ESIPT, FRET, ...) qui permette(nt) de moduler efficacement les propriétés spectrales de ce marqueur ; il résulte souvent de cela un cahier des charges varié et spécifique de l'application souhaitée. Notre projet de détection d'enzymes en microbiologie repose sur la conception de sondes de type "*covalent assembly*". Dans cette partie, ce principe non-usuel de sondes fluorogéniques va être présenté au travers des premiers travaux publiés dans la littérature au milieu des années 2000 jusqu'à son application plus récente à la formation *in situ* de pyronines fluorescentes.

I.1. Sondes de types "*covalent assembly*"

I.1.1. Concept général

Le principe connu sous l'anglicisme "*covalent assembly*" a été mis en avant et conceptualisé par le Prof. E. Anslyn en 2010 dans un éditorial du *Journal of The American Chemical Society*¹ même si celui-ci a été mis en œuvre dans différentes applications de détection au milieu des années 2000. Il est basé sur la conception et l'utilisation de précurseurs moléculaires "cagés" (en théorie non fluorescents et dont la structure ne s'apparente pas à celle d'un fluorophore) qui peuvent être convertis *in situ* en cœur fluorescent, *via* des réactions domino déclenchées par l'analyte ciblé (Figure 1).

¹ E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15833-15835.

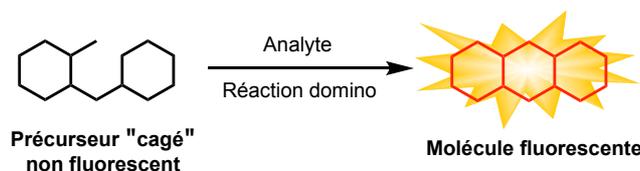


Figure 1. Représentation schématique du principe d'activation des sondes fluorogéniques de type "covalent assembly".

L'avantage principal de ces sondes par rapport aux sondes pro-fluorescentes dites conventionnelles, dont les différents mécanismes d'activation ont été décrits dans l'introduction générale, est (en règle générale) l'absence de fluorescence résiduelle du précurseur "cagé". En effet, pour rappel, la structure générale des sondes dites conventionnelles repose le plus souvent sur un fluorophore organique modifié chimiquement par un ou plusieurs motifs capables d'éteindre la fluorescence selon différents mécanismes² et spécifiquement reconnu(s) et clivé(s) par l'analyte ciblé. Si l'extinction de fluorescence causée par la modification chimique n'est pas totale, la fluorescence résiduelle du composé va induire un bruit de fond élevé de la matrice ou du milieu à analyser/observer et ainsi impacter négativement le rapport S/N inhérent à l'analyse. Généralement, l'approche utilisée pour effectuer cette modification structurale est la substitution de l'aniline primaire (ou secondaire) ou du phénol d'un fluorophore. En dépit de la simplicité de mise en œuvre de cette approche, elle est limitée par les motifs de reconnaissance utilisables ainsi que les réactions possibles pour la libération du fluorophore, même si l'utilisation d'un bras espaceur auto-immolable peut dans certains cas pallier ce manque de versatilité³. En revanche, l'approche "covalent assembly" va permettre l'utilisation de divers mécanismes de déclenchement, dépendants de la nature de l'analyte ciblé et des motifs de reconnaissance choisis, car le précurseur "cagé" ne sera pas obligatoirement un dérivé d'aniline ou de phénol fluorescent. Un autre avantage de cette stratégie est la non réversibilité du processus de réaction domino qui permet la création des nouvelles liaisons covalentes impliquées dans le système conjugué de type "push-pull" du fluorophore formé.

I.1.2. Historique et exemples

La première sonde basée sur ce principe a été développée par le groupe de T. Swager en 2003 mais curieusement ce concept très novateur à l'époque n'a pas été mis en avant⁴. Elle permet la détection des ions fluorures (F⁻) *via* la formation d'une coumarine fluorescente faisant suite à la rupture de la liaison Si-O du précurseur "cagé" et à une réaction de lactonisation *via* un processus de transestérification (Figure 2). En fonction de la nature du substituant R, il est possible d'obtenir des émissions de fluorescence pour la coumarine formée, dans la gamme spectrale du violet-bleu (R = H or NEt₂, λ_{\max} = 415 ou 450 nm avec ϕ_F = 12% ou 81% dans le CH₂Cl₂) ou du vert (R = 5-(2-

² J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.*, **2012**, 4, 973-984.

³ Pour des revues sur les bras espaceurs auto-immolables : a) S. Gnaim, D. Shabat, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, 47, 2970-2984 ; b) A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 7492-7509.

⁴ T.-H. Kim, T. M. Swager, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4803-4806.

thiényl)thiën-2-yle, $\lambda_{\text{max}} = 529 \text{ nm}$ avec $\phi_{\text{F}} = 37\%$ dans le CH_2Cl_2). Ce concept a été étendu à la conception d'un polymère semi-conducteur "intelligent" qui permet d'amplifier le signal de fluorescence induit par les ions F^- .

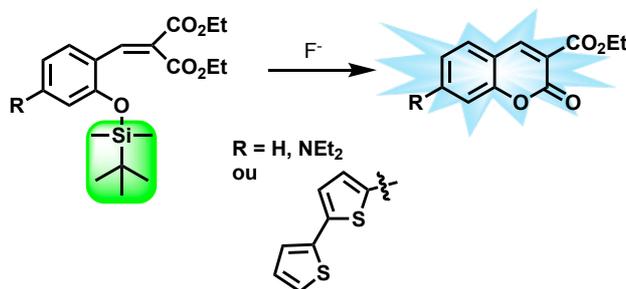


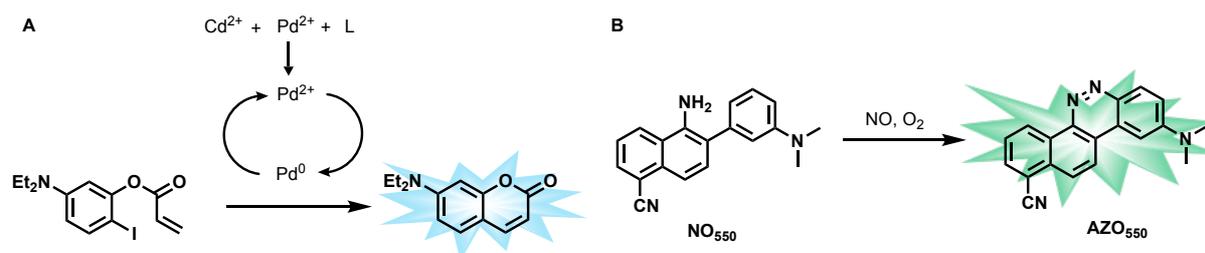
Figure 2. Principe et activation de la première sonde de type "covalent assembly" développée par le groupe de T. M. Swager⁴ pour la détection fluorogénique "Off-On" des ions fluorure.

Quelques années plus tard, le groupe de E. Anslyn publie plusieurs travaux qui s'inspirent de ce principe de détection mettant en jeu la formation *in situ* d'une coumarine fluorescente. Ainsi, en 2005, ils améliorent un système de détection de certains métaux lourds toxiques comme le Cd^{2+} publié précédemment et fondé sur la formation *in situ* du 3-méthylindole fluorescent⁵ ; le mécanisme de détection est basé sur une réaction de Heck pallado-catalysée, qui permet une cyclisation intramoléculaire et conduit cette fois-ci à la formation d'une 7-(diéthylamino)coumarine fluorescente (Figure 3A)⁶. La source de Pd^0 requise pour effectuer la réaction de Heck est un complexe entre le Pd^{2+} et un ligand poly-aza macrocyclique (*i.e.*, le 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane). Le cation métallique divalent à détecter ayant une meilleure affinité pour ce ligand, une réaction de déplacement se produit ; le cation Pd^{2+} libéré est ensuite réduit en Pd^0 par une phosphine ajoutée dans le milieu et peut catalyser la réaction de formation du cœur fluorescent. Cette modification a permis d'accélérer la cinétique de formation du fluorophore (30 min vs. 90 min). En 2010, ils étendent le concept à la formation *in situ* de fluorophores absorbant et émettant à des longueurs d'onde plus lointaines donc plus compatibles avec des applications en milieu cellulaire. Ils ont notamment développé une sonde nommée **NO₅₅₀**, pour la détection du monoxyde d'azote (NO) dont la réaction avec cet analyte permet d'obtenir une émission de fluorescence intense dans la gamme spectrale du vert imputable à la formation du fluorophore non usuel **AZO₅₅₀**⁷ (Figure 3B).

⁵ Q. Wu, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 14682-14683.

⁶ Q. Wu, E. V. Anslyn, *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 2815-2819.

⁷ Y. Yang, S. K. Seidlits, M. M. Adams, V. M. Lynch, C. E. Schmidt, E. V. Anslyn, J. B. Shear, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 13114-13116.



Depuis, ce concept a été largement appliqué à la détection *in vitro* de nombreux analytes (e.g., cations métalliques^{8a,c,h,i,k,m,n}, enzymes^{8b,j,r,s}, ROS^{8f,t}, thiols biologiques^{8d,e,g,l,o,p,q,u}) via la formation *in situ* de 7-hydroxy ou 7-*N,N*-dialkylamino(2-imino)coumarines par réaction de lactonisation ou de cyclisation de Pinner⁸. Notre groupe a d'ailleurs contribué à des avancées dans ce domaine^{8b} en développant la première sonde "dual-analyte"⁹, i.e., le précurseur "cagé" non fluorescent nécessite l'action de deux enzymes distinctes pour conduire à la formation *in situ* d'un dérivé 7-hydroxy-2-iminocoumarine fluorescent (Figure 4).

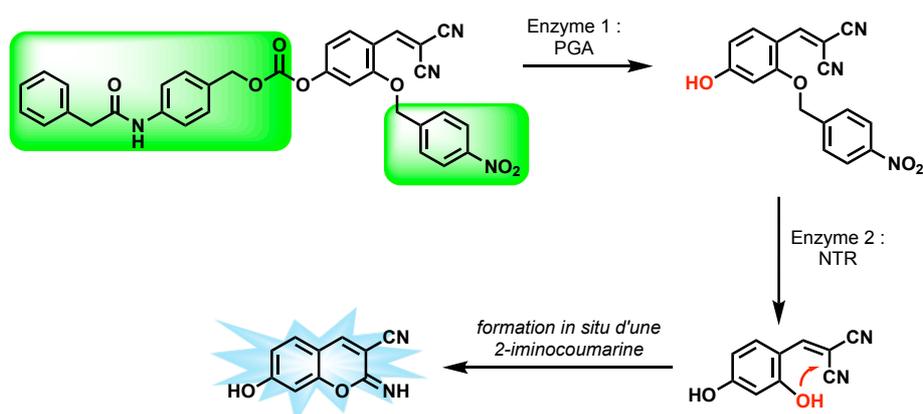


Figure 4. Mécanisme de formation *in situ* d'un dérivé 7-hydroxy-2-iminocoumarine suite à l'activation successive d'un précurseur "cagé" par deux enzymes distinctes, la pénicilline G amidase/acylase (PGA) et une nitroréductase (NTR). Approche "dual analyte" développée par S. Debieu et A. Romieu^{8b}.

⁸ Pour quelques exemples de formation *in situ* de dérivés coumarines fluorescents, voir : a) J. H. Do, H. N. Kim, J. Yoon, J. S. Kim, H.-J. Kim, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 932-934 ; b) S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 10348-10361 ; c) Y. Han, C. Yang, K. Wu, Y. Chen, B. Zhou, M. Xia, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 16723-16726 ; d) P. K. Mishra, T. Saha, P. Talukdar, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 7430-7436 ; e) H. Mohapatra, H. Kim, S. T. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 12498-12501 ; f) H. Zhang, Y. Xie, P. Wang, G. Chen, R. Liu, Y.-W. Lam, Y. Hu, Q. Zhu, H. Sun, *Talanta*, **2015**, *135*, 149-154 ; g) J. Zhang, Y. Li, W. Guo, *Anal. Methods*, **2015**, *7*, 4885-4888 ; h) Y. Chen, B. Chen, D. Luo, Y. Cai, Y. Wei, Y. Han, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 1192-1195 ; i) Y. Chen, M. Zhang, Y. Han, J. Wei, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 8380-8383 ; j) W. Feng, C. Gao, W. Liu, H. Ren, C. Wang, K. Ge, S. Li, G. Zhou, H. Li, S. Wang, G. Jia, Z. Li, J. Zhang, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 9434-9437 ; k) Z. Hu, J. Hu, H. Wang, Q. Zhang, M. Zhao, C. Brommesson, Y. Tian, H. Gao, X. Zhang, K. Uvdal, *Anal. Chim. Acta*, **2016**, *933*, 189-195 ; l) W. Chen, X. Yue, W. Li, Y. Hao, L. Zhang, L. Zhu, J. Sheng, X. Song, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2017**, *245*, 702-710 ; m) J. Hu, T. Liu, H.-W. Gao, S. Lu, K. Uvdal, Z. Hu, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2018**, *269*, 368-376 ; n) B. Huo, M. Du, A. Gong, M. Li, L. Fang, A. Shen, Y. Lai, X. Bai, Y. Yang, *Anal. Methods*, **2018**, *10*, 3475-3480 ; o) Y. Kim, M. Choi, S. V. Mulay, M. Jang, J. Y. Kim, W.-H. Lee, S. Jon, D. G. Churchill, *Chem. -Eur. J.*, **2018**, *24*, 5623-5629 ; p) L. Yang, Y. Su, Y. Geng, Y. Zhang, X. Ren, L. He, X. Song, *ACS Sensors*, **2018**, *3*, 1863-1869 ; q) L. Yang, Y. Liu, Y. Li, H. Wang, H. Zhang, J. Xu, L. Ji, Q. Wang, G. He, *Tetrahedron*, **2019**, 130538 ; r) L. Xia, Y. Tong, L. Li, M. Cui, Y. Gu, P. Wang, *Talanta*, **2019**, *204*, 431-437 ; s) H. Qin, L. Li, K. Li, Y. Xiaoqi, *Chin. Chem. Lett.*, **2019**, *30*, 71-74 ; t) L. Yang, Y. Zhang, X. Ren, B. Wang, Z. Yang, X. Song, W. Wang, *Anal. Chem.*, **2020**, *92*, 4387-4394 ; u) Y. Gan, G. Yin, T. Yu, Y. Zhang, H. Li, P. Yin, *Talanta*, **2020**, *210*, 120612.

⁹ Pour des revues sur le principe des sondes fluorogéniques "multi-analytes" : a) A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 1294-1306 ; b) J. L. Kolanowski, F. Liu, E. J. New, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 195-208.

Plus récemment, l'émergence de l'approche théranostique a conduit d'autres groupes de recherche académique à tirer profit de cette approche pour concevoir des pro-drogues fluorogéniques¹⁰. Ainsi, plusieurs travaux portant sur la synthèse de nouveaux composés permettant à la fois le diagnostic (*via* l'imagerie moléculaire de fluorescence) et le traitement de certaines pathologies ont été publiés¹¹.

Par exemple, le groupe de S. Wang a publié, en 2016 puis 2018, deux nouveaux agents théranostiques, **GMC-CA_E-NO₂** et **FDU-DB-NO₂**, activés spécifiquement dans des conditions hypoxiques (*i.e.*, manque d'oxygène au niveau des tissus) et à l'aide d'une irradiation UV-A ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$) supplémentaire pour le **GMC-CA_E-NO₂**^{11b, c}. En effet, ces deux sondes sont sensibles aux nitroréductases (NTR), enzymes redox surexprimées au sein des tumeurs hypoxiques. Ainsi, lorsque les sondes se trouvent au sein de cellules cancéreuses, l'élimination du motif de reconnaissance *para*-nitrobenzyle (*via* un processus de bioréduction du groupement NO₂ par la NTR et une élimination 1,6 du bras espaceur auto-immolable nouvellement formé) va permettre la libération du phénolate qui va cycliser sur l'ester adjacent pour conduire à la formation d'un dérivé coumarine émettant dans le bleu (cas de **GMC-CA_E-NO₂**) ou dans le vert (cas de **FDU-DB-NO₂**) et d'un agent anticancéreux, la gemcitabine¹² et la floxuridine¹³ respectivement (Figure 5).

¹⁰ Pour des revues sur les agents théranostiques à base de petites molécules, voir : a) R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 6670-6683 ; b) M. H. Lee, A. Sharma, M. J. Chang, J. Lee, S. Son, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 28-52 ; c) H.-W. Liu, L. Chen, C. Xu, Z. Li, H. Zhang, X.-B. Zhang, W. Tan, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 7140-7180.

¹¹ Pour des travaux sur l'utilisation du principe de l'assemblage covalent dans la synthèse d'agents théranostiques, voir : a) W. Feng, C. Gao, W. Liu, H. Ren, C. Wang, K. Ge, S. Li, G. Zhou, H. Li, S. Wang, G. Jia, Z. Li, J. Zhang, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 9434-9437 ; b) W. Liu, H. Liu, X. Peng, G. Zhou, D. Liu, S. Li, J. Zhang, S. Wang, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29*, 3332-3343 ; c) X. Peng, J. Gao, Y. Yuan, H. Liu, W. Lei, S. Li, J. Zhang, S. Wang, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, *30*, 2828-2843.

¹² Pour des publications sur l'efficacité de la gemcitabine pour le traitement de certains cancers : a) des poumons : S. Noble, K. L. Goa, *Drugs*, **1997**, *54*, 447-472 ; b) des ovaires : D. Lorusso, A. Di Stefano, F. Fanfani, G. Scambia, *Ann. Oncol.*, **2006**, *17*, v188-v194 ; c) du sein : J. Carmichael, K. Possinger, P. Phillip, M. Beykirch, H. Kerr, J. Walling, A. L. Harris, *J. Clin. Oncol.*, **1995**, *13*, 2731-2736 et d) du pancréas : H. A. Burris, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens, D. D. Von Hoff, *J. Clin. Oncol.*, **1997**, *15*, 2403-2413.

¹³ M. Hu, P. Huang, Y. Wang, Y. Su, L. Zhou, X. Zhu, D. Yan, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 2497-2506.

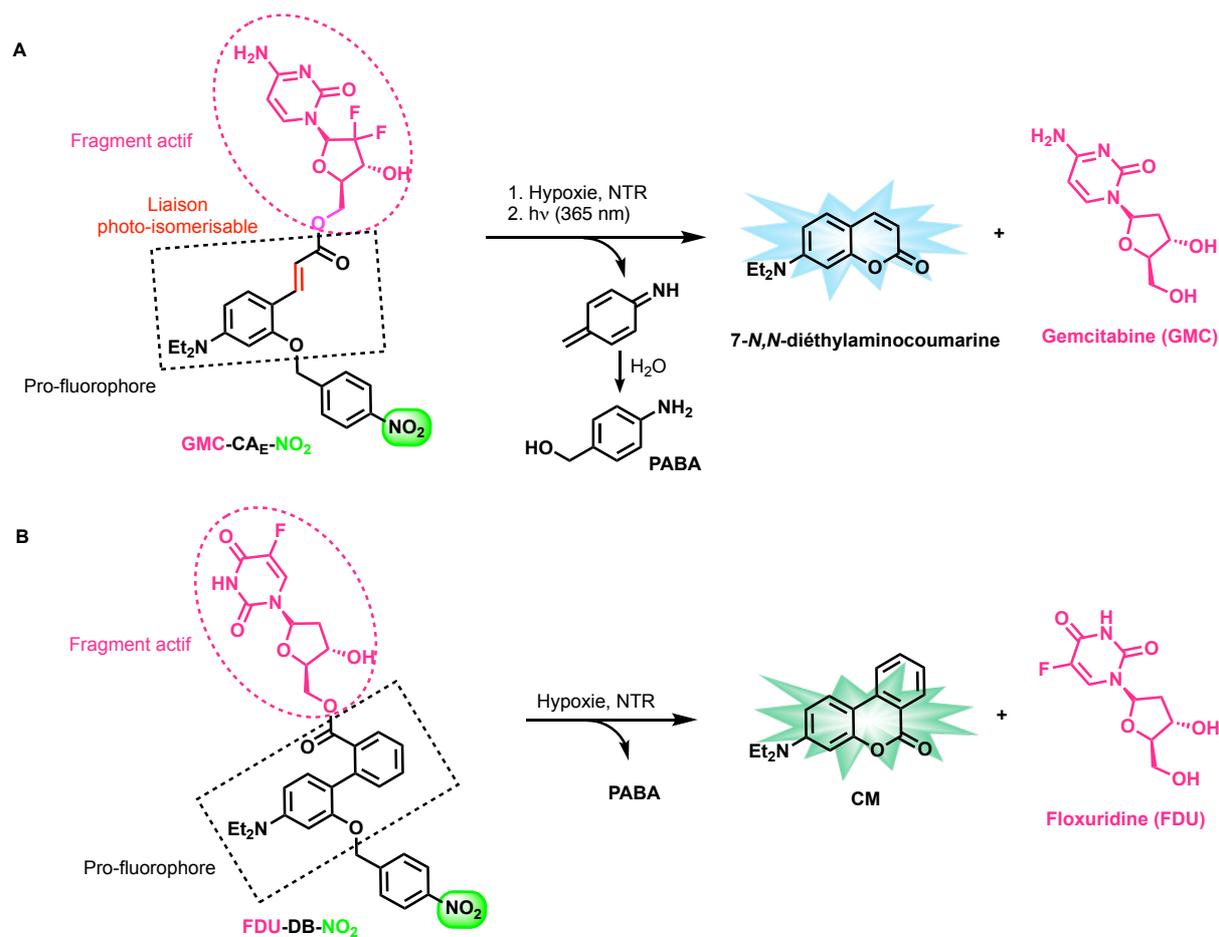


Figure 5. Agents théranostiques de type pro-drogues fluorogéniques activés au sein de cellules cancéreuses en conditions hypoxiques, basés sur le principe du "covalent assembly" et développés par le groupe de S. Wang^{11b,c}.

Malgré le fait que l'approche de synthèse *in situ* de fluorophores ait été mise en avant en 2010¹, le terme "covalent assembly" a été introduit en 2014 par Y. Yang (ancien chercheur post-doctoral au sein du laboratoire de E. Anslyn et actuellement professeur au sein de l'Université des Sciences et Technologies de la Chine de l'Est, Shanghai) et désigne la synthèse *in situ* d'un fluorophore organique appliqué à la détection ou l'imagerie de (bio)analytes d'intérêt. Les travaux de son groupe, qui vont être développés dans la partie suivante, sont les premiers exemples de formation d'un cœur xanthène à partir d'un précurseur acyclique non fluorescent et selon une réaction domino déclenchée par l'analyte à détecter.

I.2. Sondes de types "covalent assembly" conduisant à la formation *in situ* de cœurs xanthène

I.2.1. Travaux du groupe de Y. Yang

Les premiers travaux de Y. Yang et ses collaborateurs publiés dans le *Journal of the American Chemical Society*¹⁴ portent sur la détection *in vitro* du gaz sarin (agent innervant de la série G) et

¹⁴ Z. Lei, Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 6594-6597.

de ses analogues plus facilement manipulables au laboratoire (e.g., le chlorophosphate de diéthyle, DCP). La formation *in situ* de la pyronine B à partir d'un précurseur non fluorescent de type éther d'aryle mixte (**NA570**) met en jeu l'activation de groupement formyle par l'agent électrophile à détecter (chlorure, bromure ou fluorure de phosphoryle). S'ensuit une réaction de cyclisation-aromatisation avec départ de l'acide phosphorique (R = R' = OEt), phosphinique (R = R' = alkyle) ou dihalogénophosphoryle (R = R' = halogène) qui est un bon groupe nucléofuge (Figure 6A).

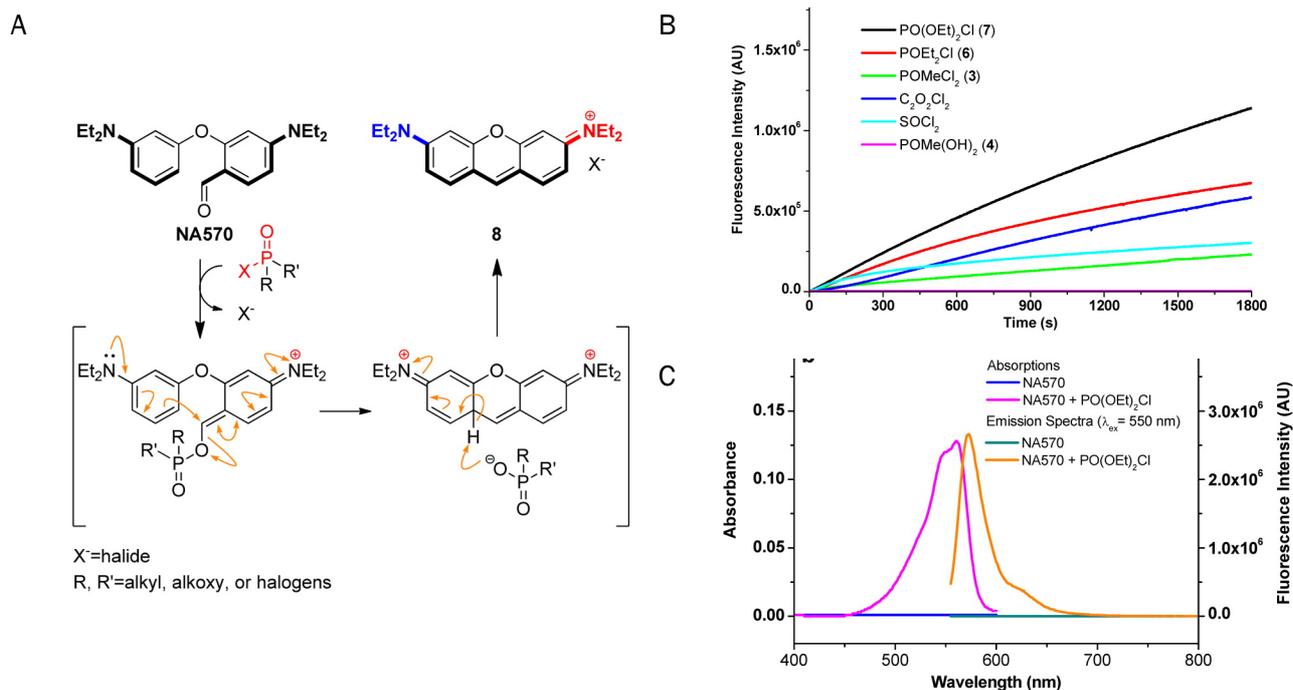


Figure 6. (A) Mécanisme proposé par le groupe de Y. Yang pour expliquer la formation *in situ* de la pyronine B à partir de la sonde **NA570** et déclenchée par l'analogue du sarin à détecter. (B) Suivi de la cinétique de formation de la pyronine B à partir de **NA570** (50 μM) mis en présence de divers analogues du Sarin (1 équiv.) dans le chlorobenzène (Ex./Em. 563/573 nm). (C) Spectres d'absorption/émission (Ex. 550 nm) de la sonde **NA570** (bleu et vert respectivement) et de la pyronine B formée *in situ* (rose et orange respectivement) enregistrés dans le chlorobenzène. Illustrations issues des travaux du groupe de Y. Yang¹⁴. © 2014 American Chemical Society.

La réponse fluorogénique de la sonde **NA570** vis-à-vis de différents organophosphorés a été testée en milieu organique (le chlorobenzène étant identifié comme le solvant le plus adapté) et montre une bonne sensibilité de celle-ci aux analytes évalués. De plus, aucune cyclisation spontanée n'est observée lorsque la sonde est mise seule en solution dans un solvant organique (Figure 6B,C). La structure de la sonde est importante pour favoriser la cyclisation intramoléculaire. L'atome de carbone (qui sera la future position 9 du cœur xanthène formé) doit être suffisamment déficient en électrons afin de subir l'attaque nucléophile intramoléculaire de l'amine phénylogue adjacente. Le motif phényle de **NA570** est donc choisi de façon à pouvoir favoriser cette attaque. En effet, le groupe électro-donneur NEt₂, en position *para*, permet d'augmenter la densité électronique de ce cycle benzénique favorisant alors ce type de réaction (stratégie généralement mise en œuvre pour favoriser les réactions de Friedel-Crafts et/ou de Vilsmeier-Haack).

Concernant les seconds travaux, publiés la même année dans le journal *Analytical Methods*¹⁵, ils portent sur la détection des cations Hg^{2+} au sein de cellules vivantes HeLa (Figure 7). Ici, le mécanisme de formation de la pyronine B fait intervenir comme étape clé une réaction de déprotection d'un motif dithiane suivie d'une attaque nucléophile de l'amine phénylogue, puis du départ d'un proton et du complexe de Hg^{2+} -1,2-éthanedithiol pour obtenir le fluorophore désiré (Figure 8-A). Ce travail est une avancée majeure dans le domaine car c'est la première fois que la formation d'un cœur xanthène fluorescent en milieu aqueux et à pH physiologique (à la fois en tampon HEPES, 10 mM, pH 7,4 et dans le contexte cellulaire) est démontrée.

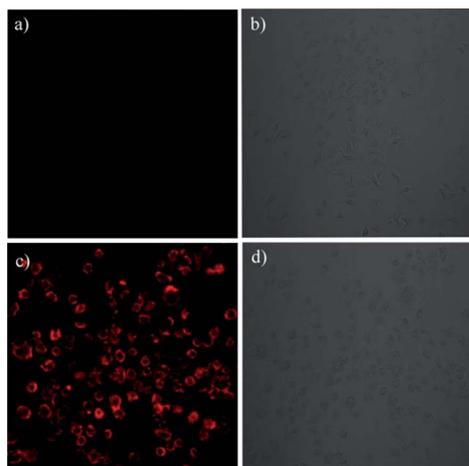


Figure 7. (a) Image de fluorescence confocale des cellules HeLa traitées avec seulement Hg570 (5 μM) pendant 30 minutes à température ambiante. (b) Contraste de phase pour (a). (c) Image de fluorescence des cellules HeLa traitées avec Hg570 (5 μM) et Hg^{2+} (5 μM). (d) Contraste de phase pour (c). Le laser a été excité à 561 nm et les longueurs d'ondes d'émissions ont été collectées de 570 à 620 nm. Illustration issue des travaux du groupe de Y. Yang¹⁵. © 2014 Royal Society of Chemistry.

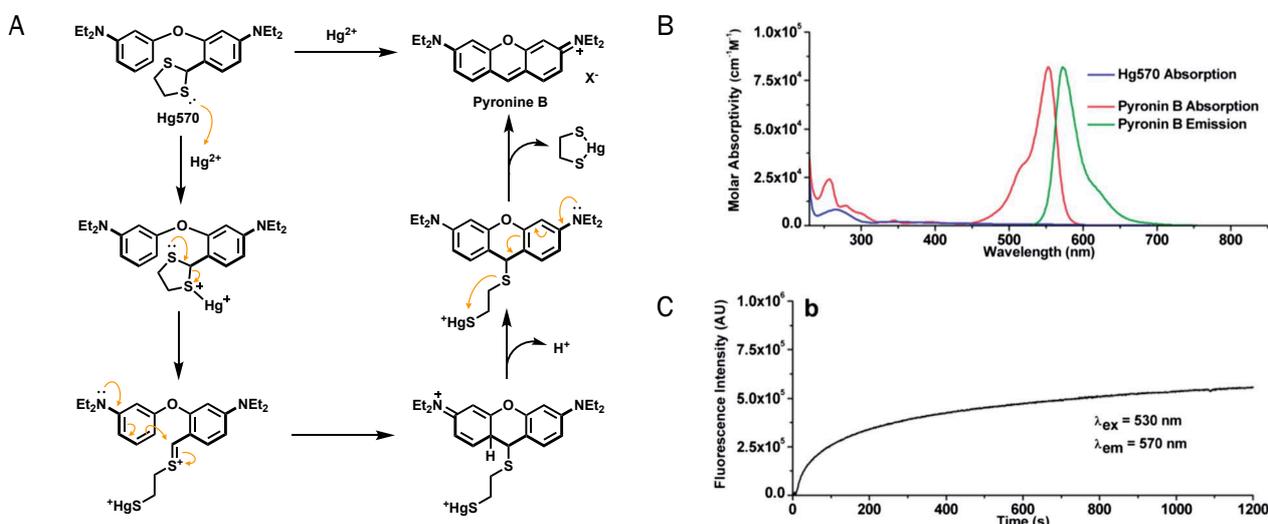


Figure 8. (A) Mécanisme proposé par le groupe de Y. Yang pour expliquer la formation *in situ* de la pyronine B à partir de la sonde Hg570 et déclenchée par les cations Hg^{2+} à détecter. (B) Spectre d'absorption de la sonde Hg570 (bleu) et spectres d'absorption/émission (Ex. 530 nm) de la pyronine B (rose et vert respectivement) enregistrés dans le tampon HEPES + 5% DMSO (10 mM, pH = 7,4). (C) Suivi de la cinétique de formation de la pyronine B à partir de Hg570 après addition de 0,5 équivalent de Hg^{2+} dans une solution à 10 μM de sonde dans le tampon HEPES + 5% DMSO (10 mM, pH = 7,4). Illustration issue des travaux du groupe de Y. Yang¹⁵. © 2014 Royal Society of Chemistry.

Il est important de souligner que le mécanisme de déprotection du motif 1,3-dithiane par le cation Hg^{2+} n'est pas habituel. En effet, l'attaque nucléophile du phényle adjacent prévaut sur

¹⁵ L. Song, Z. Lei, B. Zhang, Z. Xu, Z. Li, Y. Yang, *Anal. Methods*, **2014**, *6*, 7597-7600.

l'addition d'eau sur l'intermédiaire thiominium électrophile (qui conduit normalement à l'élimination complète de ce groupe protecteur du carbonyle). La principale force motrice de la réaction est l'élimination du cycle à 5 chaînons 1,3,2-dithiamercuriolane qui est à l'origine de la ré-aromatization du cœur xanthène.

Dans ces deux articles, l'absence totale de fluorescence résiduelle des précurseurs de départ **NA570** et **Hg570** est une caractéristique remarquable et met en lumière le principal avantage des sondes de type "covalent assembly", notamment pour augmenter le rapport S/N (Figure 6C et Figure 8B,C).

Les travaux prospectifs et remarquables du groupe de Y. Yang ont donc été une source d'inspiration pour la thématique de recherche de notre groupe relative à l'application du principe "covalent assembly" à la détection d'enzymes d'intérêt *via* la formation *in situ* de pyronines.

I.2.2. Travaux de notre groupe

Depuis sa nomination à l'Université de Bourgogne en septembre 2013, le Prof. A. Romieu a dédié une partie de ses efforts de recherche à l'application de la synthèse *in situ* de fluorophores organiques pour la détection d'activités enzymatiques d'intérêt, dans le but d'appliquer ce concept prometteur à des applications en imagerie de fluorescence *in vivo*.

I.2.2.1. Enzymes ciblées

Les enzymes sont des catalyseurs hautement spécifiques d'une réaction biochimique donnée. De ce fait, leur diversité est aussi large que celle des phénomènes biologiques existant chez le vivant, ce qui explique les nombreuses études et utilisations dans les domaines des biotechnologies¹⁶ et de la bioimagerie¹⁷. Dans notre cas, nous avons fait le choix d'étudier (du moins dans un premier temps) et de travailler sur des enzymes facilement manipulables, robustes (*i.e.*, stables en présence d'un certain pourcentage de solvant organique dans le tampon aqueux de réaction si la solubilité médiocre de la sonde l'exige), tolérantes (dans une certaine mesure) à la variabilité structurale de son substrat naturel (pour éviter les problèmes de non-reconnaissance de la sonde), bon marché et facilement accessibles.

Pour la validation de nos sondes, l'enzyme modèle utilisée et répondant à la majorité des critères énoncés ci-dessus est la PGA ("*Penicillin G-acylase*" ou "*penicillin amidase*", EC.3.5.1.11)¹⁸. Elle fait partie de la famille des hydrolases et catalyse spécifiquement l'hydrolyse des liens phénylacétamides. Elle est peu chère¹⁹, son substrat est facilement accessible *via* une réaction

¹⁶ Pour un ouvrage sur les utilisations des enzymes, voir : H.-C. Yang, W.-K. Yeh, J. R. McCarthy, *Enzyme Technologies: Pluripotent Players in Discovering Therapeutic Agents*. 1ère édition Ed., John Wiley & Sons, **2014**.

¹⁷ Pour des revues sur les sondes optiques enzymo-activables, voir : a) C. R. Drake, D. C. Miller, E. F. Jones, *Curr. Org. Synth.*, **2011**, 8, 498-520; b) H. Wei, G. Wu, X. Tian, Z. Liu, *Future Med. Chem.*, **2018**, 10, 2729-2744.

¹⁸ R. Virden, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1990**, 8, 189-218.

¹⁹ PGA de *Escherichia coli* 1250 Unités pour 109 euros. Voir le site internet de Merck (visité le 26/05/2020) <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/76427?lang=fr®ion=FR>.

d'amidification avec le chlorure de phénylacétyle commercial (PhAcCl). De plus, une fois introduit sur le motif aniline d'un fluorophore ou d'un bras espaceur auto-immolable (e.g., *para*-aminobenzyle introduit en utilisant des dérivés de l'alcool *para*-aminobenzyle (PABA)), le motif PhAc est totalement stable. Cette enzyme est également disponible immobilisée sur un support polymérique, ce qui permet d'accroître sa tolérance aux solvants organiques (e.g., tampon phosphate avec 10% d'acétone ou 20% de méthanol), ce qui a notamment permis d'utiliser le motif de reconnaissance PhAc comme groupe protecteur enzymo-labile en chimie organique²⁰. Outre les applications en biotechnologie (synthèse d'antibiotiques β -lactame, activation de pro-drogues dans le contexte de la chimiothérapie¹⁶), elle peut être une cible intéressante dans le contexte du diagnostic microbiologique (*via* la détection de bactéries exprimant cette enzyme) comme le montrent plusieurs travaux récemment publiés²¹.

Concernant les enzymes plus pertinentes sur le plan biologique et/ou biomédical et déjà identifiées comme des biomarqueurs avérés de pathologies, les aminopeptidases et les nitroréductases (NTRs) ont été choisies comme cibles en accord avec notre parrain industriel bioMérieux.

Les aminopeptidases sont une famille d'enzymes capables d'hydrolyser des liaisons peptidiques terminales (exopeptidases). Parmi elles se trouve la leucine aminopeptidase (LAP)²² dont le substrat, l'amide de la L-leucine, a une structure simple et facile à mettre en place, le plus souvent *via* une réaction d'amidification entre une aniline et un dérivé *N*-protégé de la L-leucine. D'un point de vue biologique, elle pourrait avoir un rôle dans la malignité de certains cancers²³ et jouerait un rôle dans certaines résistances aux chimiothérapies anticancéreuses notamment dans le cadre d'un traitement au cisplatine²⁴. Les sondes fluorogéniques, sensibles à la LAP présentent généralement une bonne solubilité à pH physiologique du fait de la présence de l'amine primaire du résidu leucine protonée à ce pH. Malgré une plus faible spécificité de la LAP pour le motif L-leucinyne que la PGA pour le motif PhAc, elle peut permettre de valider les concepts d'activation de

²⁰ Pour une revue sur les groupes protecteurs enzymo-labiles, voir : D. Kadereit, H. Waldmann, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3367-3396.

²¹ a) J. Wang, Q. Chen, J. Wu, W. Zhu, Y. Wu, X. Fan, G. Zhang, Y. Li, G. Jiang, *New J. Chem.*, **2019**, *43*, 6429-6434; b) Z. Tian, L. Feng, L. Li, X. Tian, J. Cui, H. Zhang, C. Wang, H. Huang, B. Zhang, X. Ma, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2020**, *310*, 127872; c) L. Li, L. Feng, M. Zhang, X. He, S. Luan, C. Wang, T. D. James, H. Zhang, H. Huang, X. Ma, *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 4640-4643.

²² M. Matsui, J. H. Fowler, L. L. Walling, *Biol. Chem.*, **2006**, *387*, 1535-1544.

²³ Pour des publications sur le sujet : a) S. Mizutani, K. Shibata, F. Kikkawa, A. Hattori, M. Tsujimoto, M. Ishii, H. Kobayashi, *Expert Opin. Ther. Targ.*, **2007**, *11*, 453-461; b) S.-Y. Tian, S.-H. Chen, B.-F. Shao, H.-Y. Cai, Y. Zhou, Y.-L. Zhou, A.-B. Xu, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2014**, *7*, 3752-3762; c) X. He, L. Li, Y. Fang, W. Shi, X. Li, H. Ma, *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, 3479-3483.

²⁴ Q. Gong, W. Shi, L. Li, H. Ma, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 788-792.

sondes à protéases^{25,26}. Parmi cette famille des aminopeptidases, la β -alanine aminopeptidase fait également partie des enzymes que l'on cible et sera évoquée plus en détails dans le quatrième chapitre de ce manuscrit.

Les NTR constituent une classe d'enzymes capables de réduire les composés nitroaromatiques (par exemple, la nitrofurazone utilisée comme antibiotique, ou le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) utilisé comme explosif)²⁷. En utilisant le NADH ou NADPH comme co-facteur, elles catalysent un transfert d'électrons pour générer successivement le composé nitroso, le dérivé hydroxylamine et finalement l'amine correspondante. Largement présentes au sein de différentes bactéries²⁸, elles sont une cible de choix pour détecter des infections bactériennes chez l'humain²⁹. Du fait de leur surexpression dans les tumeurs cancéreuses hypoxiques, de nombreux groupes académiques ont réalisé des travaux dont la finalité est de détecter/imager ces enzymes (au même titre que les activités azoréductase (AzoR) et quinone-réductase (D,T-diaphorase)) en utilisant différentes modalités dont la fluorescence^{30,31}. La conception d'agents thérapeutiques activés spécifiquement par ces réductases sont également très étudiés³².

I.2.2.2. Détection d'une activité enzymatique *via* la formation *in situ* de pyronines

Récemment, le Dr. S. Debieu (qui a préparé sa thèse au sein de notre groupe, thèse de l'Université de Bourgogne, 2014-2017) a montré, pour la première fois, qu'il était possible de déclencher la formation *in situ* d'une pyronine en milieu aqueux, à pH physiologique, à l'aide d'une activité enzymatique de type peptidase³³.

Deux précurseurs "cagés" respectivement réactifs vis-à-vis de la LAP et de la PGA ont été synthétisés et leur conversion en pyronine non-symétrique **AR116** a été démontrée par des mesures de fluorescence et des analyses HPLC-MS et HPLC-fluorescence (Figure 9). Cette pyronine

²⁵ Pour des exemples de sondes fluorogéniques activées par la LAP : a) X.-b. Zhang, M. Waibel, J. Hasserodt, *Chem. -Eur. J.*, **2010**, *16*, 792-795 ; b) O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon, J. Hasserodt, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 6253-6255 ; c) S. Huang, Y. Wu, F. Zeng, J. Chen, S. Wu, *Anal. Chim. Acta*, **2018**, *1031*, 169-177.

²⁶ Pour une revue sur les sondes fluorescences pour la détection de la LAP, voir : Y. Chen, *Mater. Today Chem.*, **2020**, *15*, Article 100216.

²⁷ M. D. Roldán, E. Pérez-Reinado, F. Castillo, C. Moreno-Vivián, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 474-500.

²⁸ A. L. James, J. D. Perry, C. Jay, D. Monget, J. W. Rasburn, F. K. Gould, *Lett. Appl. Microbiol.*, **2001**, *33*, 403-408.

²⁹ Pour des revues sur le sujet, voir : a) B. Mills, M. Bradley, K. Dhaliwal, *Clin. Transl. Imaging*, **2016**, *4*, 163-174 ; b) M. M. Welling, A. W. Hensbergen, A. Bunschoten, A. H. Velders, H. Scheper, W. K. Smits, M. Roostenberg, F. W. B. van Leeuwen, *Clin. Transl. Imaging*, **2019**, *7*, 125-138.

³⁰ Pour des revues sur les sondes fluorogéniques permettant la détection de NTR, voir : a) A. Sandeep, T. C. Frederick, E. G. Edward, *Curr. Org. Synth.*, **2011**, *8*, 593-603 ; b) R. B. P. Elmes, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 8935-8956 ; c) Y. Zeng, J. Ma, S. Zhang, D. Wu, *Curr. Med. Chem.*, **2016**, *23*, 1775-1800 ; d) J.-n. Liu, W. Bu, J. Shi, *Chem. Rev.*, **2017**, *117*, 6160-6224 ; e) W. Qin, C. Xu, Y. Zhao, C. Yu, S. Shen, L. Li, W. Huang, *Chin. Chem. Lett.*, **2018**, *29*, 1451-1455.

³¹ Pour des travaux récents sur la détection des NTRs : a) L. Xia, F. Hu, J. Huang, N. Li, Y. Gu, P. Wang, *Sens. Actuators B: Chem.*, **2018**, *268*, 70-76 ; b) Y. Liu, W. Yan, H. Li, H. Peng, X. Suo, Z. Li, H. Liu, J. Zhang, S. Wang, D. Liu, *Anal. Methods*, **2019**, *11*, 421-426 ; c) X. Peng, J. Gao, Y. Yuan, H. Liu, W. Lei, S. Li, J. Zhang, S. Wang, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, *30*, 2828-2843 ; d) Z. Zhang, T. Lv, B. Tao, Z. Wen, Y. Xu, H. Li, F. Liu, S. Sun, *Bioorg. Med. Chem.*, **2020**, *28*, Article 115280.

³² Pour une revue sur le sujet, voir : A. Sharma, J. F. Arambula, S. Koo, R. Kumar, H. Singh, J. L. Sessler, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, *48*, 771-813.

³³ S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 2575-2584.

absorbe et émet dans la gamme spectrale du jaune-orange, son maximum d'absorption est à 527 nm et son maximum d'émission à 544 nm.

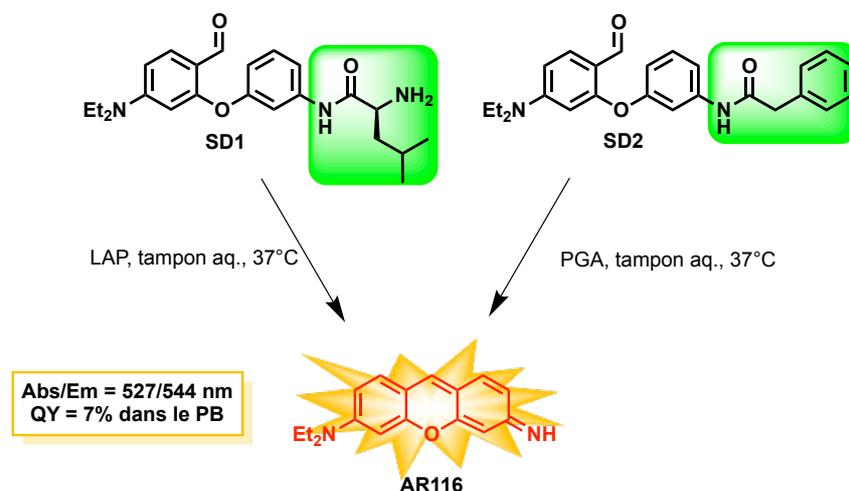
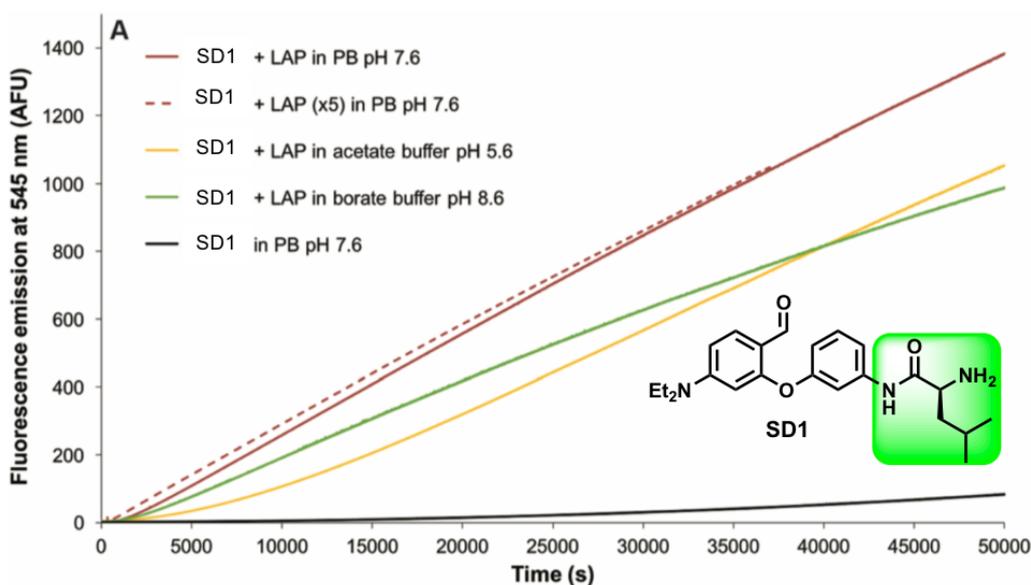


Figure 9. Structure et activation enzymatique des précurseurs "cagés" développés par le Dr. S. Debieu et conduisant à la formation *in situ* de la pyronine non-symétrique **AR116**³³.

Ces résultats sont prometteurs, toutefois, les cinétiques d'activation enzymatiques sont lentes. En effet, après 14 h, le plateau indiquant la conversion totale de la sonde en pyronine **AR116** n'a pas encore été atteint (Figure 10). Pour améliorer la cinétique du processus de cyclisation/aromatization conduisant à la formation du système conjugué de ce colorant xanthène, les leviers à actionner sont limités car la structure du cycle benzénique de l'aniline primaire substituée par le motif de reconnaissance de l'enzyme est difficilement modulable. Ainsi, la solution la plus évidente consiste à exalter l'électrophilie de l'atome de carbone de la fonction aldéhyde (future position 9 du cœur xanthène).



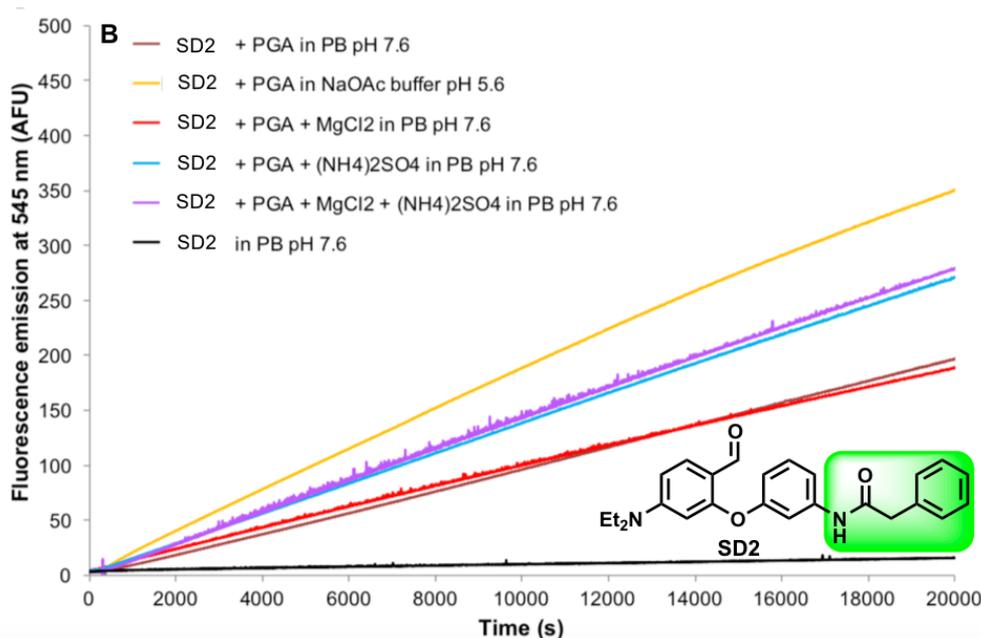


Figure 10. Évolutions de la fluorescence en fonction du temps (Ex./Em. 525/545 nm) de : (A) **SD1** (concentration : 1 μ M) en présence de LAP (2×10^{-3} U pour les lignes pleines et 10^{-2} U pour les lignes pointillées) et (B) **SD2** (concentration : 1 μ M) en présence de PGA (1 U) dans différents tampons aqueux à 37 °C. Illustrations issues de la publication de S. Debieu et A. Romieu.³³ © 2017 Royal Society of Chemistry.

I.2.2.3. Amélioration de la cinétique de formation de la pyronine **AR116** via l'emploi d'un accepteur de Michael

Dans le but d'améliorer la cinétique de formation de la pyronine **AR116** en conditions physiologiques, suite à l'activation enzymatique du précurseur "cagé" **SD2** de type éther d'aryle mixte, S. Debieu a converti le groupement formyle de ce composé en accepteur de Michael de type dicyanométhylidène par simple réaction de Knoevenagel avec le malononitrile (Figure 11A). Ainsi l'atome de carbone qui subit l'attaque nucléophile de l'amine phénylogue est plus réactif. Par ailleurs la base conjuguée du malononitrile étant un meilleur groupe nucléofuge que l'anion HO⁻, il est probable que l'étape d'élimination conduisant à la ré-aromatisation du cœur xanthène soit également favorisée. Ainsi, la cinétique d'activation de la sonde **SD3** est accélérée et ce de façon spectaculaire (Schéma 1 et Figure 11B)³⁴. Cependant, cette sonde à motif dicyanométhylidène présente un inconvénient que nous n'avons pas imaginé lors de sa conception. Cette molécule agit comme un fluorophore AIE ("Aggregation-Induced Emission")³⁵ et montre une émission large et intense dans la gamme spectrale du rouge (centrée à 600 nm, $\phi_F = 6\%$ dans le PB, 100 mM, pH 7,6). Ceci empêche la mise au point d'un schéma de détection intensiométrique de type "Off-On" et limite donc son utilisation à une détection de type ratiométrique.

³⁴ S. Debieu, A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2018**, 59, 1940-1944.

³⁵ Pour des revues sur la détection d'analytes basé sur l'AIE, voir : a) J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 11718-11940; b) Y. Hong, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2016**, 4, Article 022003; c) J. Shi, Y. Li, Q. Li, Z. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10, 12278-12294 d) L. Mao, Y. Liu, S. Yang, Y. Li, X. Zhang, Y. Wei, *Dyes Pigm.*, **2019**, 162, 611-623.

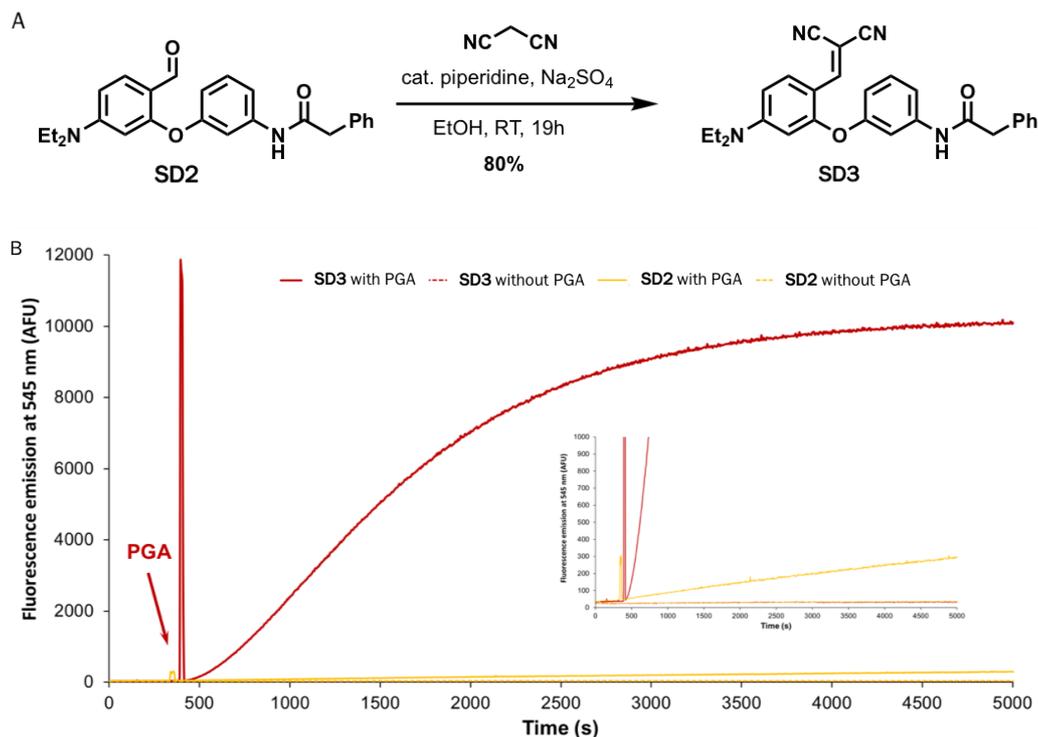


Figure 11. (A) Schéma de synthèse de la sonde **SD3** possédant un motif de type dicyanométhylidène. (B) Évolution de la fluorescence en fonction du temps (Ex./Em. 525/545 nm) de la sonde **SD2** (jaune) et **SD3** (rouge) (concentration : 1 μM) en présence de PGA (1 U) dans le PB (100 mM, pH 7,6) à 37 °C. Remarque : la PGA a été additionnée après 5 minutes d'incubation des sondes dans le PB seul. Illustrations issues de la publication de S. Debieu et A. Romieu³⁴. © 2018 Elsevier.

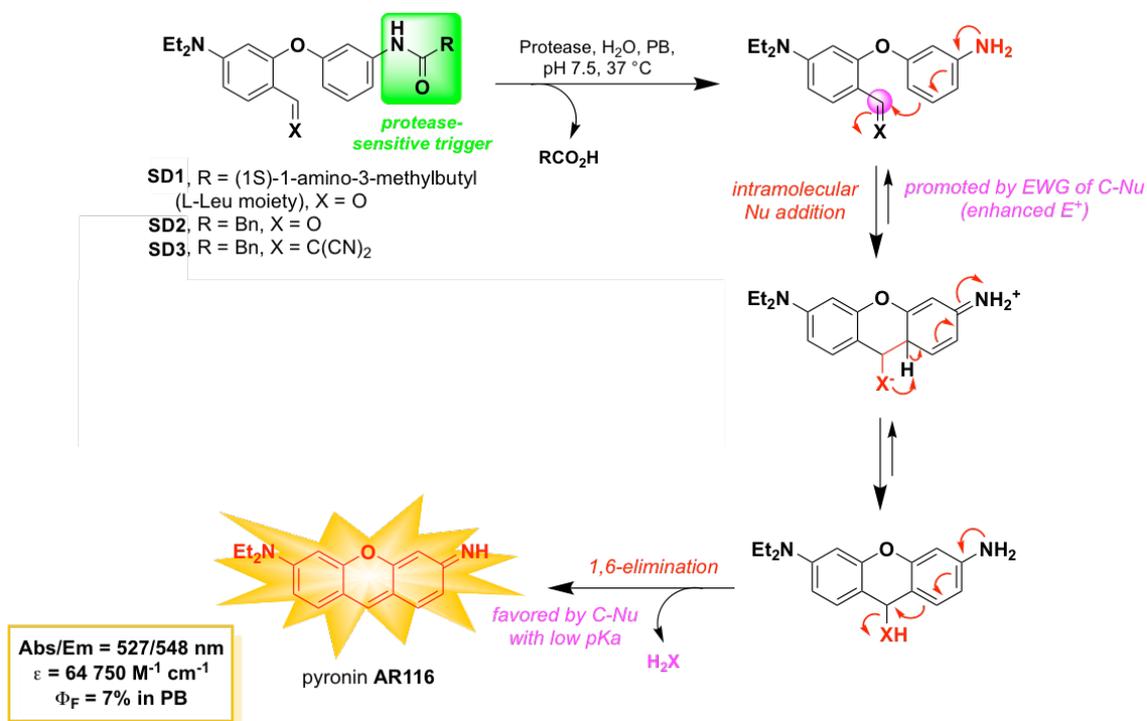


Schéma 1. Mécanisme proposé par S. Debieu et A. Romieu pour expliquer la formation *in situ* de la pyronine **AR116** à partir des sondes de type "covalent-assembly" **SD1-SD3** sensibles aux amidases/protéases LAP (**SD1**) et PGA (**SD2** et **SD3**). Illustration issue de la référence 31. © 2018 Elsevier.

Afin de contourner ce problème, le Dr. K. Renault (chercheur post-doctoral au sein de notre groupe depuis avril 2019) a développé de nouvelles sondes sensibles à la PGA en faisant varier la nature de l'accepteur de Michael (Schéma 2). L'influence des différents motifs à la fois sur la cinétique de formation de la pyronine **AR116** et sur la stabilité des précurseurs "cagés" en milieu biologique simulé (*i.e.*, tampon phosphate contenant du glutathion) a ainsi pu être étudiée (Figure 12)³⁶.

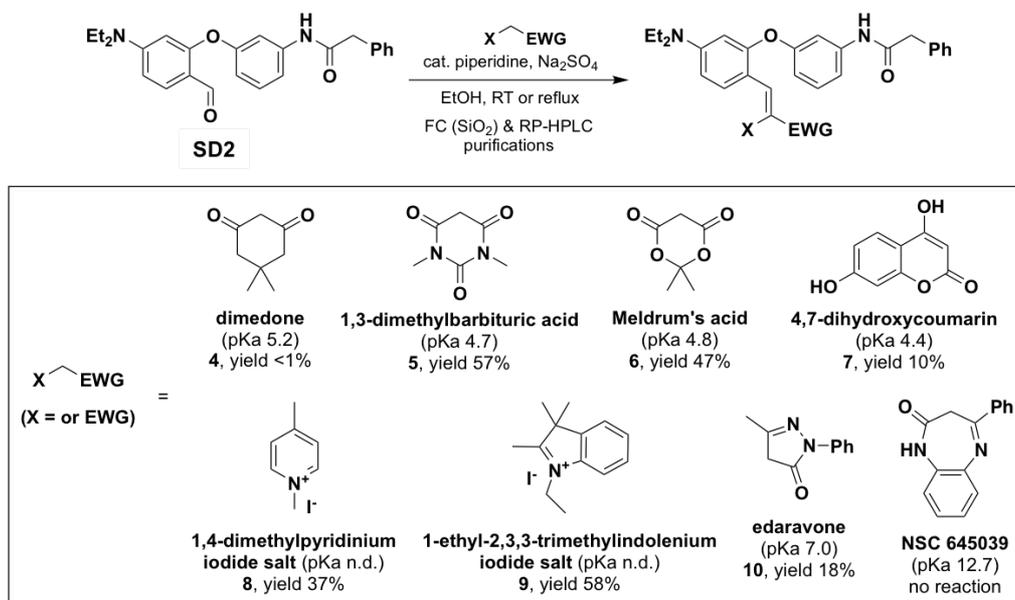


Schéma 2. Synthèse des sondes de type "covalent assembly" sensibles à la PGA et possédant un accepteur de Michael *via* une condensation de Knoevenagel. Remarque : les sondes **7-9** ont été isolées sous forme de sels de TFA. (EWG = "electron withdrawing group" pour groupement électro-attracteur, FC (SiO₂) = "flash-column chromatography over silica gel" pour chromatographie flash sur colonne de silice). Illustration issue de la publication de Renault *et al.*³⁶ © 2019 Royal Society of Chemistry.

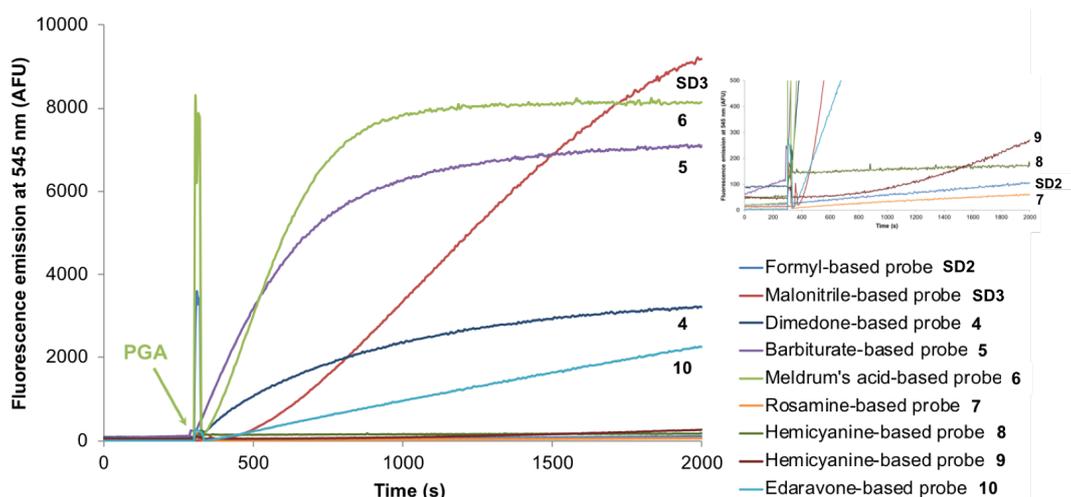


Figure 12. Évolution de la fluorescence en fonction du temps (Ex./Em. 525/545 nm) des sondes **SD1**, **SD2**, **4-10** (concentration : 1 µM) en présence de PGA (1 U) dans le PB (100 mM, pH 7,6) à 37 °C. Illustration issue de la publication de Renault *et al.*³⁶ © 2019 Royal Society of Chemistry.

³⁶ K. Renault, S. Debieu, J.-A. Richard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 8918-8932. Un preprint de cet article est également disponible en accès libre (OA) sur le site ChemRxiv.org : <http://doi.org/10.26434/chemrxiv.9445202.v1>.

Cette étude a montré que les sondes dont l'accepteur de Michael dérive de l'acide 1,3-diméthylbarbiturique **5** et de l'acide de Meldrum **6** permettent d'obtenir des cinétiques d'activation enzymatique plus rapides que la sonde à motif dicyanométhylidène. De plus, elles ne présentent pas de fluorescence AIE intrinsèque, ce qui peut permettre leurs utilisations dans des détections intensiométriques de type "Off-On".

Enfin un autre point remarquable est l'obtention de la première sonde de type "covalent assembly" dont l'activation enzymatique conduit à la fois à la formation *in situ* d'un fluorophore et à la libération d'une substance bioactive, l'édaravone, un antioxydant aidant à la récupération neurologique après des épisodes d'ischémie cérébrale³⁷ (Figure 13). En effet, les deux seuls exemples de ce type de pro-drogues fluorogéniques connus à ce jour sont ceux présentés précédemment dans la Figure 5 ; pour rappel, ils mettaient en jeu une activation par la NTR^{11b,c}.

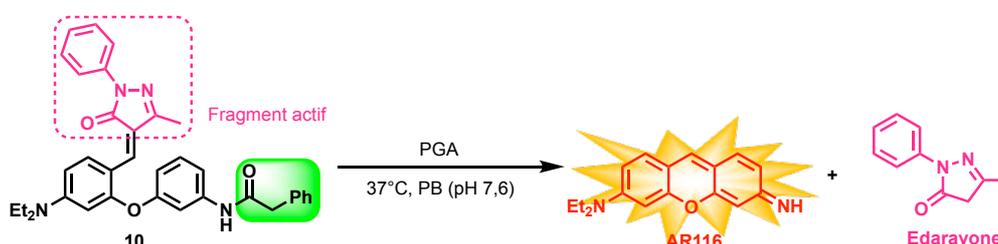


Figure 13. Réaction de la sonde de type "covalent assembly" **10** conduisant à la formation *in situ* du fluorophore **AR116** et à la libération d'une substance bioactive, l'édaravone³⁶.

Ainsi, les résultats prometteurs obtenus par S. Debieu concernant la formation *in situ* de pyronines suite à l'activation enzymatique d'un précurseur "cagé" et les récentes avancées de l'équipe sur l'amélioration de la cinétique de ce processus fluorogénique et l'obtention de Si-pyroneines stables à pH physiologique, nous ont conduit à envisager la synthèse de sondes de type "covalent assembly" conduisant à la formation *in situ* de fluorophores émettant dans le NIR-I (Figure 14).

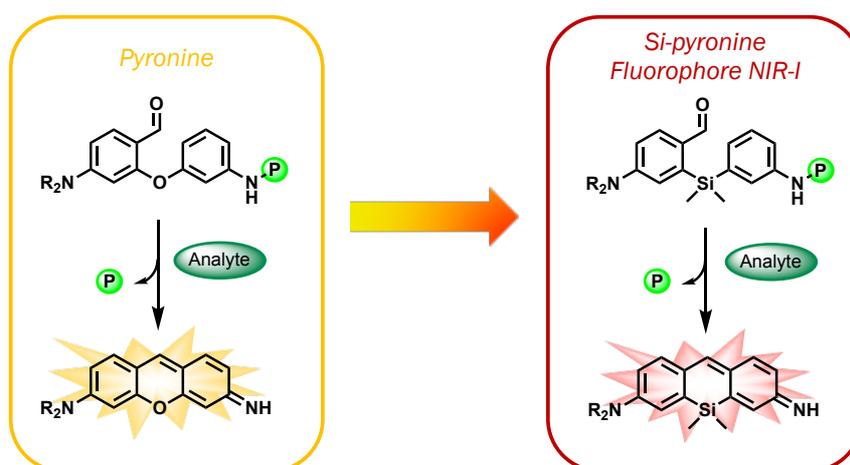


Figure 14. Stratégie envisagée pour l'application du concept de formation *in situ* de pyronines à la gamme spectrale du rouge lointain ou du NIR-I (i.e., utilisation de précurseurs "cagés" dont l'activation enzymatique conduit à la formation d'une Si-pyroneine).

³⁷ T. Watanabe, M. Tahara, S. Todo, *Cardiovasc. Ther.*, **2008**, 26, 101-114.

II. Résultats et discussions

II.1. Vers la synthèse de précurseurs "cagés" conduisant à la formation *in situ* d'une Si-pyrone fluorescente après activation enzymatique

II.1.1. Structure générale du précurseur "cagé"

Les sondes fluorogéniques dérivées des Si-xanthènes sont déjà nombreuses à être utilisées pour détecter/imager un large éventail d'activités biologiques. Le plus souvent, le mode d'activation repose sur une déprotection fluorogénique d'un ou des deux groupement amino ou hydroxyle, situé(s) sur les positions 3 et/ou 6 du cœur hétéro-xanthène (pour un rappel de la structure du cœur xanthène voir la Figure 1 du chapitre 1) ou encore sur le phénomène de spirolactamisation impliquant la position *meso*³⁸.

Notre objectif premier, en partenariat avec bioMérieux, est de détecter une activité enzymatique nous permettant d'identifier des bactéries. Le précurseur "cagé" doit donc, dans un premier temps, être totalement stable en conditions physiologiques et dans un second temps, nous souhaitons que notre sonde puisse servir à la détection d'un large éventail d'analytes et ce en changeant simplement le motif de reconnaissance. Pour ce faire, il est nécessaire que notre molécule possède au moins une aniline primaire fonctionnalisable par ce motif reconnu et clivé par l'enzyme ciblée. Ainsi, en nous basant sur les travaux de S. Debieu, la structure envisagée pour nos précurseurs "cagés" est de type diaryldiméthylsilane où l'un des deux motifs aryles est une aniline tertiaire fonctionnalisée en position *para* par un groupement formyle ou un accepteur de Michael, et le second est l'aniline primaire *N*-fonctionnalisée par la "triggering unit" spécifique de l'enzyme à détecter (Figure 15).

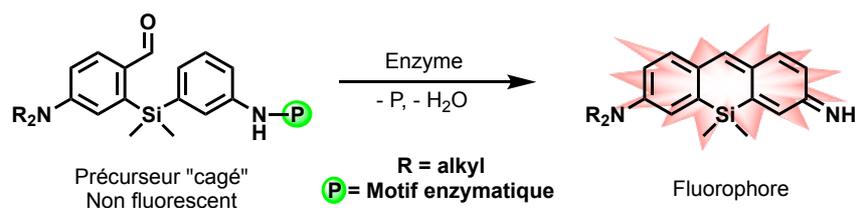


Figure 15. Structure générale de la sonde de type "covalent assembly" envisagée dans ce travail de thèse, dont l'activation enzymatique conduit à la formation *in situ* d'une Si-pyrone non symétrique.

Dans notre cas, les fluorophores ciblés sont les Si-pyrone non symétriques **GD99** et **GD192**, étudiées dans le chapitre précédent. Ainsi, l'aniline tertiaire portant la fonction électrophile, sera soit une *N*-méthylindoline, soit un dérivé julolidine. Enfin, le motif de reconnaissance enzymatique choisi dans un premier temps est le PhAc, afin de valider les sondes avec la protéase modèle PGA.

³⁸ Pour des revues sur le sujet, voir : a) Y. Kushida, T. Nagano, K. Hanaoka, *Analyst*, **2015**, *140*, 685-695; b) T. Ikeno, T. Nagano, K. Hanaoka, *Chem. - Asian J.*, **2017**, *12*, 1435-1446; c) M. Zhao, Y.-S. Guo, W.-N. Xu, Y.-F. Zhao, H.-Y. Xie, H.-J. Li, X.-F. Chen, R.-S. Zhao, D.-S. Guo, *Trends Anal. Chem.*, **2020**, *122*, Article 115704.

II.1.2. Stratégie de synthèse du précurseur "cagé"

Dans cette synthèse, deux points importants sont à noter : la formation du pont diméthylsilyle *via* la réaction d'Hitchcock³⁹ nécessite que les groupements protecteurs de l'aldéhyde et de l'aniline primaire soient : 1) orthogonaux entre eux et 2) stables dans les conditions de la réaction bis-lithiation.

Par analogie avec les voies de synthèses développées pour les dérivés Si-rosamine, P-rosamine et de la sulfone-rosamine publiées respectivement par les groupes de K. Hanaoka⁴⁰, S. Yamaguchi⁴¹ et nous-mêmes⁴², le motif allyle a été choisi comme groupement protecteur du NH₂. Il permet à la fois d'éviter la déprotonation de l'amine par la base lithiée et d'améliorer la solubilité des intermédiaires réactionnels dans les solvants organiques de réaction et de purification. De plus, il est stable dans diverses conditions (en particulier en présence de dérivés organolithiens ou organomagnésiens) et il est facilement éliminé par une réaction de Tsuji-Trost mettant en jeu une catalyse au Pd⁰⁴³. Quant à la protection de l'aldéhyde, plusieurs stratégies sont possibles. La première consiste à masquer l'aldéhyde sous la forme d'un acétal. La seconde nécessite sa réduction en alcool primaire, suivi de la protection de l'hydroxyle obtenu puis son oxydation après déprotection en fin de synthèse. La rétro-synthèse résumant les étapes importantes de la formation de la sonde est présentée dans la Figure 16.

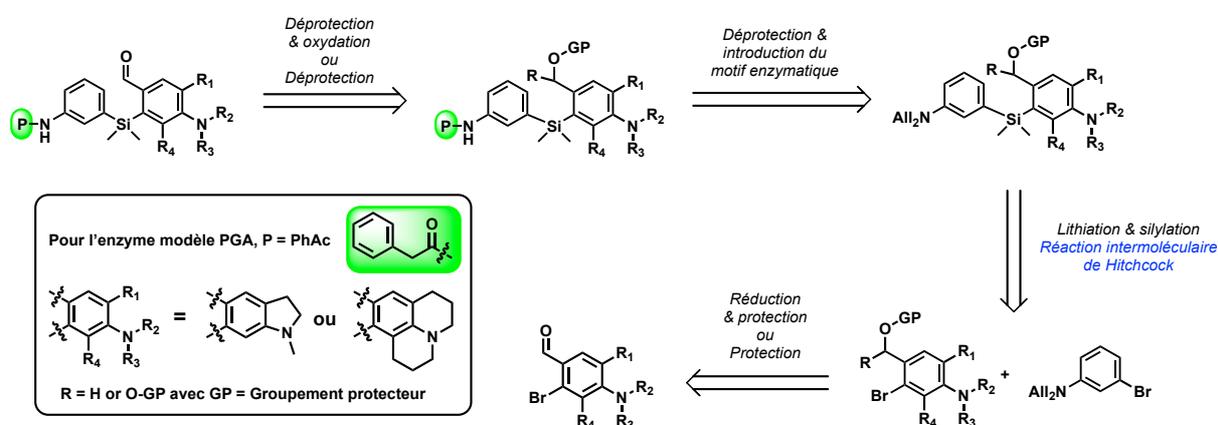


Figure 16. Rétro-synthèse de la sonde de type "covalent assembly" conduisant à la formation *in situ* des Si-pyronines non symétriques **GD99** et **GD192**.

³⁹ a) C. H. S. Hitchcock, F. G. Mann, A. Vanterpool, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 4537-4546; b) M. Durandetti, T. Bodaert, *Actual. Chim.*, **2018**, 434, 11-17.

⁴⁰ a) T. Egawa, K. Hanaoka, Y. Koide, S. Ujita, N. Takahashi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 14157-14159; b); Y. Kushida, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai, T. Ueno, K. Yoshida, M. Uchiyama, T. Nagano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 3908-3911; c) W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano, K. Hanaoka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, 52, 13028-13032.

⁴¹ A. Fukazawa, S. Suda, M. Taki, E. Yamaguchi, M. Grzybowski, Y. Sato, T. Higashiyama, S. Yamaguchi, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 1120-1123.

⁴² G. Dejoui, M. Laly, I. E. Valverde, A. Romieu, *Dyes Pigm.*, **2018**, 159, 262-274.

⁴³ P. G. M. Wuts, Editor, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 5th Edition*. Wiley, **2014**.

II.2. Synthèse du précurseur "cagé" conduisant à la formation de **GD99** après activation enzymatique

La synthèse de la Si-pyronine non symétrique **GD99** ayant été réalisée en premier, le travail sur le précurseur "cagé" correspondant a été débuté en amont de celui menant à la Si-pyronine non symétrique portant un motif julolidine. Dans cette partie, les différentes stratégies explorées pour synthétiser cette sonde vont être détaillées.

II.2.1. Première stratégie *via* une protection de l'aldéhyde

Dans un premier temps, la stratégie de protection de l'aldéhyde sous forme d'acétal a été choisie car nécessitant moins d'étapes de synthèse (6 vs. 8 pour celle passant par un alcool benzylique protégé) (Figure 17).

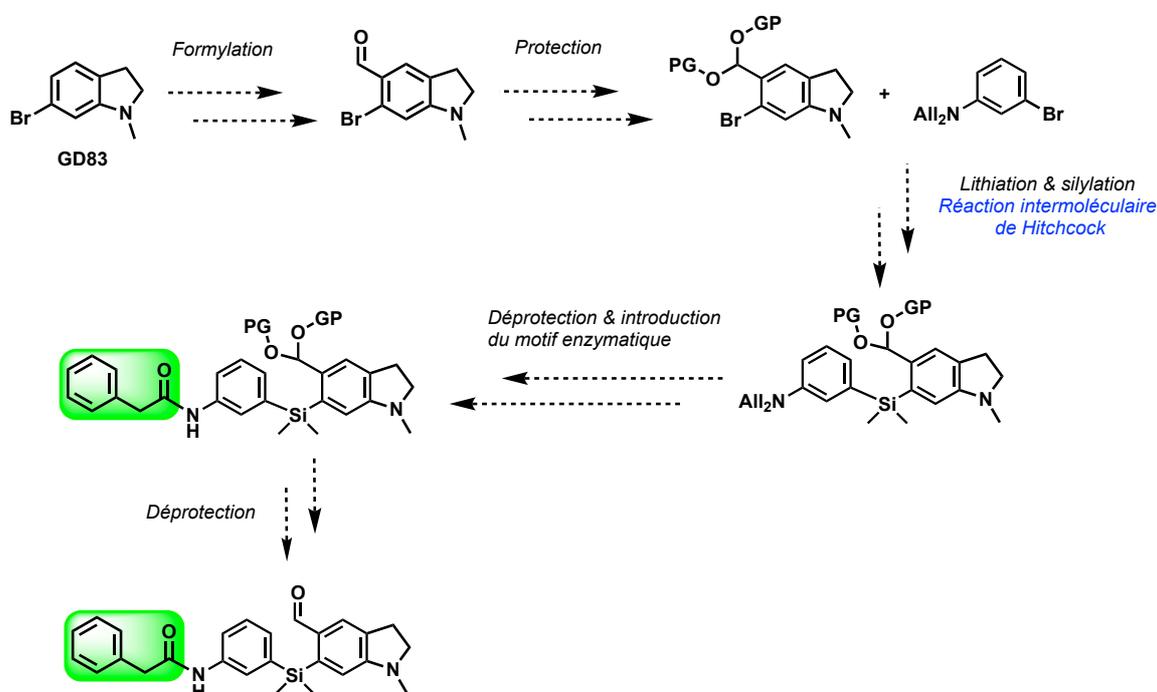


Figure 17. Représentation schématique de la stratégie de synthèse *via* la protection sous forme d'acétal de l'aldéhyde de la sonde de type "covalent assembly" conduisant à la Si-pyronine non symétrique **GD99** après activation enzymatique du motif phénylacétamide.

La synthèse débute par la formylation de **GD83** *via* une réaction de Vilsmeier-Haack permettant l'obtention de la 6-bromo-5-formyl-N-méthylindoline, **GD105**, avec un très bon rendement (95%) (Schéma 3).

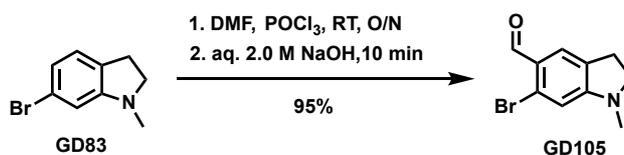


Schéma 3. Formylation de la 6-bromo-N-méthylindoline **GD83** à l'aide d'une réaction de Vilsmeier-Haack.

Le choix de la protection pour la fonction aldéhyde s'est porté dans un premier temps vers l'un des groupements protecteurs les plus couramment utilisés : le 1,3-dioxolane. Ainsi, **GD105** a été mise en présence d'éthylène glycol et d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) sous reflux du toluène anhydre (Schéma 4). Lors du suivi de la réaction par HPLC-MS, il a été surprenant de constater que le pic de masse du produit majoritairement formé correspondait au produit déformylé **GD83**. La structure a été confirmée par des analyses RMN ^1H et ^{13}C .

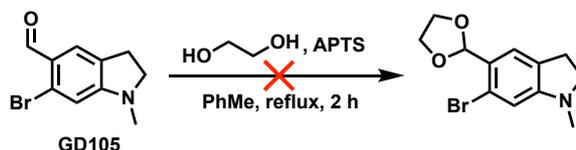


Schéma 4. Condition de réaction de la protection de l'aldéhyde de **GD105** en 1,3-dioxolane.

Pour s'assurer que ni la présence de l'atome de brome en alpha de l'aldéhyde, ni la combinaison de celui-ci et d'une amine en position *para* du groupement formyle étaient responsables de cette réaction non désirée, deux essais supplémentaires ont été réalisés (Schéma 5). Ainsi, la réaction de protection a été effectuée sur le 2-bromobenzaldéhyde et le 4-(*N,N*-diallylamino)-2-bromo-benzaldéhyde dans les mêmes conditions que celles utilisées pour protéger **GD103**. Après 2 h de réaction, les bruts réactionnels ont été analysés par RMN (Figure 18). Une conversion de 85% et de 64%, respectivement pour **GD108** et **GD109** a ainsi pu être calculée. De plus, aucune trace du produit ayant perdu le groupement formyle n'est observée. Nous pouvons donc conclure que les réactifs et les conditions de réaction ne sont pas la cause de la déformylation de **GD105** et que cette réaction doit être due à une réactivité particulière de ce substrat.

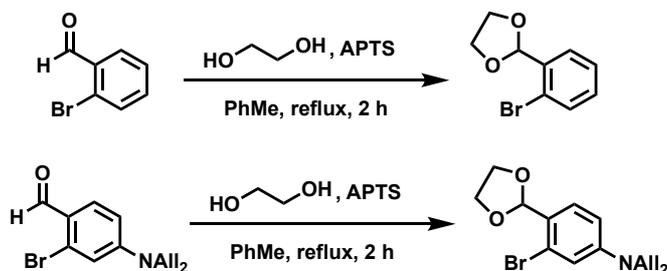


Schéma 5. Réaction de protection réalisée avec des composés modèles.

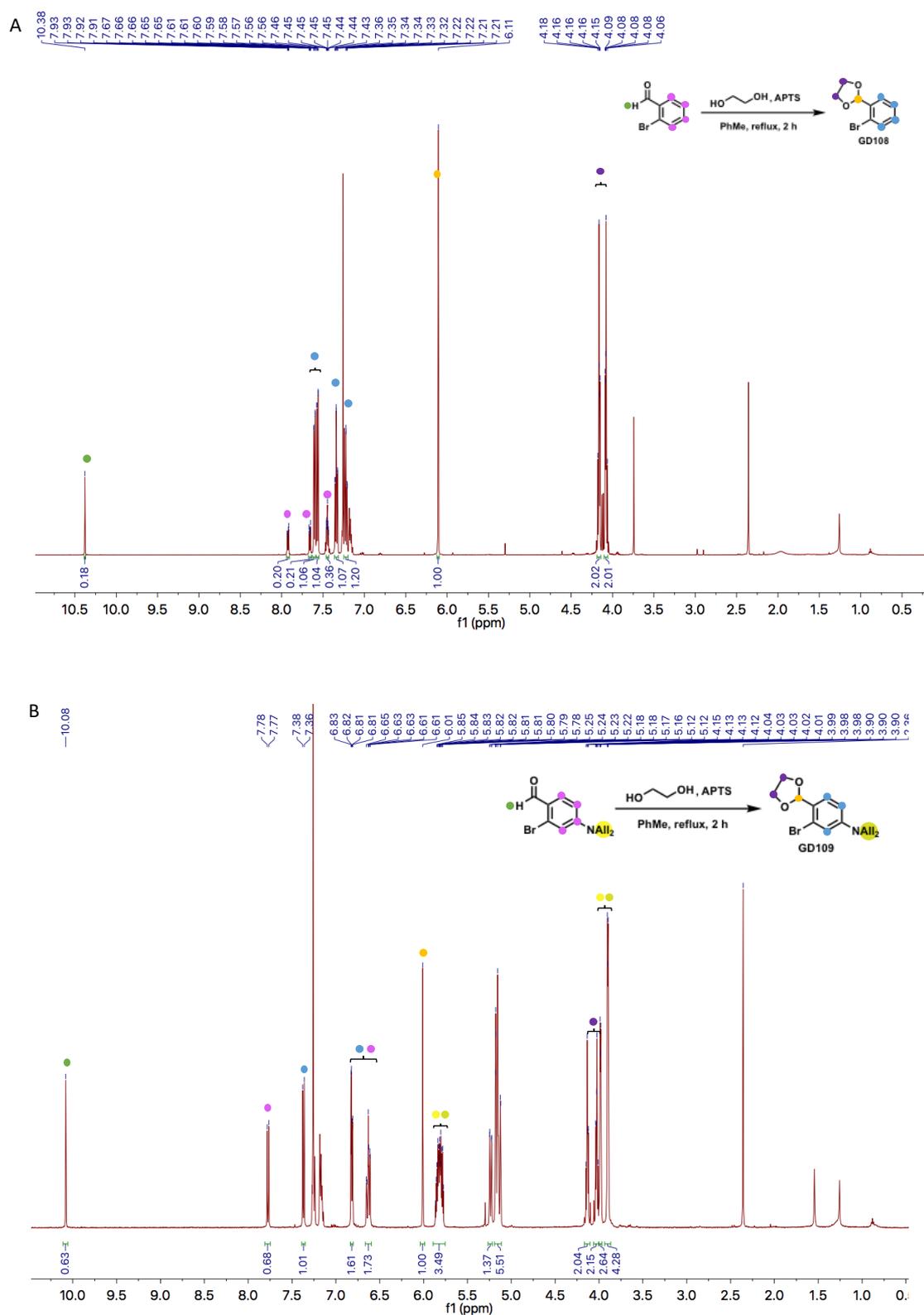


Figure 18. (A) Spectre RMN ¹H du brut réactionnel menant à la formation de **GD108** dans le toluène (enregistré à 500 MHz dans CDCl₃). (B) Spectre RMN ¹H du brut réactionnel menant à la formation de **GD109** dans le toluène (enregistré à 500 MHz dans CDCl₃).

La faible proportion du dérivé 1,3-dioxolane de **GD105** observée en RMN ^1H lors de la réaction laisse supposer que la protection de l'aldéhyde a bien lieu, mais que le produit obtenu se dégrade selon un mécanisme non-expliqué à ce jour.

L'échec de la protection sous forme de 1,3-dioxolane nous a poussé à nous tourner vers un autre motif de protection de type 1,3-dioxane, qui est connu comme étant plus résistant que les dioxolanes⁴⁴. Nous avons donc réalisé la protection de l'aldéhyde à l'aide du 2,2-diméthyl-1,3-propanediol. La réaction de protection a été conduite dans le toluène en présence du diol et d'APTS à température ambiante. En quatre heures, le dérivé acétal **GD113** a été obtenu avec un rendement de 72% (Schéma 6).

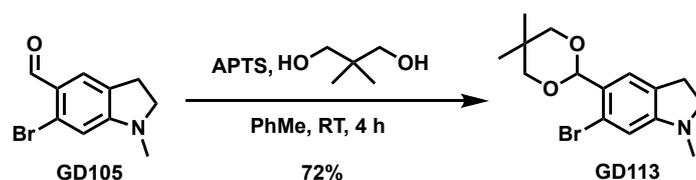


Schéma 6. Synthèse de **GD113** dont l'aldéhyde est protégé sous forme d'un 5,5-diméthyl-1,3-dioxane.

L'étape suivante, basée sur la réaction de Hitchcock, est inspirée des travaux de Wang *et al.*⁴⁵ qui propose une voie de synthèse de Si-rhodamines non-symétriques débutant par la formation du pont diméthylsilyle intracyclique. Cette réaction compte trois étapes. La première est l'échange halogène-métal du premier motif. Lorsque l'échange est complet, l'ajout lent de l'organolithien sur le dichlorodiméthylsilane peut avoir lieu, tandis que dans le même temps, la lithiation du second motif est réalisée afin de pouvoir l'additionner sur le dérivé chlorosilane intermédiaire et précédemment formé (Schéma 7).

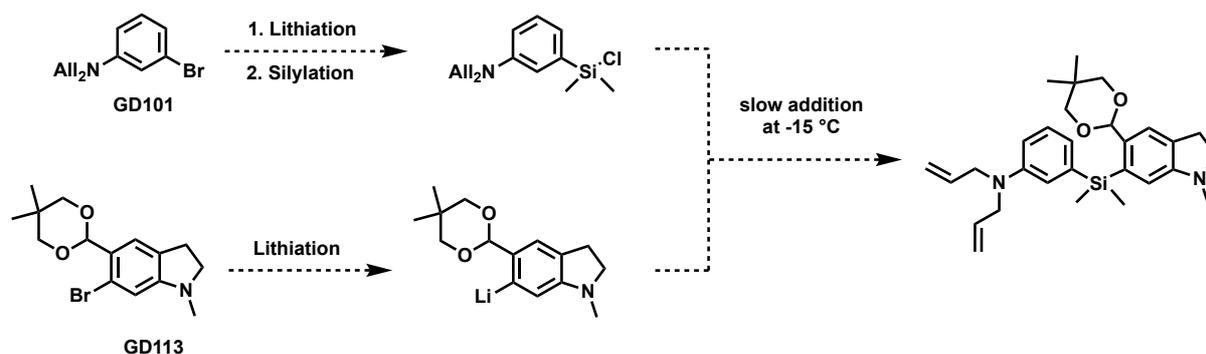


Schéma 7. Schéma réactionnel envisagé pour la réaction de Hitchcock conduisant au dérivé de type diaryldiméthylsilane.

Dans un premier temps, les réactions de lithiation sont effectuées afin de s'assurer que l'échange halogène-lithium est bien efficace. Deux organolithiens ont été utilisés pour effectuer l'échange halogène-métal de la 3-bromo-*N,N*-diallylaniline (Tableau 1). Des analyses par HPLC-MS ont permis d'effectuer le suivi réactionnel. Le *n*-BuLi permet l'échange brome-lithium mais le

⁴⁴ P. Salomaa, A. Kankaanpera, *Acta Chem. Scand.*, **1961**, 15, 871-878.

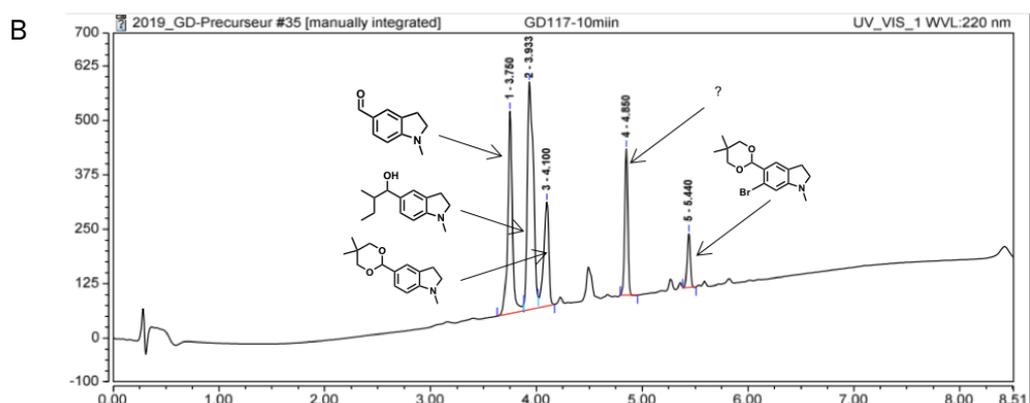
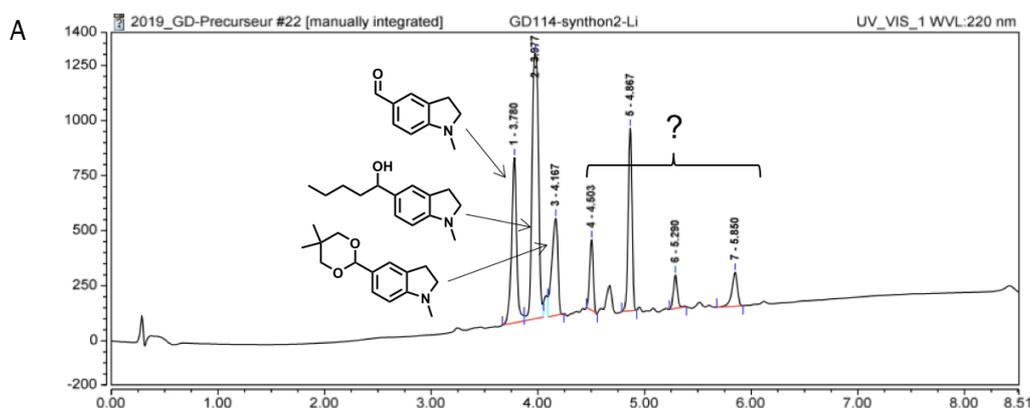
⁴⁵ B. Wang, X. Chai, W. Zhu, T. Wang, Q. Wu, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 14374-14377.

produit d'addition du fragment butyle et un produit non identifié sont également formés. L'utilisation du *s*-BuLi a été privilégiée puisqu'il permet d'éviter la réaction d'addition du fragment butyle et donc de conduire à la formation largement majoritaire du lithien souhaité.

Tableau 1 : Différents organolithiens testés pour la réaction d'échange brome-lithium de **GD101**.

| Réactif | Conditions | Observations HPLC-MS |
|----------------|------------------------------------|--|
| <i>n</i> -BuLi | 1,06 équiv., THF -78 °C, 30 min | lithien (52%) ; adduit butyle (28%) ; sous-produit (20%) |
| <i>s</i> -BuLi | 1,06 équiv., THF -78 °C, 30 min | lithien (70%) ; sous-produit (30%) |

De même, les conditions réactionnelles de l'échange brome-lithium de **GD113** ont dû être mise au point avec différents organolithiens (Tableau 2). Une nouvelle fois, un résultat surprenant est observé : la déprotection de l'aldéhyde, qui est majoritaire avec les trois organolithiens testés. En présence de *t*-BuLi, la déprotection est plus rapide que le processus d'échange halogène-métal. En effet, d'après les analyses par HPLC-MS, après 10 min, 25% du produit est déprotégé alors que seulement 2% de dérivé lithié a été formé (Figure 19C). Après 40 min, aucun changement n'est constaté, l'addition d'un nouvel équivalent de lithien conduit à la formation majoritaire du produit lithié et déprotégé sur sa fonction aldéhyde. Enfin, en présence du *n*-BuLi et du *s*-BuLi, un second sous-produit non identifié majoritaire est observé (Figure 19A, B).



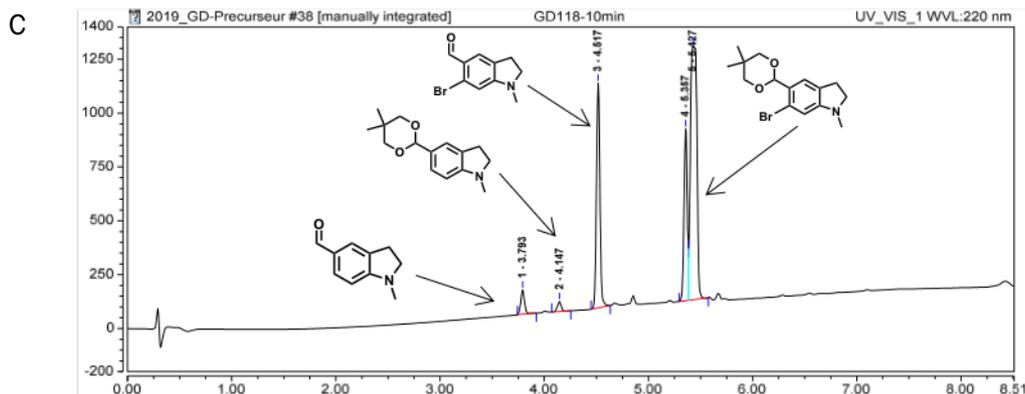


Figure 19. Profil d'éluion RP-HPLC analytique (détection UV à 220 nm), 10 min après l'addition de (A) *n*-BuLi (B) *s*-BuLi (C) *t*-BuLi sur le dérivé 5,5-diméthyl-1,3-dioxane-*N*-méthylindolidine **GD113**.

Tableau 2 : Évaluation des différents organolithiens pour la réaction d'échange halogène-métal de **GD113**.

| Réactif | Conditions | Observations HPLC-MS |
|----------------|---|---|
| <i>n</i> -BuLi | 1,06 équiv., THF -78 °C, 30 min | produit lithié ($t_r = 4,1$ min, 13%) ; produit lithié déprotégé ($t_r = 3,7$ min, 19%) ; sous-produits (55%) |
| <i>s</i> -BuLi | 1,06 équiv., THF -78 °C, 5 min | produit lithié ($t_r = 4,1$ min, 16%) ; produit lithié déprotégé ($t_r = 3,7$ min, 27%) ; sous-produits (53%) |
| <i>t</i> -BuLi | 1,06 + 1 équiv., THF -78 °C, 40 + 10 min | produit lithié ($t_r = 4,1$, 31%) ; produit lithié déprotégé ($t_r = 3,7$ min, 40%) ; sous-produits (29%) |

Au vu de ces différents résultats, il semble que l'acétal cyclique, connu pour être résistant vis-à-vis des composés organométalliques tels qu'un organolithien⁴³, n'est pas stable dans notre cas. En effet, la présence d'un groupement dialkylamino électro-donneur en position *para* du groupement protecteur peut, par effet mésomère donneur et par analogie avec la réactivité des bras auto-immolable de type PABA (alcool-*para*-aminobenzylrique)³, conduire à un processus d'élimination 1,6 de l'acétal, favorisant ainsi la déprotection de l'aldéhyde (Figure 20). Suite à ces résultats, cette voie de synthèse a été abandonnée au profit d'une nouvelle approche qui repose sur la formation d'un intermédiaire de type alcool benzylrique O-protégé.

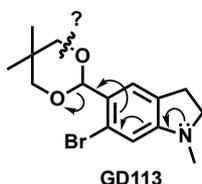


Figure 20. Bascule électronique de l'élimination 1,6 supposée et conduisant à la déprotection de l'aldéhyde.

II.2.2. Deuxième stratégie *via* un alcool benzylique protégé

Dans cette stratégie, le choix du groupement protecteur de l'alcool benzylique est une nouvelle fois primordial : il doit résister à une réaction de lithiation et aux conditions de déprotection des motifs allyles (Figure 21).

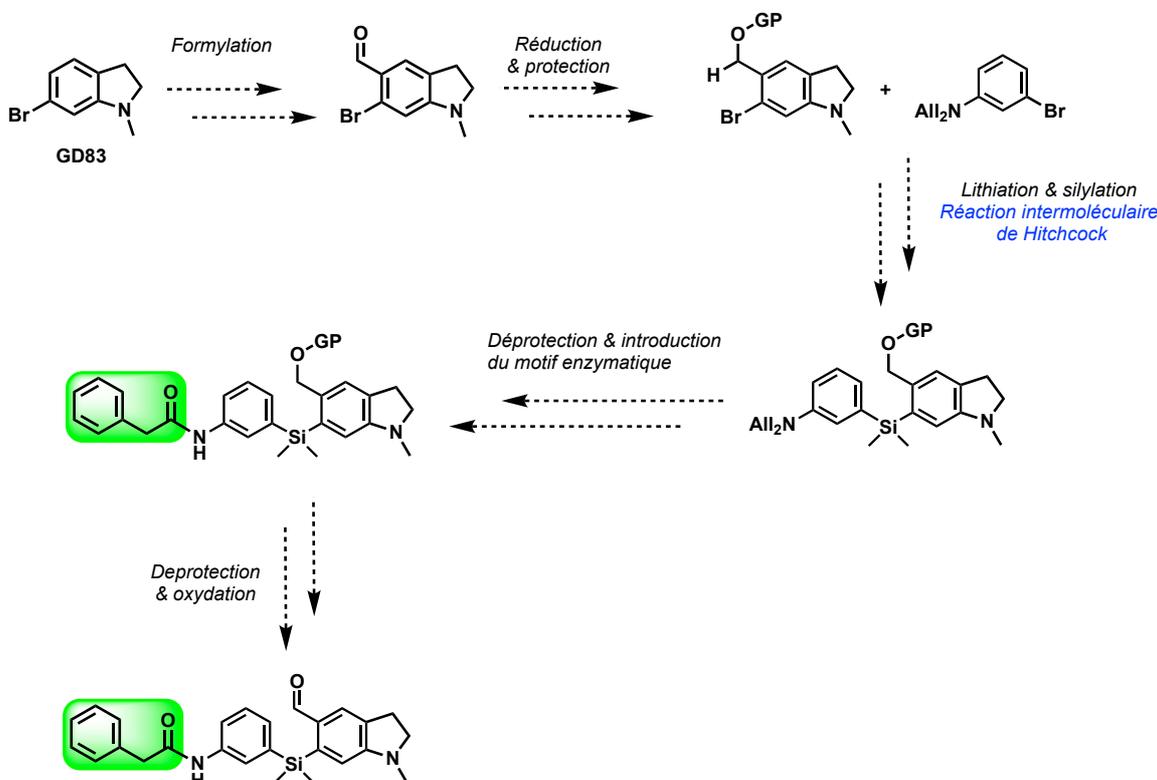


Figure 21. Représentation schématique de la stratégie de synthèse *via* la réduction en alcool benzylique de l'aldéhyde puis protection, de la sonde de type "covalent assembly" conduisant à la Si-pyronine non symétrique **GD99** après hydrolyse enzymatique du motif phénylacétamide.

Dans notre cas, les groupements protecteurs de la famille des éthers silylés n'ont pas été considérés afin d'éviter une interférence du silicium pontant du futur précurseur "cagé" lors de l'étape de déprotection du groupement hydroxyle. Les acétals ayant montrés leurs limites, notre choix s'est porté vers un éther de trityle, souvent utilisé dans la protection sélective d'alcools et d'amines primaires dans la chimie des sucres⁴⁶, des peptides⁴⁷ et des nucléosides/nucléotides⁴⁸, et facile à déprotéger en milieu acide⁴³.

⁴⁶ B. Helferich, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1948**, 3, 79-111.

⁴⁷ Bodanszky, M. *Principles in Peptides Synthesis*, Springer-Verlag: New York, **1993**, 2nd ed.

⁴⁸ H. Koester, N. Hoppe, V. Kohli, M. Kroepelin, H. Kaut, K. Kulikowski, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1980**, 7, 39-60.

Dans un premier temps, l'introduction du motif hydroxyméthyle à partir de **GD83** est effectuée via une réaction de Vilsmeier-Haack suivie d'une réduction à l'aide de NaBH_4 (Schéma 8).

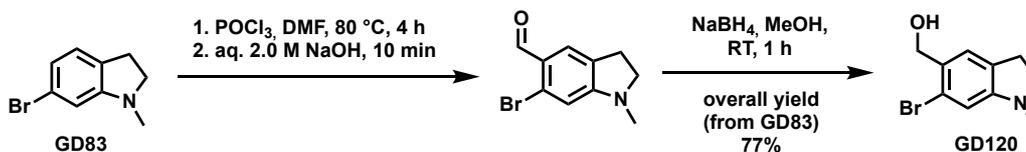


Schéma 8. Synthèse de l'alcool benzylique **GD120** à partir de la 3-bromo-N-méthylindoline via une réaction de Vilsmeier-Haack et d'une réduction.

La protection de la fonction alcool de **GD120** à l'aide du chlorure de trityle permet d'obtenir, après deux purifications par chromatographie sur colonne de silice, **GD121** avec un rendement correct (64%) (Schéma 9).

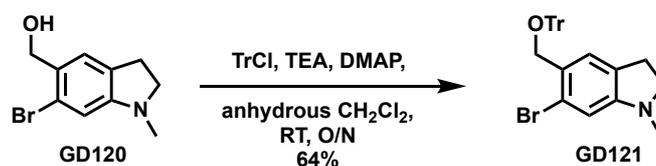
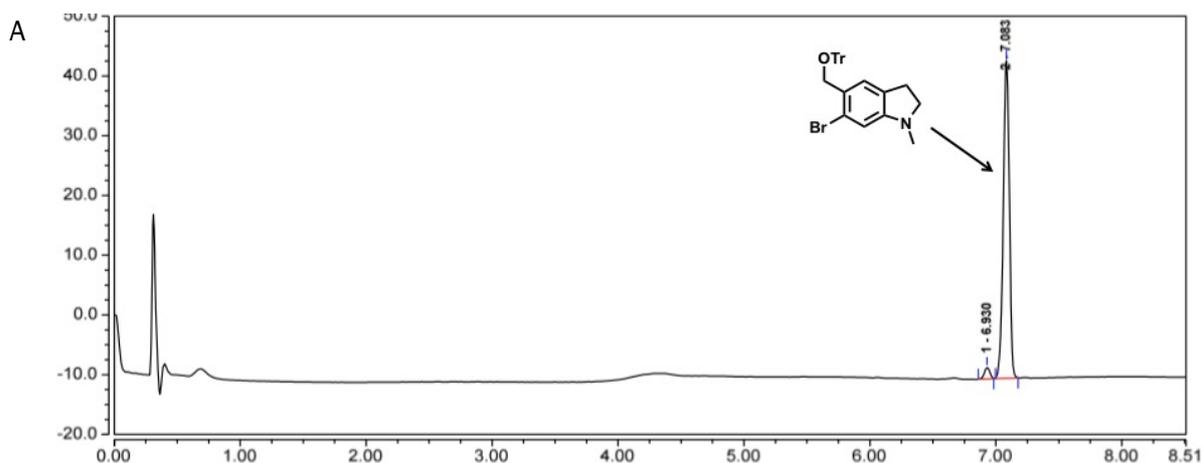


Schéma 9. Protection de l'alcool benzylique de **GD120** sous forme d'éther de trityle.

À ce jour, les essais de lithiation de **GD121** à l'aide de $t\text{-BuLi}$ ont été effectués sur une petite quantité (50 mg) qui a permis de montrer la stabilité du groupement trityle vis-à-vis des conditions de réaction (Figure 22). Pour pouvoir tenter d'effectuer la réaction de Hitchcock, il aurait fallu synthétiser **GD121** en plus grande quantité (> 500 mg). Le manque de temps et la proposition d'une nouvelle voie de synthèse par K. Renault, permettant de surmonter les problèmes inhérents à la protection de l'aldéhyde, ont conduit à l'abandon de cette voie de synthèse.



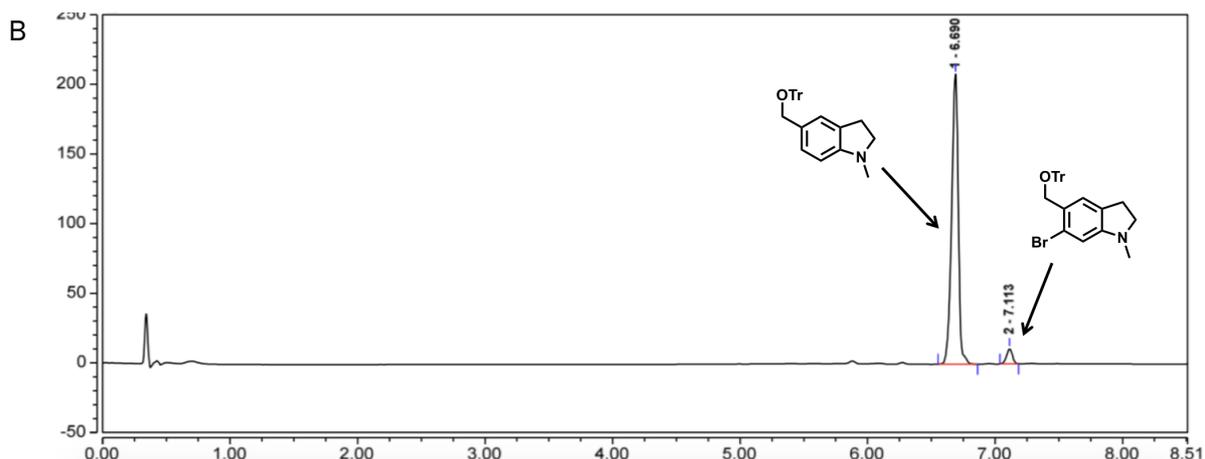


Figure 22. Profil d'éluion RP-HPLC analytique (détection UV à 300 nm), (A) du composé **GD121** (B) de la réaction de lithiation de **GD121**, 15 min après l'addition de *t*-BuLi.

II.2.3. Troisième stratégie : introduction tardive du motif formyle

Dans cette approche, l'aldéhyde est introduit sur l'hétérocycle *N*-méthylindoline en fin de synthèse. Ceci permet, en plus de contourner les problèmes de stabilité du groupement protecteur de cette fonction dans nos conditions de réactions, de réduire considérablement le nombre d'étapes de synthèse (Figure 23).

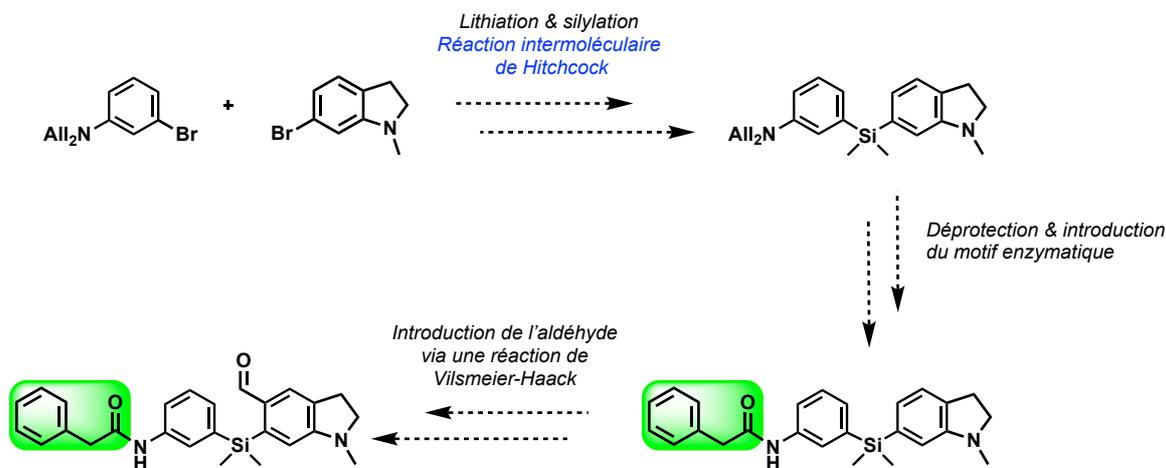
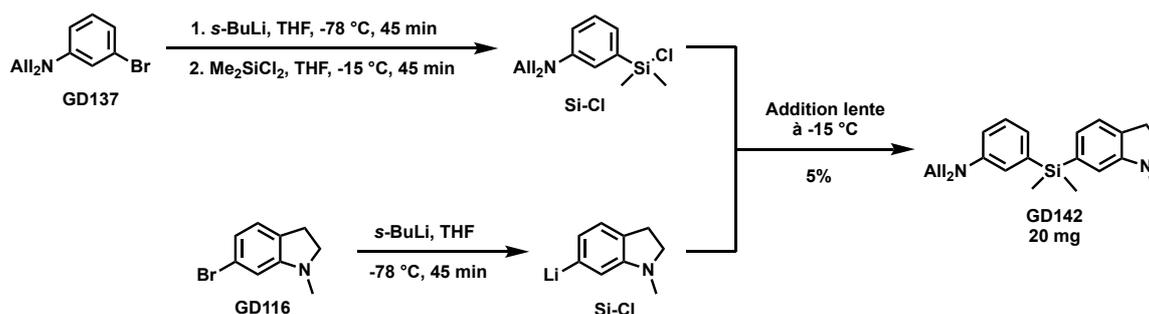


Figure 23. Stratégie de synthèse mettant en jeu une réaction de formylation tardive.

Dans un premier temps, la réaction de Hitchcock a été testée sur une échelle modeste (ca. 250 mg). **GD137** a été engagé dans une réaction de lithiation conduisant à l'obtention du premier dérivé lithié qui, après avoir été additionné à une solution de dichlorodiméthylesilane permet l'obtention de l'intermédiaire de type monochlorosilane **Si-Cl**. En parallèle de cette addition, l'échange halogène-métal a été réalisé sur le composé **GD116**. Le deuxième dérivé lithié est obtenu et mis à réagir avec **Si-Cl** pour conduire, après une purification par chromatographie sur colonne de silice, au dérivé silylé non-symétrique **GD142** avec un faible rendement (5%) (Schéma 10).

Schéma 10. Synthèse du dérivé diaryldiméthylsilane mixte **GD142** via une réaction de Hitchcock intermoléculaire.

À ce stade, la quantité de **GD142** obtenue n'a pas été suffisante pour pouvoir être engagée dans l'étape de formylation suivante. De plus, en sachant que la synthèse comporte encore trois étapes supplémentaires et en supposant que le rendement minimum de chacune des étapes soit de 50%, il faudrait une quantité de dérivé diaryldiméthylsilane importante pour espérer obtenir le composé final souhaité. En outre, l'efficacité de la réaction intermoléculaire de Hitchcock sur des petites quantités étant trop faible, la synthèse des précurseurs de départ en grandes quantités serait nécessaire. Ces études préliminaires ayant montrées les difficultés de mises en œuvre des réactions et les faibles rendements, il ne nous a pas semblé judicieux d'investir plus de temps dans la poursuite de nos recherches sur la synthèse de précurseurs "cagés" de Si-pyronines non symétriques.

III. Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans ce chapitre nous ont permis de mettre en avant les défis synthétiques liés au développement de précurseurs "cagés" conduisant (en théorie) à la formation *in situ* d'une Si-pyronine non symétrique, suite à une activation enzymatique. La synthèse repose sur une étape clé, une réaction de Hitchcock intermoléculaire, qui nécessite des choix réfléchis quant aux groupements protecteurs utilisés. Les conditions de réaction nécessitent une résistance de ces groupements vis-à-vis de bases très fortes (*i.e.*, organolithiens) et un contrôle pointu des différents paramètres (*i.e.*, température, vitesse et ordre d'addition des réactifs). Néanmoins, nous avons pu amorcer la conception d'une sonde de type "covalent assembly" conduisant à la formation de **GD99** et explorer différentes stratégies de synthèse. La réactivité non usuelle du motif *N*-méthylindoline a ainsi été mise en évidence au travers de résultats inattendus et que nous n'avons pas réussi à expliquer de façon rationnelle à ce jour.

Les travaux sur le motif julolidine ont été également débutés et ne mettent pas en lumière de problème particulier concernant la protection de la fonction aldéhyde. En effet, le dérivé 1,3-dioxane **GD168** (Figure 24) a été obtenu et le test de stabilité à l'organolithien *t*-BuLi a été concluant. Cependant, en raison de la faible quantité de produit à disposition (100 mg) et le faible rendement de l'étape de diméthylsilylation obtenu pour le précurseur "cagé" de **GD99**, nous n'avons pas envisagé la réaction de Hitchcock intermoléculaire avec ce composé.

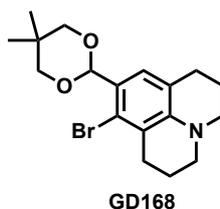
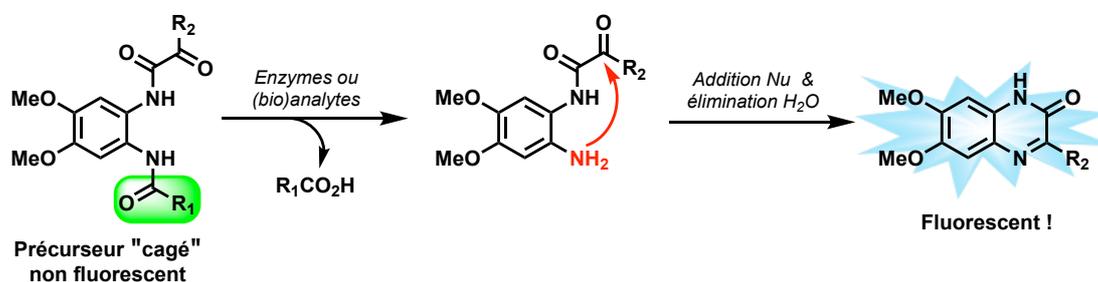


Figure 24. Dérivé de la 2-bromojulolidine dont l'aldéhyde est protégé par un motif 1,3-dioxane.

En effet, nous n'avons pas souhaité investir davantage de temps dans la resynthèse en grandes quantités (ca. 3 g) des synthons de départ qui auraient pu permettre de réaliser cette réaction à une échelle pour laquelle le contrôle des conditions aurait été facilité. Cependant par la suite, il serait intéressant de l'effectuer afin d'espérer obtenir les précurseurs "cagés" désirés et de pouvoir évaluer leurs efficacités et leurs intérêts applicatifs pour la détection d'enzymes bactériennes.

La complexité des synthèses de ces sondes nous a poussés à réfléchir à l'application du principe de "*covalent assembly*" à une autre famille de molécules fluorescentes. Celle-ci doit nous permettre d'obtenir plus rapidement et plus simplement de nouveaux substrats fluorogéniques non conventionnels et les fluorophores correspondants afin que nous puissions réaliser des essais de validations *in vitro* dans la foulée. Notre choix s'est ainsi porté sur la famille des quinoxalin-2(1*H*)-ones. En effet, elle semble répondre aux critères de simplicité synthétique (2 étapes de synthèse pour le fluorophore et 3 étapes pour la sonde). Ce projet a été porté par K. Renault qui a beaucoup travaillé sur ces molécules durant sa thèse⁴⁹ et j'ai collaboré avec lui pour obtenir une première preuve de principe comme celle présentée dans la Figure 25. Il est toutefois important de souligner que ce type de structures ne permettra pas d'accéder à des sondes dont l'activation enzymatique conduirait, comme dans le cas des pyronines et de leurs analogues siliciés, à un signal de fluorescence dans l'orange ou le rouge lointain (voir le NIR-I), mais à des émissions dans la gamme spectrale du bleu-vert. Le développement des sondes de type "*covalent assembly*" conduisant à la formation *in situ* de quinoxalinone fera l'objet du prochain chapitre de ce manuscrit.

Figure 25. Sondes fluorescentes de type "*covalent assembly*" dont l'activation enzymatique conduira à la formation *in situ* d'une quinoxalinone fluorescente.

⁴⁹ K. Renault, "Développement de ligations chimiosélectives "click" : applications à la synthèse de sonde fluorescentes", Thèse de Normandie Université, **2018**.

Chapitre 3

Sondes de type "*covalent assembly*"
conduisant à la formation *in situ* de
quinoxalin-2(1*H*)-ones fluorescentes

Ce troisième chapitre sera consacré à l'application du concept de "covalent assembly" à une autre famille d'hétérocycles fluorescents : les quinoxalin-2(1H)-ones. Une courte introduction présentera les différentes voies d'accès synthétique à ces molécules ainsi que leurs propriétés photophysiques. L'utilisation de ce motif hétérocyclique dans la conception de sondes fluorogéniques sera également présentée et illustrée au travers de quelques exemples. La thématique de recherche principale de notre groupe étant focalisée sur le développement et les applications de sondes fluorescentes de type "covalent assembly" (cf. partie I.1. du chapitre 2), nous avons choisi de présenter dans ce chapitre, le procédé de validation analytique que nous avons dû mettre au point (en 2015 dans la cadre de la thèse de S. Debieu et par la suite amélioré) pour démontrer de façon univoque la formation *in situ* d'un fluorophore sous l'action d'un stimulus enzymatique. Enfin les résultats obtenus concernant la synthèse d'une série de sondes de type "covalent assembly", dont l'activation par une activité enzymatique de type amidase ou nitroréductase conduit à la formation *in situ* de quinoxalin-2(1H)-ones fluorescentes, seront présentés et discutés.

I. Les quinoxalin-2(1H)-ones

I.1. Synthèses et modifications structurales

Le cœur quinoxalin-2(1H)-one est caractérisé par une pyrazin-2(1H)-one fusionnée à un cycle benzénique sur deux carbones adjacents. Les voies de synthèse et les modifications post-synthétiques de cet hétérocycle ont permis la synthèse de nombreux composés bioactifs¹, dont certains sont aujourd'hui commercialisés² (Figure 1). Ainsi, de nombreux travaux illustrent son large spectre d'utilisation dans le domaine pharmacologique (par exemple, activité antimicrobienne³, antithrombotique⁴ et anticancéreuse⁵).

¹ A. Carta, S. Piras, G. Loriga, G. Paglietti, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2006**, *6*, 1179-1200.

² L. Shi, H. Zhou, J. Wu, X. Li, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2015**, *12*, 96-112.

³ a) P. Sanna, A. Carta, M. Loriga, S. Zanetti, L. Sechi, *Il Farmaco*, **1998**, *53*, 455-461; b) M. Ali, M. Ismail, M. El-Gaby, M. Zahran, Y. Ammar, *molécules*, **2000**, *5*, 864-873; c) A. Carta, M. Loriga, S. Zanetti, L. A. Sechi, *Farmaco*, **2003**, *58*, 1251-1255; d) D. A. E. Issa, N. S. Habib, A. E. Abdel Wahab, *Med. Chem. Comm.*, **2015**, *6*, 202-211.

⁴ a) U. J. Ries, H. W. M. Priepeke, N. H. Huel, S. Handschuh, G. Mihm, J. M. Stassen, W. Wienen, H. Nar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2297-2302; b) J. A. Willardsen, D. A. Dudley, W. L. Cody, L. Chi, T. B. McClanahan, T. E. Mertz, R. E. Potoczak, L. S. Narasimhan, D. R. Holland, S. T. Rapundalo, J. J. Edmunds, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 4089-4099.

⁵ a) D. S. Lawrence, J. E. Copper, C. D. Smith, *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 594-601; b) A. Carta, M. Loriga, S. Piras, G. Paglietti, P. La Colla, B. Busonera, G. Collu, R. Loddo, *Med. Chem.*, **2006**, *2*, 113-122.

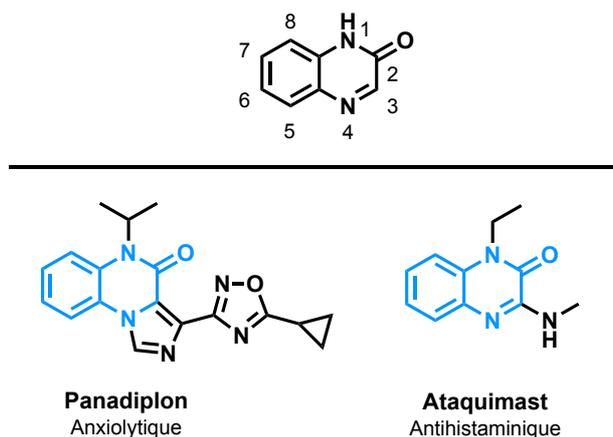


Figure 1. Structure générale des quinoxalin-2(1H)-ones (en haut) et celles de dérivés bioactifs (en bas).

Afin de moduler leurs propriétés thérapeutiques et ainsi obtenir des composés biologiquement actifs, les travaux autour de la synthèse des quinoxalin-2(1H)-ones se sont énormément développés au cours du siècle dernier⁶. La Figure 2 résume les différentes voies d'accès qui ont été explorées ; elles peuvent être divisées en huit catégories. Historiquement, la réaction de condensation, entre une *ortho*-phénylènediamine et un dérivé α -cétoester ou α -cétoacide⁷, fût la première à être utilisée pour la synthèse des quinoxalin-2(1H)-ones (Figure 2A). Cependant si le dérivé *ortho*-phénylènediamine possède différents substituants sur son noyau aromatique, la réaction de condensation conduit à la formation de plusieurs régioisomères. Pour pallier à ce problème, d'autres voies de synthèse ont été développées comme celles fondées sur des réactions d'expansion⁸ ou de contraction de cycle⁹ (Figure 2B, C). Les réactions d'oxydation¹⁰ et d'halogénéation *via* chloration de la position C-3¹¹ permettent quant à elles d'accéder à des quinoxalin-2(1H)-ones à partir de respectivement des 3,4-dihydroquinoxalin-2(1H)-ones et des 1,4-dihydroquinoxaline-2,3-diones (Figure 2D, E). Une autre alternative à la synthèse de ces N-hétérocycles est l'utilisation de réarrangements spécifiques comme le réarrangement de Wallach ou celui de Smiles¹² (Figure 2F). Les deux dernières familles de réactions permettant l'accès à des

⁶ Pour des revues sur les différentes voies de synthèses des quinoxalinones, voir : a) Y. Ramli, H. Benzeid, R. Bouhfid, Y. K. Rodi, S. Ferfra, E. M. Essassi, *St. Cer. St. CICBIA*, **2010**, *11*, 67-90; b) L. Shi, H. Zhou, J. Wu, X. Li, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2015**, *12*, 96-112; c) S. S. Sajadikhah, A. Zare, *Chem. Heterocycl. Comp.*, **2020**, *56*, 515-517.

⁷ a) O. Hinsberg, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1887**, *237*, 327-372; b) O. Hinsberg, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1896**, *292*, 245-258.

⁸ a) W. Fischer, E. Fahr, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1967**, *6*, 630-631; b) Y. Tamura, M. Chun, H. Nishida, S. Kwon, M. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, *26*, 2866-2873; c) P. D. Croce, M. Ioannisci, E. Licandro, *J. Chem. Soc.*, **1979**, 330-332; d) S.-L. Wang, J. Ding, B. Jiang, Y. Gao, S.-J. Tu, *ACS Comb. Sci.*, **2011**, *13*, 572-577.

⁹ a) H. Mtiraoui, K. Renault, M. Sanselme, M. Msaddek, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 7474-7475; b) H. Mtiraoui, M. Msaddek, K. Renault, P.-Y. Renard, C. Sabot, M. Sanselme, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 3060-3068.

¹⁰ a) M. Imanishi, M. Sonoda, H. Miyazato, K. Sugimoto, M. Akagawa, S. Tanimori, *ACS Omega*, **2017**, *2*, 1875-1885; b) P. S. Akula, B.-C. Hong, G.-H. Lee, *RSC Adv.*, **2018**, *8*, 19580-19584.

¹¹ S. A. Galal, A. S. Abdelsamie, H. Tokuda, N. Suzuki, A. Lida, M. M. Elhefnawi, R. A. Ramadan, M. H. E. Atta, D. H. I. El, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 327-340

¹² Pour le réarrangement de Smiles, voir : a) F. Christopher Bi, G. E. Aspnes, A. Guzman-Perez, D. P. Walker, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 1832-1835. Pour le réarrangement de Wallach, voir : b) A. Molnar, S. Boros, K. Simon, I. Hermeecz, C. Gonczi, *Arkivoc*, **2010**, 199-207.

quinoxalin-2(1*H*)-ones sont les réactions radicalaires¹³ et les réactions catalysées par des métaux de transition¹⁴, tels qu'une cyclisation intramoléculaire *via* une activation C-H^{14d} ou un double couplage d'Ullmann^{14a} qui conduit quant à lui, à la formation d'un isomère unique (Figure 2G, H).

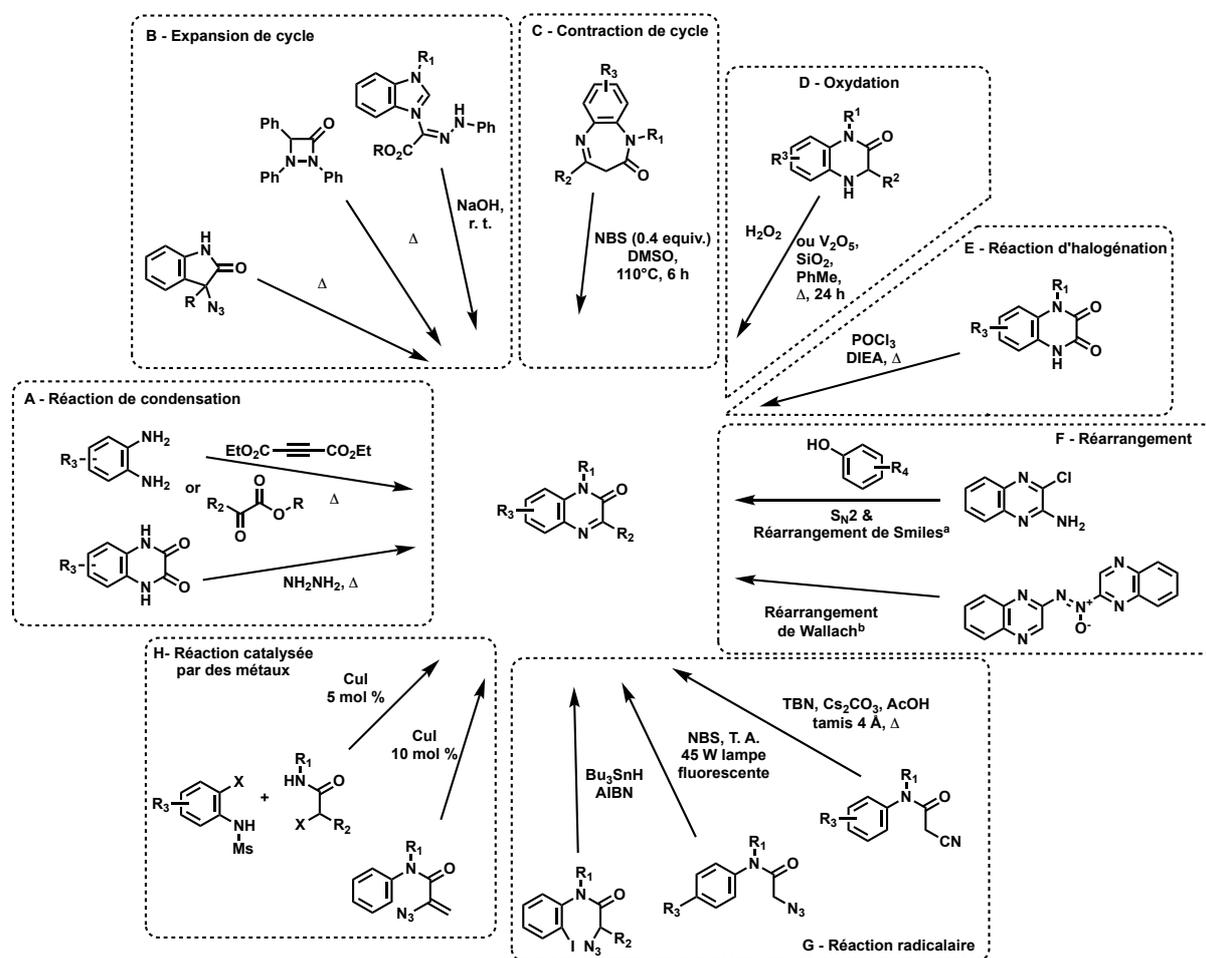


Figure 2. Résumé des différentes voies de synthèse des dérivés quinoxalin-2(1*H*)-ones¹⁵. ^aDans le cas du réarrangement de Smiles : R₁ = R₃ = H et R₂ = *N*-phénylamine^{12a}. ^bPour le réarrangement de Wallach R₁ = R₃ = H et R₂ = quinoxaline^{12b}.

Afin de créer de la diversité structurale supplémentaire, il est aussi possible de réaliser des modifications post-synthétiques sur le noyau quinoxalin-2(1*H*)-one déjà formé. Bien qu'il soit assez difficile de substituer l'azote en position 1, du fait de sa faible nucléophilie (amide sous sa forme tautomère), des réactions d'acylation ou d'alkylation *via* une activation thermique sont possibles¹⁶. La fonctionnalisation des positions 6 et 7 n'est possible que si elles sont, au préalable, substituées

¹³ a) G. Bencivenni, T. Lanza, R. Leardini, M. Minozzi, D. Nanni, P. Spagnolo, G. Zanardi, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 4721-4724; b) Z.-S. Li, W.-X. Wang, J.-D. Yang, Y.-W. Wu, W. Zhang, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 3820-3823; c) F. Wang, B.-L. Hu, L. Liu, H.-Y. Tu, X.-G. Zhang, *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 11247-11252.

¹⁴ a) D. Chen, W. Bao, *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, *352*, 955-960; b) D. Chen, Z.-J. Wang, W. Bao, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 5768-5771; c) T. Yang, H. Zhu, W. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 3376-3384.

¹⁵ Schéma inspiré du schéma 104 de la thèse de K. Renault, "Développement de ligations chimiosélectives "click" : applications à la synthèse de sondes fluorescentes", Thèse de Normandie Université, **2018**.

¹⁶ a) L. Cazaux, M. Faher, C. Picard, P. Tisnes, *Can. J. Chem.*, **1993**, *71*, 1236-1246; b) A. T. A. Boraei, E. S. H. El Tamany, I. A. I. Ali, S. M. Gebriel, *J. Heterocycl. Chem.*, **2017**, *54*, 2881-2888.

par un halogène. Il sera ainsi possible d'introduire divers groupements *via* des réactions de couplages pallado-catalysés (e.g., couplage de Suzuki-Miyaura ou de Heck)¹⁷.

Enfin la position 3 présente une grande réactivité dans le contexte des réactions radicalaires mettant en jeu un mécanisme de type SET ("Single Electron Transfer"), clés de voûte des approches en catalyse photoredox. En effet, elles sont facilitées par la stabilisation de l'intermédiaire formé suite à l'addition d'un radical R' sur la double liaison C=N (Figure 3A). De ce fait, de nombreux travaux décrivant l'introduction de divers groupements fonctionnels ou substituants (e.g., amine, amide, cétone, diphenylphosphinyle, thiol, ... ou substituants alkyle ou aryle,) ont été publiés et sont recensés dans deux revues récentes très complètes¹⁸. Deux autres réactions permettant la substitution de la position 3 ont également été décrites dans la littérature, l'insertion de motifs de type aryle *via* une activation/fonctionnalisation de la liaison C-H à l'aide d'une catalyse au palladium¹⁹ et l'insertion d'un groupement amino par des réactions de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) favorisées par des conditions oxydantes²⁰ (Figure 3B, C).

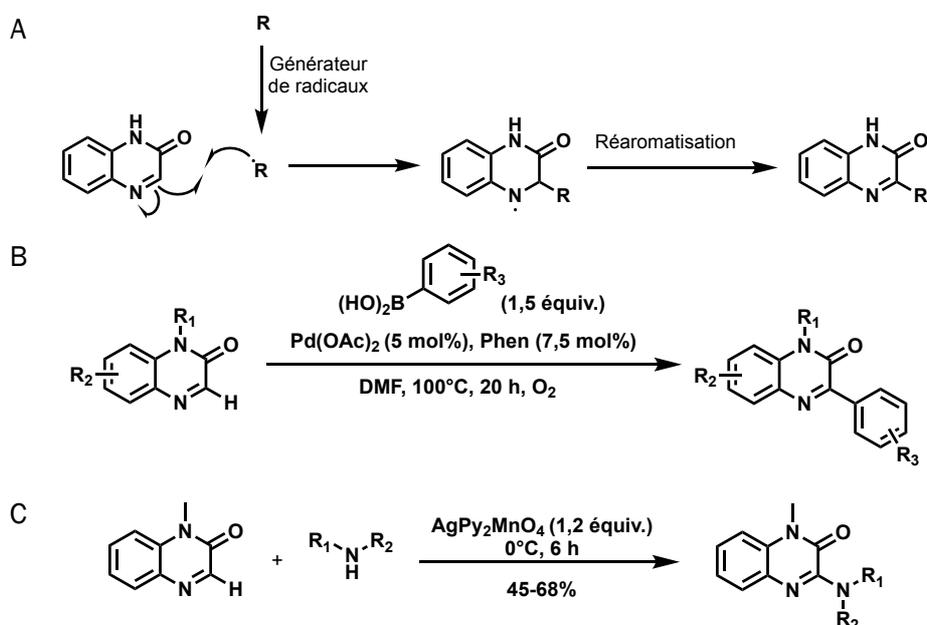


Figure 3. (A) Principe des réactions radicalaires permettant de substituer la position 3 du coeur quinoxalin-2(1*H*)-one. Stratégies de fonctionnalisation de la position 3 des quinoxalin-2(1*H*)-ones *via* (B) une réaction d'activation/fonctionnalisation de la liaison C-H à l'aide d'une catalyse au palladium¹⁹, (C) une S_NAr à l'aide de l'oxydant AgPy₂MnO₄^{20a}. (Phen = phénantroline, Py = pyridine)

¹⁷ a) S. M. Sharipova, A. A. Gilmutdinova, D. B. Krivolapov, Z. R. Khisametdinova, O. N. Kataeva, A. A. Kalinin, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2017**, 53, 504-510; b) A. A. Kalinin, S. M. Sharipova, T. I. Burganov, Y. B. Dudkina, A. R. Khamatgalimov, S. A. Katsyuba, Y. H. Budnikova, M. Y. Balakina, *Dyes Pigm.*, **2017**, 146, 82-91.

¹⁸ Pour deux revues sur les modifications de la position 3 des quinoxalin-2(1*H*)-ones, voir : a) M. Monika, S. Selvakumar, *Synthesis*, **2019**, 51, 4113-4136, b) P. Ghosh, S. Das, *Synth. Commun.*, **2020**, 50, 2266-2312.

¹⁹ A. Carrer, J.-D. Brion, S. Messaoudi, M. Alami, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 5606-5609.

²⁰ a) A. V. Gulevskaya, O. N. Burov, A. F. Pozharskii, M. E. Kletskii, I. N. Korbukova, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 696-707; b) M. Gupta, H.-i. Lee, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2017**, 242, 977-982.

Ces avancées synthétiques ont ainsi permis de développer de nouvelles molécules utilisables dans différents domaines (pharmaceutique²¹, industrie des pigments²², ...). Toutefois, si cette classe de N-hétérocycles est très connue pour son large spectre d'activités biologiques, ces molécules possèdent également des propriétés photophysiques intéressantes, le plus souvent dans la même gamme spectrale que celle des fluorophores de type 7-(dialkylamino)/7-hydroxycoumarine²³, mais encore peu exploitées. Ainsi, nous allons maintenant discuter du comportement spectral de ces molécules et de certaines applications en (bio)détection qui ont déjà été envisagées.

I.2. Propriétés photophysiques

C'est dans les années 1980 que les premiers travaux consacrés à la caractérisation spectrale de ces N-hétérocycles ont été réalisés²⁴. Une série de dix 6,7-diméthoxy-quinoxalin-2(1H)-ones originales et substituées en position 3 ont été synthétisées et leurs propriétés photophysiques étudiées. La substitution par différentes chaînes carbonées dont des motifs arylalkyle de type benzyle et un *para*-hydroxybenzyle n'influence pas les maxima d'absorption et d'émission des composés qui varient entre, respectivement, 361 nm et 366 nm et 449 nm et 452 nm dans le tampon PB pH 7,0. Il en est de même pour le rendement quantique qui varie entre 44% à 51%. Toutefois, le rendement quantique diminue drastiquement à 3% pour la 6,7-diméthoxy-3-(*para*-hydroxybenzyl)-quinoxalin-2(1H)-one, ce qui est peut-être dû à un phénomène de PeT réductif, induit par la présence du motif phénolique. Il est intéressant de noter que de nombreux dérivés quinoxalin-2(1H)-ones fluorescents portent deux substituants méthoxy en positions 6 et 7, en effet, cela permet notamment lors de la synthèse de ces composés d'obtenir un régioisomère unique.

²¹ B. Wu, Y. Yang, X. Qin, S. Zhang, C. Jing, C. Zhu, B. Ma, *ChemMedChem*, **2013**, *8*, 1913-1917.

²² a) A. A. Kalinin, S. M. Sharipova, T. I. Burganov, Y. B. Dudkina, A. R. Khamatgalimov, S. A. Katsyuba, Y. H. Budnikova, M. Y. Balakina, *Dyes Pigm.*, **2017**, *146*, 82-91; b) S. M. Sharipova, A. A. Gilmutdinova, D. B. Krivolapov, Z. R. Khisametdinova, O. N. Kataeva, A. A. Kalinin, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2017**, *53*, 504-510.

²³ Pour deux revues récentes sur l'utilisations des dérivés coumarines comme sondes fluorogéniques, voir : a) D. Cao, Z. Liu, P. Verwilt, S. Koo, P. Jangjili, J. S. Kim, W. Lin, *Chem. Rev.*, **2019**, *119*, 10403-10519; b) X.-y. Sun, T. Liu, J. Sun, X.-j. Wang, *RSC Adv.*, **2020**, *10*, 10826-10847.

²⁴ S. Hara, M. Yamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 3493-3498.

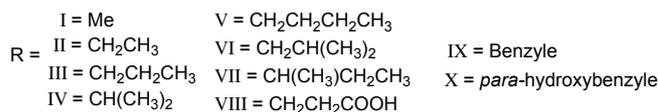
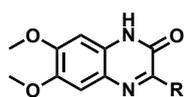


TABLE V. Fluorescence Properties of 3-Substituted 6,7-Dimethoxy-2(1*H*)-quinoxalinones^{a)} in Methanol and Phosphate Buffer (0.04 M, pH 7.0)

| Compound No. | Excitation maximum (nm) | | Emission maximum (nm) | | Relative fluorescence intensity ^{b)} | | Quantum yield | |
|--------------|-------------------------|--------|-----------------------|--------|---|--------|---------------|--------|
| | MeOH | Buffer | MeOH | Buffer | MeOH | Buffer | MeOH | Buffer |
| I | 361 | 361 | 442 | 449 | 100 | 86 | 0.50 | 0.44 |
| II | 360 | 361 | 443 | 448 | 110 | 91 | 0.50 | 0.45 |
| III | 361 | 364 | 443 | 449 | 109 | 100 | 0.53 | 0.46 |
| IV | 360 | 362 | 442 | 448 | 102 | 96 | 0.47 | 0.44 |
| V | 362 | 363 | 443 | 449 | 113 | 95 | 0.51 | 0.46 |
| VI | 363 | 365 | 443 | 449 | 108 | 89 | 0.54 | 0.47 |
| VII | 362 | 364 | 443 | 449 | 106 | 92 | 0.47 | 0.42 |
| VIII | 359 | 361 | 444 | 449 | 105 | 95 | 0.50 | 0.47 |
| IX | 366 | 368 | 447 | 452 | 129 | 102 | 0.56 | 0.51 |
| X | 365 | 366 | 444 | 449 | 5.9 | 2.0 | 0.028 | 0.018 |

a) Concentration, 1×10^{-6} M. b) The fluorescence intensity of compound I in methanol was taken as 100.

Figure 4. Propriétés spectrales des dérivés 6,7-diméthoxy-quinoxalin-2(1*H*)-one substituées en position 3. Tableau issu de la référence 24. © 1985 Pharmaceutical Society of Japan.

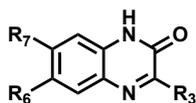
Il est intéressant de noter qu'en plus des propriétés de fluorescence, le motif quinoxalin-2(1*H*)-one possède des propriétés de solvatochromisme dues à un phénomène de prototropie. Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 1996, par S. Santra et S. K. Dogra²⁵ puis confirmées en 2017, par R. Iida *et al*²⁶.

En 2003, le groupe de T. Santa étudie la relation entre les propriétés spectrales et la structure des quinoxalin-2(1*H*)-ones, en jouant sur le jeu de substituants des positions 3, 6 et 7²⁷. Deux tendances majeures sont issues de cette étude. La présence d'un groupement électro-donneur en position 6 conduit à un déplacement des maxima d'absorption et d'émission vers le rouge, dû à l'extension de la conjugaison. La substitution de la position 7 par des groupements électro-donneurs favorise, quant à elle, le système "*push-pull*" et améliore le rendement quantique (Figure 5).

²⁵ S. Santra, S. K. Dogra, *Chem. Phys.*, **1996**, 207, 103-113.

²⁶ R. Iida, B. Benali, A. El Assyry, B. Lakhrissi, *Opt. Quant. Electron.*, **2017**, 49, 79.

²⁷ K. Azuma, S. Suzuki, S. Uchiyama, T. Kajiro, T. Santa, K. Imai, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2003**, 2, 443-449.



| R ₃ | R ₆ | R ₇ | λ _{Abs} (nm) | λ _{em} (nm) | Φ _F |
|----------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| COOEt | H | H | 370 | 492 | 1% |
| COOEt | H | OH | 375 | 501 | 2% |
| COOEt | OH | H | 411 | 548 | <0,1% |
| Ph | H | H | 356 | 441 | 5% |
| Ph | H | OMe | 362 | 433 | 18% |
| Ph | OMe | H | 384 | 496 | 10% |

Figure 5. Propriétés spectrales de dérivés quinoxalin-2(1H)-ones développés par Azuma *et al.*²⁷ L'eau est le solvant utilisé pour ces mesures.

L'influence de la nature des substituants en position 3, 6, 7 a également été étudiée plus récemment par le groupe de P.-Y. Renard. Ainsi, cette équipe a préparé trois nouveaux dérivés de la α -hydroxybenzyl-4-N-méthyl-quinoxalinone et étudié leurs propriétés photophysiques²⁸ (Figure 6). Il a été remarqué que le caractère "push-pull" d'une quinoxalin-2(1H)-one était beaucoup plus marqué lorsqu'un substituant électro-donneur est introduit en position 7. Ainsi, la présence du groupement -NH₂, exalte drastiquement le rendement quantique et conduit, selon le solvant utilisé, à un déplacement bathochrome des longueurs d'onde d'émission par rapport au composé substitué en position 6 par un groupement -OMe (Figure 6).

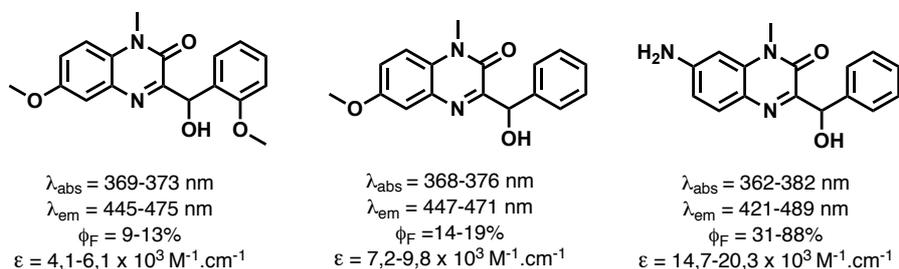


Figure 6. Structure des dérivés quinoxalin-2(1H)-ones développés par le groupe de P.-Y. Renard²⁸.

La même année, les travaux de A. Kalinin *et al.* concernant des dérivés quinoxaline-2(1H)-one fonctionnalisés en position 7 par un motif *para*-diméthylaminostyryle (DMAS) et en position 3 par un motif dicyanométhylidène ou dicyanométhylidènedihydrofurane-vinyle montrent également que ce type de systèmes "push-pull" (substituant électro-donneur en position 7 et substituant électro-attracteur en position 3) a aussi une influence sur la position des maxima d'absorption pour lesquels un déplacement bathochrome spectaculaire a pu être obtenu²⁹ (Figure 7).

²⁸ K. Renault, P.-Y. Renard, C. Sabot, *New J. Chem.*, **2017**, *41*, 10432-10437.

²⁹ A. A. Kalinin, S. M. Sharipova, T. I. Burganov, Y. B. Dudkina, A. R. Khamatgalimov, S. A. Katsyuba, Y. H. Budnikova, M. Y. Balakina, *Dyes Pigm.*, **2017**, *146*, 82-91.

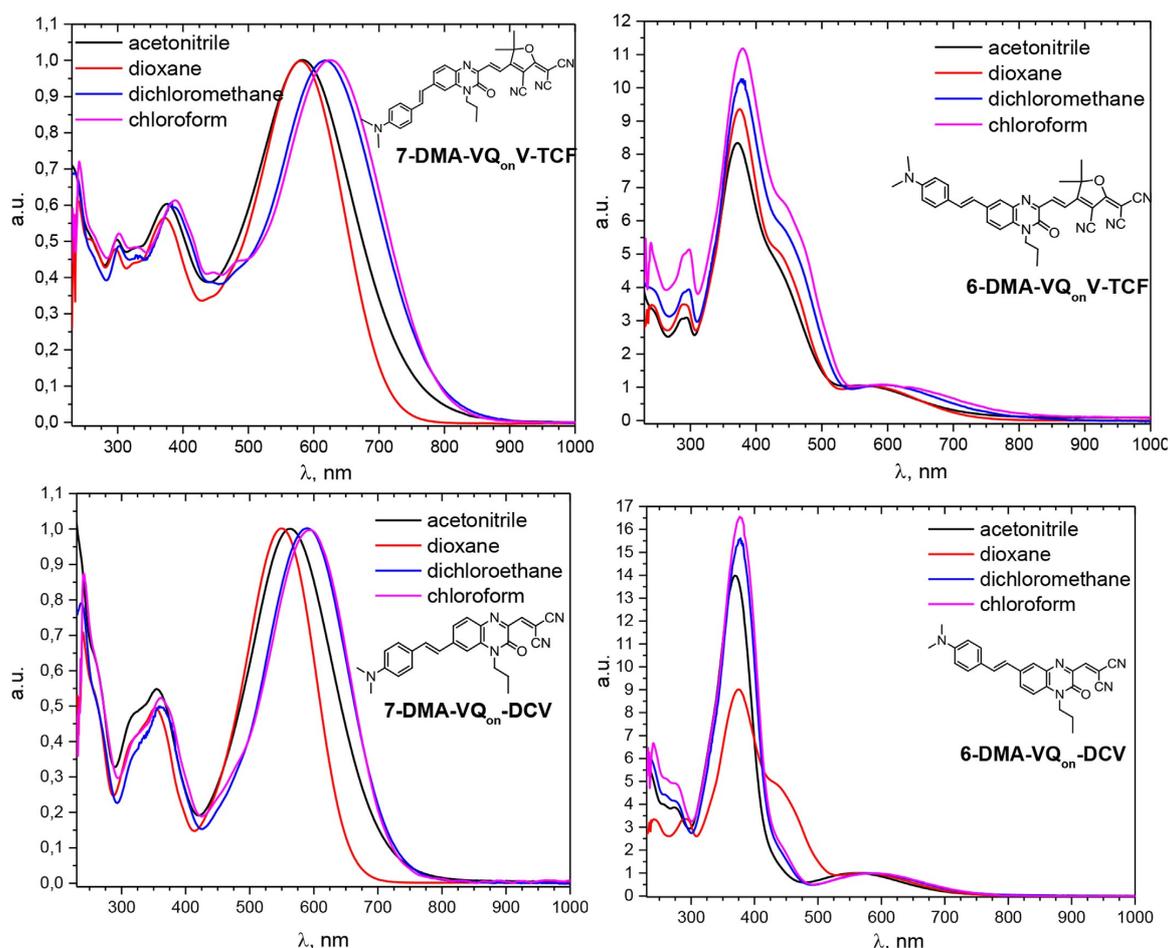


Figure 7. Spectres d'absorptions des composés synthétisés par A. Kalinin *et al.* enregistrés dans différents solvants (les spectres sont normalisés). Illustration issue de la référence 29. © Elsevier.

Les travaux les plus récents sur ces N-hétérocycles fluorescents ont été réalisés par le groupe de T. I. Burganov et font suite à ceux de A. Kalinin *et al.* Ceux datant de 2018 rapportent l'influence de la position du motif électro-donneur DMAS sur les propriétés spectrales des fluorophores synthétisés³⁰. Quant à ceux publiés en 2019, ils montrent que l'extension du système π conjugué via l'introduction de motifs *para*-dialkylaminostyryle et la formation de dérivés dimériques conduisent également à un déplacement bathochrome des maxima d'émission³¹ (Figure 8).

³⁰ T. I. Burganov, S. A. Katsyuba, S. M. Sharipova, A. A. Kalinin, A. Monari, X. Assfeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, *20*, 21515-21527.

³¹ T. I. Burganov, S. A. Katsyuba, L. N. Islamova, G. M. Fazleeva, S. M. Sharipova, A. A. Kalinin, A. Monari, X. Assfeld, *Dyes Pigm.*, **2019**, *170*, 107580.

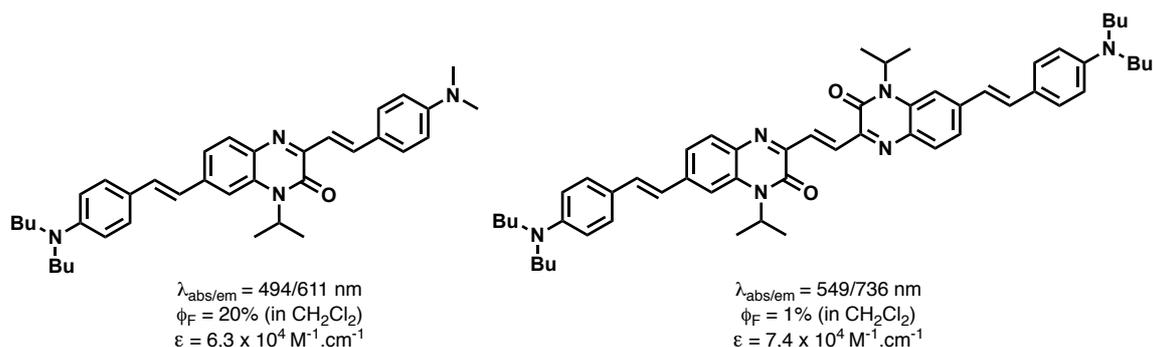


Figure 8. Structures et propriétés photophysiques de deux dérivés de quinoxalin-2(1H)-one à conjugaison étendue, synthétisés par le groupe de T. I. Burganov³¹.

I.3. Utilisations en tant que réactifs fluorescents de dérivatisation et sondes fluorogéniques

La première utilisation des dérivés de quinoxalin-2(1H)-one a concerné leur utilisation comme réactif de dérivatisation et de détection de divers analytes, par analyse HPLC couplée à une détection par fluorescence. On peut citer les quatre produits commerciaux dont la structure et les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission sont donnés dans la Figure 9. Le **Br-DMEQ** ou le **Br-MMEQ** sont utilisés pour détecter divers analytes³² *via* la formation d'un lien covalent entre des fonctions acides carboxyliques (présentes au sein de la structure des analytes) et leur bras bromoéthyle en position 3, et selon une réaction de type $\text{S}_{\text{N}}2$ ³³. Le **DMEQ-COCl** est quant à lui utilisé pour sa réactivité vis-à-vis des alcools, des amines et des phénols, selon une réaction de type $\text{S}_{\text{N}}2$ ³⁴. Enfin le **DMEQ-TAD** permet la quantification *in vitro* de métabolites de la vitamine C³⁵.

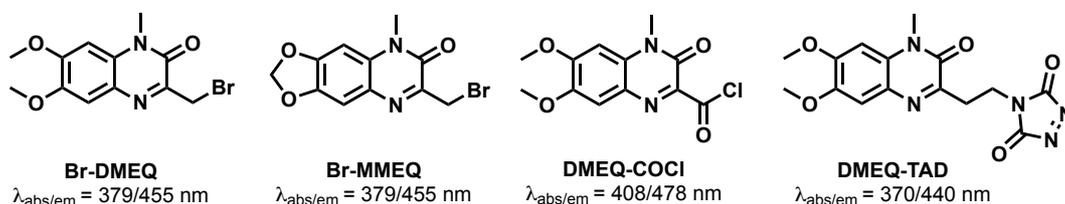


Figure 9. Structures et propriétés spectrales des dérivés de quinoxalin-2(1H)-one commerciaux utilisés pour la dérivatisation et la détection d'analytes *via* des analyses HPLC couplée à une détection par fluorescence.

³² Pour la détection : a) d'oligosaccharides : M. Yamaguchi, S. Hara, Y. Takemori, M. Nakamura, *Anal. Sci.*, **1989**, 5, 35-38. b) d'acide phénylacétique dans le plasma humain : M. Yamaguchi, M. Nakamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 3740-3745. c) de peptides : H. Kamimori, Y. Hamashima, M. Konishi, *Anal. Biochem.*, **1994**, 218, 417-424 ou d) de métabolite de la cocaïne dans l'urine humaine : K. Nakashima, M. Okamoto, K. Yoshida, N. Kuroda, S. Akiyama, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **1992**, 584, 275-279.

³³ Pour les publications princeps, voir : a) M. Yamaguchi, S. Hara, R. Matsunaga, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Anal. Sci.*, **1985**, 1, 295-296; b) M. Yamaguchi, O. Takehiro, S. Hara, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 2263-2266.

³⁴ Pour des travaux sur l'utilisation du **DMEQ-COCl**, voir : a) K. J. Dave, C. M. Riley, D. Vander Velde, J. F. Stobaugh, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1990**, 8, 307-312; b) Y. Iwasaki, K. Mochizuki, Y. Nakano, N. Maruya, M. Goto, Y. Maruyama, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *Biomed. Chromatogr.*, **2012**, 26, 41-50; c) Y. Higashi, *Detection*, **2016**, 4, 16-24.

³⁵ M. Shimizu, S. Kamachi, Y. Nishii, S. Yamada, *Anal. Biochem.*, **1991**, 194, 77-81.

Les différentes stratégies de modification de la position 3 ont permis le développement de plusieurs sondes ratiométriques pour la détection de thiols³⁶, de sulfure d'hydrogène²⁸, de ROS³⁷ *in vitro* ou *in cellulo* ou encore la visualisation du transport vésiculaire³⁸. La Figure 10 illustre le principe de la sonde à thiols proposée par Ghorbanian *et al.*^{36a} ; le motif maléimide en *para* du groupement styryle lié au cœur *N*-méthyl-quinoxalin-2(1*H*)-one sur la position 3 joue le rôle d'extincteur de la fluorescence *via* le phénomène de PeT. La réaction d'un thiol avec le maléimide met fin à ce processus, ce qui permet de retrouver la fluorescence de la sonde et la détection de l'analyte³⁹.

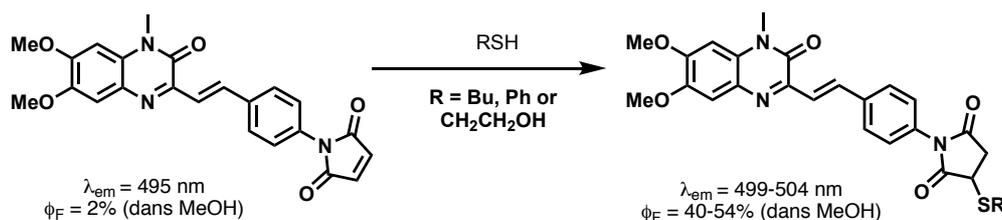


Figure 10. Principe d'une sonde à thiols basée sur un cœur quinoxalin-2(1*H*)-one développée par Ghorbanian *et al.*^{36a}

En 1991, le groupe de B. Valeur a rapporté une structure hybride de type éther couronne-quinoxalin-2(1*H*)-one dans le but de chélater un atome d'euporium Eu^{3+} et ainsi former un complexe de lanthanide où l'hétérocycle fluorescent joue le rôle d'antenne transmettant l'énergie reçue vers le cation Eu^{3+} . Ceci leur permet d'observer une émission supérieure dans le rouge (bande d'émission λ_{em} fine centrée à 615 nm caractéristique de ce cation Ln^{3+})⁴⁰. La structure hybride du composé a été reprise quelques années plus tard par le groupe de J. Parrick pour la détection de divers cations métalliques dont le cation lithium⁴¹ (Figure 11).

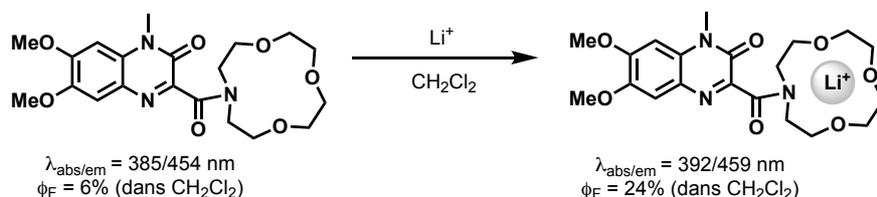


Figure 11. Sonde fluorogénique dérivée d'une quinoxalin-2(1*H*)-one pour la détection de cations métalliques⁴¹.

Une sonde fluorogénique de type FRET utilisant un dérivé quinoxalin-2(1*H*)-one comme donneur de fluorescence, le **DMEQ-TAD**, a été développé en 2013 par le groupe de A. Madder⁴². Elle est composée d'un quencher de type diazoïque (l'hélianthine, également appelée

³⁶ a) S. Ghorbanian, L. K. Mehta, J. Parrick, *J. Chem. Res.*, **2000**, 52-53; b) B. Yang, J. Xu, Z.-H. Yuan, D.-J. Zheng, Z.-X. He, Q.-C. Jiao, H.-L. Zhu, *Talanta*, **2018**, *189*, 629-635; c) X.-P. Zhang, T.-T. Wang, Z.-H. Yuan, Y. Zhou, Y.-S. Yang, H.-L. Zhu, *Dyes Pigm.*, **2019**, *171*, Article 107716.

³⁷ L. Shi, Q. Guan, X. Gao, X. Jin, L. Xu, J. Shen, C. Wu, X. Zhu, C. Zhang, *Anal. Chem.*, **2018**, *90*, 9218-9225.

³⁸ L. Shi, X. Gao, W. Yuan, L. Xu, H. Deng, C. Wu, J. Yang, X. Jin, C. Zhang, X. Zhu, *Small*, **2018**, *14*, 1800223.

³⁹ Pour une revue sur la modification de biomolécules à l'aide du motif bioconjuguable maléimide, voir : K. Renault, J. W. Frey, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29*, 2497-2513.

⁴⁰ M. Sowinska, M. T. Le Bris, B. Valeur, *J. Photochem. Photobiol., A*, **1991**, *60*, 383-386.

⁴¹ A. R. Ahmad, L. K. Mehta, J. Parrick, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 12899-12910.

⁴² K. Hoogewijs, D. Buyst, J. M. Winne, J. C. Martins, A. Madder, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 2927-2929.

méthylorange) relié au fluorophore par un peptide et elle permet la détection de l' α -chymotrypsine, une endopeptidase qui hydrolyse une chaîne peptidique en aval d'un résidu L-tyrosine, L-tryptophane, L-phénylalanine ou L-méthionine (Figure 12). Ainsi la coupure du peptide par l'enzyme va provoquer un éloignement entre le fluorophore et le quencher, ce qui aura pour effet d'interrompre le phénomène de FRET et donc de permettre une détection de la fluorescence du **DMEQ-TAD**, attestant de la présence de l'enzyme dans le milieu.

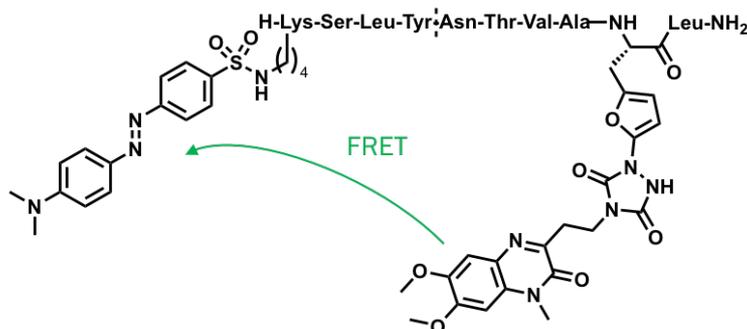


Figure 12. Structure de la sonde de type FRET développée par le groupe de A. Madder permettant la détection de l' α -chymotrypsine⁴².

En 2015 et 2017, le groupe de Akutagawa a développé des sondes ratiométriques basées sur le principe de l'ESIPT (cf. partie II.2.3 de l'introduction générale)⁴³. Celle présentée Figure 13 permet la détection des cations Li^+ , Na^+ , et des anions F^- et AcO^- . La sonde dérivée du motif 3-aminocarbonyl-quinoxalin-2(1*H*)-one est présente majoritairement dans le THF sous sa forme lactime, ce qui rend possible l'ESIPT. Une émission de fluorescence centrée à 520 nm est alors observée. Tandis qu'en présence des différents ions mentionnés ci-dessus, l'équilibre est déplacé vers la forme lactame et une émission de fluorescence centrée à 460 nm est obtenue. Le déplacement de l'équilibre est dû à la chélation entre les différents ions et l'atome d'hydrogène du motif lactame limitant ainsi sa tautomérisation^{43a}.

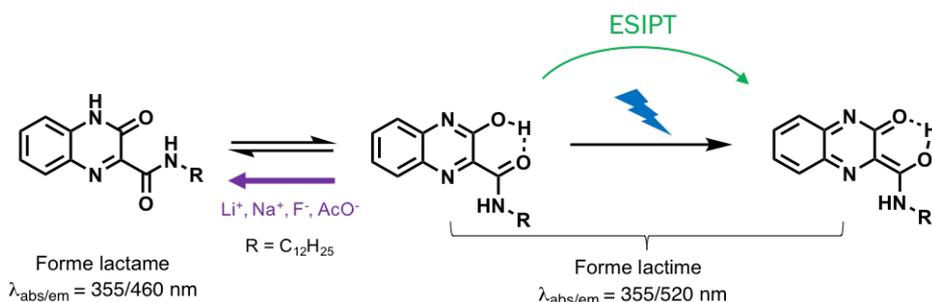


Figure 13. Sonde basée sur le phénomène d'ESIPT développée par le groupe d'Akutagawa et permettant la détection de différents ions^{43a}.

⁴³ a) Y. Nakane, T. Takeda, N. Hoshino, K.-i. Sakai, T. Akutagawa, *J. Phys. Chem. A*, **2015**, *119*, 6223-6231; b) Y. Nakane, T. Takeda, N. Hoshino, K.-i. Sakai, T. Akutagawa, *J. Mater. Chem. C*, **2017**, *5*, 6234-6242.

En 2020, la combinaison d'un dérivé quinoxalin-2(1H)-one et d'un rotor TPE *via* un pont diméthine a conduit à l'obtention d'une sonde pro-fluorescente de type AIE, **TPEQHA**, permettant la détection de la phosphatase alcaline (PAL) au sein de cellules HeLa (Figure 14)⁴⁴. L'hétérocycle est substitué en position 7, par un groupement hydroxyle estérifié par l'acide phosphorique ce qui d'une part affecte le caractère "*push-pull*" du cœur quinoxalin-2(1H)-one et d'autre part améliore significativement la solubilité aqueuse de la sonde. Lorsque ce motif est hydrolysé, le caractère AIE de la sonde *via* le rotor TPE est restauré conduisant à une émission de fluorescence centrée à 543 nm.

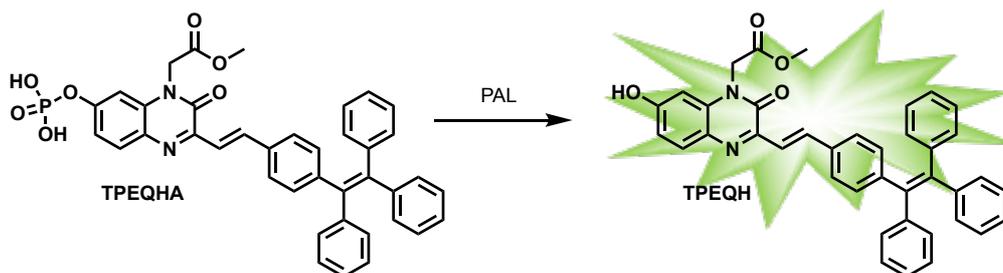


Figure 14. Principe de la sonde pro-fluorescente de type AIE développée par Guan *et al.*⁴⁴

Nous avons donc pu voir au travers de ces différents exemples que les dérivés quinoxalin-2(1H)-ones sont stables et utilisables dans des applications de (bio)détection en milieu aqueux. De plus, ces fluorophores présentent des propriétés spectrales intéressantes qui peuvent être aisément modulées en jouant sur la nature des substituants des différentes positions. Ainsi, il nous est apparu intéressant d'appliquer le principe du "*covalent assembly*" à la formation *in situ* de ces hétérocycles fluorescents même si par rapport aux objectifs initiaux de cette thèse (cf. partie III de l'introduction générale), nous étions conscients qu'il ne serait pas possible d'atteindre la gamme spectrale du rouge lointain et/ou du NIR-I.

II. Résultats et discussions

Devant la complexité des synthèses des colorants hétéro-pyronines (cf. chapitre 1) et suite aux multiples problèmes rencontrés lors de la préparation des précurseurs "cagés" des Si-pyronines (cf. chapitre 2), nous avons décidé de réorienter quelque peu le sujet de ma thèse en appliquant le concept de sondes de type "*covalent assembly*" à une autre famille de fluorophores. Le Dr. K. Renault ayant travaillé lors de sa thèse sur les dérivés de quinoxalin-2(1H)-one⁴⁵, a émis l'idée que ces *N*-hétérocycles pourraient être des cibles de choix pour le développement de nouvelles réactions domino biocompatibles et enzymo-déclenchables. Par ailleurs, on m'avait également proposé de travailler sur la formation *in situ* d'une autre famille de fluorophores : les GCTPOC⁴⁶, qui

⁴⁴ Q. Guan, X. Lu, Y. Su, J. Xu, X. Liang, P. Li, X. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.*, **2020**, 28, Article 115284.

⁴⁵ Thèse de K. Renault, "Développement de ligations chimiosélectives "click" : applications à la synthèse de sondes fluorescentes", Thèse de Normandie Université, **2018**.

⁴⁶ L. Yuan, W. Lin, H. Chen, S. Zhu, L. He, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 10018-10022.

sont des structures hybrides entre un cœur tétrahydroxanthène et un cœur coumarinique, selon des processus domino apparentés à la réaction de Morita-Baylis-Hillman, mais cette approche était beaucoup plus prospective et plus risquée que celle proposée par K. Renault.

Les fluorophores à cœur quinoxalin-2(1H)-one remplissent plusieurs critères du cahier des charges précédemment évoqué. Tout d'abord, en se basant sur la réaction de condensation historiquement utilisée pour préparer ces *N*-hétérocycles fluorescents⁷, l'obtention des fluorophores de référence est théoriquement possible en seulement deux étapes à partir d'un dérivé de type *ortho*-dinitrobenzène commercial (Schéma 1). Dans notre cas, nous avons choisi de travailler avec le 1,2-diméthoxy-4,5-dinitrobenzène ce qui nous permet d'éviter l'obtention de différents régioisomères. Ainsi après réduction des deux groupements nitro à l'aide d'une hydrogénation catalytique (H₂ et Pd/C), le dérivé *ortho*-phénylènediamine correspondant est obtenu. Sa réaction avec un dérivé α -cétoacide, facilement accessible en une ou deux étapes à partir de produits commerciaux, nous conduit au fluorophore désiré.

La synthèse des sondes de type "covalent assembly" se fait en trois étapes à partir du 1,2-diméthoxy-4,5-dinitrobenzène. Elles sont composées d'un noyau *ortho*-phénylènediamine dont l'une des deux anilines primaires porte le motif de reconnaissance enzymatique et la seconde est acylée par réaction de couplage peptidique avec le dérivé α -cétoacide sélectionné. La structure de la sonde permet, par la substitution d'une des deux anilines primaires, d'exemplifier facilement les analytes ciblés, ce qui répond à un de nos objectifs (Schéma 1). Dans un premier temps, le motif choisi est le PhAc permettant la détection de la PGA, notre enzyme modèle (cf. partie I.2.2.1. du chapitre 2). Celui-ci est introduit à l'aide d'un bras espaceur auto-immolable de type *para*-aminobenzyle (dérivé du PABA commercial) car des premières investigations ont montré que la *N*-acylation directe du dérivé *ortho*-phénylènediamine avec le chlorure de PhAc conduisait à une sonde de type "covalent assembly" non réactive vis-à-vis de l'amidase ciblée.

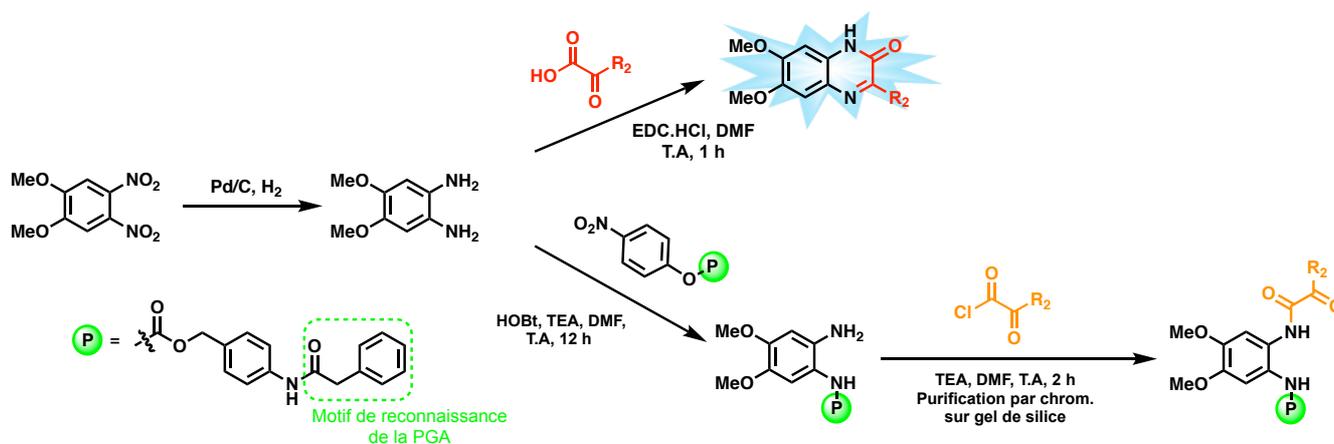


Schéma 1. Synthèse de la quinoxalin-2(1H)-one fluorescente utilisée comme référence et de la sonde de type "covalent assembly" correspondante.

Nous avons émis l'hypothèse que le processus de cyclisation/aromatization conduisant à la formation de l'hétérocycle fluorescent peut se produire spontanément dans des conditions physiologiques selon une réaction d'addition nucléophile intramoléculaire de l'aniline déprotégée sur le carbonyle activé du motif α -cétoamide voisin (Figure 15)⁴⁷.

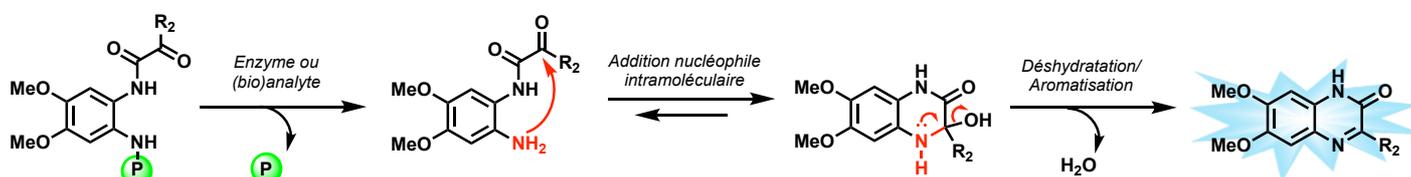


Figure 15. Processus de détection d'une activité enzymatique *via* la formation *in situ* d'une quinoxalin-2(1H)-one fluorescente à partir d'une sonde de type "covalent assembly".

Nous avons ainsi réalisé une première étude en synthétisant huit fluorophores et sept sondes sensibles à la PGA. Le procédé de validation des sondes de type "covalent assembly" est présenté dans la partie suivante. De plus, l'étude des propriétés photophysiques des fluorophores ainsi que les tests d'activation enzymatique des sondes ont fait l'objet d'une publication récemment acceptée dans le journal *Organic Letters*⁴⁸ (éditeur American Chemical Society) qui servira de support à la discussion. Cette Communication s'accompagne d'une partie expérimentale de 174 pages disponibles dans le volume II de ce manuscrit.

II.1. Méthode de validation d'une sonde fluorescente de type "covalent assembly"

Une méthodologie utilisée en routine au sein de notre groupe pour la validation des sondes fluorescentes de type "covalent assembly" a été mise au point au sein du laboratoire et est résumée dans la Figure 16 ; elle a été publiée par S. Debieu et A. Romieu en 2015⁴⁹ et a connu depuis des améliorations régulières. Dans un premier temps, il est nécessaire de synthétiser en amont de la sonde, le fluorophore de référence afin de s'assurer de sa stabilité en milieux aqueux et de déterminer ses propriétés spectrales (en particulier sa brillance B) en conditions physiologiques simulées (*i.e.*, tampon phosphate, PBS et/ou PBS + 5% BSA). De plus, cette caractérisation photophysique permettra de préciser le couple de longueurs d'onde $\lambda_{ex/em}$ à utiliser lors des tests d'activation enzymatique mettant en jeu des mesures de fluorescence selon le mode cinétique.

Ainsi, une fois la stabilité hydrolytique du fluorophore démontrée et ses propriétés spectrales déterminées, les tests de déclenchement enzymatique peuvent être effectués (sous réserve que l'enzyme isolée soit disponible). Ceux-ci sont réalisés par enregistrement (en fonction du temps) de l'émission de fluorescence à l'aide des paramètres déterminés précédemment (*vide supra*). La

⁴⁷ a) J. Hine, M. S. Cholod, W. K. Chess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 4270-4276; b) B. K. Margar, A. S. Kirdant, V. A. Shelke, S. G. Shankarwar, T. K. Chondhekar, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3, 116-123.

⁴⁸ G. Dejoui, K. Renault, Q. Bonin, A. Chevalier, C. Michaudet, M. Picquet, I. E. Valverde, A. Romieu, *Org. Lett.*, **2020**, 22, 6494-6499.

⁴⁹ S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 10348-10361.

première cinétique **K1**, débute par la mise en solution de la sonde dans le tampon choisi et à 37 °C, généralement à une concentration de 1 µM (3 mL de solution donc 3 nmoles de sonde). Après 5 min, l'enzyme (dans notre cas, la PGA, 1 U) est ajoutée à la solution. On observe alors une exaltation du signal de fluorescence jusqu'à l'obtention d'un plateau indiquant (en théorie) la conversion totale de la sonde. Dans le cas où aucune augmentation de la fluorescence n'est observée, il est nécessaire de chercher à comprendre pourquoi (encombrement stérique qui empêche la reconnaissance et la métabolisation du motif par l'enzyme, dégradation prématurée de la sonde, ...) et de retravailler à la conception (et à la synthèse) de la sonde si nécessaire. La deuxième cinétique **K2** correspond au contrôle ou "blanc", elle permet de vérifier que la sonde ne s'auto-assemble pas ou ne s'hydrolyse pas spontanément dans le milieu, sans enzyme. La sonde est mise dans le tampon à la même concentration et l'analyse est réalisée sur une durée identique à la cinétique **K1**. Une fois ces cinétiques réalisées, les solutions sont immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -20 °C. En fonction de la disponibilité des instruments analytiques de notre laboratoire, les solutions des deux cinétiques (ainsi que le tampon et les solutions de fluorophore et de sonde) sont décongelées et analysées par HPLC couplée à un détecteur de fluorescence (détecteur Thermo Scientific Dionex FLD-3400RS avec double PMT équipé d'une cellule thermostatée). Le but étant de prouver que la fluorescence observée lors des cinétiques réalisées en cuvette est bien imputable au fluorophore ; la formation de celui-ci sera confirmée (ou pas) par comparaison du temps de rétention et co-injection avec un échantillon de fluorophore préparé indépendamment. Les solutions **K1** et **K2** (volume initial de 3 mL) sont ensuite lyophilisées et les résidus sont repris dans un minimum de solvant (typiquement 0,5 mL d'un mélange H₂O-MeCN 1:1, v/v, qualité HPLC) et analysées par HPLC-MS (en modes "full-scan" et SIM pour "Single Ion Monitoring"). Le but de ces analyses est de confirmer une nouvelle fois la formation du fluorophore, mais aussi de conclure quant à la consommation totale ou pas de la sonde et/ou la formation d'un ou de plusieurs intermédiaires prouvant le mécanisme d'activation revendiqué. Précisons qu'il n'est pas possible d'effectuer des analyses HPLC avec une triple détection UV-vis-fluorescence-MS tout simplement pour des raisons techniques. En effet, le raccordement de la sortie du détecteur FLD-3400RS au spectromètre de masse MSQ Plus n'est pas possible car la surpression créée provoquerait la casse de la cellule de mesure thermostatée. Enfin, ajoutons que les analyses en mode SIM permettent de détecter aisément des quantités de l'ordre de quelques picomoles de fluorophore et/ou de sonde, ce qui permet de valider des processus domino conduisant à la formation de fluorophores peu émissifs ou ceux dont les cinétiques sont très lentes. Comme les quantités de matière détectée sont très faibles, nous veillons entre chaque analyse SIM à faire les analyses des blancs (*i.e.*, tampon PB et MeCN) pour confirmer que les pics observés ne sont pas des artefacts.

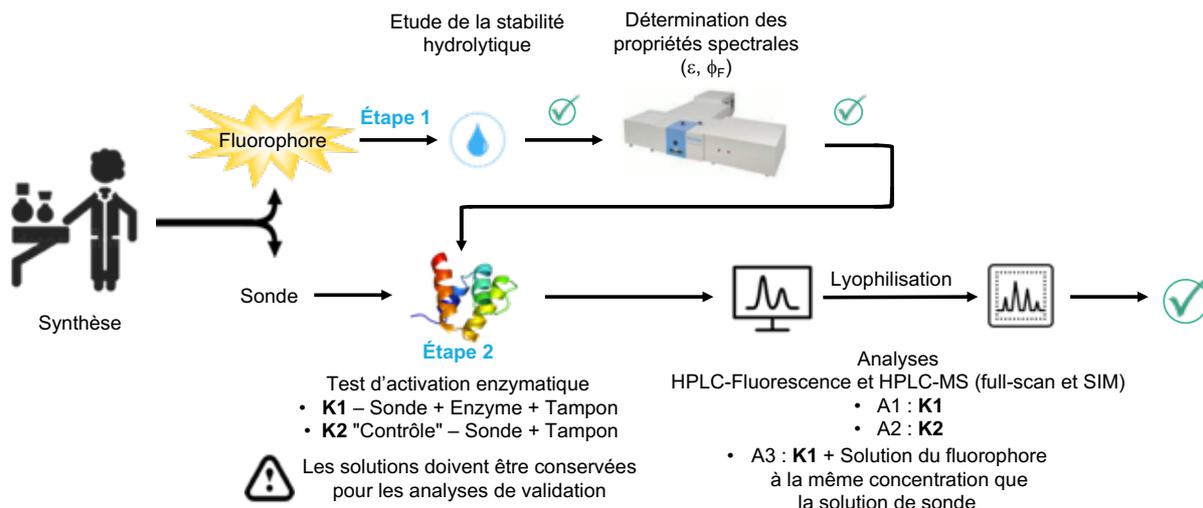


Figure 16. Représentation schématique de la méthodologie développée au sein de notre groupe et utilisée en routine pour valider des sondes fluorescentes de type "covalent assembly".

C'est donc cette méthode qui a été utilisée pour la validation des sondes de type "covalent assembly" conduisant après activation par le PGA à la formation *in situ* et quantitative de quinoxalin-2(1*H*)-ones fluorescentes et qui a permis la publication qui est exposée ci-dessous.

II.2. Article 4. "Fluorogenic Enzyme-Triggered Domino Reactions Producing Quinoxalin-2(1*H*)-one-based Heterocycles

Fluorogenic Enzyme-Triggered Domino Reactions Producing Quinoxalin-2(1H)-one-based Heterocycles

Garance Dejoux,[§] Kévin Renault,^{*,§} Quentin Bonnin, Arnaud Chevalier, Cédric Michaudet, Michel Picquet, Ibai E. Valverde, and Anthony Romieu^{*}



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02287>



Read Online

ACCESS |



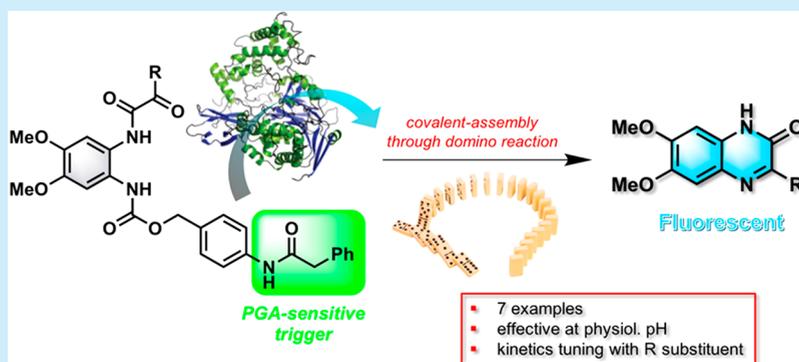
Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



ABSTRACT: A simple and effective biocompatible domino reaction triggered by a model protease and leading to the formation of strongly fluorescent quinoxalin-2(1H)-one *N*-heterocycles is described. Some positive attributes including versatility and the ability to provide outstanding fluorescence “OFF–ON” responses were revealed by this work. They open the way for practical applications of this novel type of “covalent-assembly”-based fluorescent probe in the fields of sensing and bioimaging.

Among the myriad of synthetic transformations and catalysts currently available for the concise and efficient synthesis of organic molecules, bioinspired approaches based on the use of enzymes often intertwined with cascade/domino processes occupy a special place and are receiving great attention as of late.¹ They have also contributed to the emergence of *in vivo* chemistry^{2,3} that takes advantage of biosynthetic pathways in which enzymes play a key role in achieving unique chemical transformations. In addition to possible applications devoted to the production of high-value chemicals, one of the most striking achievements in this emerging area is undoubtedly the biocompatible “click” reaction between an aromatic nitrile (e.g., 6-amino-2-cyanobenzothiazole (CBT)) and D-cysteine, leading to a D-luciferin scaffold,⁴ discovered by the Rao group (Figure 1, top).⁵ Its ability to be effective for the controlled assembly of nanoparticles in living cells together with its possible triggering by a biostimulus (pH, redox status, or hydrolases) has fostered the emergence of cutting-edge reactivity-based sensing approaches for *in vivo* molecular imaging, especially through the bioluminescence modality, to address challenges associated with light-based diagnosis.⁶

These remarkable achievements perfectly illustrate both the utility and benefits of biocompatible/bioorthogonal transformations that are capable of generating a bright luminescence output signal upon the action of a biological trigger. In the field

of activity-based fluorescence sensing, a new probe design principle, namely, the “covalent-assembly” approach, pioneered by the Swager group⁷ and next rationalized by Anslyn and Yang to address relevant biological questions,^{8,9} emerged in the mid-2000s. This cutting-edge strategy is based on the *in situ* formation of a fluorophore from a caged compound through a domino reaction triggered by the species to be detected and ideally designed to work properly in aqueous media (Figure 1, middle and bottom). Because this novel class of activatable fluorescent probes is supposed to dramatically improve signal-to-noise ratio responses, thus providing optimal detection sensitivity, it is not really surprising that they have rapidly become popular tools for the specific detection and imaging of enzyme activities. The vast majority of “covalent-assembly”-based fluorescent probes devoted to enzyme biosensing involve the *in situ* formation of blue-green-emitting (2-imino)-coumarins or related fluorophores through analyte-triggered lactonization or Pinner cyclization reactions.^{10–12} Our group,

Received: July 10, 2020

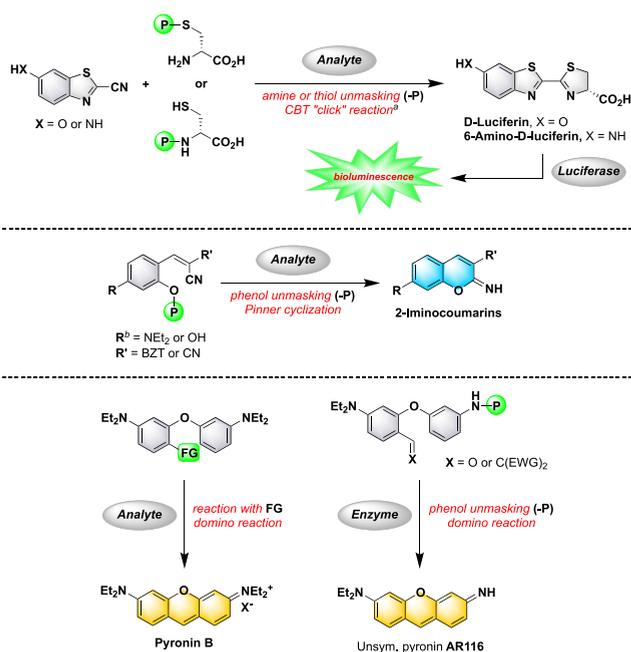


Figure 1. State of the art of the *in situ* synthesis of bioluminophores (top) and fluorophores (2-iminocoumarins (middle) and pyronins (bottom)) triggered by the (bio)analyte to be detected (BZT = 2-benzothiazolyl, EWG = electron-withdrawing group, FG = functional group that reacts with the targeted analyte, P = recognition moiety of the targeted enzyme). For clarity, related polymerization reactions and intramolecular cyclizations leading to nanoaggregates are omitted.^bNote that fused *N*-heterocycles are often used in the design of such “caged” precursors to red-shift spectral features of *in situ* formed 2-iminocoumarin.

inspired by the work of Yang et al.,¹³ has recently contributed to this research field by expanding the scope to longer wavelength fluorophores belonging to the class of xanthenes dyes (i.e., unsymmetrical pyronins with yellow-orange fluorescence).¹⁴ Some notable results were obtained with several hydrolases including penicillin G acylase (PGA) and leucine aminopeptidase (LAP), and we demonstrated that a subtle equilibrium between the reactivity and the stability of caged precursors of pyronins can be readily obtained by means of effective and facile structural modifications.

Despite all of these advances, “covalent-assembly” fluorogenic probes may sometimes have some drawbacks, including (1) intrinsic red or far-red fluorescence due to an aggregation-induced emission (AIE) phenomenon that prevents intensometric “OFF–ON” detection^{14b,15} and (2) limited molecular diversity that may complicate the optimization of their properties. Thus there is a clear need to identify alternative fluorescent scaffolds that can be built by a relevant enzyme through a novel domino process. We have identified the quinoxalin-2(1*H*)-ones, a popular class of benzo-fused *N*-heterocycles with a wide spectrum of pharmacological activities.¹⁶ They are frequently used as skeletons for the design of biologically active compounds, and their spectral behavior, close to that of coumarins, has recently promoted their use as fluorophores, especially in the construction of fluorescent probes.¹⁷ Furthermore, the very old condensation reaction historically used to prepare these *N*-heterocycles is easy to implement and involves *ortho*-phenylenediamine and α -ketoacid (or α -ketoester derivative) as coupling partners.¹⁸ Its versatility stems from the commercial or synthetic

availability of a wide range of these starting materials bearing various substituents. We hypothesized that the cyclization/aromatization process that completes the *N*-heterocycle construction may spontaneously occur under physiological conditions. In the light of the mechanism generally accepted for this reaction, that is, the ketone moiety undergoing an intramolecular nucleophilic addition of the neighboring primary amino group followed by loss of a water molecule, it is reasonable to assume that a caged *ortho*-phenylenediamine derivative, whose primary amino group would be acylated with an enzyme-specific trigger recognition moiety (the second one being acylated with the selected α -keto acid), should act as an effective “covalent-assembly”-based fluorescent probe (Figure 2).

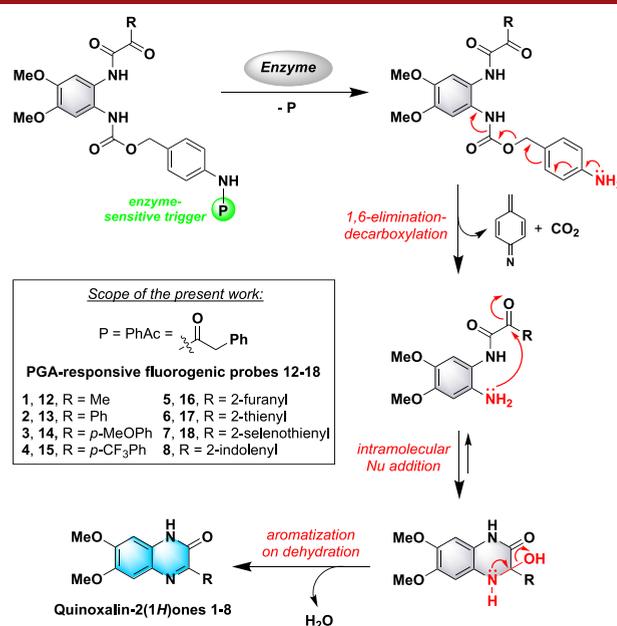
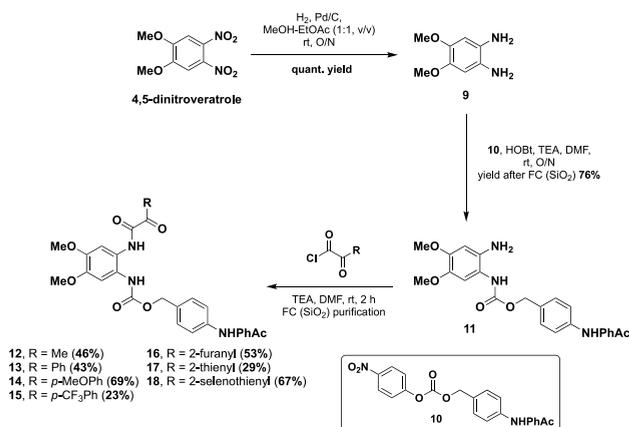


Figure 2. Enzyme-sensing strategy explored in this work based on the use of “covalent-assembly” fluorogenic probes whose activation leads to the *in situ* formation of quinoxalin-2(1*H*)-ones.

We report here the practical implementation of this unusual fluorogenic reaction-based process through the synthesis of seven distinct *N*-caged *ortho*-phenylenediamine derivatives and the use of PGA as a model protease, a commercially available and widely used biocatalyst in the enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics.¹⁹ The ability of this enzyme to trigger the *in situ* formation of fluorescent quinoxalin-2(1*H*)-ones from these “covalent-assembly”-type probes was studied in detail through *in vitro* fluorescence assays and HPLC–fluorescence/–MS analyses. All data generated have been used to rationalize the reaction mechanism and the influence of the alkyl/aryl substituent of the α -ketoamide moiety on the overall efficiency of this novel domino process.

The planned synthetic strategy was based on the sequential *N*-acylation of 1,2-phenylenediamine **9** with the *para*-nitrophenyl carbonate derivative of *para*-(phenylacetamido)benzyl alcohol (PhAc-PABA) **10**²⁰ and α -ketoacid chloride to install the recognition unit of PGA and the electrophilic moiety, respectively (Scheme 1). First, **9** was prepared immediately prior to its use by the catalytic hydrogenation of commercial 4,5-dinitroveratrole.²¹ Thereafter, the phenylacetamide unit known to be recognized and cleaved by PGA was connected to

Scheme 1. Synthesis of PGA-Responsive “Covalent-Assembly” Fluorogenic Probes 12–18^a



^aO/N = overnight, FC (SiO₂) = flash-column chromatography over silica gel.

the 1,2-phenylenediamine scaffold through a self-immolative linker (i.e., *para*-hydroxybenzyl) to lower the steric hindrance and hence increase the accessibility of the probe to the enzyme's active site.²² Indeed, our preliminary investigations have shown that the direct *N*-acylation of **9** with phenylacetyl chloride led to hindered “covalent-assembly” fluorogenic probes, not recognized by PGA (data not shown). Molecular diversity was readily achieved by selecting seven different α -ketoacids including pyruvic acid and 2-oxo-2-(hetero)arylacetic acids. (See the [Supporting Information](#) for their synthesis and conversion into acyl chlorides.) Practical implementation of the two distinct *N*-acylation reactions was performed as follows: 1,2-Phenylenediamine **9** (2.75 equiv) was reacted with activated carbonate **10** (1.0 equiv) in dry DMF in the presence of 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 1.0 equiv) and TEA (2.75 equiv). Thereafter, amidation of the remaining primary aniline with α -ketoacid chloride (1.2 equiv) was conducted under nearly identical conditions. Purification by flash-column chromatography over silica gel provided the PGA-responsive fluorogenic probes in moderate to good yields (23–69%). All spectroscopic data (see the [Supporting Information](#)), especially multinuclear nuclear magnetic resonance (NMR) mass spectrometry data, were in agreement with the structures assigned. Photophysical measurements also confirmed the lack of fluorescence emission (*vide infra*).

We have also prepared the quinoxalin-2(1*H*)-one fluorophores **1–7** assumed to be formed upon the enzymatic activation of probes **12–18**. Indeed, their use as references in fluorescence assays and HPLC analyses is essential to clearly demonstrate the reaction-based sensing mechanism. (See the [Supporting Information](#) for their synthesis and characterization.) The synthesis of indole-based derivative **8** was also achieved, but we failed to obtain the corresponding PGA-responsive probe owing to its poor stability. To have an indication of the magnitude of the fluorogenic “OFF–ON” response arising from the PGA activation of probes **12–18**, photophysical properties of fluorophores were also determined, especially in phosphate buffer (PB, 100 mM, pH 7.6). (See [Tables S1 and S2](#) and [Figures S120–S135](#).) Compounds **1–3** and **5** have been identified as the most brilliant dyes within the blue-cyan spectral range typical for quinoxalin-2(1*H*)-ones (B ($\epsilon \times \Phi_F$) values: 5000–9100 M⁻¹ cm⁻¹). It is worth noting

that the fluorescence quantum yield decreases from 0.37 for furane-based dye **5** to 0.20 for thiophene-based dye **6** to 0.06 for selenophene-based dye **7**, which is consistent with heavy-atom effects promoting triplet formation relative to fluorescence.²³ Another interesting feature that will be subjected to additional investigations concerns the indole-based dye **8**, which was found to be almost nonfluorescent ($\Phi_F < 0.01$) in PB, probably as a consequence of photoinduced electron transfer (PeT) process.²⁴ Conversely, preliminary fluorescence fixed-cell imaging experiments have shown the emission ability of this quinoxalin-2(1*H*)-one in a real biological context and its superior capability for cellular staining compared with the phenyl-based dye **2** otherwise characterized by a dramatically higher Φ_F (0.6 in PB) ([Figures S68 and S69](#)).

Fluorogenic PGA assays and blank experiments were achieved through time-course measurements.^{11f,14} In all cases, only the addition of an enzyme caused a rapid increase in the blue-cyan fluorescence emission, which reached a plateau in <10 min ([Figure 3](#) and [Figures S143–S156](#)), except

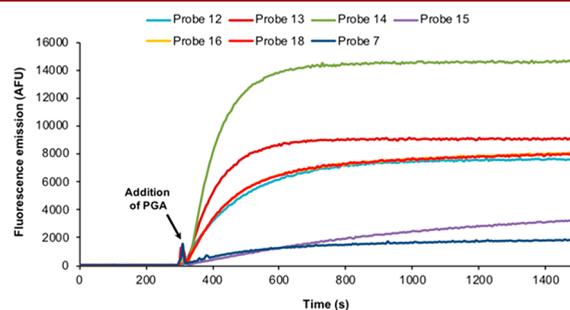


Figure 3. Fluorescence emission time course (see the [Supporting Information](#) for the detection parameters used) of fluorogenic probes **12–18** (concentration: 1.0 μ M) in the presence of PGA (1 U) in PB at 37 °C. Note that the curves for probes **16** and **18** are superimposed.

for probe **15**. For this compound, the electron-withdrawing effect of $-\text{CF}_3$ may negatively impact the dehydration step, leading to quinoxalin-2(1*H*)-one aromatization ([Figure 2](#)); this rate-determining step should be favored by the combined electron push effects of the N atom and the neighboring alkyl/aryl substituent toward the carbon atom center undergoing the loss of a hydroxide group.

Outstanding fluorescence “OFF–ON” responses were obtained ([Figures S144, S146, S148, S150, S152, S154, and S156](#)). This highlights the main valuable feature of the “covalent-assembly” approach in a striking manner. Furthermore, the enzymatic activation and fluorogenic response arising from this were not impacted by the presence of biological interferents such as glutathione ([Figures S157–S163](#)). To confirm that the intense blue-cyan fluorescence signal detected was due to the *in situ* formation of the quinoxalin-2(1*H*)-one *N*-heterocycle, each enzymatic reaction mixture was subjected to RP-HPLC–fluorescence analyses ([Figure 4A,B](#) for phenyl derivative **13** and [Figures S164–S212](#)). For each sample, a single peak was detected and unambiguously assigned to the expected fluorophore (co-injection with authentic samples of quinoxalin-2(1*H*)-ones **1–7**). To prove the validity of our assumption that the PGA-initiated domino reaction yielded these benzo-fused *N*-heterocycles, the same enzymatic mixtures were next analyzed by RP-HPLC–MS ([Figure 4C,D](#) for phenyl derivative **13** and

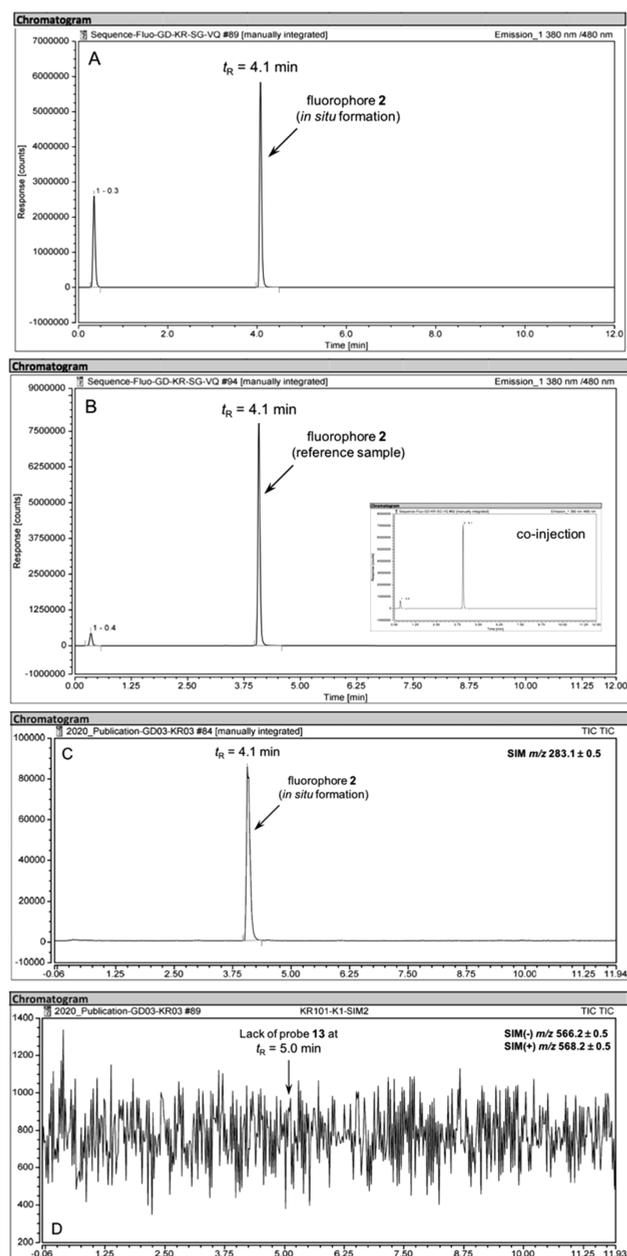


Figure 4. RP-HPLC elution profiles of the enzymatic reaction mixture of probe 13. Fluorescence detection Ex/Em 380/480 nm of (A) fluorophore 2 and (B) its coinjection with enzymatic reaction mixture (inset). ESI-MS detection, single-ion monitoring (SIM) mode for detecting (C) 2 and (D) 13.

Figures S213–S240). The disappearance of the probe 13 peak ($t_R = 5.0$ min) and the quantitative formation of quinoxalin-2(1H)-one 2 ($t_R = 4.1$ min) were clearly observed, and both the structure and integrity of the fluorophore were supported by MS-ESI \pm and UV-vis data. Interestingly, no trace of elusive intermediate aniline arising from the PGA-mediated removal of the PhAc moiety was detected, confirming the high reactivity of its primary amino group toward the adjacent carbonyl of the α -ketoamide fragment. It should also be noted that both the existence and presence in enzymatic mixtures of the transient 2-hydroxy-1,2-dihydroquinoxalinone-type intermediate (i.e., intermediate undergoing dehydration, Figure 2) cannot be confirmed due to its rapid conversion to the final fluorophore under the acidic conditions of mobile phases for

RP-HPLC. Nevertheless, all of the results presented here allowed us to confirm both the viability and the effectiveness of the sensing mechanism initially claimed (Figure 2). Furthermore, depending on the electronic effects of the R substituent found in the probe's structure, the reactivity of the α -ketoamide fragment and, by extension, the quinoxalinone production rate are impacted. This paves the way to a trivial molecular design strategy for fine-tuning the reactivity of these quinoxalinone caged precursors.

In summary, we managed to expand the scope of the “covalent-assembly” fluorescent probe design principle to quinoxalin-2(1H)-ones. Indeed, the facile construction of such benzo-fused *N*-heterocycles from structurally simple caged precursors through an effective cyclization/dehydration sequence triggered by a model protease was demonstrated. We have also shown that the kinetics of this fluorogenic process is dramatically influenced by the substituent of the α -ketoamide fragment, which also has a significant impact on the fluorescence properties and hence on the quality of detection. This feature combined with the wide scope of this approach (i.e., facile exchange of the recognition moiety of the probe for targeting a wide range of distinct bioanalytes) will open new perspectives in the field of reactivity-based sensing and therapeutics and, more broadly, expand the molecular toolbox for *in vivo* chemistry. Lastly, the presented enzyme-triggered cyclization/aromatization reaction could be a useful source of inspiration for medicinal chemists to devise novel advanced prodrug strategies.²⁵

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.orglett.0c02287>.

Experimental procedures, spectroscopic and analytical data, IR, NMR, MS, and UV-vis/fluorescence spectra, and elution profiles for all RP-HPLC-fluorescence/MS analyses (PDF)

FAIR data, including the primary NMR FID files, for compounds 1–8 and 11–18 (ZIP)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Kévin Renault – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; Email: kevin.renault@u-bourgogne.fr

Anthony Romieu – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; orcid.org/0000-0002-2300-4499; Email: anthony.romieu@u-bourgogne.fr

Authors

Garance Dejoux – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

Quentin Bonnin – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

Arnaud Chevalier – Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France; orcid.org/0000-0002-0452-1554
Cédric Michaudet – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
Michel Picquet – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
Ibai E. Valverde – Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 9, UMR 6302, CNRS, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; orcid.org/0000-0002-5802-4131

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.orglett.0c02287>

Author Contributions

[§]G.D. and K.R. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

A preprint was previously posted on ChemRxiv; see [10.26434/chemrxiv.12613862.v1](https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12613862.v1).

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the project “Pharmacimagerie et Agents Theranostiques”, supported by the Université de Bourgogne and Conseil Régional de Bourgogne through the Plan d'Actions Régional pour l'Innovation (PARI) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs. GDR CNRS “Agents d'Imagerie Moléculaire” (AIM) 2037 is also thanked for its interest in this research topic. G.D. gratefully acknowledges the Burgundy Franche-Comté region for her Ph.D. grant. Further financial support from ANR (AAPG 2018, PRCI LuminoManufacOligo, ANR-18-CE07-0045-01), especially for the postdoc fellowship of K.R., is also acknowledged. COBRA lab (UMR CNRS 6014) and Iris Biotech GmbH are thanked for the generous gift of some (bio)chemical reagents used in this work. We also thank the “Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne” (PACSMUB, <http://www.wpcm.fr>) for access to spectroscopy instrumentation, Mrs. Marie-José Penouilh (University of Burgundy, PACSMUB) for the recording of HRMS spectra, Dr. Myriam Heydel (University of Burgundy, PACSMUB) for the determination of TFA content in samples purified by semipreparative RP-HPLC, Mrs. Madeleine Cauwel (Ph.D. student from COBRA lab, grant RIN-FEDER) for her valuable advice on the synthesis of compound **9**, Dr. Valentin Quesneau (UBFC, ICMUB) for useful discussions and critical reading of the manuscript, and Dr. Laurent Plasseraud (CNRS, ICMUB) for the gift of dimethyl selenide used as reference for ⁷⁷Se NMR. The Université de Bourgogne, SATT Sayens, Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche are also acknowledged for financial support of the analytical platform PACSMUB.

REFERENCES

(1) (a) Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K. Enzyme-initiated domino (cascade) reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 332–339. (b) Glueck,

S. M.; Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K. Advances in biocatalytic synthesis. Enzyme-triggered asymmetric cascade reactions. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 2253–2257. (c) Garcia-Junceda, E.; Lavandera, I.; Rother, D.; Schrittwieser, J. H. (Chemo)enzymatic cascades-Nature's synthetic strategy transferred to the laboratory. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 1–6. (d) Schrittwieser, J. H.; Velikogne, S.; Hall, M.; Kroutil, W. Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270–348.

(2) (a) Bertozzi, C. R.; Wu, P. In vivo chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 717–718. (b) Borrmann, A.; van Hest, J. C. M. Bioorthogonal chemistry in living organisms. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2123–2134. (c) Fox, J. M.; Robillard, M. S. Editorial overview: In vivo chemistry: Pushing the envelope. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, v–vii.

(3) (a) Ngo, A. H.; Bose, S.; Do, L. H. Intracellular Chemistry: Integrating Molecular Inorganic Catalysts with Living Systems. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 10584–10594. (b) Rebelein, J. G.; Ward, T. R. In vivo catalyzed new-to-nature reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 106–114.

(4) Yuan, Y.; Liang, G. A biocompatible, highly efficient click reaction and its applications. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 865–871.

(5) Liang, G.; Ren, H.; Rao, J. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 54–60.

(6) (a) Ye, D.; Liang, G.; Ma, M. L.; Rao, J. Controlling Intracellular Macrocyclization for the Imaging of Protease Activity. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2275–2279. (b) Dragulescu-Andrasi, A.; Kothapalli, S.-R.; Tikhomirov, G. A.; Rao, J.; Gambhir, S. S. Activatable Oligomerizable Imaging Agents for Photoacoustic Imaging of Furin-Like Activity in Living Subjects. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11015–11022. (c) Godinat, A.; Park, H. M.; Miller, S. C.; Cheng, K.; Hanahan, D.; Sanman, L. E.; Bogyo, M.; Yu, A.; Nikitin, G. F.; Stahl, A.; Dubikovskaya, E. A. A Biocompatible in Vivo Ligation Reaction and Its Application for Noninvasive Bioluminescence Imaging of Protease Activity in Living Mice. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 987–999.

(d) Shen, B.; Jeon, J.; Palmer, M.; Ye, D.; Shuhendler, A.; Chin, F. T.; Rao, J. Positron Emission Tomography Imaging of Drug-Induced Tumor Apoptosis with a Caspase-Triggered Nanoaggregation Probe. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 10511–10514. (e) Van de Bittner, G. C.; Bertozzi, C. R.; Chang, C. J. Strategy for Dual-Analyte Luciferin Imaging: In Vivo Bioluminescence Detection of Hydrogen Peroxide and Caspase Activity in Murine Model of Acute Inflammation. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1783–1795. (f) Ye, D.; Pandit, P.; Kempen, P.; Lin, J.; Xiong, L.; Sinclair, R.; Rutt, B.; Rao, J. Redox-Triggered Self-Assembly of Gadolinium-Based MRI Probes for Sensing Reducing Environment. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1526–1536. (g) Ye, D.; Shuhendler, A. J.; Cui, L.; Tong, L.; Tee, S. S.; Tikhomirov, G.; Felsher, D. W.; Rao, J. Bioorthogonal cyclization-mediated in situ self-assembly of small-molecule probes for imaging caspase activity in vivo. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 519–526. (h) Ye, D.; Shuhendler, A. J.; Pandit, P.; Brewer, K. D.; Tee, S. S.; Cui, L.; Tikhomirov, G.; Rutt, B.; Rao, J. Caspase-responsive smart gadolinium-based contrast agent for magnetic resonance imaging of drug-induced apoptosis. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3845–3852. (i) Nejadnik, H.; Ye, D.; Lenkov, O. D.; Donig, J. S.; Martin, J. E.; Castillo, R.; Derugin, N.; Sennino, B.; Rao, J.; Daldrop-Link, H. Magnetic Resonance Imaging of Stem Cell Apoptosis in Arthritic Joints with a Caspase Activatable Contrast Agent. *ACS Nano* **2015**, *9*, 1150–1160. (j) Yuan, Y.; Zhang, J.; Qi, X.; Li, S.; Liu, G.; Siddhanta, S.; Barman, I.; Song, X.; McMahon, M. T.; Bulte, J. W. M. Furin-mediated intracellular self-assembly of olsalazine nanoparticles for enhanced magnetic resonance imaging and tumour therapy. *Nat. Mater.* **2019**, *18*, 1376–1383. (k) Chen, Z.; Chen, M.; Cheng, Y.; Kowada, T.; Xie, J.; Zheng, X.; Rao, J. Exploring the Condensation Reaction between Aromatic Nitriles and Amino Thiols To Optimize In Situ Nanoparticle Formation for the Imaging of Proteases and Glycosidases in Cells. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 3272–3279. (l) Chen, Z.; Chen, M.; Zhou, K.; Rao, J. Pre-targeted Imaging of Protease Activity through In Situ Assembly of Nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 7864–7870.

- (7) Kim, T.-H.; Swager, T. M. A Fluorescent Self-Amplifying Wavelength-Responsive Sensory Polymer for Fluoride Ions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 4803–4806.
- (8) For reviews, see: (a) Anslyn, E. V. Supramolecular and Chemical Cascade Approaches to Molecular Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15833–15835. (b) Luo, X.; Gu, L.; Qian, X. H.; Yang, Y. C. Molecular Probe Design via the “Covalent-Assembly” Principle. *Chem. Commun.* **2020**, DOI: 10.1039/D0CC00542H.
- (9) Yang, Y.; Seidlits, S. K.; Adams, M. M.; Lynch, V. M.; Schmidt, C. E.; Anslyn, E. V.; Shear, J. B. A Highly Selective Low-Background Fluorescent Imaging Agent for Nitric Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13114–13116.
- (10) Romieu, A. “AND” luminescent “reactive” molecular logic gates: a gateway to multi-analyte bioimaging and biosensing. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1294–1306.
- (11) (a) Kim, T.-I.; Jeong, M. S.; Chung, S. J.; Kim, Y. An Iminocoumarin-Based Fluorescent Probe for the Selective Detection of Dual-Specific Protein Tyrosine Phosphatases. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 5297–5300. (b) Kim, T.-I.; Kim, H.; Choi, Y.; Kim, Y. A fluorescent turn-on probe for the detection of alkaline phosphatase activity in living cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9825–9827. (c) Kim, D.; Sambasivan, S.; Nam, H.; Hean Kim, K.; Yong Kim, J.; Joo, T.; Lee, K.-H.; Kim, K.-T.; Han Ahn, K. Reaction-based two-photon probes for in vitro analysis and cellular imaging of monoamine oxidase activity. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6833–6835. (d) Pershagen, E.; Nordholm, J.; Borbas, K. E. Luminescent Lanthanide Complexes with Analyte-Triggered Antenna Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9832–9835. (e) Park, J.; Kim, Y. An improved fluorogenic substrate for the detection of alkaline phosphatase activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2332–2335. (f) Debieu, S.; Romieu, A. Dual enzyme-responsive “turn-on” fluorescence sensing systems based on in situ formation of 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10348–10361. (g) Pershagen, E.; Borbas, K. E. Multiplex Detection of Enzymatic Activity with Responsive Lanthanide-Based Luminescent Probes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 1787–1790. (h) Xia, L.; Hu, F.; Huang, J.; Li, N.; Gu, Y.; Wang, P. A fluorescent turn-on probe for nitroreductase imaging in living cells and tissues under hypoxia conditions. *Sens. Actuators, B* **2018**, *268*, 70–76. (i) Kong, F.; Li, Y.; Yang, C.; Li, X.; Wu, J.; Liu, X.; Gao, X.; Xu, K.; Tang, B. A fluorescent probe for simultaneously sensing NTR and hNQO1 and distinguishing cancer cells. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 6822–6827. (j) Liu, Y.; Yan, W.; Li, H.; Peng, H.; Suo, X.; Li, Z.; Liu, H.; Zhang, J.; Wang, S.; Liu, D. Two-photon fluorescent probe for hypoxic cancer stem cells by responding to endogenous nitroreductase. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 421–426. (k) Qin, H.; Li, L.; Li, K.; Xiaoqi, Y. Novel strategy of constructing fluorescent probe for MAO-B via cascade reaction and its application in imaging MAO-B in human astrocyte. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, *30*, 71–74.
- (12) For the sole examples of fluorogenic prodrugs based on the “covalent-assembly” probe design principle, see: (a) Feng, W.; Gao, C.; Liu, W.; Ren, H.; Wang, C.; Ge, K.; Li, S.; Zhou, G.; Li, H.; Wang, S.; Jia, G.; Li, Z.; Zhang, J. A novel anticancer theranostic pro-prodrug based on hypoxia and photo sequential control. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9434–9437. (b) Liu, W.; Liu, H.; Peng, X.; Zhou, G.; Liu, D.; Li, S.; Zhang, J.; Wang, S. Hypoxia-Activated Anticancer Prodrug for Bioimaging, Tracking Drug Release, and Anticancer Application. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 3332–3343. (c) Peng, X.; Gao, J.; Yuan, Y.; Liu, H.; Lei, W.; Li, S.; Zhang, J.; Wang, S. Hypoxia-Activated and Indomethacin-Mediated Theranostic Prodrug Releasing Drug On-Demand for Tumor Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2828–2843.
- (13) (a) Lei, Z.; Yang, Y. A Concise Colorimetric and Fluorimetric Probe for Sarin Related Threats Designed via the “Covalent-Assembly” Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6594–6597. (b) Song, L.; Lei, Z.; Zhang, B.; Xu, Z.; Li, Z.; Yang, Y. A zero-background fluorescent probe for Hg²⁺ designed via the “covalent-assembly” principle. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7597–7600. (c) Lei, Z.; Zeng, Z.; Qian, X.; Yang, Y. A novel chromogenic and fluorogenic scaffold for detection of oxidative radicals. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, *28*, 2001–2004.
- (14) (a) Debieu, S.; Romieu, A. In situ formation of pyronin dyes for fluorescence protease sensing. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2575–2584. (b) Debieu, S.; Romieu, A. Kinetics improvement of protease-mediated formation of pyronin dyes. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 1940–1944. (c) Renault, K.; Debieu, S.; Richard, J.-A.; Romieu, A. Deeper insight into the protease-sensitive “covalent-assembly” fluorescent probes for practical biosensing applications. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 8918–8932.
- (15) Wang, J.; Li, C.; Chen, Q.; Li, H.; Zhou, L.; Jiang, X.; Shi, M.; Zhang, P.; Jiang, G.; Tang, B. Z. An Easily Available Ratiometric Reaction-Based AIE Probe for Carbon Monoxide Light-up Imaging. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 9388–9392.
- (16) Carta, A.; Piras, S.; Loriga, G.; Paglietti, G. Chemistry, biological properties, and SAR analysis of quinoxalinones. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1179–1200.
- (17) (a) Hara, S.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. Fluorescent products of reaction between α -keto acids and 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3493–8. (b) Renault, K.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. Photophysical properties of quinoxalin-2(1H)-ones: application in the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection of hydrogen sulfide. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 10432–10437.
- (18) Shi, L.; Zhou, H.; Wu, J.; Li, X. Advances in the chemistry of quinoxalinone derivatives. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2014**, *12*, 96–112.
- (19) Chandel, A. K.; Rao, L. V.; Narasu, M. L.; Singh, O. V. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 199–207.
- (20) Pessah, N.; Reznik, M.; Shamis, M.; Yantiri, F.; Xin, H.; Bowdish, K.; Shomron, N.; Ast, G.; Shabat, D. Bioactivation of carbamate-based 20(S)-camptothecin prodrugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1859–1866.
- (21) Ottenwaelder, X.; Ruiz-Garcia, R.; Blondin, G.; Carasco, R.; Cano, J.; Lexa, D.; Journaux, Y.; Aukauloo, A. From metal to ligand electroactivity in nickel(II) oxamate complexes. *Chem. Commun.* **2004**, 504–505.
- (22) For selected reviews, see: (a) Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure–Property Relationships, and Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492–7509. (b) Yan, J.; Lee, S.; Zhang, A.; Yoon, J. Self-immolative colorimetric, fluorescent and chemiluminescent chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 6900–6916.
- (23) Detty, M. R.; Prasad, P. N.; Donnelly, D. J.; Ohulchanskyy, T.; Gibson, S. L.; Hilf, R. Synthesis, properties, and photodynamic properties in vitro of heavy-chalcogen analogues of tetramethylrosamine. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2537–2544.
- (24) For a selected example of fluorescence quenching by PeT, see: Mendive-Tapia, L.; Zhao, C.; Akram, A. R.; Preciado, S.; Albericio, F.; Lee, M.; Serrels, A.; Kielland, N.; Read, N. D.; Lavilla, R.; Vendrell, M. Spacer-free BODIPY fluorogens in antimicrobial peptides for direct imaging of fungal infection in human tissue. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10940.
- (25) Gomes, P.; Vale, N.; Moreira, R. Cyclization-activated Prodrugs. *Molecules* **2007**, *12*, 2484–2506.

En plus des sondes décrites dans cette publication, un composé supplémentaire, portant un motif *para*-allyloxyphényle **GD201** a été synthétisé ainsi que le fluorophore **GD216** correspondant (Figure 17).

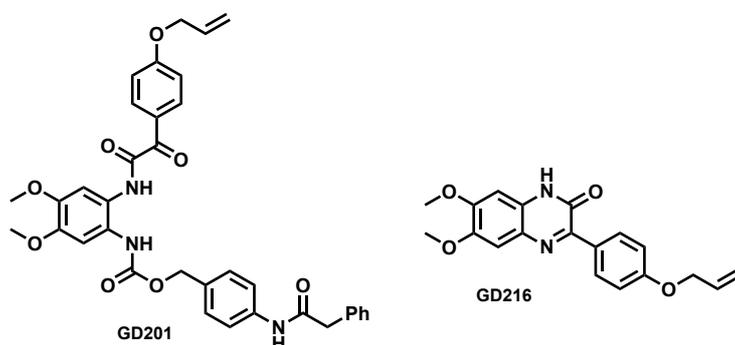
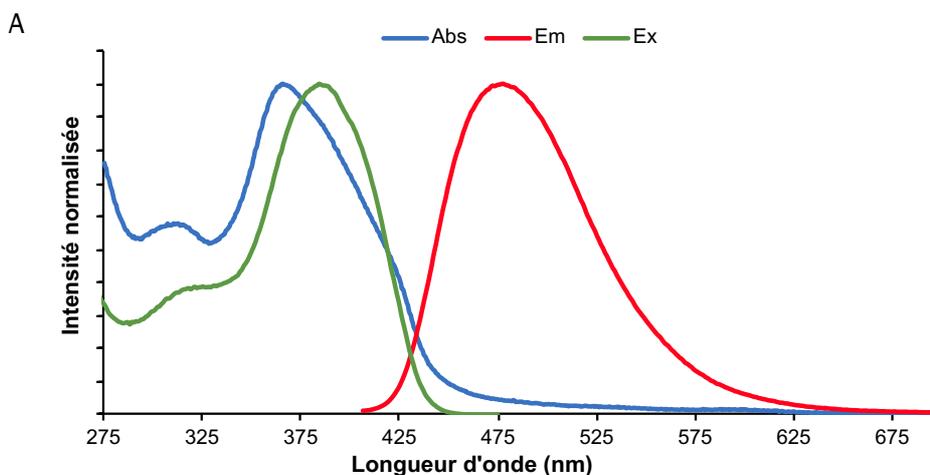


Figure 17. Structure de la sonde fluorescente de type "covalent assembly" **GD201** et du fluorophore correspondant.

Cette sonde a été synthétisée dans le but d'obtenir le dérivé phénolique *via* une déprotection au Pd⁰ dans les conditions de la réaction de Tsuji-Trost. Il n'est en effet pas possible de former directement le chlorure d'acyle de l'acide α -oxo-4-(allyloxy)phénylacétique du fait de la réactivité de l'agent de chloration (*i.e.*, éther de dichlorométhyle et de méthyle) avec les fonctions acide carboxylique et phénol. L'obtention du fluorophore et de la sonde en trop faibles quantités (< 10 mg) ne nous a pas permis de réaliser la déprotection souhaitée. Toutefois, la sonde **GD201** et le fluorophore **GD216** étant disponibles, nous avons tout de même réalisé les tests de déclenchement enzymatique. Les caractéristiques spectrales (ϵ et ϕ) du fluorophore n'ont pas été déterminées faute de temps. En revanche, l'enregistrement des spectres d'absorption, d'excitation et d'émission dans le PB, nous a permis de déterminer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission à utiliser pour les cinétiques. Des conditions expérimentales identiques à celles publiées dans *Organic Letters* ont été utilisées et les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 18.



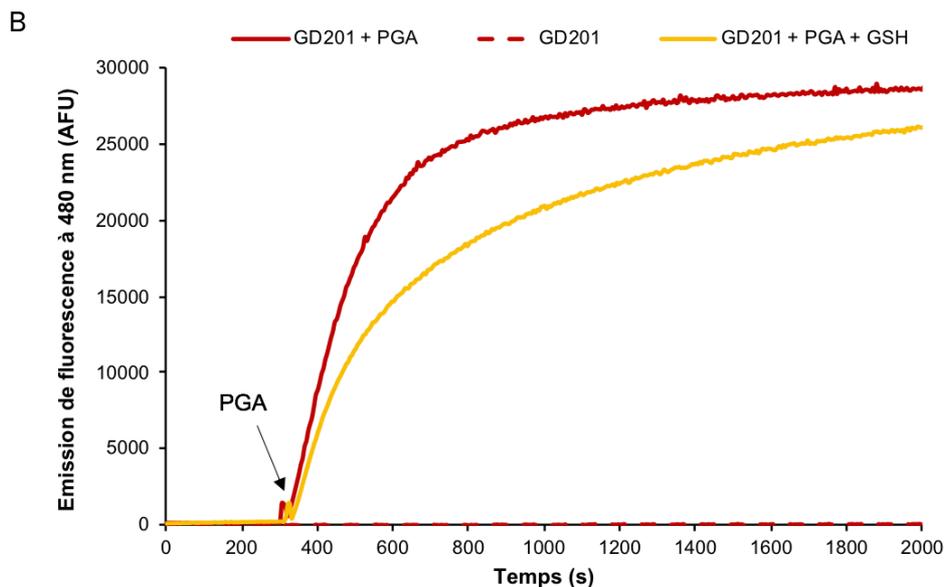


Figure 18. (A) Spectres normalisés d'absorption UV-Vis (en rouge), d'excitation (Em. 500 nm, slit 5 nm) (en bleu), d'émission (Ex. 390 nm, slit 5 nm) de **GD216** dans le PB à 25 °C. (B) Cinétique d'activation enzymatique de la sonde de type "covalent assembly" **GD201** (concentration : 1 μ M, Ex./Em. 365/480 nm, slit = 2 nm) à 37 °C en présence de PGA (1 U) (en rouge) et de GSH (47 μ M) (en jaune) à 37 °C. Remarque : la PGA a été ajoutée après 5 minutes d'incubation de la sonde dans le tampon (rouge) et dans le tampon en présence de GSH (jaune).

Après l'ajout de la PGA, une augmentation significative et régulière de la fluorescence est observée que ce soit avec ou sans glutathion (GSH), ce qui semble indiquer la formation *in situ* d'une espèce émissive dont les caractéristiques spectrales sont proches de celles du fluorophore **GD216**. En présence de GSH, la cinétique est plus lente et le niveau de fluorescence atteint est plus faible. Diverses explications sont possibles : le GSH peut être un inhibiteur partiel de l'activité de la PGA, ce tripeptide peut former une imine avec le carbonyle activé de la sonde ce qui va ralentir la cinétique de cyclisation et enfin, cet additif peut avoir un impact négatif sur le rendement quantique de fluorophore. En outre, les analyses HPLC (détection UV et MS en mode SIM, profil non présenté pour le SIM) montrent qu'en présence de GSH, la sonde n'a pas totalement réagi ce qui corrobore la première explication (Figure 19). Concernant l'impact du GSH sur l'efficacité de fluorescence de **GD216**, pour le vérifier, il faudra déterminer le rendement quantique relatif de fluorescence de cette quinoxalin-2(1*H*)-one dans le PB et en présence de GSH.

Enfin les analyses HPLC avec détection de fluorescence confirme bien que le fluorophore formé *in situ* est le fluorophore attendu **GD216** (Figure 20).

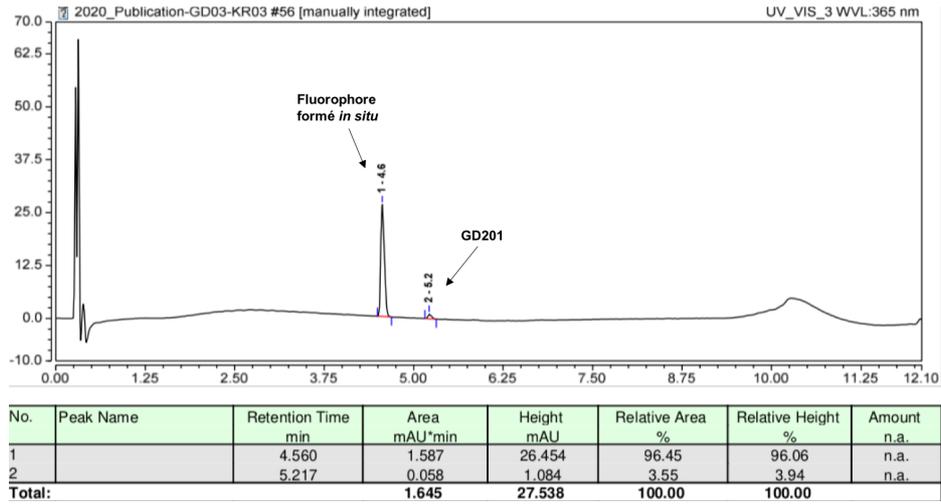
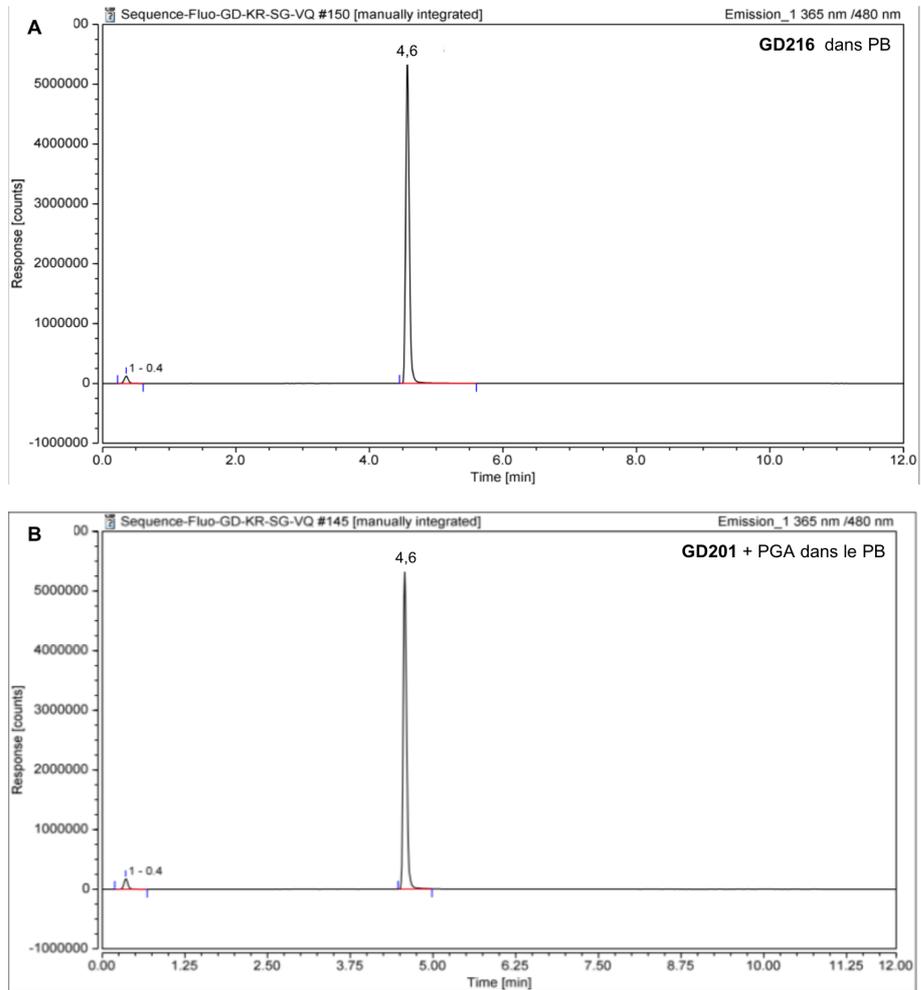


Figure 19. Profil d'éluion HPLC de la cinétique d'activation de la sonde **GD201** par la PGA et en présence de GSH (détection UV à 365 nm).



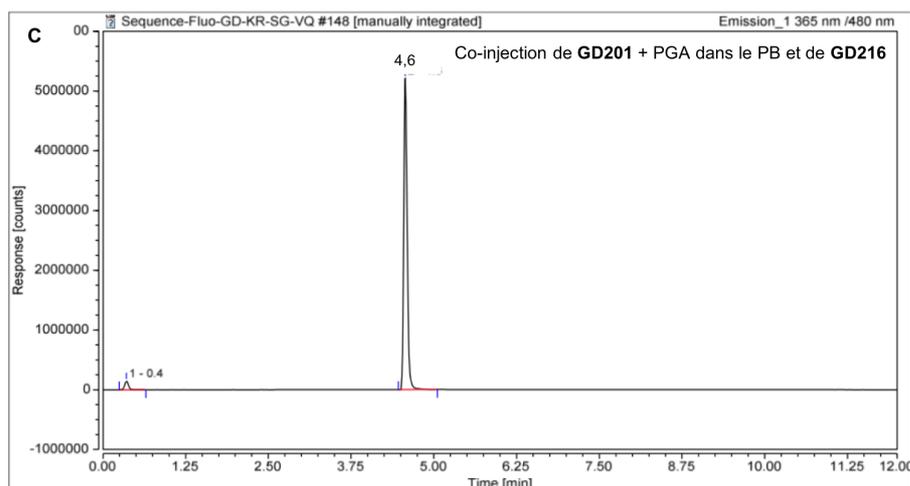


Figure 20. Profils d'élution HPLC-fluorescence (en phase inverse) des bruts de (A) **GD216** dans le PB à une concentration de 1 μ M, (B) brut du déclenchement enzymatique **GD201** + PGA dans le PB, (C) co-injection de **GD216** et du brut du déclenchement enzymatique **GD201** + PGA dans le PB.

II.3. Travaux complémentaires – Détection d'une activité de type nitroréductase

Pour démontrer la versatilité de notre approche, nous avons également envisagé la conception d'une sonde fluorescente de type "covalent assembly" permettant la détection d'une activité NTR, qui pourra trouver des applications dans le cadre de notre collaboration avec le département R&D Microbiologique de bioMérieux.

La sonde **KR169** portant comme motif de reconnaissance le *para*-nitrobenzyloxycarbonyle, a été synthétisée en deux étapes à partir du 4,5-dimethoxy-*ortho*-phénylènediamine **GD171** en reprenant la méthodologie utilisée pour la synthèse des sondes réactives vis-à-vis de la PGA (Schéma 2). Ainsi la première étape est une réaction de *N*-acylation entre le chloroformiate de *para*-nitrobenzyle commercial et un excès de **GD171** (2,2 équiv.) afin de favoriser la réaction de mono-amidification. Le produit désiré **KR167** a été obtenu avec un rendement satisfaisant de 59% après une purification par chromatographie sur colonne de silice. Il a ensuite été mis à réagir avec le chlorure d' α -oxophénylacétyle⁴⁸. Cette réaction réalisée dans le DMF anhydre en présence de TEA a permis d'obtenir la sonde désirée **KR169** avec un très bon rendement de 81% après purification par chromatographie sur colonne de silice et trituration dans le pentane.

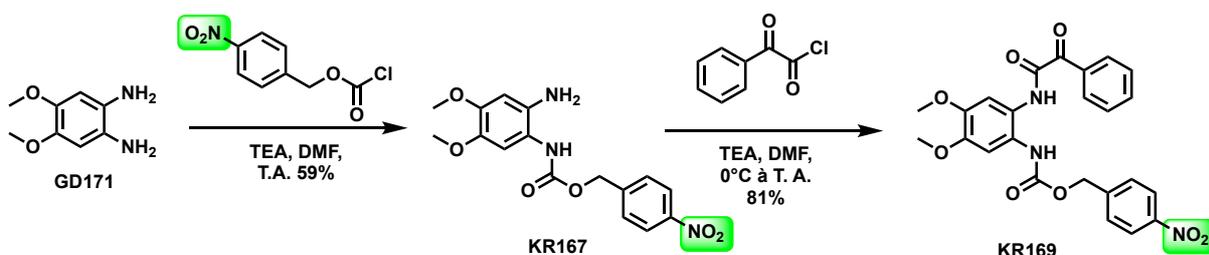


Schéma 2. Schéma de synthèse de la sonde de type "covalent assembly" **KR169** pour la détection de la NTR.

Sa structure et sa pureté (95%) ont été confirmées par des analyses RMN, ESI-MS et HPLC. Son déclenchement enzymatique *in vitro* mis en oeuvre à l'aide d'incubations avec le couple NTR/NADH à 37 °C et des mesures de fluorescence a pu être réalisé ; les courbes obtenues sont présentées dans la Figure 21. Après l'ajout du couple NTR/NADH, une augmentation de l'émission de fluorescence centrée à 480 nm est observée et un palier est atteint au bout de 10 minutes. A ce stade, il est important de remarquer qu'étant donnée la gamme d'absorption et d'émission du fluorophore formé *in situ*, l'émission intrinsèque du NADH est également visible sur le profil de cinétique. Les expériences contrôle (incubation de la sonde seule dans le tampon ou en présence du co-facteur NADH) ne montrent aucune exaltation de la fluorescence, ce qui confirme que la formation du fluorophore est induite par l'enzyme ciblée. Les analyses par HPLC-MS (full-scan) confirme que le fluorophore formé correspond à **GD174**, quant aux analyses HPLC-fluorescence et HPLC-MS (SIM), elles seront réalisées ultérieurement.

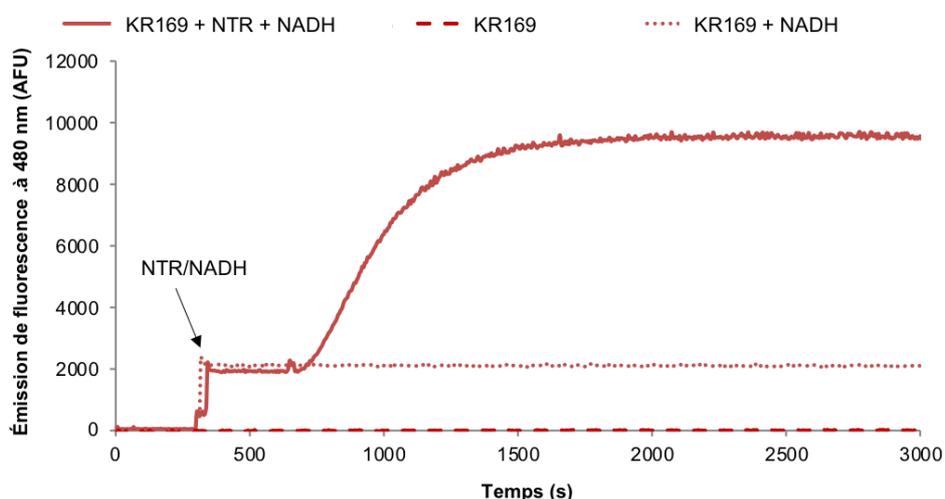


Figure 21. Cinétique d'activation enzymatique de la sonde de type "covalent assembly" **KR169** (concentration : 1 μ M, Ex./Em. 380/480 nm, slit = 2 nm) dans le PB à 37 °C en présence de NTR (0,1 U) et NADH (47 μ M) (en rouge) ; de NADH seul (rouge pointillé) et dans le PB seul (rouge tiret). Remarque : la NTR et le NADH ont été ajoutés après 5 minutes d'incubation de la sonde dans le PB.

En parallèle à cette étude, la stabilité du fluorophore de référence la quinoxalin-2(1H)-one 3-phényle (**GD174** - Cmpd 2 dans la publication) en présence de NADH a été étudiée afin de vérifier sa compatibilité avec ce réducteur biologique. **GD174** a été incubée à 37 °C en présence de NADH (47 μ M) dans le PB (pH 7,6) et son émission de fluorescence à 480 nm a été enregistrée en fonction du temps. Sur la Figure 22, aucune diminution de la fluorescence n'est observée après 50 min, nous pouvons donc affirmer que **GD174** est stable en présence du co-facteur NADH.

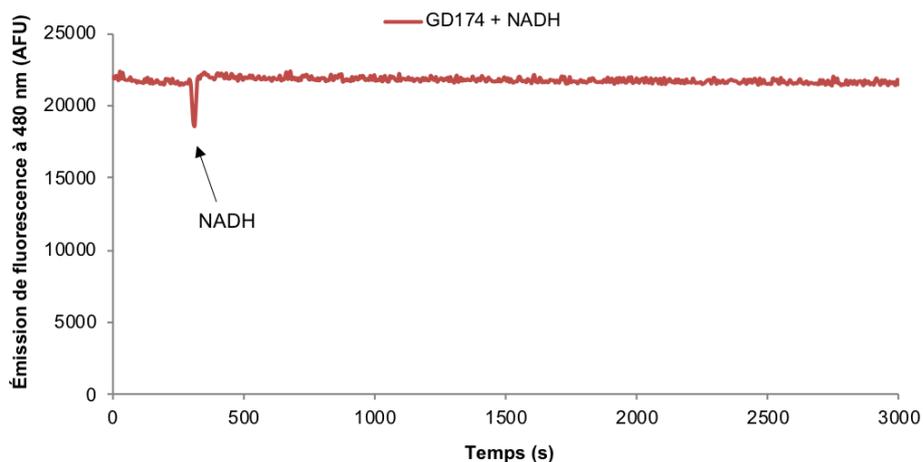


Figure 22. Cinétique de stabilité de la quinoxalin-2(1*H*)-one **GD174** (concentration : 1 μ M) en présence de NADH (47 μ M) dans le PB (pH 7,6) à 37 °C (Ex./Em. 380/480 nm, slit = 2 nm).

III. Conclusions et perspectives

Dans ce troisième chapitre, nous avons développé, pour la première fois, des sondes de type "covalent assembly" conduisant à la formation *in situ* de quinoxalin-2(1*H*)-ones fluorescentes via une activation enzymatique. En effet, la synthèse aisée des précurseurs "cagés" à partir de précurseurs structurellement simples, nous a permis de synthétiser une librairie de huit sondes sensibles à la PGA. De plus, les essais *in vitro* ont démontré l'efficacité du processus de cyclisation/déshydratation qui fait suite à l'hydrolyse du motif de reconnaissance phénylacétamide et au processus d'élimination 1,6 du bras espaceur auto-immolable, par notre protéase modèle.

Nous avons également montré que la cinétique de ce processus fluorogénique est fortement influencée par la nature du substituant du motif α -cétoamide (que l'on retrouve en position 3 de la quinoxalin-2(1*H*)-one formée *in situ*). En effet, un groupement électro-attracteur, comme le *para*-(trifluorométhyl)phényle, ralentit la cinétique de la réaction de déshydratation-aromatisante de la quinoxalin-2(1*H*)-one (Figure 23B). De plus, le caractère électronique des substituants va également impacter les propriétés de fluorescence des fluorophores obtenus (Tableau 1) et donc la qualité de détection (Figure 23A). De ce fait, nous pouvons envisager de substituer le cœur quinoxalin-2(1*H*)-one par un motif fortement électro-donneur qui pourrait permettre un déplacement bathochrome significatif des maxima d'excitation et d'émission et ainsi espérer atteindre la fenêtre spectrale du vert-jaune (500-550 nm) utilisable en imagerie de tissus superficiels. Concernant la quinoxalin-2(1*H*)-one **KR164**, la présence de l'atome de sélénium diminue drastiquement sa fluorescence. En effet, cet atome lourd favorise le phénomène de croisement inter-système. De ce fait, il serait intéressant d'étudier son aptitude à générer de l'oxygène singulet et donc à être utilisé comme photosensibilisateur en PDT. On pourrait ainsi

imaginer la conception de pro-photosensibilisateurs de type "covalent-assembly" activés spécifiquement au sein de tumeurs cancéreuses par des activités enzymatiques bien définies⁵⁰.

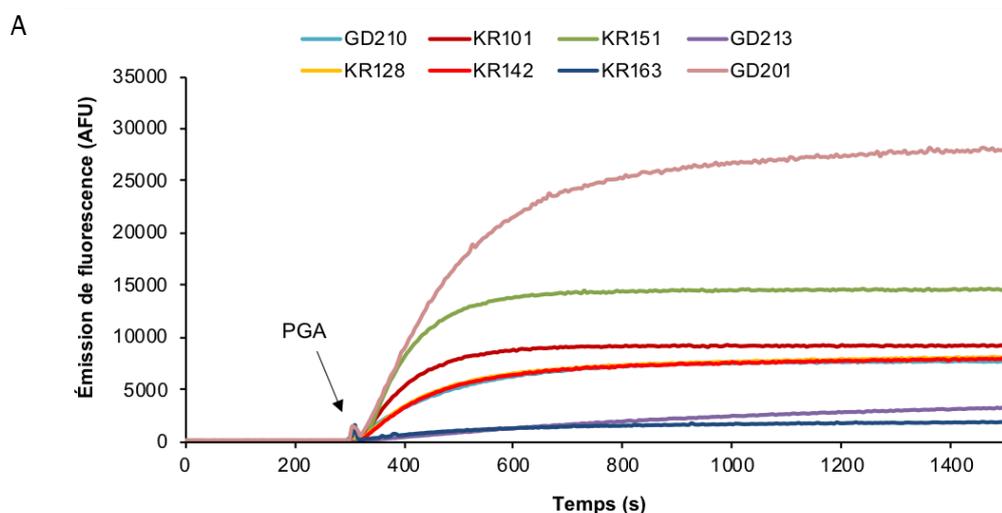
En outre, la synthèse de la sonde de type "covalent assembly" sensible à la NTR montre la versatilité de notre approche. Les résultats obtenus sont prometteurs et la sonde sera prochainement évaluée au sein des laboratoires de la société bioMérieux.

Tableau 1. Propriétés photophysiques des quinoxalin-2(1*H*)-ones déterminées dans le PB (pH 7,5) à 25 °C.

| Fluorophore ^a | λ_{abs} (nm) | λ_{em} (nm) | ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹) | ϕ_F ^b |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|-----------------------|
| GD210 | 361 | 454 | 10 600 | 47% |
| GD174 | 387 | 476 | 12 000 | 60% |
| GD184 | 391 | 474 | 15 400 | 59% |
| GD206 | 387 | 492 | 11 600 | 19% |
| KR125 | 405 | 481 | 18 600 | 37% |
| KR136 | 386 | 487 | 12 900 | 20% |
| KR164 | 381 | 492 | 8 700 | 6% |
| GD172 | 402 | 460 | 23 600 | < 1% |

^aDes solutions stocks des fluorophores ont été préparées (1 mg/mL) dans le DMSO (qualité spectroscopique).

^bLes standards suivant ont été utilisés : sulfate de quinine ($\phi_F = 54\%$ dans une solution aq. de H₂SO₄ (0,05 M), $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm)⁵¹ et la 7-hydroxycoumarine ($\phi_F = 76\%$ dans le PB (pH 7,5), $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm)⁵². Les indices de réfraction utilisées : 1.333 pour la solution aq. de H₂SO₄ (0,05 M) et 1.337 pour le PB.



⁵⁰ Pour des publications et revues sur les pro-photosensibilisateurs ou photosensibilisateurs activables, voir : a) J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2839-2857; b) X. Li, S. Kolemen, J. Yoon, E. U. Akkaya, *Adv. Funct. Mater.*, **2017**, *27*, 1604053; c) W. Zhai, Y. Zhang, M. Liu, H. Zhang, J. Zhang, C. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*, 16601-16609; d) F. Xu, H. Li, Q. Yao, H. Ge, J. Fan, W. Sun, J. Wang, X. Peng, *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, 10586-10594; e) M. Chiba, M. Kamiya, K. Tsuda-Sakurai, Y. Fujisawa, H. Kosakamoto, R. Kojima, M. Miura, Y. Urano, *ACS Cent. Sci.*, **2019**, *5*, 1676-1681.

⁵¹ A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, **2011**, *83*, 2213-2228.

⁵² K.-i. Setsukinai, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, T. Nagano, *J. Chem. Soc.*, **2000**, 2453-2457.

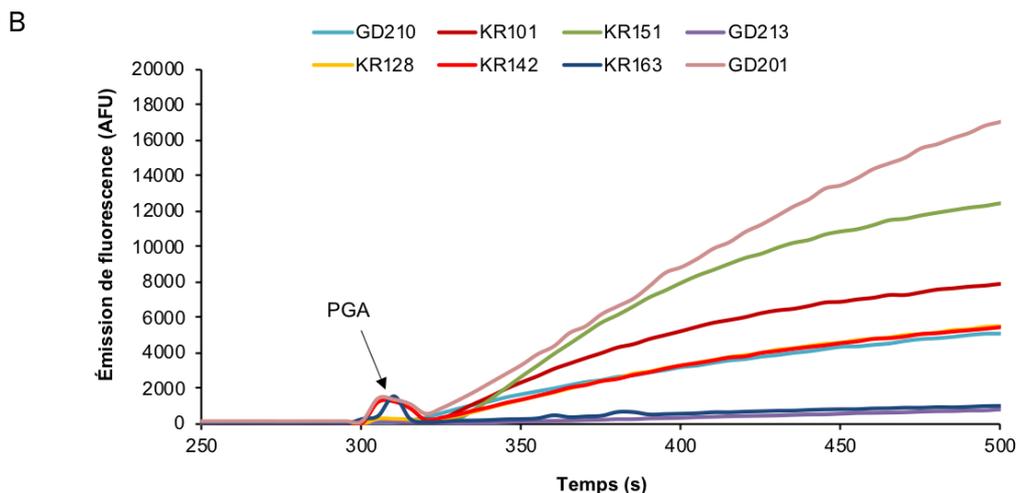


Figure 23. (A) Cinétiques d'activation enzymatique des différentes sondes de type "covalent assembly" dans le PB (pH 7.6) à 37 °C en présence de PGA. (B) Zoom sur la réponse fluorogénique faisant suite à l'addition de la PGA dans le milieu. Note : pour un rappel de la structure des différents composés, voir la fiche récapitulative des molécules.

Enfin, il serait intéressant d'obtenir la quinoxalin-2(1*H*)-one portant en position trois un motif *ortho*-hydroxyphényle pour étudier son comportement spectral (Figure 24). En effet, nous supposons que la présence du groupement -OH en *ortho* pourrait conduire à un phénomène de type ESIPT (cf. partie II.2.3. de l'introduction générale). Un déplacement bathochrome peut-être attendu, voire une précipitation du composé dans le milieu, ce qui peut être intéressant pour certaines utilisations (e.g., tests *in vitro*, détection bactérienne en solution). De plus, la synthèse du précurseur "cagé" conduisant à ce fluorophore pourrait permettre d'obtenir une sonde de type "dual" permettant la détection de deux (bio)analytes différents au travers de deux canaux d'émission différents⁵³. En effet, la première activation conduirait à la formation de la quinoxalin-2(1*H*)-one portant l'*ortho*-hydroxyphényle protégé par un motif de reconnaissance différent du premier. La déprotection de ce deuxième motif par une seconde analyte cible, permettrait le phénomène de type ESIPT et donc une seconde émission de fluorescence.

⁵³ Pour des revues sur les sondes de type "dual", voir : a) A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 1294-1306; b) J. L. Kolanowski, F. Liu, E. J. New, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 195-208; c) Y. Yue, F. Huo, F. Cheng, X. Zhu, T. Mafireyi, R. M. Strongin, C. Yin, *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, *48*, 4155-4177.

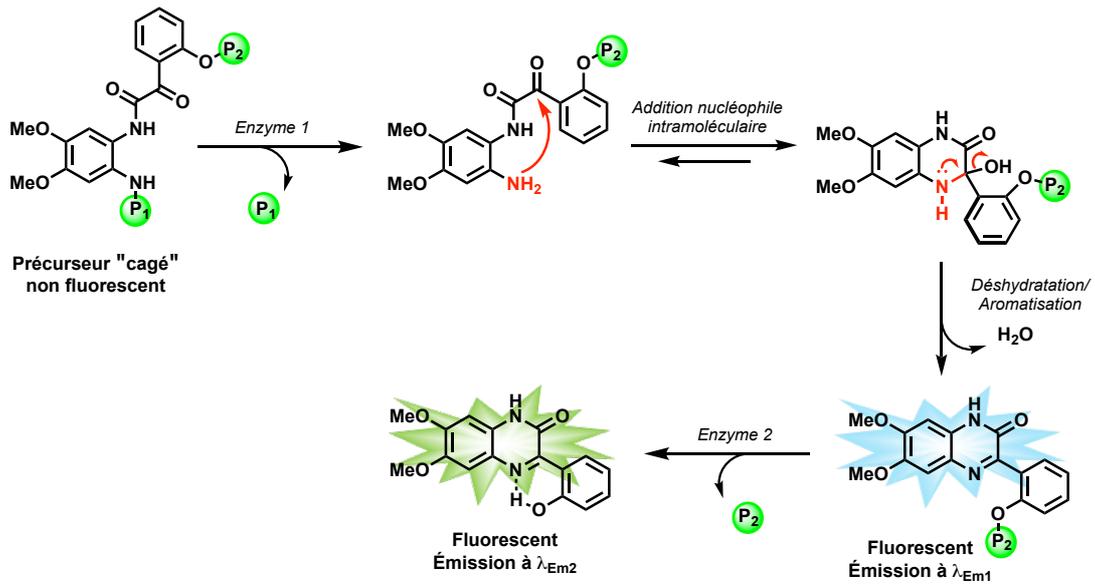


Figure 24. Mécanisme d'activation supposé d'une sonde de type "dual" menant à la formation *in situ* de la 3-ortho-hydroxyphényle-quinoxalin-2(1*H*)-one et permettant la détection simultanée de deux activités enzymatiques différentes.

Chapitre 4

Substrats fluorogéniques conventionnels
dérivés d'une nouvelle bis-sulfonyl-
para-phénylènediamine fluorescente.
Application en microbiologie

Ce dernier chapitre est consacré à la synthèse d'un nouveau substrat fluorogénique dit conventionnel (cf. partie II de l'introduction générale) et dérivé d'une nouvelle *para*-phénylènediamine fluorescente. L'application visée de cette sonde est la détection d'enzymes en microbiologie, par conséquent un état de l'art sur l'identification des bactéries à l'aide de substrats fluorogéniques va tout d'abord être présenté. La synthèse de la sonde et les résultats des tests *in vivo*, réalisés au sein du département R&D Microbiologie de bioMérieux, seront décrits dans la seconde partie.

I. État de l'Art

Les causes des maladies infectieuses humaines et animales sont nombreuses et variées, toutefois, elles sont généralement causées par quatre pathogènes potentiels : les bactéries, les virus, les champignons et les parasites¹. Il est donc important de disposer d'outils d'identification et de détection efficaces, conduisant à un diagnostic et à la prescription d'un traitement adapté à la maladie identifiée. L'importance de l'identification bactérienne n'est pas limitée à l'environnement hospitalier. Les industries agroalimentaires et cosmétiques nécessitent la mise en œuvre quotidienne de procédures de contrôle qualité permettant de vérifier l'absence de pathogènes dans les produits fabriqués. Historiquement, l'identification des bactéries, des champignons, ou des levures se fait par isolement en culture suivi de réactions enzymatiques et d'analyses morphologiques².

Afin de faciliter l'étude des activités métaboliques, l'utilisation de substrats synthétiques pouvant fournir un signal facilement mesurable comme une variation d'absorbance ou d'émission de fluorescence sont très utilisés³. Toutefois, au cours des dernières décennies, le développement de nouvelles méthodes mettant en jeu par exemple les techniques de spectrométrie de masse comme l'ionisation par électro-spray (ESI pour "*Electrospray ionization*")⁴ ou encore la désorption-ionisation laser assistée par matrice couplée à un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF pour "*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*")⁵, ont permis de répondre à différents besoins en microbiologie tels que l'identification rapide de micro-organismes et de leur résistance aux antibiotiques, mais aussi la détection de mutations génétiques chez certains micro-organismes⁶. Cependant, ces techniques bien que rapides, précises et efficaces nécessitent un

¹ B. Albert, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, P. Walter, *Introduction to Pathogens, Molecular Biology of the Cell*. 4ème Ed., Garland Science, New York, **2002**.

² K. P. Talaro, B. Chess, *Foundation in Microbiology: Basic Principles*. 8ème Ed., McGraw-Hill Higher Education, New York, **2012**.

³ Pour une revue sur les tests enzymatiques colorimétriques et fluorogéniques : J.-L. Reymond, V. S. Fluxà, N. Maillard, *Chem. Commun.*, **2009**, 34-46.

⁴ J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science*, **1989**, 246, 64-71.

⁵ M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301.

⁶ Pour une revue sur les avancées technologiques pour la détection bactérienne, voir : P. A. C. Braga, A. Tata, V. Gonçalves dos Santos, J. R. Barreiro, N. V. Schwab, M. Veiga dos Santos, M. N. Eberlin, C. R. Ferreira, *RSC Adv.*, **2013**, 3, 994-1008.

investissement financier non-négligeable dans des instruments souvent sophistiqués, utilisables par des personnels formés et générant des quantités considérables de données. En outre, l'analyse rapide et le stockage pérenne de ces dernières requièrent des ressources informatiques importantes et des solutions logicielles performantes, faisant vite de ces techniques des méthodes relativement onéreuses. En ce qui concerne l'identification des bactéries, micro-organismes auxquels nous nous intéressons particulièrement dans le cadre de notre collaboration avec le département R&D Microbiologie de bioMérieux, l'utilisation de substrats chromogènes et/ou fluorogéniques spécifiques d'enzymes microbiennes reste un moyen économique et largement répandu. En effet, de nombreux kits commerciaux (e.g., les galeries API®⁷) permettent l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. En outre, ces tests sont de plus en plus automatisés et il existe de nombreux appareils commerciaux (e.g., BD Phoenix™ ou Vitek 2®⁸) permettant l'identification bactérienne en deux ou trois heures contre un minimum de 24 h pour les cultures manuelles⁹ (Figure 1).

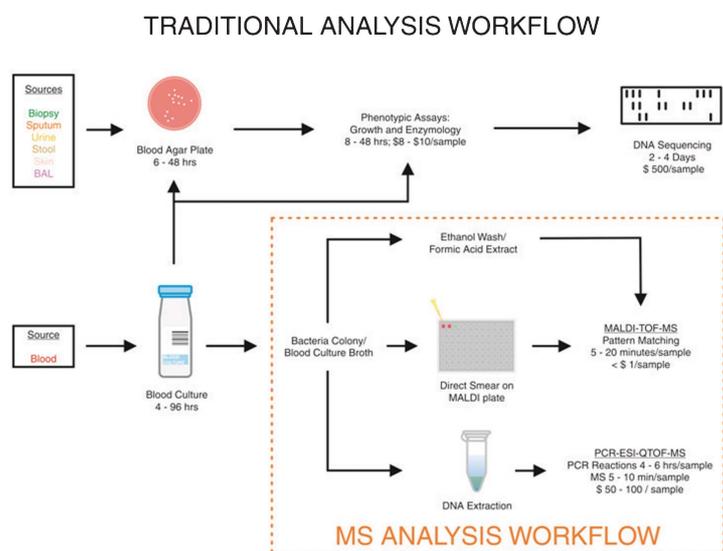


Figure 1. Résumé schématique de la méthodologie généralement utilisée pour l'identification bactérienne et de l'intégration récente des méthodes fondés sur les techniques d'analyse par spectrométrie de masse. Illustration issue de la référence 6. © 2010 Royal Society of Chemistry.

Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement à l'identification des bactéries *via* la détection de leurs profils enzymatiques à l'aide de substrats fluorogéniques et dont le domaine d'application est l'analyse microbiologique. Dans un second temps, une attention particulière sera portée à la détection de l'activité des peptidases bactériennes.

⁷ P. B. Smith, K. M. Tomföhrde, D. L. Rhoden, A. Balows, *Appl. Microbiol.*, **1972**, 24, 449-452.

⁸ Pour des articles sur les cartes utilisées dans le Vitek 2®, voir : a) M. Ligozzi, C. Bernini, M. G. Bonora, M. de Fatima, J. Zuliani, R. Fontana, *J. Clin. Microbiol.*, **2002**, 40, 1681-1686; b) G. Funke, P. Funke-Kissling, *J. Clin. Microbiol.*, **2004**, 42, 4067-4071.

⁹ Pour des revues comparant les techniques d'identifications bactériennes, voir : a) J. H. Jorgensen, M. J. Ferraro, *Clin. Infect. Dis.*, **2009**, 49, 1749-1755; b) S. Puttaswamy, S. Gupta, H. Regunath, L. Smith, S. Sengupta, *Arch. Clin. Microbiol.*, **2018**, 9, Article 3:83.

I.1. Identification des bactéries

La première manière de classer les nombreux types de bactéries existantes repose sur l'analyse de leurs morphologies. Les *cocci* sont plutôt courtes et sphériques, les *bacilli* en forme de bâtonnet, les *spirilla* sont rigides et forment des spirales et d'autres sont flexibles et spiralées, incurvées, ...¹⁰ La seconde classification est basée sur la structure de leurs parois cellulaires. Elle se fait au travers du test de coloration de Gram, développé par H. C. Gram en 1882 puis publié en 1884¹¹. Selon cette méthode, les cellules bactériennes sont fixées sur une lame de microscope et colorées avec une solution de cristal violet (colorant de la famille des triarylméthanés), parfois remplacée par une solution de bleu de méthylène. Une solution d'iode est ensuite utilisée pour fixer le colorant sur la paroi des micro-organismes. Après un lavage à l'aide d'une solution alcoolique pour éliminer l'excès de colorant, la plaque est observée au microscope. En raison de leur paroi cellulaire épaisse constituée de peptidoglycanes et d'une faible teneur en lipides, les bactéries à Gram positif seront colorées en violet, contrairement à celles à Gram négatif. Une contre-coloration à la safranine (colorant à cœur phénazine et de couleur rose) peut ensuite être effectuée pour pouvoir différencier les bactéries à Gram positif qui resteront colorées en violet et celles à Gram négatif qui apparaîtront colorées en rose¹².

Enfin, afin de différencier correctement les espèces bactériennes, car il est possible que la ressemblance entre certaines lignées pathogènes et naturelles puisse conduire à des confusions, des tests biochimiques spécifiques des phénotypes enzymatiques des espèces étudiées peuvent être alors mis en œuvre¹³. Il existe le test de la catalase, enzyme produite uniquement par les bactéries utilisant l'oxygène dans leur cycle respiratoire (*i.e.*, différenciation entre les staphylocoques et les streptocoques), et le test de l'oxydase, qui va aider à l'identification du genre des bacilles à Gram négatif. A côté de ces tests mettant en jeu des processus redox, ceux visant à détecter des enzymes de type hydrolase (peptidases, glycosidases, estérases, ...) sont également très largement employés. Dans ce cas, la détection de l'enzyme bactérienne s'effectue à l'aide de substrats chromogènes et/ou fluorogéniques dont le principe est rappelé dans la Figure 2.

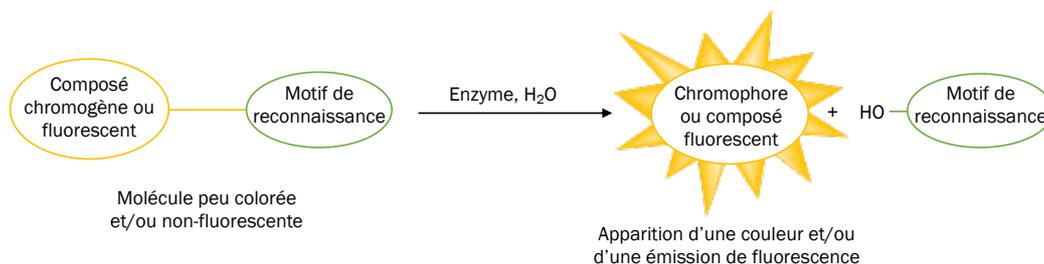


Figure 2. Principe schématique du test d'hydrolyse d'un substrat chromogène et/ou fluorogénique pour la détection des enzymes bactériennes.

¹⁰ T. Heart et P. Shears, *Atlas de poche de microbiologie*, Médecine-Sciences-Flammarion, 2006.

¹¹ C. Gram, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1884, 10, 234-235.

¹² J. Barenfanger, C. A. Drake, *Lab. Med.*, 2001, 32, 368-375.

¹³ M. Ford, J. D. Perry, Identification Tests. In *Medical Microbiology*, 2ième Ed., Oxford University Press: New York, 2012.

I.2. Substrats enzymatiques fluorogéniques en microbiologie

L'utilisation de substrats enzymatiques en milieu de culture, telle que la gélose nutritive, est basée sur l'incubation de bactéries isolées en présence du substrat chromogène ou fluorogénique. Ce dernier possède un motif de reconnaissance de l'enzyme ciblée pouvant être métabolisé par cette dernière. Cette réaction enzymatique conduit à libération d'une molécule (chromophore et/ou molécule fluorescente) présentant des propriétés optiques détectables seulement lorsque le micro-organisme ciblé, exprimant cette enzyme, est présent. Les avantages de ce type de tests sont : la facilité de mise en œuvre, le faible coût et parfois la détection et l'identification précoce des agents pathogènes¹⁴.

Le premier substrat synthétique date du milieu du 20^{ème} siècle¹⁵, il est basé sur la libération de l'*ortho*-nitrophénol, ayant une couleur jaune intense, suite à l'hydrolyse du *ortho*-nitrophényl- β -D-galactosidase par la β -D-galactosidase extraite d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Figure 3).

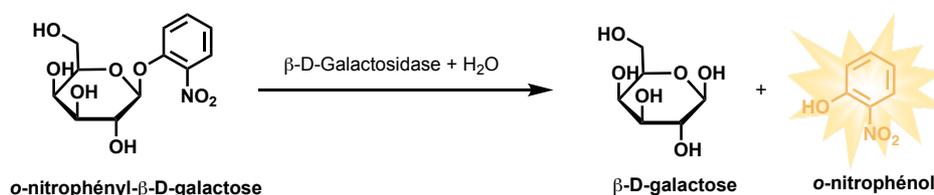


Figure 3. Principe du substrat chromogène permettant la détection de la β -D-galactosidase¹⁵. Remarque : La couleur jaune intense de l'*ortho*-nitrophénol est due à sa forme phénolate. Son pKa étant égale à 7,2, en solution aqueuse, la forme phénol et phénolate sont en équilibre.

Toutefois, la coloration de la plupart des milieux de culture est proche de la couleur jaune, il pouvait donc être difficile de distinguer de façon certaine l'apparition d'une couleur due à la libération du chromophore *ortho*-nitrophénol¹⁶. C'est pour pallier à ce genre d'inconvénients que les chercheurs se sont rapidement tournés vers les substrats fluorogéniques qui doivent permettre (du moins en théorie) d'accéder à une plus grande sensibilité de détection intrinsèque. En effet, la perception de la différence de couleur due à la libération du chromophore repose sur une perception subjective pouvant changer avec l'éclairage environnant. Tandis que pour les fluorophores, l'émission de lumière est dépendante d'une excitation à une longueur d'onde définie, elle est donc généralement plus facile à observer et dans un laps de temps plus réduit (6 à 8 h contre 24 à 72 h pour les substrats chromogènes)¹⁷. Dans le reste du chapitre, nous nous intéresserons donc principalement aux substrats fluorogéniques.

¹⁴ L. Varadi, J. L. Luo, D. E. Hibbs, J. D. Perry, R. J. Anderson, S. Oregna, P. W. Groundwater, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 4818-4832.

¹⁵ J. Lederberg, *J. Bacteriol.*, **1950**, 60, 381-392.

¹⁶ M. Manafi, W. Kneifel, *J. Appl. Bacteriol.*, **1990**, 69, 822-827.

¹⁷ M. J. Corey, *Coupled Bioluminescent Assays: Methods, Evaluations, and Applications*. John Wiley & Sons, New Jersey, **2009**.

Aujourd'hui, la plupart des milieux pro-fluorescents utilisent des composés fluorogéniques dérivés de la coumarine, tel que la 4-méthylumbelliférone (ou 4-méthylumbelliférone, 4-MU) ou la 7-amino-4-méthylcoumarine (7-AMC), fluorophores bien connus présentant un large déplacement de Stokes (voisin ou supérieur à 100 nm en tampon aqueux, pH 7,5) et une émission intense dans le bleu, centrée vers 450 nm (Figure 4)¹⁸. La première utilisation de la 4-MU date de 1975 ; le motif de reconnaissance présent sur les substrats dérivés de ce phénol fluorescent était une unité sucre liée au niveau de sa position anomérique *via* un lien de type acétal¹⁹. J. L. Maddocks et M. J. Greenan ont ainsi montré qu'il était possible de différencier les souches de *E. coli* de celles de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Cette 7-hydroxycoumarine possède une fluorescence dépendante du pH liée à l'équilibre acido-basique mettant en jeu sa fonction phénol (pKa ~ 7,8). Dans le PBS (100 mM + 150 mM NaCl, pH 7,5), son rendement quantique relatif de fluorescence est de 87%²⁰. Cette valeur élevée s'interprète notamment par la présence en solution de la forme phénolate qui se caractérise par une structure de type "push-pull" (*i.e.*, le phénolate agit en tant que groupement électro-donneur et le motif lactone agit en tant que groupement électro-attracteur)²¹. L'utilisation d'un milieu contenant un substrat fluorogénique dérivé de la 4-MU nécessite donc un pH légèrement alcalin ou l'addition d'une solution alcaline post-incubation pour révéler la fluorescence bleue²². Cependant, le maximum d'émission de ce fluorophore se situe dans la gamme spectrale de la fluorescence naturelle de plusieurs bactéries²³ (*e.g.*, *P. aeruginosa* produit de la pyoverdine, un oligopeptide antibiotique de la famille des sidérophores, possédant un chromophore dérivé de la quinoléine et dont le maximum d'émission est centré à 455 nm²⁴), limitant ainsi son utilisation. Enfin, la 4-MU a tendance à diffuser dans le milieu de culture, ce qui pose un problème quant à la localisation précise des enzymes au sein de la bactérie et peut conduire à des résultats médiocres en termes de rapport S/N.

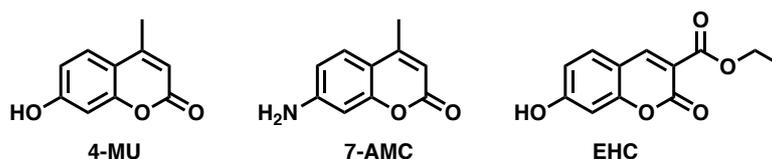


Figure 4. Structure des principaux dérivés de coumarine fluorescents utilisés dans l'élaboration de substrats enzymatiques fluorogéniques.

¹⁸ M. Goodfellow, E. G. Thomas, A. C. Ward, A. L. James, *Zentralbl. Bakteriolog.*, **1990**, 274, 299-315.

¹⁹ J. L. Maddocks, M. J. Greenan, *J. Clin. Pathol.*, **1975**, 28, 686-687.

²⁰ P. C. Glowacka, N. Maindrion, G. R. Stephenson, A. Romieu, P.-Y. Renard, F. da Silva Emery, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, 57, 4991-4996.

²¹ a) R. F. Chen, *Anal. Lett.*, **1968**, 1, 423-428 ; b) E. Koller, O. S. Wolfbeis, *Monatsh. Chem.*, **1985**, 116, 65-75.

²² J. E. L. Corry, G. D. W. Curtis, R. M. Baird, *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*, Royal Society of Chemistry, **2011**.

²³ X. Hou, S. Liu, Y. Feng, *Sci.Rep.*, **2017**, 7, Article 39289.

²⁴ J. C. MacDonald, G. G. Bishop, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1984**, 800, 11-20.

La 7-AMC, homologue aminé de la 4-MU, possède quant à elle une fluorescence indépendante du pH. Ses maxima d'absorption et d'émission se situent dans la même gamme spectrale (respectivement à 360 nm et 430 nm)²⁵ et son rendement quantique est de 83% dans le PBS²⁰. Elle reste toutefois très utilisée pour la conception de substrats de référence destinés à la détection de certaines enzymes (principalement des peptidases)²⁶ et qui sont mis en œuvre dans les systèmes automatisés de diagnostic microbiologique cités en introduction²⁷. La diffusion dans les milieux de culture de ces deux fluorophores (une fois libérés après la réaction entre l'enzyme et le substrat) ne permet pas l'incorporation directe des substrats correspondants au sein d'un milieu nutritif tel que la gélose (matrice couramment utilisée pour les tests en boîte de Petri). De ce fait, d'autres substrats ont été développés comme la 7-hydroxycoumarine-3-carboxylate d'éthyle (EHC)²⁸ (Figure 4). L'introduction en position C-3 du cœur coumarinique d'un groupement électro-attracteur de type -CO₂Et permet de diminuer la valeur de pKa du phénol (pKa ~ 4,8). La forme largement majoritaire dans un milieu à pH neutre sera ainsi le phénolate fluorescent (*vide supra*). Les travaux du groupe de J. D. Perry ont montré que les milieux contenant la EHC présentaient une intensité de fluorescence environ trois fois plus élevée à pH 7,0 (après 6 h d'incubation à 37 °C) que les milieux contenant la 4-MU (respectivement 70000 AFU contre 26000 AFU)²⁸. Un autre fluorophore, la β-naphtylamine, a aussi été utilisée pour l'identification de différents genres bactériens (e.g., *Streptococcus*, *Enterococcus*) via l'hydrolyse du substrat L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide par la pyroglutamyl-aminopeptidase²⁹ (Figure 5). L'émission de fluorescence centrée à 520 nm était un moyen efficace (du moins sur le papier) de s'éloigner de la fenêtre d'auto-fluorescence des bactéries³⁰. Cependant la détection à l'aide de la 7-AMC s'est révélée plus sensible, en effet, le rendement quantique de la β-naphtylamine est plus faible (47% dans l'eau³¹). De plus, comme beaucoup d'amines aromatiques, c'est un composé toxique. De ce fait, les dérivés de β-naphtylamine ne sont guère utilisés³².

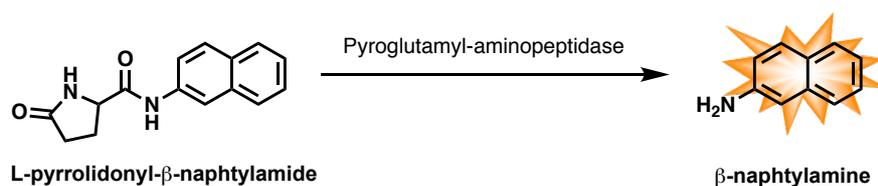


Figure 5. Substrat fluorogénique dérivé de la β-naphtylamine développée par A. Szewczuk et M. Mulczyk pour la détection de la pyroglutamyl-aminopeptidase, permettant ainsi d'identifier des genres bactériens²⁹.

²⁵ C. Prakash, I. K. Vijay, *Anal. Biochem.*, **1983**, 128, 41-46.

²⁶ M. Cellier-Rastit, A. L. James, S. Oregna, J. D. Perry, S. N. Robinson, G. Turnbull, S. P. Stanforth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, 29, 1227-1231.

²⁷ F. Garcia-Garrote, E. Cercenado, E. Bouza, *J. Clin. Microbiol.*, **2000**, 38, 2108-2111.

²⁸ K. F. Chilvers, J. D. Perry, A. L. James, R. H. Reed, *J. Appl. Microbiol.*, **2001**, 91, 1118-1130.

²⁹ A. Szewczuk, M. Mulczyk, *Eur. J. Biochem.*, **1969**, 8, 63-67.

³⁰ A. K. Mishra, M. Swaminathan, S. K. Dogra, *J. Photochem.*, **1985**, 28, 87-91.

³¹ K. Tsutsumi, H. Shizuka, *Chem. Phys. Lett.*, **1977**, 52, 485-488.

³² K. Fujiwara, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **1978**, 83, 1145-1149.

Les substrats enzymatiques fluorescents sont donc des outils bioanalytiques puissants, largement utilisés en biochimie³³ et en microbiologie³⁴, qu'il est nécessaire de développer et d'optimiser pour répondre aux exigences de la microbiologie. C'est dans ce contexte que le travail présenté dans ce chapitre s'est inscrit. Les différentes enzymes sont généralement classées en fonction du type de réaction qu'elles catalysent. Il existe ainsi 6 catégories d'enzymes : les hydrolases, les isomérases, les ligases, les lyases, les oxydoréductases, et les transférases³⁵. Dans les paragraphes qui suivent, nous ne présenterons que l'état de l'art des substrats fluorogéniques ciblant les enzymes capables de cliver des liaisons covalentes au travers d'un processus hydrolytique catalysé (*i.e.*, hydrolases) et plus spécifiquement les protéases (on parle également de peptidases ou d'enzymes protéolytiques).

I.3. Substrats fluorogéniques pour la détection de protéases

Les protéases ou peptidases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse de liaisons peptidiques au sein des protéines (Figure 6). En fonction de la position du site subissant le processus de clivage, on parle d'exopeptidases qui permettent la libération d'un acide aminé en bout de chaîne (*i.e.*, extrémité C-terminale pour les carboxypeptidases et N-terminale pour les aminopeptidases), ou d'endopeptidases, qui peuvent couper une liaison peptidique en milieu de la chaîne³⁵. C'est une famille d'enzymes très utilisée pour différencier les bactéries.

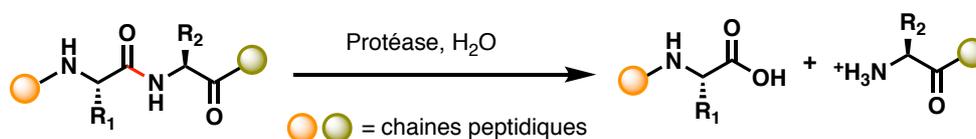


Figure 6. Hydrolyse d'un lien peptidique catalysée par une protéase/peptidase (cas d'une endopeptidase représenté).

I.3.1. Les substrats ciblant la L-alanine aminopeptidase

La L-alanine aminopeptidase (AAP) est généralement exprimé par les bactéries à Gram-négatif, il est donc possible, en la ciblant, de faire une différenciation avec celles à Gram positif³⁶. Les premiers travaux ont été réalisés en 1990 par M. Manafi et W. Kneifel¹⁶ dans lesquels ils utilisent un substrat fluorogénique L-alanyl-7-amino-4-méthylcoumarine (simple dérivé de la 7-AMC qui est amidifiée au niveau de son aniline primaire par l'acide aminé L-alanine) qui a démontré toute son efficacité (Figure 7). Cependant, le fluorophore libéré, la 7-AMC, diffuse dans la gélose utilisée comme matrice des tests de détection. D'autres substrats ont été développés pour pallier à ce problème. En 2008, la société bioMérieux au travers d'une collaboration de longue date avec

³³ H. Singh, K. Tiwari, R. Tiwari, S. K. Pramanik, A. Das, *Chem. Rev.*, **2019**, *119*, 11718-11760.

³⁴ Pour des revues sur les substrats chromogènes et fluorogéniques en microbiologie, voir : a) M. Manafi, *Int. J. Food Microbiol.*, **2000**, *60*, 205-218; b) S. Oregna, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry, D. H. Pincus, *J. Microbiol. Methods*, **2009**, *79*, 139-155; c) W. Chyan, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 1810-1823.

³⁵ J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, In *Biochemistry*, 5ème Ed., W. H. F. a. Company, Ed. New York, **2000**, Chapitre 8 & 9.

³⁶ G. M. Carlone, M. J. Valadez, M. J. Pickett, *J. Clin. Microbiol.*, **1982**, *16*, 1157-1159.

des (bio)chimistes anglais des Universités de Northumbria et Sunderland, ont synthétisé de nombreux dérivés d'acridinium pour différencier les bactéries à Gram positif. Ils ont alors montré que le sel de 9-(4'-*N*-[L-Ala-L-Ala-L-Ala]aminophényl)-10-méthylacridinium, substrat chromogène, pouvait être utilisé dans ce contexte et ne présentait aucune diffusion dans la matrice³⁷ (Figure 7). Des substrats fluorogéniques dérivés de l'hétérocycle benzothiazole ont également été développés et testés par les mêmes groupes pour détecter cette activité³⁸ (Figure 8) ; il est intéressant de préciser que dans ce cas, le centre fluorogénique étant un phénol (sur le modèle des dérivés d'ombelliférone), il est indispensable d'ajouter au sein de la structure un bras espaceur auto-immolable de type *para*-aminobenzyle (PHB) afin de lier l'acide aminé L-alanine au phénol fluorescent. Les derniers travaux émanant de cette collaboration public-privé franco-anglaise ont été publiés en 2019, les substrats synthétisés sont des dérivés de type 3-hétéroaryl-7-aminocoumarine et de 6-amino-2-hétéroaryl-quinoléines³⁹. Parmi les six substrats testés, seuls les deux présentés dans la Figure 7 permettent une détection efficace et sélective des micro-organismes testés.

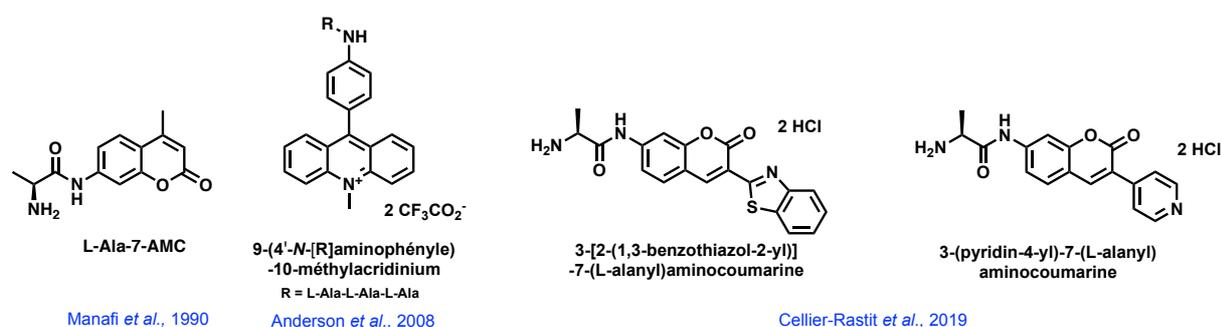


Figure 7. Structures des différents substrats ciblant l'enzyme AAP et permettant de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif.

³⁷ R. J. Anderson, P. W. Groundwater, Y. Huang, A. L. James, S. Orenga, A. Rigby, C. Roger-Dalbert, J. D. Perry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 832-835.

³⁸ Pour des travaux sur des substrats dérivés de l'hétérocycle benzothiazole, voir : a) M. Cellier, O. J. Fabrega, E. Fazackerley, A. L. James, S. Orenga, J. D. Perry, V. L. Salwatura, S. P. Stanforth, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 2903-2910; b) M. Cellier, A. L. James, J. Lowe, S. Orenga, J. D. Perry, A. K. Rasul, S. P. Stanforth, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 4066-4074.

³⁹ M. Cellier-Rastit, A. L. James, S. Orenga, J. D. Perry, S. N. Robinson, G. Turnbull, S. P. Stanforth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, *29*, 1227-1231.

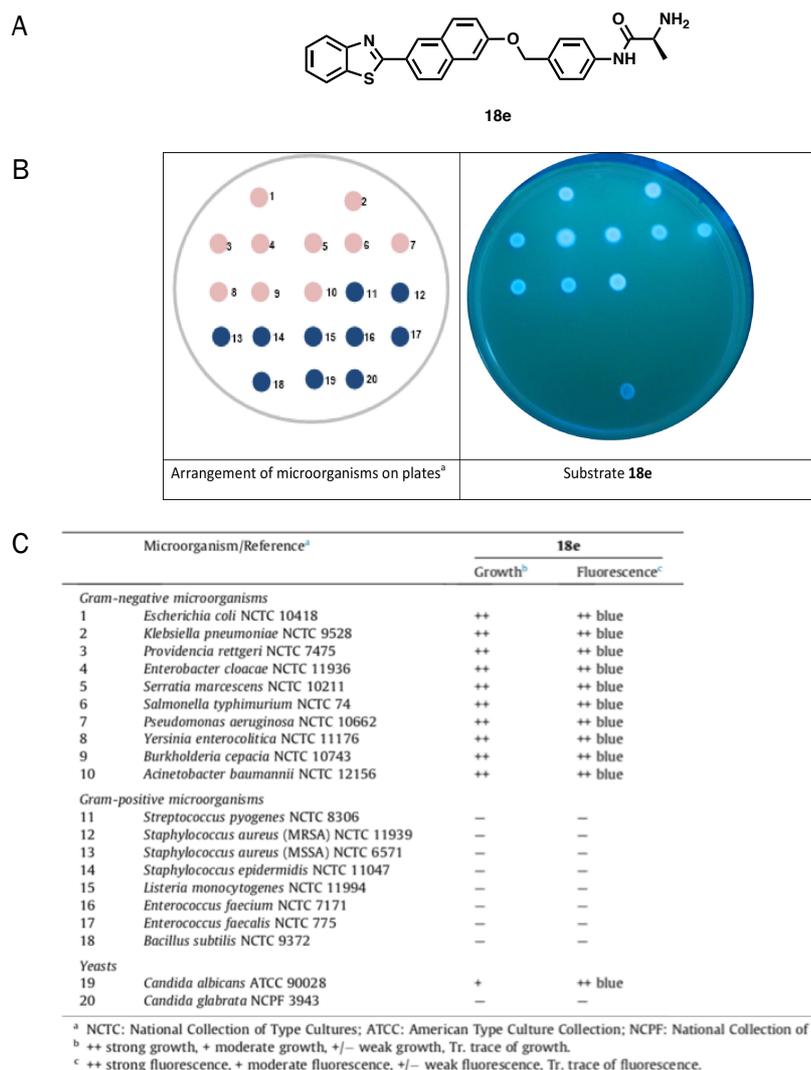


Figure 8. (A) Structure du substrat fluorogénique **18e** dérivé de l'hétérocycle benzothiazole et développé par Cellier *et al.* (B) Plaque de gélose contenant le substrat **18e**, à gauche : disposition des micro-organismes dont la numérotation correspond au numéro du tableau de (C) (en rose les bactéries à Gram négatif et en bleu les bactéries à Gram positif et les levures), à droite : photographie de la plaque de gélose sous illumination UV-A à 360 nm. (C) Tableau présentant les résultats obtenus avec le substrat **18e** ciblant l'enzyme AAP. Illustration issue de la référence 38b. © 2016 Elsevier.

I.3.2. Les substrats ciblant la β -alanine aminopeptidase

La β -alanine aminopeptidase (BAP) est une enzyme présente au sein d'un nombre restreint de micro-organismes. A ce jour, seulement six β -aminopeptidases sont connues et caractérisées d'un point de vue fonctionnel, cinq sont exprimées par des bactéries à Gram négatif et une par un champignon⁴⁰. Parmi les bactéries à Gram négatif exprimant la BAP se trouve le microorganisme *P. aeruginosa*, 6^{ème} pathogène le plus fréquent dans les infections nosocomiales, il est le principal déterminant de la morbidité et de la mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose⁴¹ et est très virulent chez les personnes immunodéprimées⁴². La détection précoce et rapide de *P.*

⁴⁰ M. John-White, J. Gardiner, P. Johanesen, D. Lyras, G. Dumsday, *Appl. Env. Microbiol.*, **2019**, 85, Article e00318-19.

⁴¹ J. B. Lyczak, C. L. Cannon, G. B. Pier, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2002**, 15, 194-222.

⁴² J. A. Fishman, *N. Engl. J. Med.*, **2007**, 357, 2601-2614.

aeruginosa est donc essentielle pour prévenir et empêcher sa transformation en phénotype mucoïde (*i.e.*, formation d'un biofilm qui protège le micro-organisme et lui permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles) extrêmement difficile à traiter.

Un premier substrat chromogène adapté à une détection en milieu gélifié et ciblant spécifiquement la BAP, a été développé en 2008 toujours dans le cadre de la collaboration entre bioMérieux et les équipes de J. D. Perry et A. L. James⁴³. Il est basé sur la conversion de la 7-*N*- β -alanyl-1-pentylresorufamine (7-*N*- β -alanyl-1-PRF), en 1-PRF (dérivé de la famille des oxazines possédant une aniline primaire chromogène) suite à l'hydrolyse du lien amide catalysée par la BAP. En raison de son excellente spécificité et sensibilité, le milieu contenant la 7-*N*- β -alanyl-1-PRF est aujourd'hui la base d'un test de diagnostic commercial de bioMérieux (ChromID™ *P. aeruginosa*)⁴⁴, qui peut être utilisé, par exemple, pour la détection de *P. aeruginosa* à partir de crachats de patients atteints de mucoviscidose⁴⁵ (Figure 9).

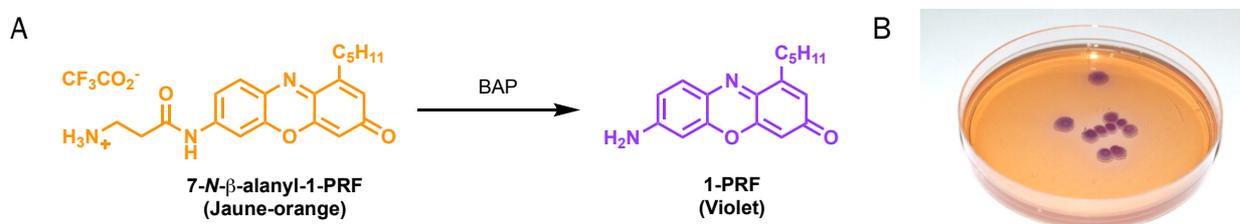


Figure 9. (A) Principe de fonctionnement du substrat chromogène 7-*N*- β -alanyl-1-PRF permettant de détecter la BAP. (B) Photo d'un milieu ChromID™ *P. aeruginosa* après incubation pendant 72 h de colonies de *P. aeruginosa*. Illustration issue de la revue de S. Orenga et al.^{34b} © 2009 Elsevier.

Afin de pallier aux inconvénients des substrats chromogènes déjà évoqués ci-dessus, plusieurs travaux concernant la conception, la synthèse et la validation de substrats fluorogéniques pouvant détecter la BAP, ont été réalisés. En 2016, le groupe de J. D. Perry toujours en collaboration avec bioMérieux⁴⁶, ont développé deux nouveaux substrats (**8a** et **8b**) qu'ils comparent à la β -Ala-7-AMC (**9**) déjà connue¹⁸ (Figure 10A). La détection de l'enzyme est efficace avec les deux substrats, cependant le fluorophore libéré (*i.e.*, 4-MU) par l'hydrolyse du lien amide entre le résidu β -Ala et le bras espaceur auto-immolable PHB de **8a** présente une intensité de fluorescence plus faible que celle du phénol **6b** et celle de l'aniline 7-AMC, ces deux composés étant issus de l'hydrolyse enzymatique des substrats **8b** et **9**. L'activation enzymatique de ces derniers produit des résultats équivalents, toutefois le fluorophore libéré par **8b** ne présente aucune diffusion dans

⁴³ A. V. Zaytsev, R. J. Anderson, A. Bedernjak, P. W. Groundwater, Y. Huang, J. D. Perry, S. Orenga, C. Roger-Dalbert, A. James, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 682-692.

⁴⁴ J. R. Anderson, P. W. Groundwater, A. James, D. Monget, A. V. Zaytsev, Novel enzymatic substrates derived from phenoxazinone and their use as developer in detection of micro-organism with peptidase activity. bioMérieux. W02006030119.

⁴⁵ L. Laine, J. D. Perry, J. Lee, M. Oliver, A. L. James, C. De La Foata, D. Halimi, S. Orenga, A. Galloway, F. K. Gould, *J. Cyst. Fibros.*, **2009**, 8, 143-149.

⁴⁶ L. Varadi, D. E. Hibbs, S. Orenga, M. Babolat, J. D. Perry, P. W. Groundwater, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 58884-58889.

le milieu contrairement à la 7-AMC (Figure 10B). Au cours de la même année, d'autres travaux portant sur de nouveaux substrats fluorogéniques dérivés de 2-aminoacridones *N*-substituées⁴⁷, de sulfonamides du 1-aminonaphtalène ou de 4-hydrazino-*N*-alkyl-1,8-naphtalimides⁴⁸ ont été publiés (Figure 11). Toutefois, si la sonde dérivée de la *N*-phényl-2-aminoacridone permet une détection ratiométrique du pathogène ciblé⁴⁷, les composés synthétisés par Luo *et al.* n'ont pas montré leur efficacité à différencier les bactéries exprimant la BAP de celles n'en produisant pas⁴⁸.

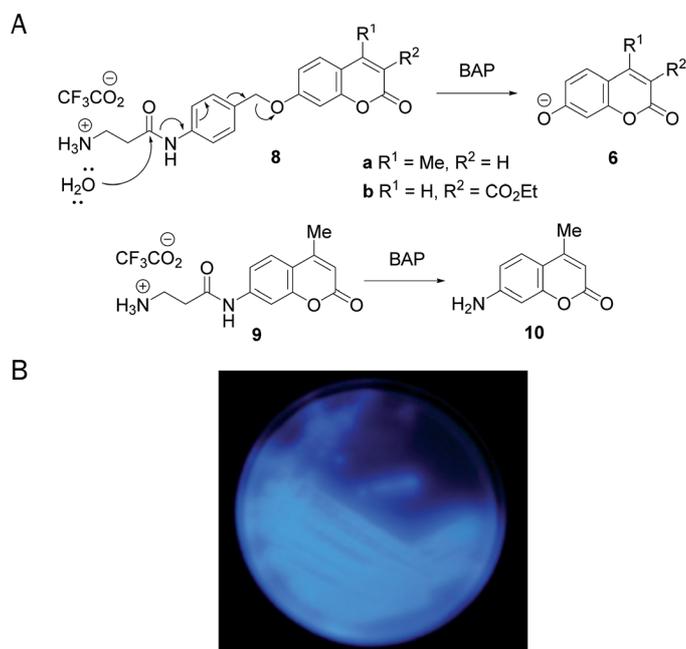


Figure 10. (A) Structure et principe du substrat fluorogénique permettant la détection de *P. aeruginosa* via la détection de la BAP. (B) Photographie d'une gélose contenant le substrat **8b** en présence d'une souche de *P. aeruginosa* après 18 h d'incubation, illuminé sous UV-A à 365 nm. Illustrations issues de la publication de L. Varadi *et al.*⁴⁶ © 2016 Royal Society of Chemistry.

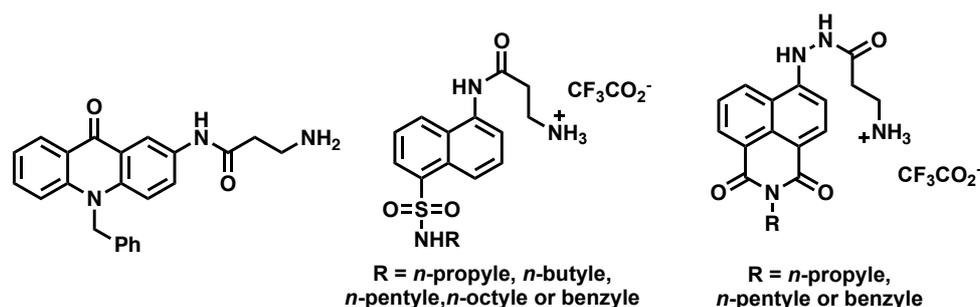


Figure 11. Structure des substrats fluorogéniques dérivés de la *N*-phényl-2-aminoacridones⁴⁷ (à gauche), de sulfonamides du 1-aminonaphtalène ou de 4-hydrazino-*N*-alkyl-1,8-naphtalimides (au milieu et à droite) développés pour la détection de *P. aeruginosa* via leur hydrolyse par la BAP⁴⁸.

Le substrat le plus récent à avoir été développé dérive de la 7-(diéthylamino)coumarine (DEAC) substituée en C-3 par un motif *para*-aminostyryle⁴⁹. Contrairement aux autres substrats

⁴⁷ M. Cellier, A. L. James, J. Lowe, S. Orenge, J. D. Perry, A. K. Rasul, S. P. Stanforth, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 4066-4074.

⁴⁸ J. L. Luo, T. Jin, L. Váradi, J. D. Perry, D. E. Hibbs, P. W. Groundwater, *Dyes Pigm.*, **2016**, *125*, 15-26.

⁴⁹ L. Váradi, M. Wang, R. R. Mamidi, J. L. Luo, J. D. Perry, D. E. Hibbs, P. W. Groundwater, *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, *26*, 4745-4750.

fluorogéniques à aniline qui produisent une réponse intensiométrique de type "Off-On" ou ratiométrique, ce substrat possède une fluorescence intrinsèque et une extinction de celle-ci est observée après hydrolyse du lien amide et élimination du motif β -alanyle (Figure 12A). L'absence de fluorescence de l'aniline (**(E)-A-DEAC**) est interprétée par une diminution du phénomène d'ICT au sein de la structure, due au caractère électro-donneur du groupement amino, et qui conduit ainsi à la désexcitation par une voie non-radiative⁵⁰. A l'inverse, au sein de la structure du substrat β -**(E)-A-DEAC**, le groupement $-NEt_2$ étant électro-donneur et le motif carboxamide étant électro-attracteur, la molécule s'apparente à un système "push-pull" caractérisée par un phénomène d'ICT marqué (Figure 12B).

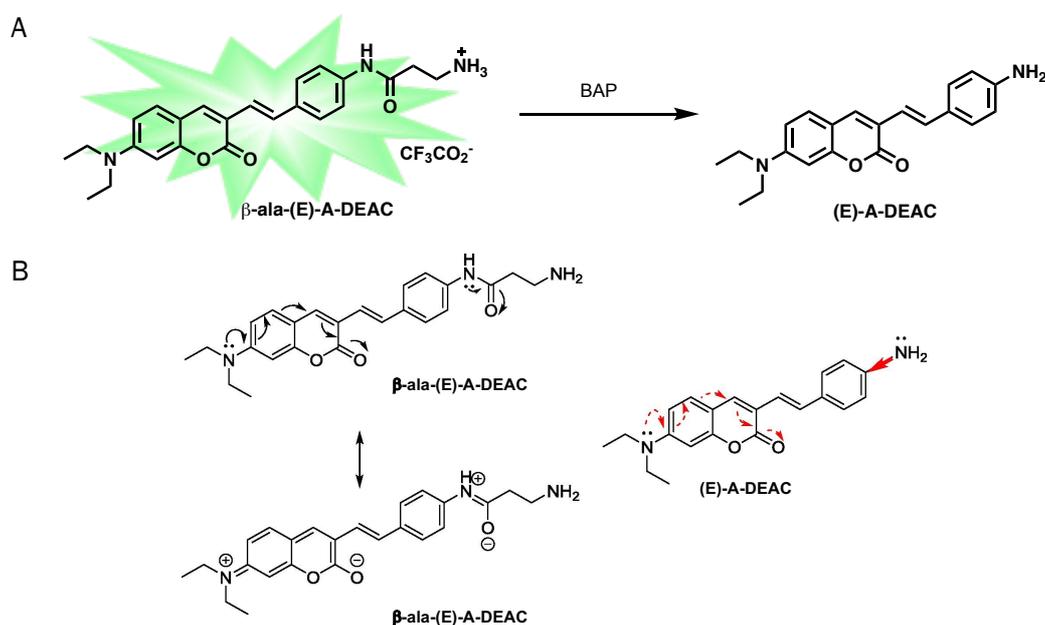


Figure 12. (A) Structure de la sonde sensible à la BAP mettant en jeu une détection intensiométrique de type "On-Off". (B) Formes mésomères illustrant le phénomène d'ICT au sein de la molécule β -**(E)-A-DEAC** et son inhibition dans le dérivé aniline (**(E)-A-DEAC**)⁴⁹. Illustration (B) issue de la publication de Varadi *et al.* © 2018 Elsevier.

I.3.3. Substrats ciblant la pénicilline G amidase

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 2 (partie I.2.2.1.) de ce manuscrit, la PGA est la protéase modèle que nous utilisons pour la validation *in vitro* de nos sondes fluorogéniques fondées sur le principe du "covalent assembly". Elle est produite par de nombreux micro-organismes et elle est très utilisée comme biocatalyseur pour la production d'antibiotiques de la famille des β -lactames *via* la synthèse de l'acide 6-aminopenicillanique (6-APA)⁵¹. Cependant cette capacité à hydrolyser les antibiotiques de la famille des pénicillines peut s'avérer problématique

⁵⁰ H. A. Anila, F. Ali, S. Kushwaha, N. Taye, S. Chattopadhyay, A. Das, *Anal. Chem.*, **2016**, 88, 12161-12168.

⁵¹ a) C. Rojviriyā, T. Pratumrat, M. A. Saper, J. Yuvaniyama, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **2011**, 67, 1570-1574 ; b) P. Rathinaswamy, S. M. Gaikwad, C. G. Suresh, A. A. Prabhune, J. A. Brannigan, G. G. Dodson, A. V. Pundle, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2012**, 50, 25-30 ; c) V. S. Avinash, A. V. Pundle, S. Ramasamy, C. G. Suresh, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2016**, 36, 303-316.

lorsqu'elle conduit, *in vivo*, à rendre un antibiotique inactif et ce de façon prématurée⁵². Il y a donc une nécessité à pouvoir détecter cette amidase. Lors des 20 dernières années, de nombreuses sondes fluorogéniques potentiellement activables par la PGA ont été publiées^{20,53} mais le but de ces travaux est souvent de valider un nouveau pro-fluorophore à aniline ou phénol, ou un nouveau bras espaceur auto-immolable mais pas de détecter la PGA dans un contexte biologique d'intérêt. Les sondes spécifiquement développées pour la détection de cette amidase reposent principalement sur des dérivés pro-fluorescents à cœur coumarine⁵⁴. Récemment, afin de pallier aux inconvénients liés à la gamme spectrale d'absorption et d'émission de ces fluorophores (*i.e.*, gamme spectrale du bleu-vert), des travaux, permettant la détection de la PGA au sein de bactéries, ont été publiés. Le premier, par le groupe de G. Jiang, propose une sonde pro-fluorescente basée sur une structure de type hémicyanine phénolique absorbant à 440 nm et émettant dans la gamme spectrale de l'orange-rouge ($\lambda_{\max} = 593$ nm), totalement éteinte lorsque son groupement hydroxyle est estérifié par l'acide phénylacétique⁵⁵ (Figure 13). Ils ont ainsi montré, à l'aide de tests *in vivo* en milieu nutritif liquide, que la sonde **HCyNB** permettait la détection de la PGA au sein d'une souche de *Bacillus cereus*.

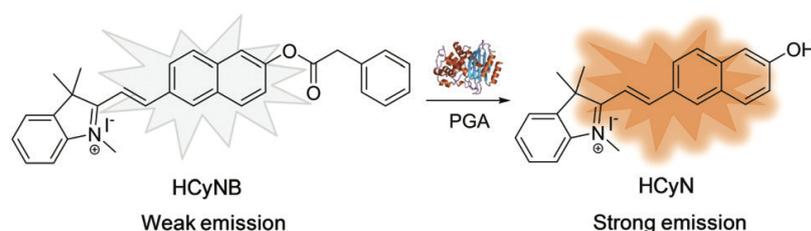


Figure 13. Principe et activation de la sonde **HCyNB** développée par le groupe de G. Jiang pour la détection de la PGA au sein des bactéries⁵⁵. Illustration issue de la publication 55. © 2019 Royal Society of Chemistry

En 2020, le groupe de C. Wang, associé à celui de X. Ma, a développé deux nouvelles sondes fluorogéniques mettant en jeu des anilines présentant des maxima d'absorption/émission respectivement dans le rouge et le vert. La première sonde pro-fluorescente permet une détection de type "Off-On" à partir d'un dérivé phénylacétamide de la 7-amino-1,3-dichloro-9,9-

⁵² P.-H. Chan, K.-C. Chan, H.-B. Liu, W.-H. Chung, Y.-C. Leung, K.-Y. Wong, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 5268-5276.

⁵³ Pour des publications sur la détection de PGA sans application dans le domaine de la microbiologie, voir : a) M. Ninkovic, D. Riester, F. Wirsching, R. Dietrich, A. Schwienhorst, *Analytical Biochemistry*, **2001**, *292*, 228-233; b) G. Clavé, A. Bernardin, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 6229-6233; c) E. Danieli, D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 7318-7324; d) Y. Meyer, J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 1517-1520; e) J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 4175-4178; f) J.-A. Richard, Y. Meyer, V. Jolivel, M. Massonneau, R. Dumeunier, D. Vaudry, H. Vaudry, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1707-1718; g) R. Weinstain, P. S. Baran, D. Shabat, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 1783-1791; h) Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 1777-1780; i) G. Woronoff, A. El Harrak, E. Mayot, O. Schicke, O. J. Miller, P. Soumillion, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 2852-2857; j) O. Redy, D. Shabat, *J. Control. Release*, **2012**, *164*, 276-282; k) J. Sloniec, U. Resch-Genger, A. Hennig, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 14336-14344; l) S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 10348-10361; m) J. Sloniec-Myszk, U. Resch-Genger, A. Hennig, *J. Phys. Chem. B*, **2016**, *120*, 877-885; n) S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 2575-2584; o) S. Debieu, A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2018**, *59*, 1940-1944; p) K. Renault, S. Debieu, J.-A. Richard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 8918-8932.

⁵⁴ Pour des publications sur la détection de PGA à l'aide de dérivés pro-fluorescents à cœur coumarine, voir : a) T. Scheper, M. Weiss, K. Schuegerl, *Anal. Chim. Acta*, **1986**, *182*, 203-206 ; b) M. Ninkovic, D. Riester, F. Wirsching, R. Dietrich, A. Schwienhorst, *Anal. Biochem.*, **2001**, *292*, 228-233.

⁵⁵ J. Wang, Q. Chen, J. Wu, W. Zhu, Y. Wu, X. Fan, G. Zhang, Y. Li, G. Jiang, *New J. Chem.*, **2019**, *43*, 6429-6434.

diméthylacridin-2(9*H*)-one (**DDAN**, un fluorophore original qui peut être considéré comme l'analogue azoté du 1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2(9*H*)-one, DDAO) (Figure 14). La détection de la PGA au sein de *E. coli* a été démontrée *via* la libération du fluorophore à aniline absorbant et émettant dans le rouge (maxima centrés respectivement à 600 et 667 nm)⁵⁶. La seconde, la *N*-(*n*-butyl)-4-*N*-(phénylacétamido)-1,8-naphthalimide (**PNA**)⁵⁷, permet une détection ratiométrique de type bathochromique de la PGA au sein de trois souches bactériennes différentes *via* la libération d'une aniline émettant dans le vert, la *N*-butyl-4-amino-1,8-naphthalimide (**AMNA**) (Figure 15).



Figure 14. Structure et principe d'activation de la fluorescence rouge de la sonde **DDAP**, développée par les groupes de C. Wang et X. Ma, et permettant la détection de type "Off-On" de la PGA au sein de bactéries⁵⁶.

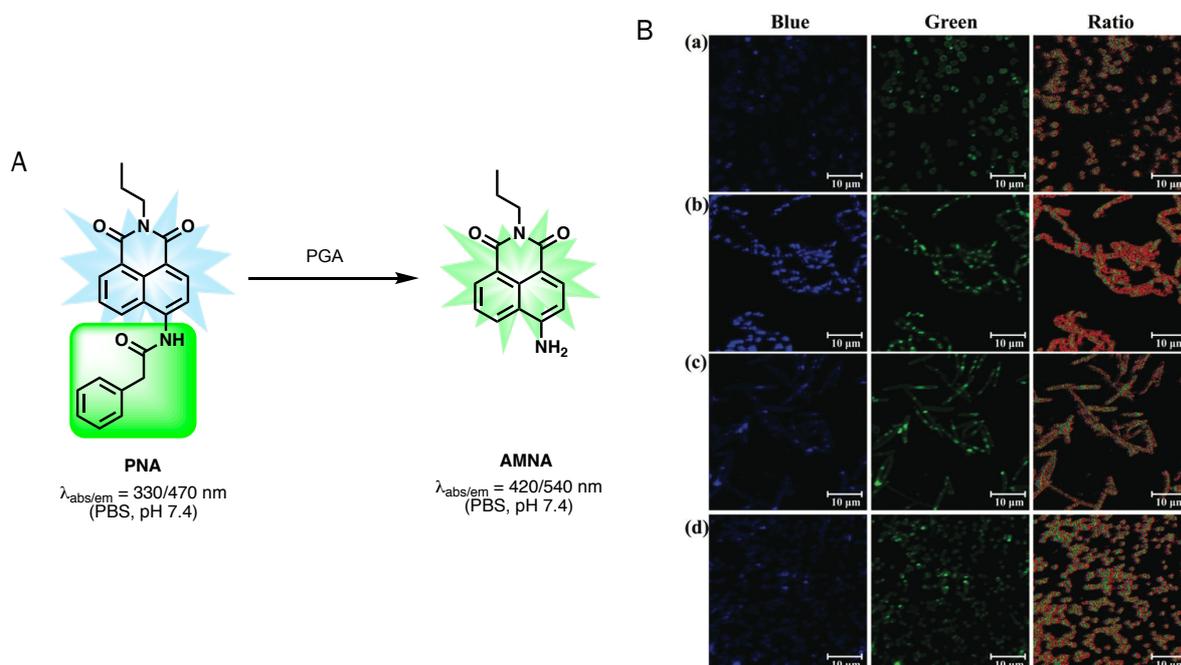


Figure 15. (A) Structure et principe d'activation de la fluorescence verte de la sonde **PNA** développée par les groupes de C. Wang et X. Ma. (B) Image de fluorescence des différentes souches bactériennes incubées avec la sonde **PNA** (50 µM). (a) *Acinetobacter baumannii* (b) *Bacillus cereus* (c) *Brevibacillus parabrevis* (d) *Staphylococcus aureus*. Première colonne : Ex./Em 405/425-459 nm, deuxième colonne : Ex./Em. 405/525-575 nm. Illustration (B) issue de la publication 57. © 2020 Royal Society of Chemistry.

Ainsi, nous avons pu montrer que l'utilisation de fluorophores possédant une aniline primaire ou un phénol jouant le rôle d'interrupteur de fluorescence (on parle aussi de centre fluorogénique) est souvent une façon simple, efficace et donc souvent employée pour accéder rapidement à des pro-fluorophores dont l'activation par l'analyte à détecter met en jeu une réaction chimique non

⁵⁶ Z. Tian, L. Feng, L. Li, X. Tian, J. Cui, H. Zhang, C. Wang, H. Huang, B. Zhang, X. Ma, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2020**, *310*, Article 127872.

⁵⁷ L. Li, L. Feng, M. Zhang, X. He, S. Luan, C. Wang, T. D. James, H. Zhang, H. Huang, X. Ma, *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 4640-4643.

réversible⁵⁸. La substitution de ces motifs par un groupement électro-attracteur et réactif vis-à-vis d'un analyte va altérer le caractère "*push-pull*" de la molécule conduisant souvent à l'extinction quasi-complète de sa fluorescence intrinsèque⁵⁹. La déprotection du motif de reconnaissance par réaction avec l'analyte va libérer le fluorophore et donc conduire, le plus souvent, à une réponse intensiométrique de type "Off-On". Suite à la publication d'une nouvelle aniline fluorescente, et après concertation avec nos collègues du département R&D Microbiologie de bioMérieux, nous avons souhaité utiliser ce principe pour concevoir et synthétiser une nouvelle sonde pro-fluorescente capable de détecter une activité enzymatique dans le contexte microbiologique.

II. Résultats et discussions

Récemment, le groupe de X. Ning a synthétisé une sonde enzymatique pro-fluorescente à partir d'un nouveau motif fluorescent⁶⁰. L'activité ciblée est de type NTR, afin de pouvoir détecter une bactérie pathogène, la *Listeria monocytogenes*. Ce micro-organisme à Gram positif, provenant d'une contamination alimentaire⁶¹, cause de graves infections et peut entraîner un risque de décès chez les personnes immunodéprimées ou déclencher une fausse couche chez les femmes enceintes⁶². Ce pro-fluorophore est composé d'un motif bio-métabolisable et d'un fluorophore, une *para*-phénylènediamine portant deux motifs sulfone de méthyle, la **BMeS-*p*-A** (Figure 16).

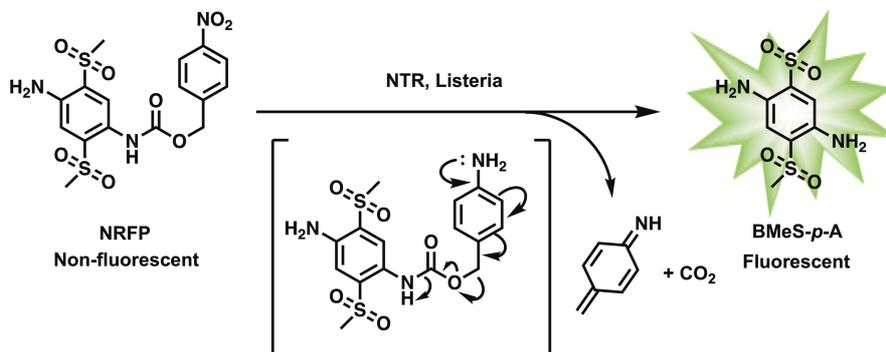


Figure 16. Principe de la sonde sensible à une activité NTR développée par le groupe de Ning dans le but de détecter la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*. Illustration inspirée de la référence 60. © 2019 Elsevier.

Le fluorophore utilisé, **BMeS-*p*-A**, a été synthétisé en 2015 par le groupe de H. Katagiri⁶³. Ce composé possède plusieurs caractéristiques particulièrement avantageuses : il est soluble dans l'eau, présente un large déplacement de Stokes (140 nm) et un rendement quantique de fluorescence de 67% dans l'eau. C'est pourquoi, dans le cadre de notre collaboration avec

⁵⁸ Y. Tang, D. Lee, J. Wang, G. Li, J. Yu, W. Lin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 5003-5015.

⁵⁹ F. Bureš, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 58826-58851.

⁶⁰ L. Zhang, L. Guo, X. Shan, X. Lin, T. Gu, J. Zhang, J. Ge, W. Li, H. Ge, Q. Jiang, X. Ning, *Talanta*, **2019**, 198, 472-479.

⁶¹ Pour des revues sur les méthodes de détection et d'identification de la *Listeria monocytogenes* dans les chaînes alimentaires, voir : a) J. M. Farber, P. I. Peterkin, *Microbiol. Rev.*, **1991**, 55, 476; b) A.-L. Välimaa, A. Tilsala-Timisjärvi, E. Virtanen, *Food Control*, **2015**, 55, 103-114.

⁶² a) Y. H. Grad, S. M. Fortune, *Nat. Genet.*, **2016**, 48, 229-230; b) W. Xu, M. Cater, A. Gaitan, M. Drewery, R. Gravois, C. J. Lammi-Keefe, *Food Control*, **2017**, 76, 62-65.

⁶³ T. Beppu, K. Tomiguchi, A. Masuhara, Y.-J. Pu, H. Katagiri, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 7332-7335.

bioMérieux, nous avons pensé qu'il pourrait s'agir d'un bon candidat pour la conception de substrats fluorogéniques destinés à la détection d'une activité de type NTR au sein des bactéries.

La re-synthèse du fluorophore et la synthèse d'une sonde sensible à une activité NTR ont donc été envisagées. Cependant, cette dernière n'ayant pas pu être obtenue, nous nous sommes orientés vers la préparation d'un autre substrat fluorogénique **GD155** ciblant une autre enzyme bactérienne évoquée au paragraphe I.3.2 (*vide supra*), la BAP. Ces travaux, ainsi que les tests *in vivo* du composé **GD155** réalisés lors de mon séjour chez bioMérieux vont être présentés dans la suite de ce chapitre.

II.1. Synthèse du fluorophore et des sondes fluorogéniques

II.1.1. Synthèse du fluorophore BMeS-*p*-A

Dans le but de synthétiser une sonde fluorogénique par substitution d'une (ou des deux) fonction(s) aniline(s) du fluorophore **BMeS-*p*-A**, la préparation de ce dernier a été envisagée. Elle se réalise en six étapes à partir de la *para*-phénylènediamine (PPD) commerciale (Schéma 1).

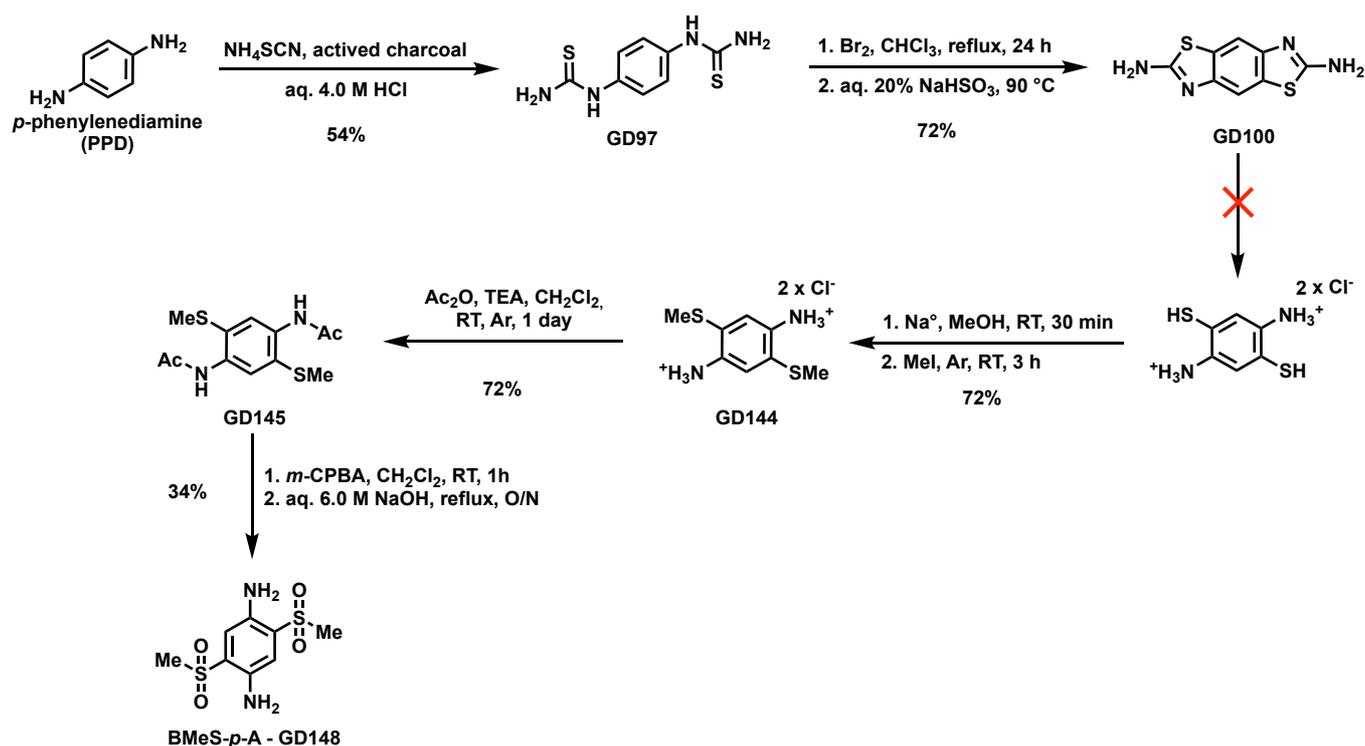


Schéma 1. Synthèse du fluorophore **BMeS-*p*-A (GD148)**.

La première étape est l'obtention de la bis-thiourée **GD97** par réaction de thiocyanation de PPD dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique pendant une journée. Elle est ensuite mise en présence de dibrome pour former le dérivé diamino-benzobisthiazole **GD100**⁶⁴. L'obtention du chlorhydrate de 2,5-diaminobenzène-1,4-dithiol est réalisée selon le protocole publié par Wolfe et Loo⁶⁵ qui consiste à déprotéger le dérivé benzobisthiazole en présence d'une solution aqueuse de KOH préparée dans de l'eau déminéralisée dégazée. Le dérivé bis-thiophénol obtenu en solution est immédiatement mis en présence d'une solution aqueuse dégazée d'acide chlorhydrique afin d'obtenir ce sel. Malgré les trois essais réalisés, le composé n'a pas pu être obtenu. La sensibilité à l'oxygène de l'air de la molécule non-salifiée (oxydation des motifs aniline et thiol ?) est sans doute la cause de ces échecs.

Toutefois, ce sel étant disponible commercialement (210 euros les 5 g chez TCI Europe), sa commande nous a permis de continuer la synthèse du fluorophore à partir de l'étape de méthylation des motifs thiols. Elle s'effectue en présence d'iodure de méthyle et dans une solution de sodium métallique dans le méthanol anhydre. Le rôle de Na° est double ; il permet la déprotonation des thiols mais aussi la réduction des dérivés disulfures qui pourraient se former dans le stock du réactif commercial par oxydation à l'air. Après, filtration le sel **GD144** est obtenu avec un rendement de 72%. Après protection des amines par un groupement acétyle, le composé **GD145** est mis en présence d'acide *meta*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA)⁶³. L'oxydation des thiols est quantitative en 40 minutes. Contrairement à ce qu'annonçait la publication du groupe de X. Ning⁶⁰, le produit de mono-oxydation n'est observé qu'en très faible quantité (< 5%). La déprotection des amines s'effectue ensuite à l'aide d'une solution de soude concentrée. Le milieu réactionnel est filtré et permet ainsi d'obtenir le mélange du produit désiré et d'un dérivé *para*-phénylènediamine non-symétrique (*i.e.*, molécule possédant une sulfone et un sulfoxyde). Une purification par chromatographie sur colonne de silice a permis l'obtention du fluorophore pur **GD148**, caractérisé par une couleur jaune intense, avec un rendement satisfaisant de 34%.

II.1.2. Synthèse d'un substrat fluorogénique sensible à une activité de type NTR

Dans un premier temps, il nous a semblé intéressant de tester la réactivité fluorogénique de la sonde **NRFP** (déjà publiée) dans le contexte de détection et d'identification de bactéries en milieu de culture liquide ou solide.

Le fluorophore **GD148** a donc été mis à réagir avec le chloroformiate de 4-nitrobenzyle afin d'acyler l'un ou les deux groupements amino (Schéma 2). Cependant, même en présence d'un large excès de base et le chauffage du brut réactionnel, aucune réaction de *N*-acylation n'est observée.

⁶⁴ Pour les premières étapes de synthèse, voir : G. Conboy, R. G. D. Taylor, N. J. Findlay, A. L. Kanibolotsky, A. R. Inigo, S. S. Ghosh, B. Ebenhoch, L. Krishnan Jagadamma, G. K. V. V. Thalluri, M. T. Sajjad, I. D. W. Samuel, P. J. Skabara, *J. Mater. Chem. C*, **2017**, 5, 11927-11936.

⁶⁵ J. F. Wolfe, B. H. Loo, F. E. Arnold, *Macromolecules*, **1981**, 14, 915-920.

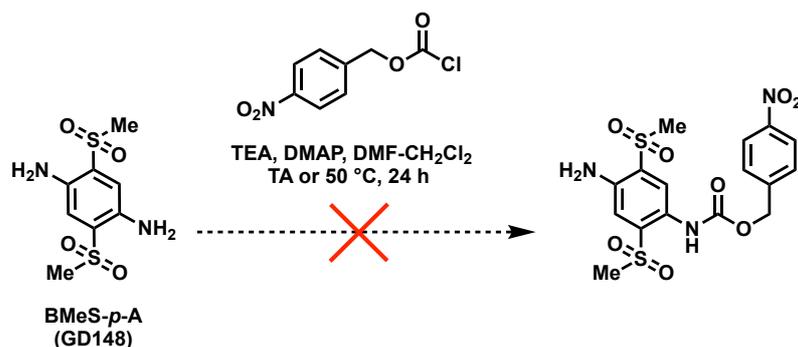


Schéma 2. Tentative de synthèse de la sonde NRFP par mono-*N*-acylation de GD148 avec le chloroformiate de 4-nitrobenzyle.

Lors d'un deuxième essai, malgré l'ajout d'un équivalent d'une base plus forte, la 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU), aucune trace de produit de *N*-acylation n'a été détectée. Or, dans la publication de référence⁶⁰, le rendement annoncé était de 60%. Après avoir contacté le Prof. X. Ning, celui-ci nous a expliqué que le rendement annoncé était calculé/corrigé en tenant compte du produit de départ récupéré. Par ailleurs, selon ses dires, la réaction fonctionne bien uniquement en grande échelle et en utilisant un chloroformiate de 4-nitrobenzyle fraîchement préparé par réaction de l'alcool 4-nitrobenzylique avec le phosgène.

Suite à ces deux échecs et comme il ne me restait que peu de temps avant mon départ chez bioMérieux, pour obtenir un substrat fluorogénique sensible à une enzyme microbienne, nous avons décidé d'explorer la synthèse d'une sonde réactive vis-à-vis de la BAP.

II.1.3. Synthèse d'un substrat fluorogénique sensible à la β -alanine aminopeptidase

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce chapitre, la BAP fait partie de la famille des enzymes qui sont capables d'hydrolyser une liaison peptidique à partir de l'extrémité *N*-terminale. Elle est présente seulement au sein de bactéries à Gram négatif et plus particulièrement exprimé chez *P. aeruginosa*⁶⁶. Contrairement à la plupart des aminopeptidases (méthionine aminopeptidase (MAP), leucine aminopeptidase (LAP)), dont le mécanisme d'action basé sur la présence d'un atome de zinc sur le site actif aide à la rupture de la liaison peptidique⁶⁷, le site actif de la β -alanine aminopeptidase n'est pas connu. A ce jour, très peu de substrats fluorogéniques existent pour l'identifier, le plus connue et le plus largement utilisé est un dérivé de la 7-AMC formellement amidifié par la β -alanine (ou acide 3-aminopropanoïque)^{34b}. Il y a donc un fort intérêt à développer de nouvelles sondes fluorogéniques spécifiques de cette enzyme, permettant une détection plus rapide et plus efficace.

⁶⁶ H. Komeda, Y. Asano, *FEBS J.*, **2005**, 272, 3075-3084.

⁶⁷ N. D. Rawlings, G. Salvesen, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3ème Ed., Academic Press, **2012**.

Ainsi un couplage peptidique entre **GD148** et le dérivé *N*-Boc de la β -alanine, en présence de HATU et de DIEA dans le DMF anhydre à 50 °C, a permis d'obtenir exclusivement le produit de mono-acylation. Il est important de préciser que cet intermédiaire est obtenu seulement en présence d'un large excès de dérivé *N*-Boc de la β -alanine, d'HATU et de DIEA, montrant ainsi la faible réactivité des groupements amino de **BMeS-*p*-A**. La déprotection du bras β -alanyle par traitement au TFA dans le CH₂Cl₂ permet l'obtention de la sonde **GD155**. Le faible rendement est dû aux différentes purifications par HPLC semi-préparative en phase inverse. En effet, **GD155** étant une molécule très polaire, il a tendance à co-éluer avec les sels de HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazole) et de DIEA présents dans le brut réactionnel (Schéma 3).

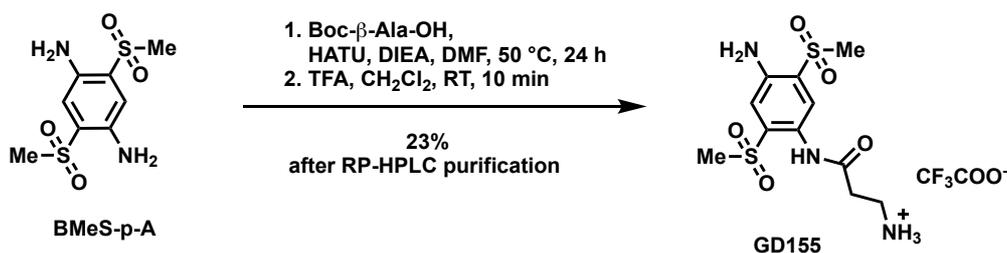


Schéma 3. Synthèse du substrat fluorogénique **GD155** sensible à la β -alanine aminopeptidase.

Il est important de préciser que le composé **GD155** est fluorescent en dépit de l'amidation de l'une de ces deux amines. Il sera donc possible d'envisager son utilisation uniquement en tant que sonde ratiométrique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à l'étude de ses propriétés spectrales et de celles du fluorophore de référence **BMeS-*p*-A**.

II.2. Étude spectrale du fluorophore **GD148** et du substrat fluorogénique **GD155**

La structure du fluorophore **GD148** a été confirmée par des analyses de masse (enregistré en mode ESI) et de RMN ¹H. Une analyse HPLC en phase inverse a confirmé sa pureté (98% à 260 nm). Le pourcentage de TFA résiduel après lyophilisation, déterminé par chromatographie ionique, est seulement de 1%. Les spectres d'absorbance et d'émission ont été enregistrés dans le PBS (pH 7,6) et des maxima sont observés à 376 nm et 517 nm (Figure 18). Le rendement quantique relatif de fluorescence a pu être déterminé ($\phi_F = 56\%$) en utilisant la sulfate de quinine comme standard ($\phi_F = 53\%$ dans une solution d'acide sulfurique 0,05 M).

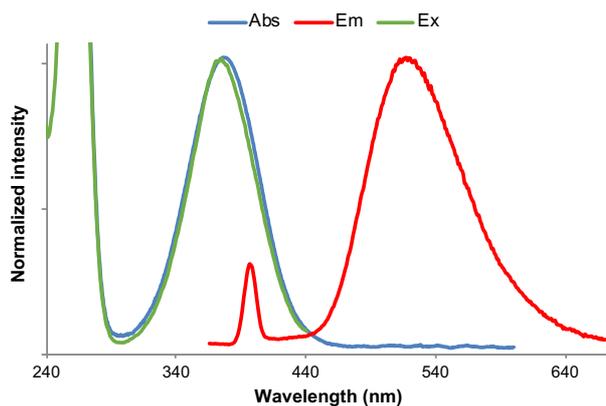


Figure 17 - Spectres d'absorbance, d'émission et d'excitation (Ex./Em. 350/520 nm, bande passante = 5 nm) de **GD148** dans le PBS (pH 7,6) à 25 °C. Le pic d'émission à 397 nm correspond à la diffusion de Raman dans l'eau.

La sonde **GD155** ayant été synthétisée peu de temps avant mon départ pour bioMérieux et en faible quantité, sa structure a été seulement confirmée par une analyse par spectrométrie de masse (enregistré en mode ESI). Sa pureté (98% à 260 nm) a été évaluée par analyse HPLC en phase inverse. L'allure des spectres d'absorption et d'émission est similaire à celles du fluorophore **GD148**. Un déplacement hypsochrome des maxima est observé avec un maximum d'absorption centré à 339 nm et un maximum d'émission à 457 nm (Figure 18). Le rendement quantique est de 59% en utilisant le même standard que précédemment.

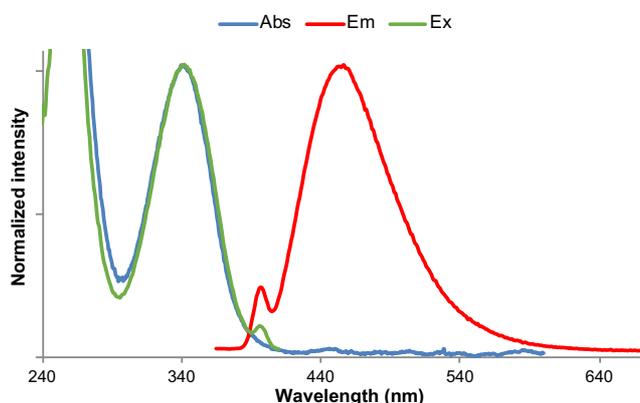


Figure 18 - Spectres d'absorbance, d'émission et d'excitation (Ex./Em. 350/460 nm, bande passante = 5 nm) de **GD155** dans le PBS (pH 7,6) à 25 °C. Le pic d'émission à 397 nm correspond à la diffusion de Raman dans l'eau.

La différence de coloration, de fluorescence et le large déplacement de Stokes entre les spectres d'absorption et d'émission des deux composés (Figure 19), nous confirme qu'une détection selon un mode ratiométrique est possible.

Ainsi, l'efficacité du substrat fluorogénique **GD155** a pu être évaluée sur des souches bactériennes par mes soins et sous l'encadrement du Dr. Valérie Chalansonnet, au sein du département R&D Microbiologie de bioMérieux.

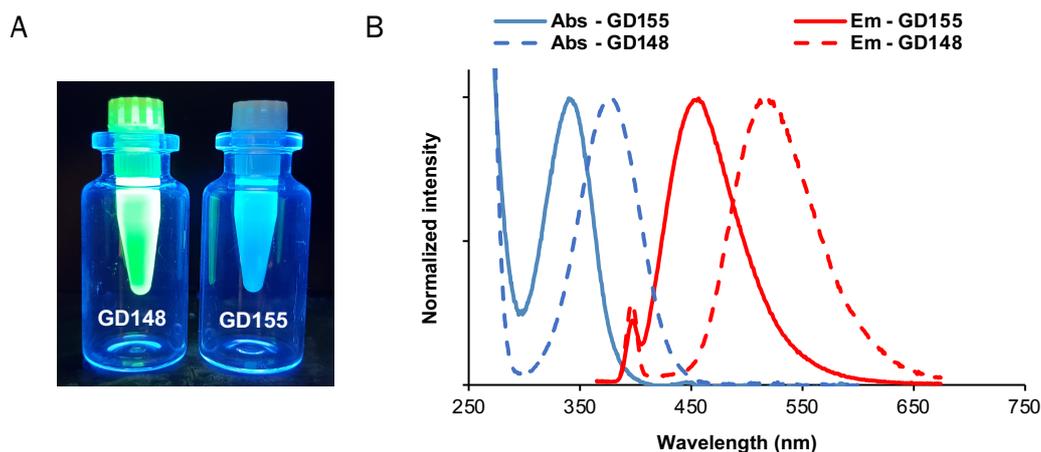


Figure 19. (A) Photo des solutions stock (1 mg/mL) des deux composés **GD148** et **GD155** sous rayonnement UV-A à 365 nm. (B) Superpositions des spectres d'absorption et d'émission de ces deux composés.

II.3. Évaluation *in vivo* de la sonde **GD155**

La BAP n'existe pas sous sa forme isolée/commerciale, il n'a donc pas été possible d'effectuer des tests de validation *in vitro* au sein de l'ICMUB. Durant l'été 2019, j'ai eu la chance de pouvoir passer deux mois à bioMérieux afin d'évaluer l'activation enzymatique du substrat fluorogénique **GD155** dans des souches bactériennes.

II.3.1. Évaluation de l'hydrolyse de la sonde **GD155** dans des souches bactériennes

Afin d'évaluer notre sonde (en théorie) sensible à la BAP, **GD155**, un panel de sept souches bactériennes à Gram négatif différentes a été sélectionné. Parmi elles, les deux souches d'*E. coli* constituent notre contrôle négatif ; en effet, ces bactéries n'expriment pas la BAP. Les souches de contrôle positif sont : deux souches *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), deux souches *P. aeruginosa* et une souche *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*)⁴⁶. L'hydrolyse de notre substrat fluorogénique sera comparée à celle du pro-fluorophore β -alanine 7-amido-4-méthylcoumarine (sous forme de sel de TFA), substrat fluorogénique de référence pour détecter cette activité dans les souches bactériennes.

Un essai consiste à suivre l'évolution de l'émission de fluorescence, suite à l'hydrolyse enzymatique des substrats, en fonction du temps. L'évaluation des sondes est faite en solution et à l'aide d'un lecteur de microplaques TECAN M1000. La cinétique est effectuée à 37 °C, des mesures de fluorescence sont réalisées toutes les 15 minutes pendant 20 h. Des mesures de densité optique (DO) à 660 nm sont également réalisées afin de suivre l'augmentation de turbidité de la solution due à la croissance bactérienne. Ainsi la toxicité du substrat sur la souche peut être évaluée (Figure 20).

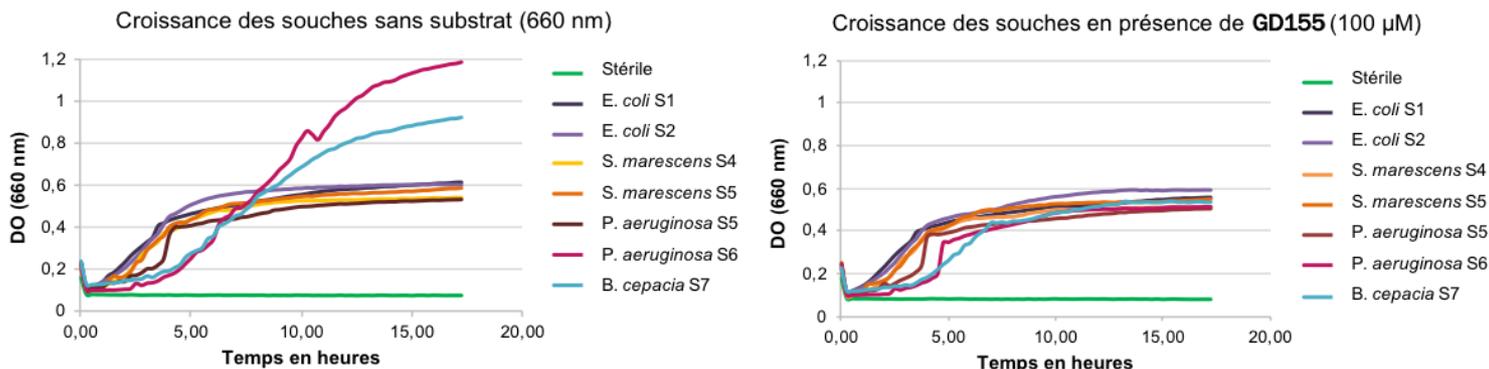


Figure 20. Évaluation de la toxicité de GD155 par mesure de la croissance bactérienne.

Par comparaison de la croissance des souches en présence du substrat GD155 à celle sans substrat, une différence significative de croissance pour les souches de *B. cepacia* et la deuxième souche de *P. aeruginosa* (S6) est observée. Toutefois, en l'absence de substrat, ces deux souches présentent également une croissance ralentie par rapport aux autres souches (visible par la pente de la courbe, Figure 20 à gauche). La sonde GD155 n'a donc pas d'effet toxique significatif sur la croissance des souches.

L'activation enzymatique est évaluée par mesure de la fluorescence à la longueur d'onde d'émission (515 nm) du produit après hydrolyse (*i.e.*, GD148). Les mesures effectuées ne montrent aucune augmentation de l'émission de fluorescence en corrélation avec la croissance bactérienne (Figure 21A). Cette absence de signal indique qu'aucune hydrolyse du substrat GD155 n'a eu lieu.

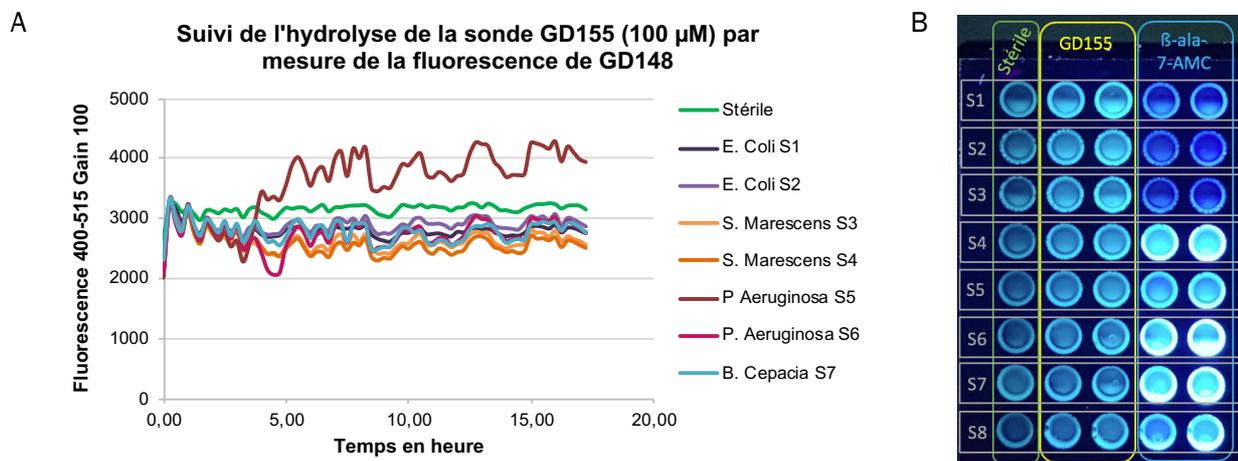


Figure 21. (A) Cinétique d'activation bactérienne de la sonde GD155 par mesure d'émission de fluorescence à 515 nm. (Ex. 400 nm). (B) Photographie de la microplaque sous illumination UV-A à 365 nm.

Une observation visuelle sous lampe UV-A à 365 nm confirme les résultats de ces mesures (Figure 21B). Il est important de noter que le milieu de culture TSB ("*Tryptic Soy Broth*", bouillon de soja tryptique) est légèrement fluorescent mais cela n'influence pas les mesures effectuées. Ainsi, on peut constater que la fluorescence dans les colonnes 2 et 3, correspondant au substrat GD155, est identique quelle que soit la souche bactérienne. *A contrario*, l'activité enzymatique est nettement visible dans les colonnes 4 et 5, correspondant au substrat de référence, où l'hydrolyse

du substrat β -Ala-7-AMC est effective via la visualisation d'une émission de fluorescence intense pour les souches attendues (S4 à S8).

L'absence d'hydrolyse de **GD155** peut être due à une absence de contact entre l'enzyme et le composé suite à une mauvaise pénétration cellulaire de ce dernier en dépit d'une charge globale positive (amine primaire du motif β -alanine protonée à pH physiologique). Afin de vérifier cette hypothèse, de nouveaux essais ont été effectués en mettant en œuvre une étape de lyse (*i.e.*, destruction de la paroi bactérienne). Ce procédé permet de libérer le contenu biologique de la bactérie et notamment l'enzyme BAP⁶⁸. Les lysats seront ensuite incubés en présence de la sonde **GD155**, ainsi si le substrat est reconnu par l'enzyme, une émission de fluorescence devrait être observée.

II.3.2. Évaluation de l'hydrolyse de la sonde **GD155** par des lysats bactériens

Différentes techniques existent pour effectuer une lyse : mécanique, chimique et thermique⁶⁹. Dans notre cas, la lyse mécanique est la plus adaptée. En effet, la lyse chimique (*i.e.*, utilisation d'enzymes ou de détergents) ne permet pas l'élimination de l'agent lysant qui pourrait interférer avec notre substrat ou lors des mesures de fluorescence effectuées. Quant à la lyse thermique, elle dénature les protéines (et donc les enzymes) en altérant leurs structures tertiaires actives.

Dans ce type d'essai, la plaque à micro-puits est inoculée avec le surnageant récupéré lors de la lyse mécanique. Afin de contrôler que la lyse a été efficace, un contrôle de la croissance bactérienne est effectué comme précédemment et en même temps que le relevé des mesures cinétiques de fluorescence. Lors du premier essai, une croissance bactérienne a été observée, signifiant que la procédure de lyse n'a pas été optimale. Les résultats obtenus ne sont donc pas exploitables. De ce fait, un second essai a été réalisé avec une lyse mécanique plus poussée, généralement requise pour l'extraction d'ADN.

D'après la mesure de la DO à 660 nm, la seconde lyse a été efficace puisqu'aucune augmentation n'est observée pour les différentes souches. Si aucun signal de fluorescence n'est observé pour **GD155**, une augmentation tardive de fluorescence est observée pour le substrat de référence β -Ala-AMC en présence de la souche de *P. aeruginosa* indiquant une hydrolyse tardive de la sonde. Ceci laisse supposer qu'une dénaturation partielle des enzymes peut avoir eu lieu ou bien que la concentration en BAP au sein des bactéries était faible. Cette petite quantité d'enzyme peut être due à l'atteinte, par les bactéries, de leurs phases stationnaires de croissance, n'ayant plus besoin de se développer, elles ne produisent plus les enzymes nécessaires à leur activité métabolique.

⁶⁸ S. Goldberg, Mechanical/Physical Methods of Cell Disruption and Tissue Homogenization. In *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*, A. Posch, Ed. Humana Press: Totowa, **2008**.

⁶⁹ S. T. L. Harrison, *Biotechnol. Adv.*, **1991**, 9, 217-240.

Afin de disposer d'une concentration en enzyme suffisante, un nouvel essai a été réalisé où les souches bactériennes ont été mise en pré-culture en milieu liquide pendant 5 h. Les lysats ont été obtenus à partir d'une suspension bactérienne plus concentrée à partir de ces pré-cultures.

Les mesures obtenues montrent que les lysats hydrolysent le substrat β -Ala-7-AMC tandis qu'aucune augmentation de l'émission de fluorescence, due à l'hydrolyse de **GD155**, n'est visible (Figure 22). Le niveau de fluorescence initial observé à 515 nm, est dû à la fluorescence intrinsèque de la souche *P. aeruginosa*. Le substrat fluorogénique **GD155** n'est donc pas reconnu et/ou hydrolysé par l'enzyme ciblée.

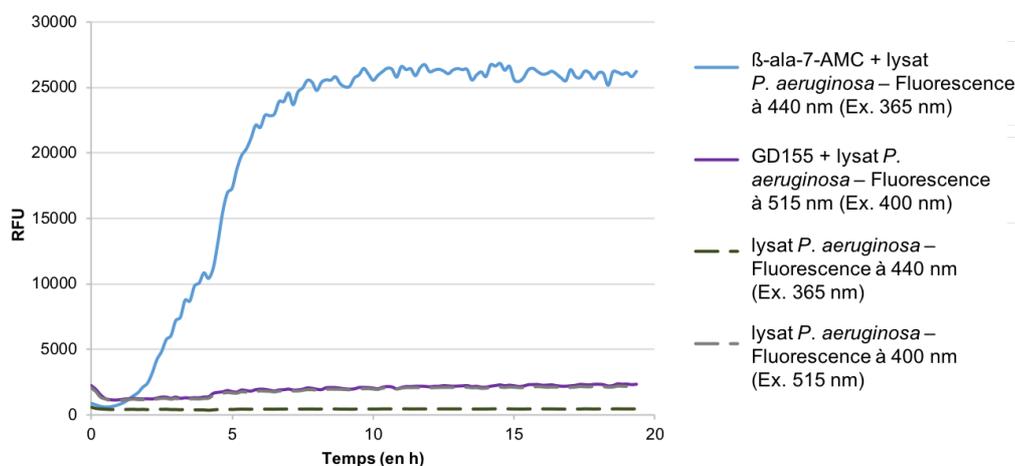


Figure 22 : Évolution de l'émission de fluorescence de **GD155** et du substrat de référence β -Ala-7-AMC. ^aLe couple Ex./Em. utilisé pour la détection n'est pas la même pour les deux composés. β -Ala-7-AMC : 365 nm/440 nm – **GD155** : 400 nm/515 nm.

III. Conclusions et perspectives

Dans ce dernier chapitre, la synthèse de nouveaux substrats fluorogéniques dérivés d'un nouveau fluorophore à motif aniline, la **BMeS-p-A**⁶³, a été développée et ce, afin de tester le caractère fluorogénique de ses deux groupements amino. La première sonde sensible à une activité NTR, inspirée par une publication récente permettant de détecter *in vivo* et *in vitro* un pathogène bactérien⁶⁰, n'a pas pu être obtenue. Suite aux informations expérimentales fournies par les auteurs, il serait intéressant d'explorer à nouveau sa préparation en travaillant sur une échelle de synthèse plus grande, et avec un chloroformiate de 4-nitrobenzyle fraîchement préparé. Une autre possibilité est de changer l'ordre des étapes de synthèse. L'idée serait de substituer les anilines avant l'étape d'oxydation des atomes de souffres, afin de limiter l'effet électro-attracteur de ces groupements sur la réactivité des -NH₂.

En outre, une sonde sensible à la BAP a été obtenue et des tests *in vivo* ont pu être réalisés au sein du département R&D Microbiologie de bioMérieux. Ceux-ci ont montré que le motif β -

alanyle ne semble pas être métabolisé par l'enzyme ciblée. Ce résultat négatif peut être dû à l'encombrement stérique autour du site de reconnaissance enzymatique.

Le dérivé bis-sulfonyl-*p*-phénylènediamine, **BMeS-*p*-A**, possède une structure compacte et des propriétés spectrales intéressantes en milieu physiologique. Il serait donc envisageable et pertinent de synthétiser une nouvelle sonde portant un bras espaceur auto-immolable (e.g., PHB) entre le fluorophore et le motif enzymatique afin d'éloigner ce dernier et de le rendre plus accessible pour le site actif de l'enzyme (Figure 23). Dans un premier temps, un motif phénylacétyle pourrait être introduit afin de réaliser des tests à l'aide de notre enzyme modèle, la PGA, à l'ICMUB. Si les résultats *in vitro* sont encourageants, il serait alors envisageable d'introduire le motif reconnu par la BAP pour effectuer de nouveaux tests *in vivo*.

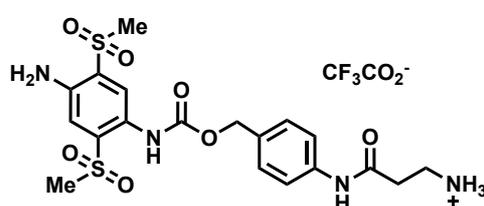


Figure 23. Structure alternative envisagée pour une sonde fluorogénique dérivée de **BMeS-*p*-A** et sensible à la BAP, portant un bras espaceur auto-immolable de type PHB afin de faciliter la reconnaissance et la métabolisation par l'enzyme.

Ces travaux seront prochainement réalisés par M. Emilien Sezeur (étudiant en licence professionnelle de chimie de l'Université du Mans) qui sera en stage au sein de notre groupe à compter du 31 août 2020.

Conclusions et perspectives

I. Conclusions

L'objectif initial de cette thèse était de développer de nouveaux substrats fluorogéniques d'enzymes microbiennes (principalement des peptidases et des réductases), destinés à être utilisés dans des applications en contrôle microbiologique industriel. Le développement de ces nouveaux substrats est basé sur un concept novateur, récemment apparu dans le domaine des sondes fluorescentes et connu sous l'anglicisme "*covalent assembly*". Le fondement de cette stratégie est la formation *in situ* d'un fluorophore organique déclenchée par l'activité enzymatique que l'on souhaite détecter. Ainsi, l'analyte catalyse la formation du système moléculaire photoactif à l'origine de sa détection.

Pour faire suite à la première preuve de concept réalisée par le Dr. S. Debieu lors de sa thèse au sein de notre équipe (2014-2017) qui a démontré qu'il était possible de détecter une activité enzymatique de type peptidase (PGA ou LAP) *via* la formation *in situ* d'une pyronine non-symétrique (**AR116**) émettant dans la gamme spectrale du jaune-orange, le premier objectif de ma thèse était d'étendre ce concept à des dérivés hétéro-xanthènes (SO₂- et Si-xanthènes). Ces colorants se caractérisent par la présence d'un hétéroatome intracyclique capable d'induire un fort déplacement bathochrome des propriétés de fluorescence (Figure 1).

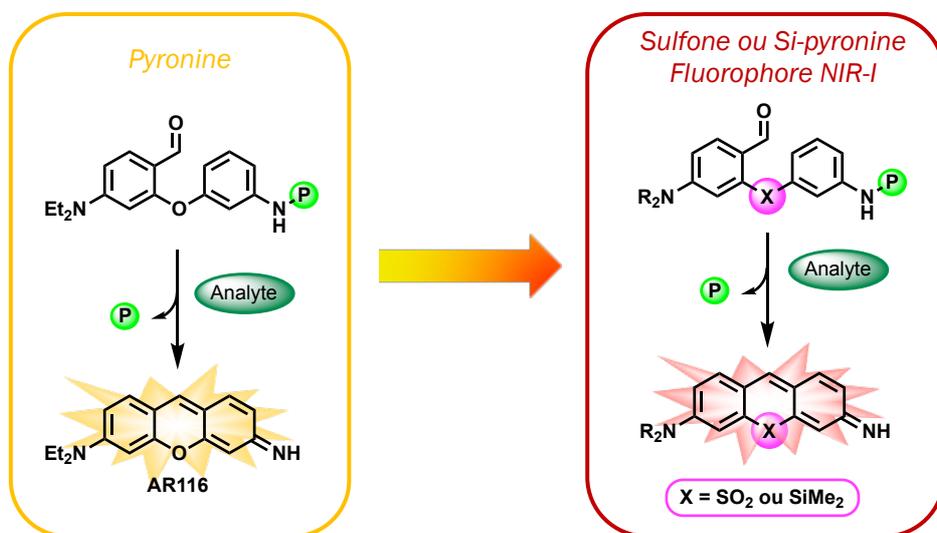


Figure 1. Rappel du premier objectif de ma thèse. Applications du principe des sondes fluorescentes de type "*covalent assembly*" à des fluorophores organiques à cœur hétéro-xanthène.

Ainsi, j'ai consacré la première année de ma thèse à la synthèse de fluorophores organiques à cœur hétéro-xanthène utilisés comme référence pour la validation des substrats fluorogéniques (Chapitre 1). Il était en effet nécessaire de s'assurer de la stabilité en milieu aqueux, de ces derniers avant d'envisager la préparation des sondes de type "*covalent assembly*" enzymo-activables correspondantes (*i.e.*, les précurseurs "cagés" dans notre jargon).

La substitution de l'atome d'oxygène intracyclique par le motif sulfone (SO₂), étant la modification chimique la plus efficace (rapportée à ce jour dans la littérature¹) pour induire un déplacement bathochrome significatif des maxima d'absorption et d'émission, je me suis attelé à la synthèse de la première sulfone-pyronine. Son obtention a permis de confirmer le déplacement vers le rouge des maxima d'absorption et d'émission (+ 100 nm par rapport aux λ_{max} de **AR116**), mais aussi de démontrer la sensibilité de la position *meso* du cœur hétéro-xanthène vis-à-vis des nucléophiles et notamment l'anion OH⁻ et la molécule d'eau. Nous avons ainsi tenté de stabiliser cette position en la substituant par un motif aryle de type *ortho*-méthylphényle, ce qui nous a permis d'obtenir la première sulfone-rosamine possédant deux anilines primaires. Toutefois, malgré la démonstration de son caractère fluorogénique *via* la synthèse d'une sonde conventionnelle activable par la protéase modèle la PGA, celle-ci n'est pas stable à pH physiologique, qui est une des conditions requises pour la détection d'espèces microbiennes. Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication (Article 1 : G. Dejoui, M. Laly, I. E. Valverde, A. Romieu, *Dyes Pigm.*, **2018**, *159*, 262-274).

Afin de diminuer le caractère électrophile de la position *meso* du cœur xanthène dû au fort caractère électro-attracteur du motif SO₂, nous l'avons substitué par le motif diméthylsilyle (SiMe₂). La synthèse conduisant à ces Si-xanthènes requiert la mise en œuvre de la réaction de Hitchcock qui est l'une des voies privilégiées pour la construction des hétérocycles silylés². Des efforts importants ont été déployés pour bien appréhender et parfaitement contrôler tous les paramètres qui régissent cette réaction dont la mise en œuvre pratique est peu triviale. Ainsi, il a été possible d'obtenir la première Si-pyronine symétrique et fluorogénique (*i.e.*, portant deux anilines primaires). Cette substitution de l'oxygène intracyclique permet un déplacement bathochrome satisfaisant (+50 nm par rapport aux λ_{max} de **AR116**) et améliore la stabilité de la position *meso*. Toutefois, même si la stabilité hydrolytique a été améliorée, l'hétéro-pyronine n'est pas stable à pH physiologique. La synthèse de cette première Si-pyronine symétrique a fait l'objet d'un second article où ses propriétés photophysiques et sa stabilité sont comparées à celle de son analogue oxygéné, la 3-imino-3*H*-xanthen-6-amine ou pyronine (Article 2 : A. Romieu, G. Dejoui, I. E. Valverde, A. Romieu, *Tetrahedron Lett.*, **2018**, *59*, 4574-4581).

Pour espérer obtenir un hétéro-xanthène stable à pH physiologique, la synthèse de Si-pyronines non symétriques a donc été entreprise. Deux nouveaux fluorophores ont ainsi été obtenus, une Si-pyronine non symétrique portant un motif *N*-méthylindoline et une seconde caractérisée par une aniline tertiaire de type julolidine. Cette désymétrisation du cœur hétéro-xanthène a permis d'améliorer de façon significative la stabilité hydrolytique de ces fluorophores organiques à pH physiologique. De plus, ces deux motifs, du fait de leur caractère électro-donneur marqué,

¹ J. Liu, Y.-Q. Sun, H. Zhang, H. Shi, Y. Shi, W. Guo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, *8*, 22953-22962.

² M. Durandetti, T. Boddaert, *Actual. Chim.*, **2018**, *434*, 11-17.

contribuent à un déplacement bathochrome des propriétés spectrales encore plus important si on le compare à celui obtenu avec la Si-pyronine symétrique (Figure 2) (Article 3 : G. Dejoux, K. Renault, I. E. Valverde, A. Romieu, *Dyes Pigm.*, 2020, Article 108496. Pour un preprint de cet article disponible en "OA", voir : <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12055893.v1>).

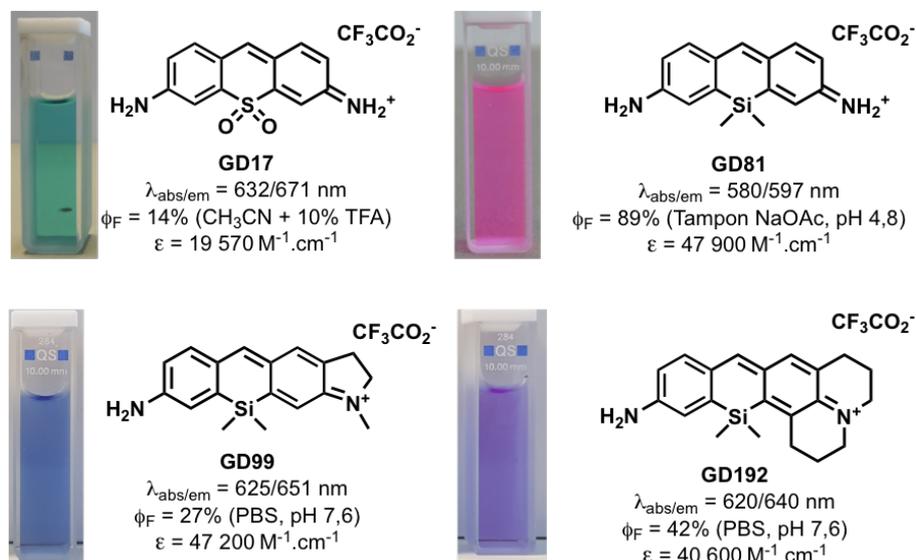


Figure 2. Structure et propriétés spectrales des quatre hétéro-pyrone synthétisées lors de ce travail de thèse.

L'obtention d'un Si-pyronine stable à pH physiologique ayant été réalisée, la synthèse des précurseurs "cagés" correspondants a alors pu être envisagée (Chapitre 2). Plusieurs stratégies de synthèse ont été explorées car la mise en œuvre de la réaction de Hitchcock, clé de voûte de notre stratégie pour l'introduction du motif SiMe_2 , requiert la protection des fonctions clés avec des groupements protecteurs adaptés. Cependant, aucune n'a abouti car de nombreux problèmes, parfois surprenants et inattendus, ont été rencontrés. De ce fait, nous n'avons pas pu accéder aux sondes fluorescentes de type "covalent assembly" souhaitées.

Il a alors été décidé d'appliquer le concept de synthèse *in situ* de fluorophores à une nouvelle famille d'hétérocycles azotés fluorescents, les quinoxalin-2(1H)-ones (Chapitre 3). En collaboration avec le Dr. K. Renault, huit sondes fluorogéniques sensibles à la PGA, une sonde fluorogénique sensible à la NTR et neuf fluorophores ont été synthétisés. Les essais de déclenchement *in vitro* ont démontré l'efficacité du concept de "covalent assembly" pour la détection de ces activités enzymatiques. (Article 4 : G. Dejoux, K. Renault, Q. Bonin, A. Chevalier, C. Michaudet, M. Picquet, I. E. Valverde, A. Romieu, *Org. Lett.*, 2020, 22, 6494-6499).

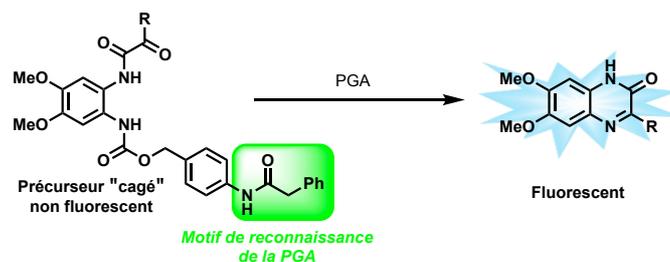


Figure 3. Principe des sondes fluorescentes de type "covalent assembly" appliqué à la famille des quinoxalin-2(1H)-ones.

Enfin, j'ai également travaillé au développement d'une sonde pro-fluorescente conventionnelle basée sur un nouveau motif fluorescent dérivé d'une *para*-phénylènediamine et récemment publiée dans la littérature³ (fluorophore **BMeS-p-A**). La synthèse d'une sonde sensible à la BAP m'a permis d'aller tester son activité *in vivo* au sein de l'entreprise parraine de ma thèse bioMérieux. Celle-ci s'est avérée ne pas être un bon substrat de l'enzyme ciblée, toutefois, des modifications sont possibles pour tenter d'améliorer la reconnaissance ainsi que la métabolisation par la BAP.

II. Perspectives

En ce qui concerne les fluorophores organiques à cœur hétéro-xanthène, une innovation possible concerne la sulfone-rosamine qui possède des propriétés spectrales intéressantes (λ_{abs} et λ_{ex} dans le NIR-I et déplacement de Stokes important).

En se basant sur le modèle des Si-rosamines fluorogéniques développées par le groupe de C. R. Bertozzi⁴, qui permettent la détection *in vivo* de peptidoglycanes bactériens et ce par la présence d'un azoture sur le phényle de l'hétéro-rosamine qui réagit avec un alcyne vrai porté par les peptidoglycanes préalablement fonctionnalisés. Nous pourrions envisager de développer une nouvelle famille de fluorophores organiques proche-IR pour faire du marquage de biomolécules (peptides, anticorps, ...) et ce afin de mettre en évidence certaines pathologies. Celle-ci serait basée sur une *N,N,N',N'*-tétraalkyl-sulfone-rosamine (l'alkylation des anilines diminuant le caractère électrophile de la position *meso*) dont le phényle serait fonctionnalisés par un motif bioconjugué (Figure 4).

³ T. Beppu, K. Tomiguchi, A. Masuhara, Y.-J. Pu, H. Katagiri, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 7332-7335.

⁴ P. Shieh, M. S. Siegrist, A. J. Cullen, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2014**, 111, 5456-5461.

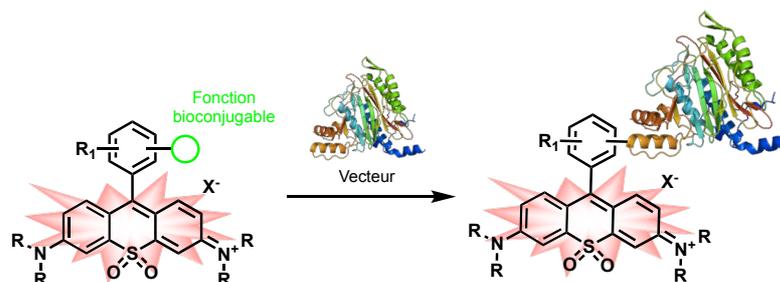


Figure 4. Représentation schématique d'un nouveau fluorophore NIR-I pour faire de l'imagerie de biomolécule basé sur une sulfone-rosamine N,N,N',N' -tétraalkylée portant une fonction bioconjuguable.

Parmi les différentes sondes de type "covalent assembly" conduisant à la formation *in situ* d'une quinoxalin-2(1H)-one, les caractéristiques spectrales des fluorophores obtenus sont toutes situées dans la gamme du bleu-cyan, ce qui limite les applications à des contextes *in vitro* pour lesquelles la matrice à analyser n'est pas ou peu source d'interférences. Dans le but d'obtenir un déplacement bathochrome vers le rouge et d'atteindre ainsi la gamme spectrale du vert-jaune (compatible par exemple avec l'imagerie des tissus peu profonds), il serait intéressant de synthétiser une nouvelle famille de quinoxalin-2(1H)-ones dont la structure serait fusionnée sur sa partie benzénique à un hétérocycle bis-azotés de type pipérazine N,N' -substituée. En effet, cette stratégie a déjà été mise en œuvre avec succès sur des fluorophores organiques de la famille des coumarines ou des xanthènes (rhodols), caractérisés par un système électronique étendu de type "push-pull"⁵. Nous pouvons alors imaginer que ce motif, appartenant à la classe des tétrahydroquinoxalines, ait le même effet sur les maxima d'absorption et d'émission des nouveaux dérivés quinoxalin-2(1H)-ones (Figure 5).

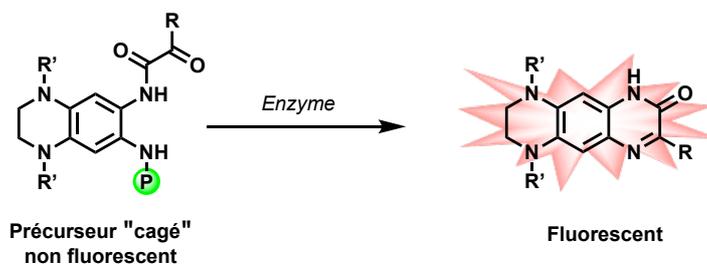


Figure 5. Exemple de quinoxalin-2(1H)-one fusionnée à un cycle pipérazine dans le but d'obtenir un déplacement bathochrome de ses maxima d'absorption et d'émission.

⁵ Pour des exemples de fluorophores présentant ce type de motif, voir : a) P. Hou, S. Chen, H. Wang, J. Wang, K. Voitchovsky, X. Song, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 320-322; b) X. Liu, F. Qi, Y. Su, W. Chen, L. Yang, X. Song, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, 4, 4320-4326; c) W. Chen, S. Xu, J. J. Day, D. Wang, M. Xian, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 16611-16615; d) X. Liu, L. He, L. Yang, Y. Geng, L. Yang, X. Song, *Sens. Actuators B-Chem.*, **2018**, 259, 803-808; e) T.-B. Ren, W. Xu, W. Zhang, X.-X. Zhang, Z.-Y. Wang, Z. Xiang, L. Yuan, X.-B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140, 7716-7722; f) X. Zhang, H. Liu, Y. Ma, W. Qu, H. He, X. Zhang, S. Wang, Q. Sun, F. Yu, *Dyes Pigm.*, **2019**, 171, 107722; g) Y. Gan, G. Yin, T. Yu, Y. Zhang, H. Li, P. Yin, *Talanta*, **2020**, 210, Article 120612.

Synthesis of novel organic-based fluorophores – Implementation to the design of fluorogenic enzyme substrates based on the principle of *in situ* synthesis

Keywords: enzymatic activation, fluorescence, fluorogenic probes, hetero-xanthene dyes, *in situ* synthesis, quinoxalinones.

Abstract: Detection and fluorescence imaging of biologic systems requires the implementation of efficient, robust and easy-to-use tools. Conventional fluorogenic probes currently used in microbiology lack efficiency since they are based on the single chemical modification of a fluorophore bearing an optically tunable reactive group, which often leads to incomplete fluorescence quenching. The main goal of my Ph.D thesis was to develop novel fluorogenic enzymatic substrates based on the "covalent assembly" principle. This approach also named "*in situ* synthesis" is based on the use of domino reactions to form a fluorescent moiety starting from a "caged" non-fluorescent molecule. In our case, the bioanalyte that triggers the reaction is present in bacteria, that we want to detect. This strategy provides many advantages (improved signal-to-noise ratio, easy exemplification to a wide range of analytes, ...).

In this context, the first goal of my thesis was to synthesize original fluorescent hetero-xanthene dyes to assess their stability under physiological conditions. Novel sulfone- and Si-pyronin derivatives were obtained. Synthesis of the corresponding "caged" precursors to the most stable compounds was then undertaken for their use as a peptidase-responsive probes. This work is described in the first and second chapter of this manuscript. Faced with difficulties to implement "covalent assembly" probe design principle to Si-pyronins, another class of fluorophores, namely quinoxalinone was explored. *In situ* formation of these fluorescent heterocycles triggered by an enzyme is presented in the third chapter. Finally, the last chapter was devoted to the synthesis of a conventional probe derived from a bis-sulfonyl-bis-aniline recently reported in the literature.

Synthèse de nouveaux fluorophores organiques – Application à la conception de substrats fluorogéniques d'enzymes fondés sur le principe de la synthèse *in situ*

Mots clés : activation enzymatique, fluorescence, hétéro-xanthènes, quinoxalinones, sondes fluorogéniques, synthèse *in-situ*.

Résumé : La détection et l'imagerie par fluorescence de systèmes biologiques nécessite la mise en place d'outils efficaces, robustes et simples d'utilisation. Les sondes fluorogéniques conventionnelles, actuellement utilisées en microbiologie manquent de précision puisqu'elles résultent de la simple modification chimique de la structure d'un fluorophore déjà formé, conduisant souvent à une extinction incomplète de sa fluorescence intrinsèque. Mes travaux de thèse ont pour but de développer de nouveaux substrats fluorogéniques d'enzymes basés sur le principe du "*covalent assembly*". Cette approche de synthèse chimique *in situ* d'un cœur fluorescent à partir d'un précurseur dit "cagé" non-fluorescent, met en jeu des réactions domino caractérisées par la formation et la rupture de liaisons covalentes, déclenchées par une réaction enzymatique déclenchée par les bactéries à identifier. Les avantages d'une telle approche sont nombreux (meilleur rapport signal sur bruit, exemplification aisée à un large éventail d'analytes, ...).

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été de synthétiser des fluorophores de type hétéro-xanthène originaux afin de valider leur stabilité dans des conditions physiologiques. De nouvelles sulfone- et Si-pyronines ont été obtenus. La synthèse des précurseurs "cagés" correspondant aux composés les plus stables en milieu aqueux, a été entreprise pour pouvoir les utiliser comme sondes à peptidases. L'ensemble de ces travaux sont décrits dans le chapitre I et II de ce manuscrit. Les difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre de l'approche "*covalent assembly*" avec ces hétéro-xanthènes, nous ont conduit à explorer une nouvelle famille de fluorophores, les quinoxalinones. La formation *in-situ* de ces hétérocycles fluorescents, faisant suite à un stimuli enzymatique d'un précurseur "cagé" est présenté dans le chapitre III. Enfin le dernier chapitre traite de la synthèse d'une sonde conventionnelle dérivée d'une bis-sulfonyl-bis-aniline récemment publiée dans la littérature.